

**Strukturelle Charakterisierung, Modifikation und  
eisrekristallisationsinhibierende Wirkung  
verschiedener Carrageene**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

**M. Sc. Julia Anna Hale**

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referent: Prof. Dr. Daniel Wefers

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2023



„NIEMAND WEIß, WAS ER KANN, WENN ER ES NICHT VERSUCHT.“

- Publilius Syrus



# 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 23.07.2024

---

Julia Hale



# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Struktur und Klassifizierung von Carrageenen.....	2
1.2	Vorkommen und Gewinnung.....	6
1.3	Physikochemische Eigenschaften.....	8
1.3.1	Konformationsänderung.....	8
1.3.2	Aggregation und Gelbildung.....	12
1.3.3	Viskositätserhöhung und Stabilisierung.....	15
1.4	Hemmung der Eiskristallisation.....	16
1.4.1	Gefrierprozess.....	17
1.4.2	Einfluss von Hydrokolloiden auf die Eiskristallisation.....	20
1.4.3	Carrageene als eiskristallisationshemmende Hydrokolloide.....	22
2	Zielsetzung.....	27
3	Material und Methoden.....	29
3.1	Strukturcharakterisierung der Carrageene.....	29
3.1.1	Carrageentyp.....	29
3.1.2	Monosaccharidzusammensetzung.....	30
3.1.3	Molekulargewicht.....	32
3.1.4	Sulfatgehalt.....	33
3.1.5	Kationengehalt.....	34
3.2	Freisetzung und Charakterisierung von Carrageen-Oligosacchariden.....	35
3.2.1	Rekombinante Enzymgewinnung.....	36
3.2.2	Strukturaufklärung von Oligosacchariden.....	47
3.3	Modifizierung von Carrageenen.....	51
3.4	Analyse der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität.....	52
4	Ergebnisse und Diskussion.....	57
4.1	Strukturcharakterisierung der Ausgangsmaterialien.....	57
4.1.1	Bestimmung des Carrageentyps.....	57
4.1.2	Analyse der Monosaccharidzusammensetzung.....	59
4.1.3	Bestimmung des Molekulargewichts.....	62
4.1.4	Analyse des Sulfatgehalts.....	64
4.1.5	Analyse des Kationengehalts.....	66
4.2	Detaillierte Charakterisierung ausgewählter Carrageene.....	68

4.2.1	Methodenentwicklung .....	68
4.2.2	Anwendung der Methode auf ausgewählte Hybridcarrageene .....	76
4.3	Analyse von chemisch modifizierten Carrageenen .....	84
4.3.1	Bestimmung des Carrageentyps.....	85
4.3.2	Analyse der Monosaccharidzusammensetzung .....	86
4.3.3	Bestimmung des Molekulargewichts.....	88
4.3.4	Analyse des Sulfatgehaltes .....	91
4.3.5	Analyse des Kationengehalts .....	93
4.4	Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität.....	96
4.4.1	Einfluss der Kationenform .....	96
4.4.2	Einfluss des Carrageentyps .....	101
4.4.3	Einfluss von Vorläufercarrageenen .....	104
4.4.4	Einfluss der Sulfatgruppe an der G-Einheit .....	106
4.5	Zusammenfassende Diskussion .....	107
5	Zusammenfassung.....	114
6	Literaturverzeichnis.....	118
7	Chemikalien und Instrumente.....	127
7.1	Chemikalienliste.....	127
7.2	Puffer und Reagenzien.....	131
7.3	Verwendete Enzyme und Kits.....	133
7.4	Instrumente.....	134
7.4.1	Analysengeräte .....	134
7.4.2	Verwendete Säulen .....	136
8	Arbeitsvorschriften.....	137
8.1	Strukturcharakterisierung der Carrageene .....	137
8.1.1	Bestimmung des Carrageentyp.....	137
8.1.2	Analyse der Monosaccharidzusammensetzung .....	137
8.1.3	Bestimmung des Molekulargewichts.....	138
8.1.4	Sulfatgehalt.....	138
8.1.5	Gehalt an assoziierten Kationen.....	139
8.2	Gewinnung rekombinanter Enzyme .....	139
8.2.1	Amplifizierung der Gene .....	139
8.2.2	Überprüfung der Amplifizierung durch Elektrophorese .....	140
8.2.3	Aufreinigung der Gene .....	140
8.2.4	Klonierung des Gens in den Vektor.....	141



8.2.5	Transformation nach Klonierung .....	141
8.2.6	Kolonie-PCR.....	142
8.2.7	Aufreinigung der Plasmide .....	142
8.2.8	Transformation vor Genexpression.....	143
8.2.9	Induktion der Genexpression.....	143
8.2.10	Proteinisolation.....	144
8.3	Detaillierte Charakterisierung von Hybridcarrageenen.....	145
8.3.1	Enzymatische Hydrolyse.....	145
8.3.2	Analyse mittels HILIC-MS.....	145
8.3.3	Analyse mittels HPSEC-RI.....	146
8.4	Modifizierung von Carrageenen.....	146
8.4.1	Kationenaustausch.....	146
8.4.2	Alkalische Modifizierung.....	147
8.5	Analyse der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität von Carrageenen.....	147
9	Anhang .....	148
9.1	Abbildungen.....	148
9.2	Tabellen.....	160
10	Publikationsliste .....	164

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CD	Leitfähigkeitsdetektor, engl. <i>Conductivity Detector</i>
CID	Kollisions-induzierte Dissoziation, engl. <i>Collision-induced Dissociation</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
dCMP	Desoxycytidinmonophosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGMP	Desoxyguanosinmonophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Polymerisationsgrad, engl. <i>Degree of Polymerization</i>
ESI	Elektrosprayionisation
FBRM	<i>Focused Beam Reflectance Measurement</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier-Transform Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie, engl. <i>High Performance Anion Exchange Chromatography</i>
HPSEC	Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie, engl. <i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i>
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma, engl. <i>Inductively Coupled Plasma</i>
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
LALLS	Niedrigwinkellichtstredetektor, engl. <i>Low Angle Laser Light Scattering</i>
LC	Flüssigchromatographie, engl. <i>Liquid Chromatography</i>
LIC	<i>Ligation-independent Cloning</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MALLS	Mehrwinkellichtstredetektor, engl. <i>Multi Angle Laser Light Scattering</i>

MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MMB	Methylmorpholinboran
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie, engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OES	Optische Emissionsspektrometrie, engl. <i>Optical Emission Spectroscopy</i>
PAD	Gepulster amperometrischer Detektor, engl. <i>Pulsed Amperometric Detector</i>
PAHBAH	4-Hydroxybenzhydrazid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie, engl. <i>Size Exclusion Chromatography</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TSP	3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure



# 1 EINLEITUNG

Polysaccharide stellen einen wesentlichen Bestandteil der menschlichen Ernährung dar und werden häufig aus Pflanzen gewonnen. So tragen Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand maßgeblich zur Aufnahme von Ballaststoffen bei, während Speicherkohlenhydrate wie zum Beispiel Stärke als Energiequelle dienen. Zudem sind pflanzliche Polysaccharide aufgrund ihrer technofunktionellen Eigenschaften auch für die lebensmittelverarbeitende Industrie von großer Bedeutung. Neben Landpflanzen weisen auch marine Organismen wie Algen, Mikroalgen und Bakterien eine Reihe an Biopolymeren auf. Besonders Algen enthalten eine Vielzahl an strukturell einzigartigen Kohlenhydraten. Zu den bereits kommerziell genutzten Polysacchariden zählen Alginat aus Braunalgen sowie Agar und Carrageene aus Rotalgen. Bei Carrageenen sowie auch Agar und Alginaten handelt es sich um Bestandteile der Algenzellwand (de Ruiter und Rudolph, 1997). Diese besteht ähnlich wie bei Landpflanzen aus einer kristallinen Phase (Gerüst) und einer amorphen Phase (Matrix). Die kristalline Phase ist bei den meisten Meeresalgen aus neutralen und linearen Polysacchariden aufgebaut. Cellulose stellt dabei das am häufigsten vorkommende Polymer dar. In Abhängigkeit von der Spezies und dem Lebenszyklus können auch Xylane und Mannane in der kristallinen Phase der Algenzellwand vorliegen. Die amorphe Phase ist hingegen überwiegend aus polyanionischen Polysacchariden zusammengesetzt, welche sich abhängig von der Algenart unterscheiden. Bei Rotalgen der Abteilung Rhodophyta sind neben Carrageenen beispielsweise ebenfalls Agar und Porphyran in der Matrix enthalten (Kloareg und Quatrano, 1988). Aufgrund des polyanionischen Charakters weisen die Matrixpolysaccharide ein Wasserhaltevermögen sowie gelbildende und viskositätserhöhende Eigenschaften auf. Dadurch tragen sie maßgeblich dazu bei, die Flexibilität der Alge auch bei starken Meeresströmungen zu gewährleisten und diese vor der Austrocknung zu schützen (Chevenier *et al.*, 2023).

Neben dem natürlichen Vorkommen in der Algenzellwand sind Carrageene aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften auch in extrahierter Form als Gelbildner, Stabilisatoren und Verdickungsmittel von Bedeutung. Wichtige Einsatzgebiete sind Milchprodukte sowie Fleisch- und Fleischersatzprodukte (Bixler und Porse, 2010). Die Verwendung von Carrageenen als Lebensmittelzusatzstoff ist in der Lebensmittelzusatzstoffverordnung VO (EG) 1333/2008 und VO (EU) 231/2012 geregelt. Hier wird ebenfalls zwischen Carrageen (E407) und verarbeiteten *Euchema*-Algen (E407a) unterschieden. Neben der Anwendung in Lebensmitteln finden Carrageene ebenfalls Einsatz in kosmetischen Mitteln, in der Papier- und Textilindustrie sowie in

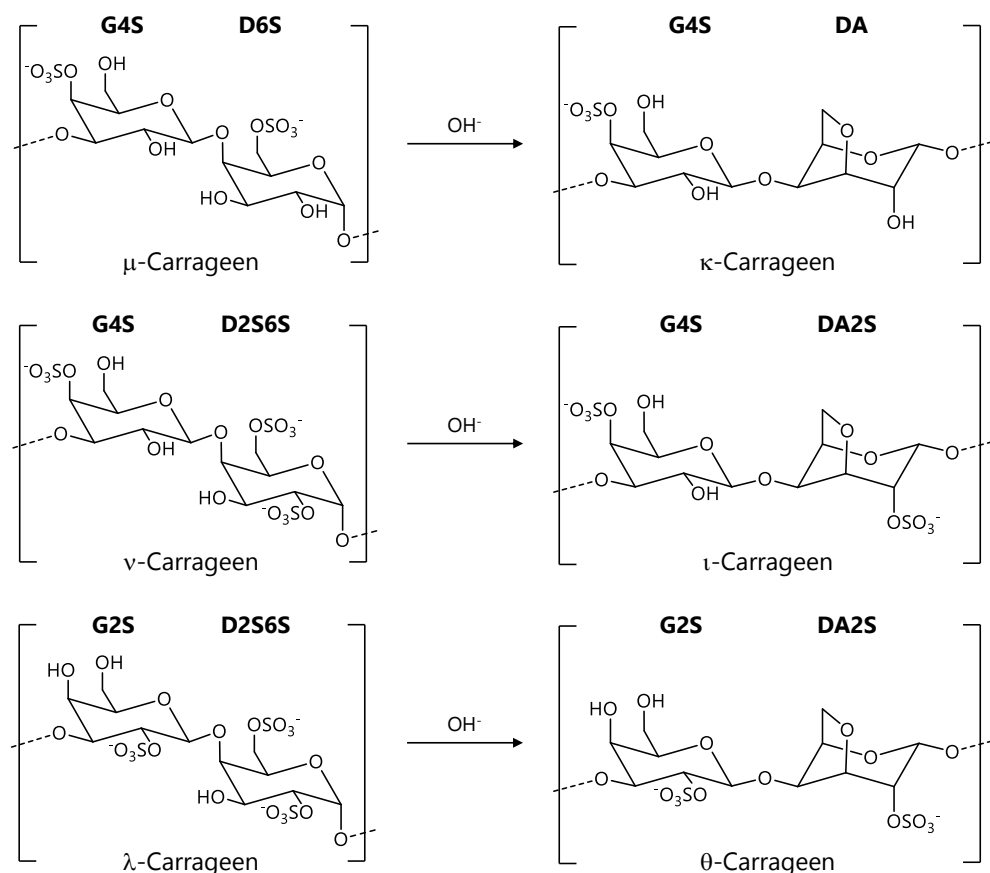
der Biotechnologie (Glicksman, 1987; de Ruiter und Rudolph, 1997). Weitere Anwendungen erstrecken sich auf den medizinischen Bereich. So können Carrageene beispielsweise in der Gewebezüchtung oder als Verkapselungsmaterial für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung eingesetzt werden (Zia *et al.*, 2017). Darüber hinaus weisen Carrageene ebenfalls eine eisrekristallisationsinhibierende Aktivität auf, daher bietet sich ein Einsatz in gefrorenen Lebensmitteln wie Eiscreme an. Da die Eisrekristallisation mit Veränderungen in der Größe, der Anzahl und der Form von Eiskristallen einhergeht, welche die Textur und die sensorischen Eigenschaften des Produktes negativ beeinflussen, ist die Hemmung der Eisrekristallisation wünschenswert (Gaukel *et al.*, 2014). Eine Hemmung der Eisrekristallisation konnte in Modellsystemen für verschiedene Carrageene bereits experimentell anhand einer Bestimmung des mittleren Eiskristalldurchmessers bestätigt werden (Gaukel *et al.*, 2014; Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2020; Kiran-Yildirim und Gaukel, 2020). Der genaue Mechanismus sowie die für die Hemmung der Eisrekristallisation erforderlichen Struktureigenschaften sind bisher allerdings noch nicht bekannt. Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Struktur und der eisrekristallisationsinhibierenden Wirkung könnten dazu beitragen, gezielt Carrageene mit den entsprechenden Strukturvoraussetzungen für den Einsatz in Lebensmitteln zu erzeugen.

## 1.1 Struktur und Klassifizierung von Carrageenen

Die Bezeichnung Carrageene umfasst eine Gruppe sulfatierter Polysaccharide, die sich hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung sowie in der Anzahl und Position der an die Monosaccharideinheiten gebundenen Sulfatgruppen unterscheiden. Im Allgemeinen handelt es sich bei Carrageenen um lineare und wasserlösliche Polymere, die sich üblicherweise durch ein hohes Molekulargewicht auszeichnen. Für Carrageene, die als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt werden, bewegt sich das gewichtsmittlere Molekulargewicht meist in einem Bereich von 400 - 600 kDa mit einem Minimum von 100 kDa (van de Velde und de Ruiter, 2002). Höhere Molekulargewichte bis zu 1000 kDa werden in der Literatur jedoch auch beschrieben (Campo *et al.*, 2009).

Das Polysaccharidrückgrat ist aus alternierenden Einheiten von  $\beta$ -1,3-verknüpfter D-Galactopyranose (G-Einheit) und  $\alpha$ -1,4-verknüpfter D-Galactopyranose (D-Einheit) aufgebaut. Die 1,4-verknüpfte Einheit kann in einigen Carrageenen ebenfalls in Form einer 3,6-Anhydrogalactose (DA-Einheit) vorliegen. Die G- und die D- bzw. DA-Einheit können jeweils mit Sulfatgruppen substituiert vorliegen, welche über eine Esterbindung an die Hydroxygruppen

gebunden sind (Usov, 1998; van de Velde und de Ruiter, 2002). Der Sulfatgehalt kommerziell erhältlicher Carrageene beträgt in der Regel zwischen 22 % und 38 % (w/w) (van de Velde und de Ruiter, 2002). Anhand des Sulfatierungsmusters und dem Auftreten einer Anhydrogruppe können die Carrageene in unterschiedliche Carrageentypen eingeteilt werden, die üblicherweise mit einem griechischen Buchstaben bezeichnet werden. Die Einteilung in verschiedene Carrageentypen basiert auf der Vorstellung, dass sich wiederholende Disaccharideinheiten aus einer G- und einer D- bzw. DA-Einheit vorliegen. Die kommerziell bedeutendsten Carrageentypen sind  $\kappa$ -,  $\iota$ - und  $\lambda$ -Carrageene (Usov, 1998; van de Velde und de Ruiter, 2002). Die Strukturen der charakteristischen Disaccharideinheiten der verschiedenen Carrageentypen sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Neben der Bezeichnung der Carrageene mithilfe von griechischen Buchstaben wird häufig eine buchstabenbasierte Nomenklatur zur Beschreibung der Carrageenstruktur verwendet, welche von Knutsen *et al.* (1994) entwickelt wurde. Diese Nomenklatur umfasst sowohl die Art des Monosaccharids als auch die Substitution dieses Monosaccharids mit Sulfatgruppen. Eine 1,3-verknüpfte Galactoseeinheit, welche an der Position O-4 mit einer Sulfatgruppe substituiert vorliegt, würde demnach mit G4S abgekürzt werden (Knutsen *et al.*, 1994).



**Abbildung 1.1:** Disaccharideinheiten der Carrageene des Typs  $\kappa$ ,  $\iota$  und  $\theta$ , sowie der Vorläuferstufen  $\mu$ ,  $\nu$  und  $\lambda$ . Die Kurzbezeichnung der einzelnen Monosaccharide richtet sich nach der von Knutsen *et al.* (1994) vorgestellten Nomenklatur.

Die Typen  $\mu$ -,  $\nu$ - und  $\lambda$ -Carrageen stellen natürliche Vorläuferstufen der Carrageene  $\kappa$ ,  $\iota$  und  $\theta$  dar und zeichnen sich durch das Vorliegen einer D-Einheit und damit durch das Fehlen einer Anhydrogruppe aus. Jedoch kann unter alkalischen Bedingungen eine Anhydrobrücke durch Elimination des Sulfatesters an Position C-6 gebildet werden (van de Velde und de Ruiter, 2002). Die Umwandlung der  $\alpha$ -D-Galactose in die entsprechende 3,6-Anhydrogalactose folgt einem mehrstufigen Reaktionsmechanismus. Bei der Reaktion von  $\nu$ - bzw.  $\lambda$ -Carrageenen kommt es durch den hohen pH-Wert zunächst zu einer Ionisierung der Hydroxygruppe an Position C-3 (Ciancia *et al.*, 1993b). Bei der Umwandlung von  $\mu$ -Carrageenen erfolgt neben der Ionisierung der Hydroxygruppe an Position C-3 ebenfalls eine Ionisierung an Position C-2 (Viana *et al.*, 2004). Da sich die negativ geladene äquatoriale Hydroxygruppe an Position C-3 benachbart zu einer negativ geladenen Sulfat- oder Hydroxygruppe (C-2) befindet, kommt es zu einer gegenseitigen Abstoßung, welche wiederum eine Destabilisierung der  ${}^4C_1$ -Konformation der Pyranose zur Folge hat. Aufgrund der Destabilisierung findet im nächsten Schritt eine Konformationsänderung von der  ${}^4C_1$ - in die  ${}^1C_4$ -Konformation statt, wodurch die Substituenten an Position C-2 und C-3 möglichst weit voneinander entfernt vorliegen. Die Konformationsänderung hat ebenfalls zur Folge, dass die negativ geladene Hydroxygruppe an Position C-3 sowie die Sulfatgruppe an Position C-6 parallel zueinander in axialer Position ausgerichtet sind. Dadurch kann im Zuge einer intramolekularen  $S_N2$ -Reaktion die Ausbildung der 3,6-Anhydrobrücke unter Abspaltung der Sulfatgruppe an Position C-6 erfolgen (Ciancia *et al.*, 1993b; Viana *et al.*, 2004).

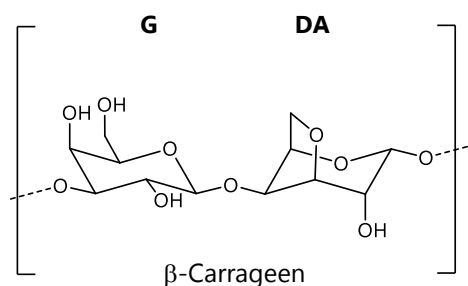
Das Vorliegen einer Anhydrogruppe bestimmt maßgeblich die funktionellen Eigenschaften des Carrageens, da sie die Voraussetzung für die Ausbildung eines Gels darstellt. Daher sind  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene in der Lage, Gele auszubilden, während  $\lambda$ -Carrageene lediglich viskositätserhöhende Eigenschaften aufweisen. Grund hierfür sind die Konformationen der  $\alpha$ -Galactose- bzw.  $\alpha$ -Anhydrogalactoseeinheit. So erlaubt die  ${}^1C_4$ -Konformation der Anhydrogalactoseeinheit in  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenen die Ausbildung einer Helixstruktur und damit auch die Ausbildung eines Gels. In  $\lambda$ -Carrageenen führt die  ${}^4C_1$ -Konformation der  $\alpha$ -Galactoseeinheit hingegen zu Knicken in der Polymerkette, weshalb eine regelmäßige Anordnung in Form einer Helix nicht möglich ist (van de Velde und de Ruiter, 2002; Campo *et al.*, 2009).

Die Einteilung von Carrageenen in verschiedene Typen, die mittels griechischen Buchstaben voneinander abgegrenzt werden, setzt voraus, dass sich ausschließlich das für diesen Carrageentyp charakteristische Disaccharid innerhalb des Polymers wiederholt. Diese ideale



Struktur ist jedoch nicht immer gegeben. Bei einigen Carrageenen können die Disaccharideinheiten verschiedener Typen gemeinsam vorliegen. Dabei können einerseits Mischungen verschiedener Carrageene auftreten, welche nicht kovalent verknüpft vorliegen. Andererseits können auch innerhalb einer Polymerkette verschiedene Bausteine auftreten. Die verschiedenen Disaccharideinheiten können dabei alternierend, zufällig verteilt oder blockweise innerhalb des Polymers vorkommen (Guibet *et al.*, 2008). Carrageene, die verschiedene Carrageentypen innerhalb einer Polysaccharidkette aufweisen, werden auch als Hybridcarrageene bezeichnet (Piculell, 2006; van de Velde, 2008). In der Literatur wurden bereits verschiedene Hybridcarrageene beschrieben und strukturell charakterisiert. Zu diesen zählen zum einen Carrageene, die sich aus Einheiten einer Hauptstufe sowie der jeweiligen Vorstufe zusammensetzen, wie beispielsweise  $\nu$ -/ $\iota$ - (Jouanneau *et al.*, 2010a) oder  $\mu$ -/ $\kappa$ -Hybridcarrageene (Jouanneau *et al.*, 2010b). Darüber hinaus wurden Vertreter beschrieben, die Disaccharideinheiten zweier Hauptstufen aufweisen, wie zum Beispiel  $\kappa$ -/ $\iota$ -Hybridcarrageene (van de Velde *et al.*, 2001; Guibet *et al.*, 2008).

Ein in der Literatur bereits ausführlich charakterisiertes Hybridcarrageen stellt das Furcellaran dar. Dieses Hybridcarrageen weist innerhalb einer Polymerkette sowohl Wiederholeinheiten des  $\kappa$ -Typs als auch des  $\beta$ -Typs auf, wobei die  $\kappa$ -Strukturelemente in höheren Anteilen vorliegen (Tuvikene *et al.*, 2010). Die Struktur der charakteristischen Disaccharideinheit des  $\beta$ -Carrageens ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abbildung 1.2:** Disaccharideinheit des  $\beta$ -Carrageens. Die Kurzbezeichnung der einzelnen Monosaccharide richtet sich nach der von Knutsen *et al.* (1994) vorgestellten Nomenklatur.

Das  $\beta$ -Carrageen ist aus alternierenden Einheiten von  $\beta$ -1,3-verknüpfter D-Galactopyranose (G-Einheit) und  $\alpha$ -1,4-verknüpfter 3,6-Anhydro-D-galactopyranose (DA-Einheit) aufgebaut und unterscheidet sich von  $\kappa$ -Carrageen durch das Fehlen einer Sulfatgruppe an Position *O*-4 der G-Einheit (Laos und Ring, 2005; Tuvikene *et al.*, 2010). Dementsprechend weist das Furcellaran mit 16 - 18 % (w/w) auch einen niedrigeren Sulfatgehalt auf (Laos und Ring, 2005). Das Molekulargewicht beträgt im Durchschnitt etwa 500 kDa, für einzelne Proben konnten auch

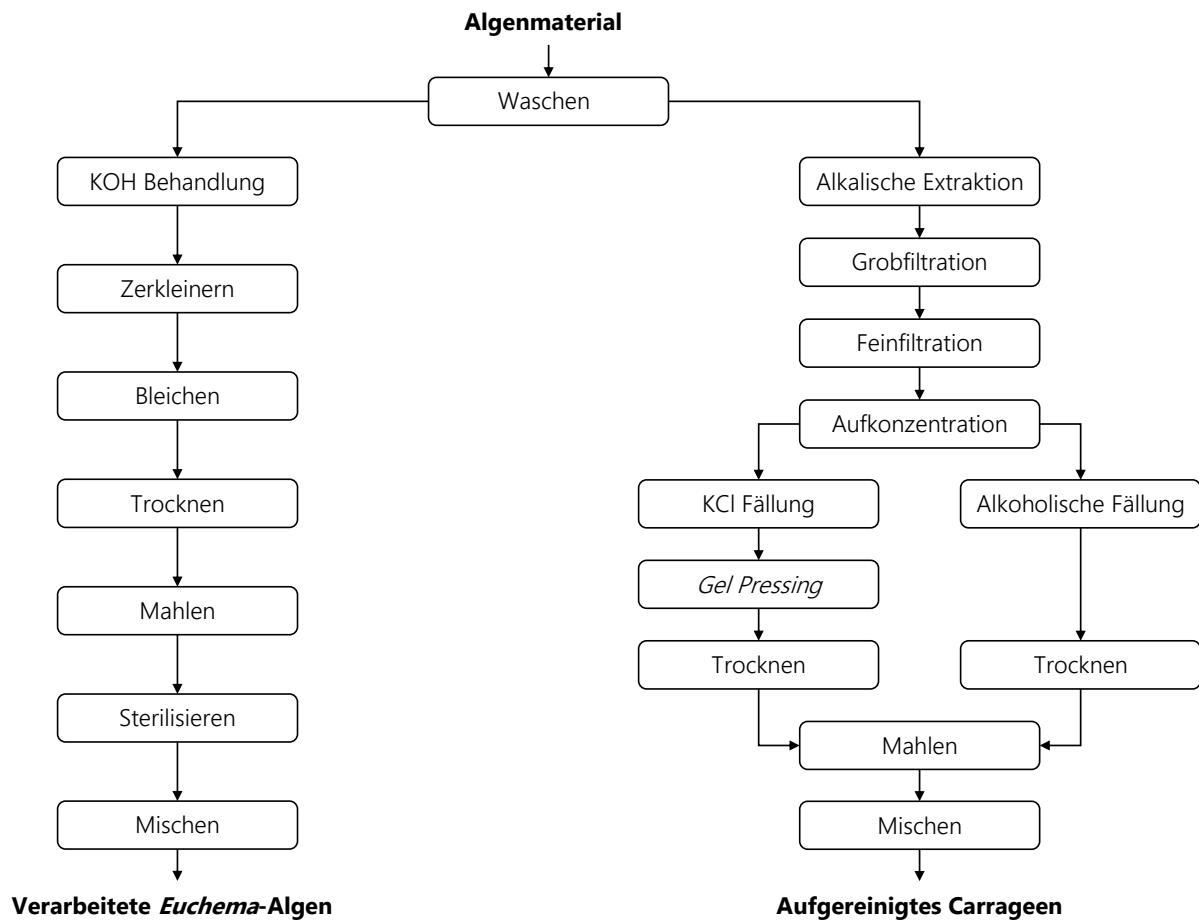
niedrigere Werte in einem Bereich von 180 - 290 kDa ermittelt werden. Aufgrund des höheren Anteils an  $\kappa$ -Struktureinheiten wird das Furcellaran im Allgemeinen der Familie der  $\kappa$ -Carrageene zugeordnet (Tuvikene *et al.*, 2010).

## 1.2 Vorkommen und Gewinnung

Das Vorkommen der verschiedenen Carrageentypen in Rotalgen ist sowohl von der Algenart als auch vom Lebenszyklus der jeweiligen Algen abhängig. Aus Algen der Art *Kappaphycus alvarezii* kann nach alkalischer Extraktion ein vergleichsweise homogenes  $\kappa$ -Carrageen gewonnen werden, während aus Algen der Art *Eucheuma denticulatum* überwiegend  $\iota$ -Carrageen extrahiert werden kann. Andere Carrageentypen werden üblicherweise aus Algen der Gattung *Gigartina* und *Chondrus* gewonnen. Bei diesen Arten werden in Abhängigkeit vom Lebenszyklus unterschiedliche Carrageentypen gebildet. In der sporophytischen (diploiden) Phase liegen überwiegend  $\lambda$ -Carrageene in den Algen vor, während in der gametophytischen (haploiden) Phase Hybriden aus  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenen gebildet werden. Für die kommerzielle Gewinnung von  $\lambda$ -Carrageenen werden beispielsweise die Arten *Gigartina pistillata* und *Chondrus crispus* verwendet (de Ruiter und Rudolph, 1997; Campo *et al.*, 2009).  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageene können neben *Gigartina* und *Chondrus* ebenfalls aus Algen der Gattung *Gymnogongrus*, *Ahnfeltia*, *Stenogramme* oder *Hypnea* gewonnen werden (van de Velde *et al.*, 2001), während das Furcellaran aus Algen der Art *Furcellaria lumbricalis* extrahiert wird (Laos und Ring, 2005; Tuvikene *et al.*, 2010).

Die industrielle Verarbeitung der Algen unterscheidet sich abhängig davon, ob vollständig aufgereinigte Carrageene gewonnen oder ob die Algen direkt im Lebensmittel als verarbeitete *Eucheuma*-Algen eingesetzt werden sollen. Die entsprechenden Verarbeitungsschritte sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Um verarbeitete *Eucheuma*-Algen zu erhalten, wird das Algenmaterial zunächst mit Kaliumhydroxidlösung auf 70-80 °C erhitzt. Bei diesen Bedingungen erfolgt eine Umwandlung der Vorläuferstufen in die jeweiligen Hauptstufen der Carrageene. Zwar ist die Temperatur nicht ausreichend, um eine Extraktion der Polymere aus den Algen zu erreichen, durch die thermische Behandlung kann jedoch ein Großteil des niedermolekularen Materials entfernt werden. Im Anschluss werden die Algen in kleinere Stücke geschnitten und bei Bedarf gebleicht, um eine hellere Farbe des Endproduktes zu erhalten. Danach wird das Algenmaterial gewaschen, getrocknet und gemahlen. Für bestimmte Anwendungen kann zusätzlich ein

Sterilisationsschritt durchgeführt werden, um die mikrobielle Qualität des Produktes zu verbessern (van de Velde und de Ruiter, 2002).



**Abbildung 1.3:** Herstellungsprozess von aufgereinigtem Carrageen sowie von verarbeiteten *Eucheima*-Algen (van de Velde und de Ruiter, 2002). KOH: Kaliumhydroxid, KCl: Kaliumchlorid.

Eine Extraktion von aufgereinigtem Carrageen aus Algen erfolgt klassischerweise mittels alkalischer Extraktion. Hierfür wird das Algenmaterial in alkalischer Lösung für mehrere Stunden auf Temperaturen von  $\geq 110$  °C erhitzt. Bei diesen Bedingungen erfolgt einerseits ein Herauslösen der Carrageene aus der Zellwand, andererseits werden durch die basischen Bedingungen die Vorläuferstufen der Carrageene in die Hauptstufen umgewandelt. Dies führt zu einer verbesserten Gelbildung der extrahierten Carrageene und damit auch zu verbesserten funktionellen Eigenschaften im Endprodukt. In diesem Prozessschritt können verschiedene alkalische Lösungen eingesetzt werden, abhängig davon, welche Kationenform das polyanionische Carrageen aufweisen soll. Im Anschluss an die alkalische Extraktion wird der Rückstand über eine mehrstufige Filtration abgetrennt. Bevor die aufgereinigten Carrageene aus dem Überstand gewonnen werden können, wird dieser zunächst mittels Evaporationsverfahren aufkonzentriert, um eine Carrageenkonzentration von circa 3 % zu erhalten. Die Gewinnung der Carrageene aus dem

Überstand erfolgt anschließend durch alkoholische Fällung mit Isopropanol. Speziell für  $\kappa$ -Carrageene kann neben der alkoholischen Fällung ebenfalls eine Präzipitation durch Kaliumchlorid erfolgen, was auch als *Gel Pressing*-Methode bezeichnet wird. Das präzipitierte Carrageen wird anschließend gepresst und durch mehrere Gefrier- und Auftauschritte von überschüssigem Wasser befreit. In beiden Fällen wird das polymere Material anschließend getrocknet und gemahlen (van de Velde und de Ruiter, 2002).

Neben einer alkalischen Extraktion kann auch eine mikrowellengestützte Extraktion zur Gewinnung von Carrageenen angewendet werden (Vázquez-Delfín *et al.*, 2013; Álvarez-Viñas *et al.*, 2023). Diese bietet im Vergleich zur konventionellen Extraktion den Vorteil, dass eine gleichmäßigere Erhitzung der Lösung und des Algenmaterials möglich ist. Aufgrund der hohen Viskosität der Lösung kann es bei der klassischen Methode zu Temperaturgradienten innerhalb der Reaktionsmischung kommen, was bei der Extraktion zu Verlusten führen kann. Durch den Einsatz der mikrowellenunterstützten Extraktion kann hingegen eine schnellere Erhitzung im Inneren der Algen erfolgen, was das Aufbrechen der Zellen und die Freisetzung der Carrageene in die Lösung begünstigt. Dies führt zu verkürzten Extraktionszeiten, was wiederum mit einer Energieeinsparung verbunden ist (Vázquez-Delfín *et al.*, 2013).

## 1.3 Physikochemische Eigenschaften

Carrageene werden aufgrund ihrer technofunktionellen Eigenschaften als Zusatzstoff in Lebensmitteln eingesetzt. Hierbei werden vor allem die viskositätserhöhenden, stabilisierenden und gelbildenden Eigenschaften genutzt, welche von der chemischen Struktur des Polysaccharids abhängig sind und in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

### 1.3.1 Konformationsänderung

Für Carrageene wird die Ausbildung eines Gels, welche mit einer Konformationsänderung in Lösung einhergeht, üblicherweise anhand des *Domain Model* nach Morris *et al.* (1980b) beschrieben. Hierbei findet ein Übergang von einer ungeordneten schlaufenförmigen Struktur (*Random Coil*) in eine geordnete Helixstruktur statt (Morris *et al.*, 1980b). Erste Hinweise auf das Auftreten einer Konformationsänderung wurden von Rees *et al.* (1969) sowie McKinnon *et al.* (1969) ermittelt. In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei  $\kappa$ - (Rees *et al.*, 1969) als auch bei  $\iota$ -Carrageenlösungen (McKinnon *et al.*, 1969) beim Abkühlen zu Änderungen in der optischen Aktivität des Polymers kommt. In einer späteren Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die optische Aktivität der beiden Konformationen den berechneten Werten für eine *Random*

*Coil-* und eine Doppelhelix-Konformation entspricht (Rees *et al.*, 1970). Die Ausbildung einer Doppelhelix konnte für Carrageene in festem Zustand bereits mittels Röntgenbeugung festgestellt werden. Hierfür wurden die Beugungsmuster semikristalliner Fasern von  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenen in verschiedenen Salzformen untersucht, wobei Hinweise auf eine helikale Anordnung der Carrageene erhalten wurden. Sowohl für  $\kappa$ - als auch  $\iota$ -Carrageene postulierten die Autoren die Ausbildung einer Doppelhelix, welche drei Disaccharideinheiten pro Helixwindung aufweist. Beide Polymerstränge sind in diesem Modell über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden, während die Sulfatgruppen des Carrageens an der Außenseite der Doppelhelix lokalisiert sind (Anderson *et al.*, 1969).

Die Konformationsänderung von Carrageenen in Lösung konnte ebenfalls durch die Anwendung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernspinresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) bestätigt werden. Anhand von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen von  $\kappa$ -Carrageen bei verschiedenen Temperaturen konnte gezeigt werden, dass die Signale des Polysaccharids, die bei einer Temperatur von 25 °C im Spektrum sichtbar sind, durch eine Verringerung der Temperatur auf 16 °C nicht länger detektiert werden können. Dies kann sowohl mit der Ausbildung einer helikalen Struktur als auch eines Gels begründet werden. In beiden Fällen ist die Mobilität der Monosaccharideinheiten stark eingeschränkt und durch das Auftreten von dipolaren Wechselwirkungen kommt es schließlich zu einer starken Verbreiterung sowie zum Verlust der Signale. Da bei einer Temperatur von 16 °C für das analysierte  $\kappa$ -Carrageen keine makroskopische Veränderung der Lösung bzw. Gelbildung festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der Verlust der Signale auf eine Konformationsänderung zurückzuführen ist (Rochas *et al.*, 1980). Ähnliche Ergebnisse konnten mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen für  $\iota$ -Carrageen erzielt werden. Auch für diesen Carrageentyp wurde eine Verringerung der Signalintensität mit sinkender Temperatur beobachtet, die auf die Ausbildung einer Helixstruktur zurückgeführt werden kann (Ablett *et al.*, 1982).

Ob es sich bei der helikalen Konformation in Lösung um eine Doppelhelix handelt, wie sie bereits für Carrageenfasern in festem Zustand beschrieben wurde (Anderson *et al.*, 1969), oder ob die Carrageene in Form einer Einfachhelix vorliegen, konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. In der Literatur finden sich sowohl Studien, die eine Doppelhelix für die wahrscheinlichere Form halten (Viebke *et al.*, 1995; Hjerde *et al.*, 1998; Hjerde *et al.*, 1999), als auch Studien, die das Modell einer Einfachhelix unterstützen (Grasdalen und Smidsrød, 1981b; Smidsrød und Grasdalen, 1982; Vanneste *et al.*, 1994). Grundlage für das Doppelhelix-Modell stellen häufig Ergebnisse von

Molekulargewichtsbestimmungen dar, welche mittels Gelpermeationschromatographie oder Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) in Kombination mit Niedrigwinkel- (*Low Angle Laser Light Scattering*, LALLS) oder Mehrwinkellichtstreuung (*Multi Angle Laser Light Scattering*, MALLS) ermittelt wurden. Im Zuge dieser Messungen konnte beim Konformationsübergang von der ungeordneten in die geordnete Struktur eine Verdoppelung des Molekulargewichts festgestellt werden, was die Ausbildung einer bimolekularen Struktur und damit einer Doppelhelix impliziert (Viebke *et al.*, 1995; Hjerde *et al.*, 1998; Hjerde *et al.*, 1999). Dies konnte sowohl für intakte (Viebke *et al.*, 1995; Hjerde *et al.*, 1999) als auch partiell säurehydrolysierte Polymere (Hjerde *et al.*, 1998) des Carrageentyps  $\kappa$  und  $\iota$  gezeigt werden. In einer Studie von Vanneste *et al.* (1994), im Zuge derer die Konformationsänderung eines  $\iota$ -Carrageens ebenfalls mittels lichtstreuungsbasierter Methoden analysiert wurde, konnte hingegen keine Verdoppelung des Molekulargewichts ermittelt werden, was das Modell der Einfachhelix stützt. Weiterhin konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Temperatur, bei der die Konformationsänderung stattfindet, nicht von der Konzentration des Carrageens abhängt, was für eine intermolekulare Assoziation jedoch zu erwarten wäre (Grasdalen und Smidsrød, 1981b; Smidsrød und Grasdalen, 1982). In den letzten Jahren wurden ebenfalls Methoden wie *Atomic Force Microscopy* oder *Molecular Dynamics Simulations* in Kombination mit Weitwinkelröntgenstreuung herangezogen, um die geordnete Konformation von Carrageenen in Lösung aufzuklären (Schefer *et al.*, 2014; Diener *et al.*, 2019; Westberry *et al.*, 2023). Jedoch konnte bisher auch mithilfe dieser Methoden keine endgültige Beschreibung der helikalen Struktur erfolgen.

Was in der Literatur jedoch eindeutig gezeigt werden konnte, ist der Einfluss der Ionenart und -konzentration auf die Stabilität der geordneten Konformation. Rochas und Rinaudo (1980) untersuchten den Einfluss der Salzkonzentration auf die Helixbildung eines  $\kappa$ -Carrageens und stellten fest, dass die Temperatur des Konformationsübergangs in direktem Zusammenhang mit der Salzkonzentration steht. Zudem untersuchten sie den Effekt verschiedener mono- und divalenter Kationen. Die höchste Temperatur für den Konformationsübergang und damit einhergehend die stärkste helixstabilisierende Wirkung konnte für  $\kappa$ -Carrageen in Anwesenheit von Rubidiumionen festgestellt werden, gefolgt von Cäsium-, Kalium- und Ammoniumionen. Beim Vorliegen anderer monovalenter Kationen wie Tetramethylammonium-, Natrium- und Lithiumionen wurden hingegen niedrigere Temperaturen für den Konformationsübergang ermittelt (Rochas und Rinaudo, 1980). Anhand des helixstabilisierenden Effekts lassen sich die

untersuchten Ionen in die Gruppe der spezifischen monovalenten ( $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) und unspezifischen monovalenten ( $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) Kationen einteilen (Piculell, 2006). Der für  $\kappa$ -Carrageen spezifische und deutlich ausgeprägte stabilisierende Effekt der Rubidium-, Cäsium- und Kaliumionen kann auf eine Bindung dieser Ionen an die Helixkonformation zurückgeführt werden, was anhand verschiedener NMR-Experimente gezeigt werden konnte (Grasdalen und Smidsrød, 1981a; Belton *et al.*, 1986). Anhand von FTIR-Analysen wurde zunächst vermutet, dass die Bindung der Kationen an die Sulfatgruppen des  $\kappa$ -Carrageens erfolgt, dies konnte allerdings nicht eindeutig experimentell bestätigt werden (Belton *et al.*, 1989). Da Sulfatgruppen im Allgemeinen keine geeigneten Liganden für Alkalimetallionen darstellen, könnte laut Nilsson und Piculell (1991) die Bindung der Kationen ebenso an den Ether- oder Hydroxygruppen des  $\kappa$ -Carrageens erfolgen, während das durch die Sulfatgruppen erzeugte negative Oberflächenpotential lediglich zu einer Erhöhung der Kationendichte führt.

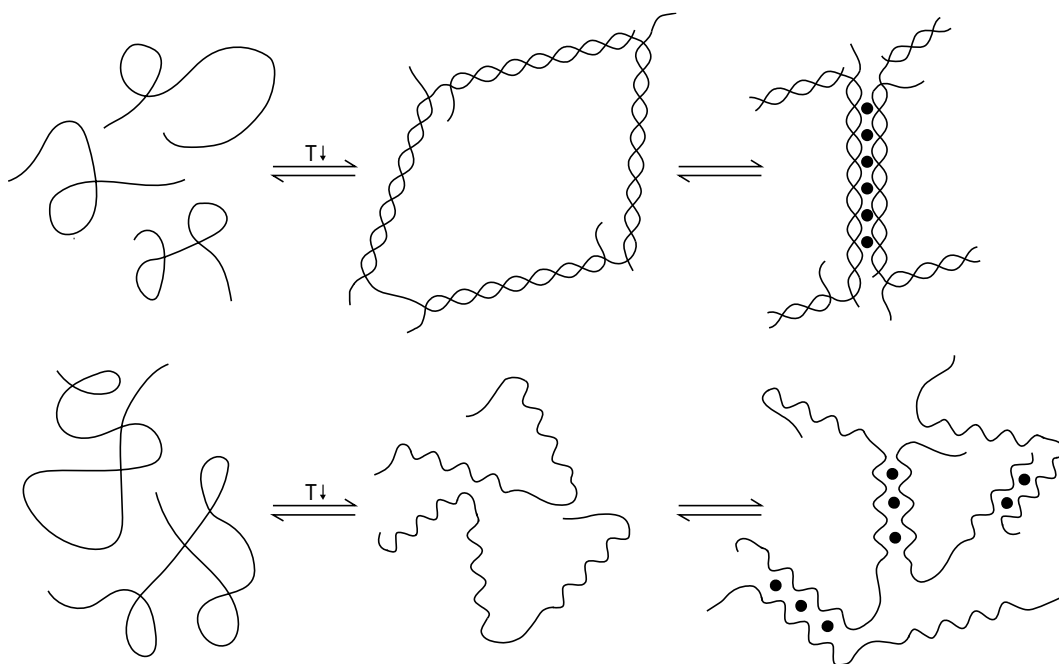
Eine Analyse der helixstabilisierenden Eigenschaften verschiedener divalenter Kationen zeigte, dass die Unterschiede innerhalb dieser Gruppe im Vergleich zu den monovalenten Kationen weniger stark ausgeprägt sind. Hier konnte die folgende Reihenfolge für die helixstabilisierenden Eigenschaften aufgestellt werden:  $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$  (Rochas und Rinaudo, 1980). Neben den Kationen beeinflussen auch die vorliegenden Anionen die Stabilität der geordneten Konformation. Bei konstanter Ionenkonzentration und gleichbleibender Kationenart folgt der helixstabilisierende Effekt der Reihenfolge  $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- \geq \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-}$  (Norton *et al.*, 1984). Auch für die Anionen wird von einer Anlagerung an die helikale Struktur ausgegangen, welche beispielsweise für Iodid bereits mittels NMR experimentell bestätigt wurde (Grasdalen und Smidsrød, 1981b).

Für  $\iota$ -Carrageen wurde ebenfalls eine Beeinflussung des Konformationsübergangs durch die vorliegenden Ionen beschrieben. Bei diesem Carrageentyp ist der helixstabilisierende Effekt vor allem bei divalenten Kationen wie Calciumionen besonders stark ausgeprägt (Rinaudo *et al.*, 1979; Nilsson *et al.*, 1989). Für monovalente Kationen konnte in Gegenwart von  $\iota$ -Carrageenen ein vergleichbarer Trend hinsichtlich der helixstabilisierenden Eigenschaften festgestellt werden wie für Carrageene des  $\kappa$ -Typs ( $\text{K}^+ > \text{Na}^+ \approx \text{Li}^+ > \text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ ). Die helixstabilisierende Wirkung der monovalenten Kationen gegenüber  $\iota$ -Carrageenen ist jedoch schwächer als gegenüber  $\kappa$ -Carrageenen (Morris *et al.*, 1980b). In einer Studie von Piculell *et al.* (1987) konnte für ein Carrageen des  $\iota$ -Typs hingegen keine kationenspezifische Stabilisierung der geordneten Konformation in Gegenwart von Tetramethylammonium- bzw. Kaliumionen ermittelt werden. Aus

diesem Grund vermuteten die Autoren, dass die in früheren Experimenten gezeigte Spezifität monovalenter Kationen auf das Vorliegen von  $\kappa$ -Strukturelementen in den  $\iota$ -Carrageenproben zurückzuführen ist (Piculell *et al.*, 1987).

### 1.3.2 Aggregation und Gelbildung

Wie in Kapitel 1.3.1 bereits erwähnt, stellt das in Abbildung 1.4 gezeigte *Domain Model* von Morris *et al.* (1980b) das am häufigsten beschriebene Modell für die Ausbildung eines Gelnetzwerks von Carrageenen dar. In diesem Modell tritt beim Abkühlen einer Carrageenlösung zunächst der Konformationsübergang von der *Random Coil*-Struktur in eine geordnete doppelhelikale Struktur auf. Bei der Ausbildung von Doppelhelices entstehen aufgrund von intermolekularen Assoziationen unabhängige Domänen, welche eine begrenzte Anzahl an Polymerketten aufweisen. In Anwesenheit von Kationen, die eine Gelbildung fördern, erfolgt eine Aggregation von Helices verschiedener Domänen. Dies führt zur Verknüpfung verschiedener Domänen über größere Distanzen und zur Ausbildung eines zusammenhängenden Netzwerks. Die Kationen liegen dabei zwischen den aggregierten Helices eingeschlossen vor (Morris *et al.*, 1980b). Ein ähnlicher Gelbildungsmechanismus wurde von Smidsrød und Grasdalen (1982) postuliert, welche die geordnete Konformation jedoch als Einfachhelix beschreiben. Das Prinzip dieses Mechanismus ist ebenfalls in Abbildung 1.4 dargestellt.



**Abbildung 1.4:** Prinzip der Gelbildung von Carrageenen. Das Modell nach Morris *et al.* (1980b) postuliert die geordnete Konformation als Doppelhelix (oben), während in dem Modell von Smidsrød und Grasdalen (1982) von einer Einfachhelix ausgegangen wird (unten). Die Ausbildung eines Gelnetzwerks erfolgt in beiden Fällen durch eine kationenvermittelte Aggregation. Assoziierte Kationen sind durch Punkte (●) gekennzeichnet (Morris *et al.*, 1980b; Smidsrød und Grasdalen, 1982).



Wie beim Modell von Morris *et al.* (1980b) kommt es zunächst zum Übergang von der ungeordneten in die geordnete Konformation. Die gebildeten Einfachhelices können in einem zweiten kationenvermittelten Schritt aggregieren und dadurch das Gelnetzwerk ausbilden (Smidsrød und Grasdalen, 1982). Eine Gemeinsamkeit beider Modelle ist die Notwendigkeit von Kationen für die Gelbildung, da diese eine Reduktion der effektiven Ladungsdichte der Helices bewirken und dadurch die Aggregation ermöglichen (Piculell, 2006). Dass es im Zuge der Gelbildung zu einer Aggregation der helikalen Strukturen kommt, kann experimentell durch das Auftreten einer thermalen Hysterese belegt werden. Anhand einer Analyse der optischen Aktivität während des Konformationsübergangs von  $\kappa$ -Carrageen konnte gezeigt werden, dass der Übergang von *Coil* zu Helix bei einer niedrigeren Temperatur stattfindet als der Übergang von der Helix- zur *Coil*-Struktur, was auf eine erhöhte Stabilität des geordneten Zustands aufgrund von Aggregation zurückgeführt werden kann. Die thermale Hysterese von  $\kappa$ -Carrageen wurde im Zuge dieser Studie allerdings lediglich in Anwesenheit von Kaliumionen untersucht (Morris *et al.*, 1980a). Weitere Hinweise auf eine Aggregation der Helices können mittels Lichtstreuung (Morris *et al.*, 1980a; Ueda *et al.*, 1998; Meunier *et al.*, 1999) oder *Atomic Force Microscopy* erhalten werden (Ikeda *et al.*, 2001; Funami *et al.*, 2007). Die Aggregation der geordneten Struktur des  $\kappa$ -Carrageens ist sowohl von der Konzentration als auch der Art der Ionen abhängig. Durch die Anwendung der *Atomic Force Microscopy* konnte gezeigt werden, dass  $\kappa$ -Carrageen in Gegenwart von 0,1 M Kaliumchlorid ein Gelnetzwerk über interhelikale Aggregation ausbildet. Rheologische Messungen zeigten für diese Kaliumkonzentration zudem eine thermale Hysterese beim Übergang von Lösung zu Gel bzw. Gel zu Lösung. Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration führte zu einer verringerten thermalen Hysterese. In Anwesenheit von Natriumchlorid oder Calciumchlorid konnte hingegen erst bei einer höheren Salzzugabe (0,5 M bzw. 0,05 M) eine thermale Hysterese und die Bildung eines Gels festgestellt werden (Funami *et al.*, 2007). Dass die Gelbildung in Gegenwart von Kaliumionen im Vergleich zu Natrium- und Calciumionen bereits bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt, deutet auf einen spezifischeren Wirkmechanismus hin, welcher ähnlich wie die helixfördernde Wirkung möglicherweise mit der Bindung der Kaliumionen an die helikale Struktur begründet werden kann.

Das Auftreten einer thermalen Hysterese konnte für  $\iota$ -Carrageen in Anwesenheit von Kaliumionen ebenfalls anhand einer Messung der optischen Aktivität während des Konformationsübergangs gezeigt werden (Norton *et al.*, 1983). Eine andere Studie kam hingegen zu dem Ergebnis, dass die thermale Hysterese lediglich auf Verunreinigungen des  $\iota$ -Carrageens mit  $\kappa$ -Carrageen

zurückzuführen ist, da für das untersuchte  $\iota$ -Carrageen in dieser Studie keine thermale Hysterese festgestellt werden konnte (Piculell *et al.*, 1987). Das Auftreten einer Aggregation bei der Gelbildung von  $\iota$ -Carrageenen wurde zudem mittels Lichtstreuung untersucht. Die Ergebnisse von Bongaerts *et al.* (2000) sowie Hjerde *et al.* (1999) verdeutlichen, dass auch der  $\iota$ -Typ eine ausgeprägte Tendenz zu intermolekularer Aggregation aufweist. Anhand einer Analyse mittels Kleinwinkelröntgenstreuung konnte allerdings gezeigt werden, dass die Gelbildung von  $\iota$ -Carrageen überwiegend durch den Konformationsübergang in eine Doppelhelix-Struktur induziert wird und die interhelikale Aggregation im Vergleich zu  $\kappa$ -Carrageen eine untergeordnete Rolle spielt (Yuguchi *et al.*, 2002).

Die rheologischen Eigenschaften von Carrageengelen sind von verschiedenen Faktoren abhängig, zu denen beispielsweise der Carrageentyp, das Molekulargewicht des Carrageens sowie die vorliegenden Ionen zählen. Rochas *et al.* (1989) untersuchten den Einfluss der molekularen Struktur auf die Gelbildung, indem sie die rheologischen Eigenschaften von reinem  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Carrageen mit Mischungen beider Carrageentypen verglichen. Das aus reinem  $\kappa$ -Carrageen gebildete Gel wurde als spröde beschrieben und wies einen hohen Wert für den Elastizitätsmodul (*Young's Modulus*) auf, was mit einer hohen Gelfestigkeit assoziiert werden kann. Bei einer Verringerung des Anteils an  $\kappa$ -Carrageen in den untersuchten Mischungen, sank auch der Wert für den Elastizitätsmodul. Für reines  $\iota$ -Carrageen konnte der niedrigste Wert ermittelt werden, was auf die Ausbildung eines schwächeren Gels hindeutet. Das Verhalten des Elastizitätsmoduls in Abhängigkeit von der Carrageenzusammensetzung deutet außerdem darauf hin, dass kein synergistischer Effekt bei einer Mischung verschiedener Carrageentypen zu erwarten ist. Gegenteilige Ergebnisse konnten jedoch anhand einer Messung der Fließspannung ermittelt werden. Hier zeigte sich ein starker synergistischer Effekt für eine 1:1-Mischung beider Carrageentypen, was auf eine erhöhte Anzahl oder verbesserte Qualität der Vernetzungen im Gel zurückgeführt werden könnte (Rochas *et al.*, 1989).

Des Weiteren wurde der Einfluss des Molekulargewichts eines  $\kappa$ -Carrageens auf Elastizitätsmodul und Fließspannung des gebildeten Gels untersucht. Beide Größen zeigten einen Anstieg mit steigendem Molekulargewicht des Carrageens. Im Falle des Elastizitätsmoduls konnte dieser Anstieg allerdings nur bis zu einem Molekulargewicht von 180 kDa festgestellt werden. Oberhalb dieses Werts konnte keine Änderung des Elastizitätsmoduls mit variierendem Molekulargewicht detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass es vermutlich eine minimal notwendige Länge des Polymers zum Aufbau des Gelnetzwerks gibt (Rochas *et al.*, 1990). Die Abhängigkeit der

rheologischen Eigenschaften der Gele von der Art der Kationen wurde beispielsweise anhand eines  $\kappa$ -Carrageens gezeigt, wobei sowohl einzelne Kationen als auch Mischungen verschiedener Kationen untersucht wurden. Für die Kaliumform des  $\kappa$ -Carrageens variierte die Stärke des ausgebildeten Gels in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration. Bei einer Konzentration an Kaliumchlorid von 100 mM kam es zur Aggregation und Ausbildung einer steifen Netzwerkstruktur, während eine Konzentration von 10 mM die Ausbildung eines gröberen Netzwerks und damit eines schwächeren Gels zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu konnte sowohl für die Natrium- als auch die Calciumform des  $\kappa$ -Carrageens keine Abhängigkeit der Geleigenschaften von der Konzentration der Ionen im untersuchten Bereich festgestellt werden. Zudem führten beide Kationen zur Ausbildung eines relativ schwachen Gels. Die Analyse von Mischungen verschiedener Kationentypen zeigte einen synergistischen Effekt von Kalium und Calcium, welcher verglichen mit den reinen Kationenformen in stärkeren Gelen resultierte. Bei Zugabe von Natriumionen zu der Kaliumform des  $\kappa$ -Carrageens konnte ebenfalls ein synergistischer Effekt festgestellt werden (Hermansson *et al.*, 1991).

### 1.3.3 Viskositätserhöhung und Stabilisierung

Für  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen gibt es im Lebensmittelbereich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten als Geliermittel. Zu den wichtigsten Produktgruppen zählen unter anderem Sorbets, kalorienreduzierte Marmeladen, Relishes und Saucen, Würstchen oder fettreduzierte Fleisch- und Wurstwaren. Darüber hinaus werden Carrageene auch in verschiedenen Arten von Tierfutter eingesetzt. Da  $\lambda$ -Carrageene nicht in der Lage sind, Gele auszubilden, wird dieser Carrageentyp überwiegend aufgrund seiner viskositätserhöhenden Wirkung beispielsweise in Salatdressings oder Saucen verwendet (Piculell, 2006). Dieser Unterschied in den funktionellen Eigenschaften ist auf die chemische Struktur der Polymere zurückzuführen. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, liegen die Galactoseeinheiten in  $\lambda$ -Carrageen ausschließlich in der  ${}^4C_1$ -Konformation vor, wodurch die Ausbildung einer geordneten Konformation in Lösung verhindert wird (van de Velde und de Ruiter, 2002; Campo *et al.*, 2009). Dies konnte beispielsweise von Schefer *et al.* (2014) mittels *Atomic Force Microscopy* experimentell bestätigt werden. Das untersuchte  $\lambda$ -Carrageen zeigte in dieser Studie auch bei hohen Salzkonzentrationen keine Änderung der Konformation, sondern verblieb in der ungeordneten *Coil*-Struktur (Schefer *et al.*, 2014). Ähnlich wie die Gelbildung wird jedoch auch die viskositätserhöhende Wirkung des  $\lambda$ -Carrageens von den vorliegenden Ionen beeinflusst. Zabik und Aldrich (1967) untersuchten die Viskosität von definierten Kationenformen eines Carrageens mit hohen Anteilen des  $\lambda$ -Typs nach Kationenaustausch. Darüber hinaus

ermittelten sie den Einfluss einer zusätzlichen Salzzugabe auf die Viskosität der jeweiligen Kationenformen. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Kationenformen von Aluminium, Zinn und Eisen generell niedrige Viskositäten aufwiesen. Der höchste Wert für die Viskosität konnte für die Natriumform des  $\lambda$ -Carrageens ermittelt werden. Eine zusätzliche Salzzugabe zu den Kationenformen führte in allen Fällen zu einer Verringerung der Viskosität im Vergleich zu einer Lösung dieser Kationenform in demineralisiertem Wasser. Das native Carrageen, welches überwiegend Kaliumionen enthielt, wies in demineralisiertem Wasser im Vergleich zu allen untersuchten Kationenformen die höchste Viskosität auf. Dies deutet darauf hin, dass in Anwesenheit von Kaliumionen die stärksten viskositätserhöhenden Eigenschaften erzielt werden können. Eine weitere Salzzugabe führte jedoch ebenfalls zu einer Verringerung der Viskosität (Zabik und Aldrich, 1967).

Neben der gelbildenden und viskositätserhöhenden Wirkung weisen Carrageene auch stabilisierende Eigenschaften in Milchprodukten auf, welche auf eine Interaktion der Carrageene mit den Caseinen in der Milch zurückgeführt werden können. Eiscremes, Puddings, Schokoladenmilch und Sahneprodukte stellen Beispiele für Lebensmittel dar, in denen Carrageene als Stabilisatoren eingesetzt werden können (Piculell, 2006). In einer Lösung von Milchproteinen und Stabilisatoren wie beispielsweise Xanthan, Johannisbrotkernmehl oder Guarkernmehl kommt es zu einer ausgeprägten Phasenseparation von Proteinen und Polysacchariden aufgrund der Inkompatibilität dieser Makromoleküle. Bei einem Zusatz von 0,025 % oder 0,05 %  $\kappa$ -Carrageen zu diesen Lösungen kann hingegen auf makroskopischer Ebene keine Phasentrennung festgestellt werden. Dieser Effekt kann möglicherweise auf eine Interaktion des  $\kappa$ -Carrageens mit der Oberfläche der Caseinmizellen zurückgeführt werden, wodurch die Koaleszenz und Sedimentation der Mizellen verhindert und eine Stabilisation der Phasen erreicht werden kann (Thaiudom und Goff, 2003). Eine stabilisierende Wirkung konnte sowohl für  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen als auch  $\lambda$ -Carrageen gezeigt werden. In den ersten beiden Fällen ist das Vorliegen einer geordneten helikalen Struktur eine Voraussetzung für die Interaktion mit Caseinen (Dalgleish und Morris, 1988).

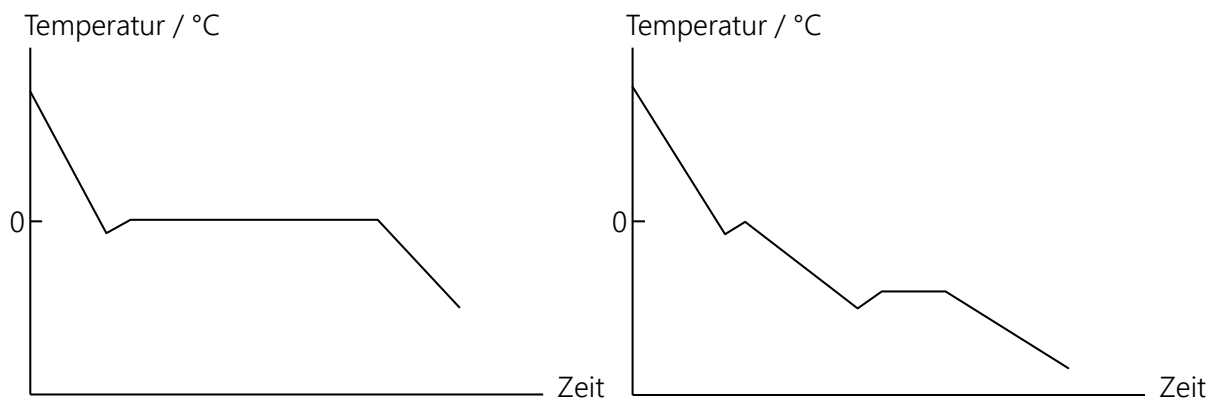
## 1.4 Hemmung der Eiskristallisation

Neben den bereits beschriebenen funktionellen Eigenschaften sind Carrageene ebenfalls in der Lage, die Eiskristallisation zu hemmen. Bei der Rekristallisation handelt es sich um einen in gefrorenen Lebensmitteln unerwünschten Prozess, da dieser mit einer Verschlechterung der

Textur und der sensorischen Eigenschaften einhergeht. Rekrystallisationsprozesse führen zu einer Vergrößerung des mittleren Eiskristalldurchmessers sowie zu einer Abnahme der Anzahl an Eiskristallen. Besonders in Eiscreme werden diese Texturveränderungen als negativ empfunden (Gaukel *et al.*, 2014). Eine Hemmung der Eisrekrystallisation durch den Einsatz von Hydrokolloiden wie beispielsweise Carrageenen kann hingegen zum Erhalt der gewünschten cremigen Textur von Eiscreme beitragen und stellt somit eine alternative Anwendungsmöglichkeit dieses Polysaccharids als Lebensmittelzusatzstoff dar. Die Grundlagen des Gefrierprozesses sowie die eisrekrystallisationsinhibierende Wirkung von Carrageenen werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

### 1.4.1 Gefrierprozess

Gefrieren ist definiert als physikalischer Prozess und beschreibt die Abtrennung von reinem Wasser aus einer Lösung durch die Bildung von Eiskristallen (Goff, 1992). Der Gefrierprozess lässt sich in verschiedene Teilschritte gliedern und ist in Abbildung 1.5 in Form eines Temperatur-Zeit-Diagramms für reines Wasser sowie für wässrige Lösungen dargestellt.



**Abbildung 1.5:** Gefrierkurven von reinem Wasser (links) und einer wässrigen Lösung (rechts), dargestellt als Temperatur-Zeit-Diagramm (Kumar *et al.*, 2020).

Im Zuge des Gefrierens erfolgt zunächst eine Unterkühlung auf Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts. Das Erreichen dieses metastabilen Zustands entspricht der Aktivierungsenergie, welche für die Bildung von Kristallkeimen benötigt wird. Wird eine kritische Masse an Keimen erreicht, kommt es zur Nukleation und zu einer Temperaturerhöhung, da latente Wärme schneller freigesetzt als aus dem System entfernt wird. Für reines Wasser kann ein deutlich höherer Grad an Unterkühlung erreicht werden, während die in wässrigen Lösungen gelösten Substanzen die Keimbildung begünstigen (Goff, 1992). Findet die Organisation der Moleküle in ein Kristallgitter ohne äußere Einflüsse statt, wie es bei reinem Wasser der Fall ist, wird dies als homogene Keimbildung bezeichnet. Eine heterogene Keimbildung findet in Anwesenheit von

Fremdschubstanzen statt (Hartel, 2013). Nachdem Kristallkeime gebildet wurden, kommt es zum Wachstum der Kristalle. Während dieses Prozesses kristallisiert der gefrierbare Anteil des Wassers vollständig aus und lagert sich an das wachsende Kristallgitter an (Goff, 1992). Der Phasenübergang findet in reinem Wasser bei nahezu konstanter Temperatur statt, da die thermische Energie, die dem System entzogen wird, in etwa der freigesetzten latenten Wärme entspricht. Nach einer vollständigen Kristallisation sinkt die Temperatur des Systems auf die des Kühlmediums ab (Kumar *et al.*, 2020). In wässrigen Lösungen führt die Kristallisation des Wassers zu einer Aufkonzentrierung der gelösten Substanzen in der verbleibenden Lösung, was mit einer Senkung der Gefriertemperatur einhergeht. Die Kristallisation wird zudem durch eine Erhöhung der Viskosität der flüssigen Phase erschwert, welche ebenfalls im Zuge der Aufkonzentrierung auftritt. Bei entsprechend niedrigen Temperaturen kann auch für eine gelöste Substanz ein ausreichendes Maß an Unterkühlung erreicht werden, sodass eine Keimbildung möglich ist. Das Kristallwachstum von Wasser und gegebenenfalls der gelösten Substanz schreitet so lange fort, bis das System bei sehr niedrigen Temperaturen vollständig auskristallisiert vorliegt (Goff, 1992). Sowohl die Keimbildung als auch das Kristallwachstum können durch die Gefriereschwindigkeit beeinflusst werden. Bei hohen Gefriereschwindigkeiten wird die bei der Nukleation freigesetzte latente Wärme sehr schnell abgeführt, wodurch es weiterhin zur Unterkühlung und damit auch zu einer erhöhten Häufigkeit der Keimbildung kommt. Dies resultiert in der Bildung einer hohen Anzahl an Kristallen mit einer kleinen Kristallgröße. Beim langsamen Gefrieren bilden sich hingegen wenige große Kristalle aus (George, 1993).

Rekristallisation stellt den letzten Schritt des Kristallisationsprozesses dar und umfasst Veränderungen in der Anzahl und Form der Eiskristalle, wobei das Gesamtvolumen an Eis unverändert bleibt. Dies kann sowohl während der Lagerung der gefrorenen Produkte als auch bereits während der Kristallisation auftreten (Cook und Hartel, 2010). Die Rekristallisation führt mit der Zeit zu einer Erhöhung der Kristallgröße sowie zu einer Abnahme der Anzahl an Eiskristallen (Hartel, 2013; Zhao und Takhar, 2017). Die Triebkraft dieses Phänomens ist das Bestreben des Systems, die freie Energie zu minimieren, was durch eine Vergrößerung des Krümmungsradius der Kristalle erreicht werden kann (Zhao und Takhar, 2017). Dabei stellen Ostwald-Reifung (*Migratory Recrystallization*), Koaleszenz (*Accretive Recrystallization*) und das Abrunden von Kristallen (*Isomass Recrystallization*) die drei Hauptmechanismen der Rekristallisation dar (Cook und Hartel, 2010).

Bei der *Migratory Recrystallization* oder Ostwald-Reifung führen Unterschiede in der Löslichkeit dazu, dass große Kristalle auf Kosten der kleineren wachsen (Hartel, 2013; Zhao und Takhar, 2017). Weist ein Kristall einen kleinen Krümmungsradius auf, besitzt er eine höhere Löslichkeit und dadurch einen niedrigeren Schmelzpunkt im Vergleich zu einem größeren Kristall (Hartel, 2013). Dieser Löslichkeitsunterschied resultiert in einem Massentransfer vom kleineren zum größeren Kristall durch Diffusion. In der Theorie würde dieser Reifungsprozess so lange fortschreiten, bis lediglich ein einzelner großer Kristall vorliegt und das System einen Gleichgewichtszustand erreicht hat (Voorhees, 1992).

Koaleszenz (*Accretive Recrystallization*) beschreibt die Bildung eines großen Kristalls durch das Zusammenwachsen zweier kleinerer Kristalle. Hierfür kommt es zunächst zu einer Verbindung der Oberflächen zweier nah beieinander liegender Kristalle. Da diese Verbindungsstelle eine negative Krümmung und damit eine niedrige Oberflächenenergie aufweist, kommt es zur Anlagerung von Wassermolekülen und schließlich zum Zusammenwachsen der Kristalle (Zhao und Takhar, 2017).

Neben der Ostwald-Reifung und der Koaleszenz kommt es während der Rekristallisation ebenfalls zu einer Abrundung der Kristalle (*Isomass Recrystallization*). Da eine glatte und kugelförmige Struktur bei gleicher Masse die kleinste Oberflächenenergie aufweist, werden unregelmäßig geformte Kristalle im Zuge der Rekristallisation schrittweise abgerundet und in eine kompaktere Kugelform überführt (Zhao und Takhar, 2017).

Die Rekristallisationsrate kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, zu denen die Lagertemperatur, das Auftreten von Temperaturschwankungen sowie das Volumen der Eisphase zählen. Sutton *et al.* (1996b) untersuchten beispielsweise den Einfluss der Lagertemperatur auf die Eiskristallisation von gefrorenen Fructoselösungen. Hierfür verglichen sie die Rekristallisationsraten von Lösungen mit einem konstanten Eisanteil bei verschiedenen Lagertemperaturen und konnten zeigen, dass eine Senkung der Lagertemperatur mit einer Verlangsamung der Rekristallisation einhergeht (Sutton *et al.*, 1996b). Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls am Beispiel von Vanilleeiscreme ermittelt werden (Donhowe und Hartel, 1996). Neben der Wahl der Lagertemperatur ist auch das Auftreten von Temperaturfluktuationen entscheidend für das Ausmaß der Rekristallisation. Höhere Temperaturen führen zum Schmelzen kleinerer Kristalle und damit zur Ausbildung von lokalen Konzentrationsgradienten in der Matrixphase des Produkts. Dies resultiert in einer Diffusion des flüssigen Wassers entlang dieses Gradienten, bis die Umgebungstemperatur sinkt und das Wasser erneut gefrieren kann. Da unter diesen Bedingungen keine Keimbildung auftritt, gefriert das Wasser an der Oberfläche

bestehender Kristalle und trägt dadurch zum Wachstum dieser Kristalle bei (*Melt-Refreeze-Rekristallisation*) (Sutton *et al.*, 1996b). Donhowe und Hartel (1996) ermittelten in einer Studie die Eiskristallgröße von Vanilleeisproben, welche einerseits bei konstanter Temperatur gelagert wurden und andererseits sinusförmigen Temperaturschwankungen von  $\pm 1$  °C ausgesetzt waren. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Schwankungen in der Lagertemperatur, verglichen mit einer Lagerung bei konstanter Temperatur, eine Erhöhung der Rekristallisationsrate zur Folge haben und das Auftreten des *Melt-Refreeze*-Mechanismus begünstigt wird (Donhowe und Hartel, 1996).

Das Volumen der Eisphase ist ebenfalls maßgeblich für die Eisrekristallisation. In einer Studie konnte anhand von Fructoselösungen mit unterschiedlichen Eisanteilen gezeigt werden, dass eine Senkung des Volumens der Eisphase eine Senkung der Rekristallisationsrate bewirkt. Dies kann auf einen verringerten Kontakt der Kristalle zurückgeführt werden, der vor allem zu Beginn der Rekristallisation entscheidend ist, da hier das Kristallwachstum überwiegend aufgrund von Koaleszenz auftritt (Sutton *et al.*, 1996b).

#### 1.4.2 Einfluss von Hydrokolloiden auf die Eisrekristallisation

In der Literatur konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass auch Stabilisatoren die Eisrekristallisation beeinflussen können. In einer Studie von Sutton *et al.* (1996a) wurde der Einfluss einer Zugabe von 0,3 % (w/w) Johannisbrotkernmehl auf die Eisrekristallisation einer Fructoselösung untersucht. Bei Zugabe des Stabilisators konnte eine Verringerung der Rekristallisationsrate um das Vierfache festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt eine Erhöhung der Viskosität der flüssigen Phase durch das Polysaccharid dar. Im Zuge der Studie konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Viskosität und der Rekristallisationsrate ermittelt werden (Sutton *et al.*, 1996a). In einem ähnlichen Ansatz wurde der Einfluss der Viskosität durch Zugabe von Carboxymethylcellulose, Guarkernmehl, Johannisbrotkernmehl, Alginat und Tragant zu Wasser bzw. einer wässrigen Saccharoselösung untersucht. Im Zuge dieser Studie führte der Zusatz von Hydrokolloiden ebenfalls zu einer Abnahme der Rekristallisationsrate, was auf eine Erhöhung der Viskosität zurückgeführt werden könnte. Es konnte für die verschiedenen Hydrokolloide jedoch auch gezeigt werden, dass die Rekristallisationsgeschwindigkeit bei gleicher Viskosität und Temperatur unterschiedlich stark beeinflusst wird. Dies verdeutlicht, dass eine reine Erhöhung der Viskosität nicht ausreichend ist, um die eisrekristallisationshemmende Wirkung von Hydrokolloiden zu erklären (Budiaman und Fennema, 1987). Weitere Analysen von Hagiwara und Hartel (1996) sowie Miller-Livney und Hartel (1997) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die



Verlangsamung der Rekristallisation durch den Zusatz von Stabilisatoren nicht mit Veränderungen in der Viskosität der flüssigen Phase begründet werden kann.

Die eisrekristallisationsinhibierende Wirkung von Hydrokolloiden wird in der Literatur zudem häufig mit der Fähigkeit zur Gelbildung in Verbindung gebracht. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Gelstruktur zu einer sterischen Hinderung führt und damit zu einer erschwerten Diffusion von Wasser an die Kristalloberfläche. Bei einem Vergleich des eisrekristallisationshemmenden Effekts eines Pektins, welches zum einen in Lösung und zum anderen nach Ausbildung eines Gels untersucht wurde, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Vorliegen eines Gelnetzwerks eine Senkung der Rekristallisationsgeschwindigkeit zur Folge hat (Blond, 1988). In einer Studie von Regand und Goff (2003) wurde die Wirkung von Carrageen, Alginat, Xanthan, Carboxymethylcellulose, Gelatine und Johannisbrotkernmehl auf die Eisrekristallisation in einer Saccharoselösung mit und ohne Zusatz von Milchproteinen untersucht. In Saccharoselösung konnte nur für Alginat und Xanthan eine Verringerung der Rekristallisation festgestellt werden. Bei Zugabe von Milchproteinen zeigten alle Stabilisatoren mit Ausnahme von Gelatine eine rekristallisationshemmende Wirkung. Da Gelatine, welche eine Gelstruktur in Anwesenheit von Milchproteinen zeigt, in dieser Studie keinen Effekt auf die Rekristallisation aufwies, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Gelbildung nicht alleine entscheidend für eine Verringerung der Rekristallisationsgeschwindigkeit ist (Regand und Goff, 2003).

Miller-Livney und Hartel (1997) stellten die Hypothese auf, dass der rekristallisationshemmende Effekt der Hydrokolloide möglicherweise nicht auf Veränderungen in der makroskopischen Viskosität zurückzuführen ist, sondern auf eine Erhöhung der Mikroviskosität, welche sich wiederum auf die Beweglichkeit der Moleküle und damit auch auf die Diffusion von Wasser auswirkt. Diese Vermutung wird ebenfalls von Regand und Goff (2003) als mögliche Erklärung für die eisrekristallisationshemmende Aktivität von nicht-gelbildenden Stabilisatoren diskutiert.

In der Studie von Sutton *et al.* (1996a), welche eine Verlangsamung der Eisrekristallisation einer Fructoselösung durch Zugabe von Johannisbrotkernmehl erzielen konnten, wurde zudem eine Abhängigkeit der Rekristallisationsgeschwindigkeit von der eingesetzten Konzentration des Stabilisators festgestellt. Dabei konnte eine maximale Konzentration ermittelt werden, oberhalb derer eine weitere Zugabe von Johannisbrotkernmehl keinen Effekt auf die Rekristallisation mehr hatte. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die rekristallisationshemmende Wirkung des Johannisbrotkernmehls auf einer Adsorption des Hydrokolloids an die Oberfläche der Eiskristalle

beruht und die Geschwindigkeit der Rekristallisation bei Erreichen der maximal möglichen Menge an adsorbiertem Polymer ebenfalls ein Plateau erreicht (Sutton *et al.*, 1996a).

### 1.4.3 Carrageene als eisrekristallisationshemmende Hydrokolloide

Carrageene weisen neben anderen funktionellen Eigenschaften ebenfalls eine eisrekristallisationsinhibierende Aktivität auf, welche in der Literatur bereits gezeigt werden konnte. In den Studien von Regand und Goff (2003) sowie Miller-Livney und Hartel (1997) wurde neben anderen Stabilisatoren ebenfalls der Einfluss von Carrageenen auf die Eisrekristallisation untersucht. Sowohl in den analysierten Eiscremeproben als auch in einer Lösung aus Saccharose und Milchproteinen führte der Zusatz von Carrageenen zu einer Verlangsamung der Rekristallisationsrate (Miller-Livney und Hartel, 1997; Regand und Goff, 2003). Eine strukturelle Charakterisierung des untersuchten Carrageens wie beispielsweise eine Bestimmung des Carrageentyps wurde in diesen Studien allerdings nicht durchgeführt.

Gaukel *et al.* (2014) analysierten die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität von  $\kappa$ -Carrageen in einer 49 % Saccharoselösung (w/w) und verglichen diese mit der Aktivität von Alginat sowie von Antifrierproteinen, welche in arktischen Fischen vorkommen und in der Lage sind, die Bildung von größeren Eiskristallen im Blut zu unterbinden. Während Alginat nur einen geringen Einfluss auf die Eisrekristallisation hatte, konnte für  $\kappa$ -Carrageen bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine deutlich stärkere inhibierende Wirkung festgestellt werden, welche durch eine Erhöhung der Carrageenkonzentration weiter anstieg. Eine Analyse der Viskosität zeigte keinen eindeutigen Zusammenhang mit der eisrekristallisationshemmenden Wirkung. Weiterhin führte die Zugabe von  $\kappa$ -Carrageen zur Bildung von länglichen und rechteckigen Eiskristallen verglichen mit einer reinen Saccharoselösung, welche Kristalle mit einer runden Form aufwies. Eine ähnliche Veränderung in der Kristallform konnte ebenfalls in Anwesenheit von Antifrierproteinen beobachtet werden, was vermuten lässt, dass beide Substanzklassen einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen (Gaukel *et al.*, 2014). Für Antifrierproteine konnte bereits gezeigt werden, dass diese an verschiedene Flächen des Eiskristalls adsorbieren und dadurch das Wachstum des Kristalls unterdrücken. Durch die Adsorption der Proteine kann eine Anlagerung von Wasser in das Kristallgitter nur noch in den Bereichen stattfinden, in denen die Oberfläche nicht bedeckt ist. In diesen Bereichen führt ein weiteres Wachstum zur Bildung einer Krümmung, was mit einer lokalen Senkung des Krümmungsradius sowie des Gefrierpunktes einhergeht und schließlich in einer Hemmung des Kristallwachstums resultiert (Knight *et al.*, 1991).

Andere Studien konnten ebenfalls experimentell bestätigen, dass der Einsatz von Carrageenen zu einer Verlangsamung der Eiskristallisation führt (Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2015; Leiter *et al.*, 2017a; Leiter *et al.*, 2017b; Leiter *et al.*, 2018; Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2020; Kiran-Yildirim und Gaukel, 2020; Kot *et al.*, 2022). Dabei wurden sowohl Unterschiede in der eiskristallisationshemmenden Aktivität verschiedener Carrageentypen als auch in Abhängigkeit vom Molekulargewicht und den vorliegenden Ionen ermittelt. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität eines  $\kappa$ -Carrageens und der Art der zur Lösung zugegebenen Ionen wurde von Leiter *et al.* (2017a) anhand einer 49 % Saccharoselösung (w/w) untersucht. Nach Zugabe von Kaliumionen konnte verglichen mit der reinen Saccharoselösung keine Reduktion des mittleren Eiskristalldurchmessers festgestellt werden, während die Zugabe von Natriumionen eine leichte Verringerung des mittleren Durchmessers zur Folge hatte. Die Autoren vermuteten, dass diese Unterschiede in der Aktivität auf Unterschiede in der Stärke des ausgebildeten Gels zurückzuführen sind. Da  $\kappa$ -Carrageen in Anwesenheit von Kaliumionen stärkere Gele bildet, könnte dies die Mobilität der Polymere einschränken und dadurch eine Adsorption der Carrageene an die Eiskristalloberfläche verhindern (Leiter *et al.*, 2017a).

Inwieweit die Ausbildung eines Gelnetzwerks die Rekristallisation beeinflusst, wurde in einer nachfolgenden Studie von Leiter *et al.* (2018) durch Zugabe von Salzen mit unterschiedlichen gelfördernden Eigenschaften ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$ , KCl und NaCl eine Erhöhung des Eiskristalldurchmessers im Vergleich zur Carrageenlösung ohne Salzzugabe erfolgte. Lediglich für Lithiumchlorid konnte eine signifikante Abnahme des mittleren Durchmessers und damit auch eine Erhöhung der eiskristallisationshemmenden Aktivität ermittelt werden. Die Analyse verschiedener Anionen zeigte für Natriumiodid eine erhöhte eiskristallisationsinhibierende Aktivität im Vergleich zur reinen Carrageenlösung. Anhand der rheologischen Eigenschaften konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Gelbildung und der eiskristallisationshemmenden Wirkung festgestellt werden, es konnte lediglich die Tendenz abgeleitet werden, dass eine gelähnliche Struktur mit einer Senkung der Aktivität einhergeht. Zwischen der Stärke der Aggregation, welche anhand einer Analyse der thermalen Hysterese beurteilt werden kann, und der eiskristallisationshemmenden Wirkung konnte hingegen ein negativer Zusammenhang festgestellt werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei einer verstärkten Aggregation mehr Polymerketten im Gelnetzwerk verknüpft vorliegen und dadurch die Anzahl an Molekülen, welche mit der Kristalloberfläche interagieren können, reduziert wird (Leiter *et al.*, 2018). Dabei wurde jedoch

nicht untersucht, inwieweit die am Polymer assoziierten Kationen unabhängig von den Ionen der umgebenden Lösung die eisrekristallisationshemmende Wirkung beeinflussen.

Kamińska-Dwórznička *et al.* (2015) untersuchten den Einfluss des Molekulargewichts von Carrageenen auf die Eisrekristallisation einer 30 % Saccharoselösung (w/w) bei einer Lagertemperatur von -8 °C. Dabei verglichen sie den Effekt eines  $\kappa$ -Carrageens vor und nach Säurehydrolyse. Sowohl für die hydrolysierten Proben als auch das native  $\kappa$ -Carrageen konnte eine Senkung des mittleren Eiskristalldurchmessers im Vergleich zur reinen Saccharoselösung festgestellt werden. Für das native  $\kappa$ -Carrageen war dieser Effekt nach einer Lagerung von 96 h jedoch weniger deutlich ausgeprägt als für die hydrolysierten Proben. Allerdings wiesen die in dieser Studie untersuchten Carrageene auch nach Säurehydrolyse noch Molekulargewichte von 2700 kDa bzw. 3200 kDa auf (Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2015).

In einer Studie von Leiter *et al.* (2017b) wurde ebenfalls der Einfluss einer sauren Hydrolyse auf die eisrekristallisationshemmende Aktivität von  $\kappa$ -Carrageen untersucht. Die Reduktion des Molekulargewichts erfolgte einerseits anhand einer sauren Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure oder Salzsäure und zum anderen anhand einer Dialyse gegen demineralisiertes Wasser, wodurch das Carrageen in die Säureform überführt und das Molekulargewicht durch Autohydrolyse verringert wurde. Für das native  $\kappa$ -Carrageen, welches ein Molekulargewicht von 1420 kDa aufwies, konnte im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion des mittleren Eiskristalldurchmessers ermittelt werden. Eine Senkung des Molekulargewichts auf einen Wert zwischen 20 kDa und 260 kDa ging mit einer Reduktion der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität des  $\kappa$ -Carrageens einher. Wird von einer Adsorption der Moleküle an die Eiskristalloberfläche ausgegangen, könnte die Hydrolyse des Carrageens dazu führen, dass das Polymer weniger funktionelle Gruppen für eine Interaktion mit der Eiskristalloberfläche aufweist, was eine schwächere Adsorption und damit auch eine schwächere eisrekristallisationshemmende Wirkung zur Folge hätte. Darüber hinaus könnte die geringere Molekülgröße der hydrolysierten Carrageene mit einem verringerten Bedeckungsgrad der Eiskristalloberfläche einhergehen (Leiter *et al.*, 2017b). Abweichend von den Ergebnissen dieser Studie konnten Kamińska-Dwórznička *et al.* (2015) eine Erhöhung der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität nach Säurehydrolyse ermitteln. Das native  $\kappa$ -Carrageen, das in der Studie von Kamińska-Dwórznička *et al.* (2015) verwendet wurde, wies ein Molekulargewicht von 34000 kDa auf, was deutlich oberhalb des für Carrageene üblichen Bereichs liegt und auf eine Aggregation der Polysaccharide hindeutet. Da auch für die hydrolysierten Carrageene ein vergleichsweise hohes Molekulargewicht ermittelt

wurde (2700 bzw. 3200 kDa) (Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2015), könnte die erhöhte eiskristallisationsinhibierende Aktivität der Proben nach Säurebehandlung auch auf eine reduzierte Aggregatbildung zurückgeführt werden (Leiter *et al.*, 2017b).

In der Literatur konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass neben  $\kappa$ -Carrageen auch andere Carrageentypen eine eiskristallisationsinhibierende Aktivität aufweisen. In einer Studie von Kiran-Yildirim und Gaukel (2020) wurde der Einfluss auf die Eiskristallisation sowohl für den  $\kappa$ - als auch den  $\iota$ -Typ untersucht. Für beide Carrageene konnte eine eiskristallisationshemmende Wirkung festgestellt werden. Diese war im Fall des  $\iota$ -Carrageens jedoch weniger stark ausgeprägt (Kiran-Yildirim und Gaukel, 2020). Kamińska-Dwórznička *et al.* (2020) ermittelten den Einfluss von  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen sowie einer Mischung beider Hydrokolloide auf die Rekristallisation eines Erdbeersorbets. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kiran-Yildirim und Gaukel (2020) konnte für das  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Carrageen eine ähnliche eiskristallisationshemmende Wirkung bei einer Lagerung des Sorbets in einem konventionellen Gefrierschrank festgestellt werden. Den geringsten Eiskristalldurchmesser und damit die höchste Aktivität konnte für eine Mischung beider Carrageentypen erhalten werden. Während das Sorbet ohne Zugabe von Carrageen einen mittleren Durchmesser von knapp 18,0  $\mu\text{m}$  aufwies, konnte dieser in Anwesenheit beider Carrageentypen auf einen Wert von 5,4  $\mu\text{m}$  gesenkt werden (Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2020).

Für den  $\iota$ -Typ wurden ebenfalls Versuche unternommen, die eiskristallisationsinhibierende Aktivität nach saurer und enzymatischer Hydrolyse zu analysieren (Kot *et al.*, 2022). Die säurehydrolytische Spaltung des  $\iota$ -Carrageens erfolgte mittels Salzsäure, für die enzymatische Hydrolyse wurde eine  $\beta$ -Galactosidase und eine Lactase verwendet. Für die hydrolysierten Proben konnten Eiskristalldurchmesser zwischen 20,5 - 21,7  $\mu\text{m}$  festgestellt werden, aber keine Unterschiede im Molekulargewicht. Die erhöhte eiskristallisationsinhibierende Aktivität der hydrolysierten Proben im Vergleich zum nativen  $\iota$ -Carrageen (27,6  $\mu\text{m}$ ) könnte laut den Autoren auf eine reduzierte Anzahl an Sulfatgruppen nach der Hydrolyse zurückgeführt werden (Kot *et al.*, 2022). Da für die Enzyme Lactase und  $\beta$ -Galactosidase eine Spaltung von Sulfatestern bisher nicht beschrieben wurde, ist dieser Erklärungsansatz lediglich für Carrageene nach Säurebehandlung denkbar. Eine quantitative Bestimmung der polymergebundenen Sulfatgruppen vor und nach Hydrolyse wurde allerdings nicht durchgeführt.

In der Literatur konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Carrageene eine eiskristallisationshemmende Wirkung aufweisen. Eine detaillierte Strukturcharakterisierung der

untersuchten  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene wurde in diesen Studien allerdings nicht durchgeführt. Dementsprechend ist auch der Effekt einzelner Strukturelemente oder funktioneller Gruppen auf die Hemmung der Eiskristallisation nicht bekannt. Die eiskristallisationsinhibierende Aktivität verschiedener Hybridcarrageene sowie der Einfluss der Zusammensetzung und Verteilung der verschiedenen Strukturelemente wurde bisher ebenfalls nicht untersucht. Ein weiterer Aspekt, der in der Literatur bisher kaum betrachtet wurde, ist der Einfluss der am Polysaccharid assoziierten Kationen.

## 2 ZIELSETZUNG

Carrageene werden aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften als Lebensmittelzusatzstoff in einer Vielzahl von Lebensmitteln eingesetzt. Dabei werden die stabilisierenden, viskositätserhöhenden und gelbildenden Eigenschaften dieser Polysaccharide genutzt, um die Textur verschiedener Produkte gezielt anzupassen. Carrageene können jedoch auch aufgrund ihrer eiskristallisationsinhibierenden Aktivität eingesetzt werden, welche beispielsweise in Eiscremes zum Erhalt einer cremigen Textur beitragen kann. Diese Wirkung beruht auf einer Hemmung des Eiskristallwachstums, welches im Zuge der Eiskristallisation auftritt. Der Mechanismus der eiskristallisationshemmenden Wirkung von Carrageenen konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. Mögliche Erklärungsansätze beruhen meist auf einer Adsorption der Polysaccharide an die Eiskristalloberfläche oder auf der Ausbildung eines Gelnetzwerks und der damit verbundenen sterischen Hinderung der Wassermoleküle. Des Weiteren ist nicht bekannt, welchen Einfluss die chemische Struktur der Carrageene auf die Hemmung der Eiskristallisation hat. In der Literatur wurden bisher überwiegend  $\kappa$ -Carrageene hinsichtlich ihrer eiskristallisationsinhibierenden Aktivität untersucht, während andere Carrageentypen wenig berücksichtigt wurden. Darüber hinaus wurden die verwendeten Carrageenproben in diesen Studien nur selten strukturell charakterisiert und auch die am Polysaccharid assoziierten Kationen wurden nicht untersucht. Was in der Literatur jedoch bereits näher betrachtet wurde, ist der Einfluss des Molekulargewichts der Carrageene sowie die Auswirkungen von pH-Wert und frei vorliegenden Salzen auf die eiskristallisationshemmende Wirkung.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Zusammenhang zwischen der Struktur und der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität verschiedener chemisch definierter Carrageene zu untersuchen und zu einem besseren Verständnis des Wirkungsmechanismus beizutragen. Dabei sollen vor allem Strukturparameter wie der Carrageentyp, die assoziierten Kationen sowie das Vorliegen von Hybridcarrageenen und von Vorläuferstrukturelementen betrachtet werden. Hierfür sollen zunächst verschiedene kommerzielle Carrageene, die eine möglichst hohe strukturelle Vielfalt aufweisen, umfassend strukturell charakterisiert werden. Neben den kommerziell bedeutenden  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenen stehen ebenfalls Proben im Fokus, die sich aus mehreren Carrageentypen zusammensetzen. Um die Feinstruktur dieser Carrageene zu charakterisieren, soll eine Methode entwickelt werden, die auf einer chromatographischen

Analyse nach selektiver enzymatischer Hydrolyse beruht, was die rekombinante Gewinnung entsprechender carrageenspaltender Enzyme notwendig macht. Die enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide sollen im Anschluss an die enzymatische Hydrolyse unter geeigneten chromatographischen Bedingungen aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie (MS) detektiert werden. Zudem erfolgt eine Analyse des zurückbleibenden Polysaccharids mittels *High Performance-SEC* (HPSEC) in Kombination mit einem Brechungsindex (*Refractive Index*, RI)-Detektor. Anhand der ermittelten Strukturinformationen sollen Carrageene ausgewählt und gezielt strukturell modifiziert werden, um die Auswirkungen einer Veränderung bestimmter Struktureigenschaften auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität untersuchen zu können. Die eisrekristallisationshemmende Wirkung der Carrageene soll dabei anhand einer Bestimmung des mittleren Eiskristalldurchmessers in einer Modelllösung beurteilt werden. Ausgehend von den Ergebnissen für den mittleren Durchmesser sollen so Zusammenhänge zwischen der molekularen Struktur und der eisrekristallisationshemmenden Wirkung abgeleitet werden.



## 3 MATERIAL UND METHODEN

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Carrageene wurden in isolierter Form von verschiedenen Herstellern bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Dabei standen insgesamt drei als  $\kappa$ -Carrageen (KC1 - KC3), fünf als  $\iota$ -Carrageen (IC1 - IC5) und sechs als  $\lambda$ -Carrageen (LC1 - LC6) vertriebene Proben zur Verfügung. Darüber hinaus wurden zwei weitere Carrageenproben (C1, C2) bezogen, die jedoch keine genaueren Angaben zum vorliegenden Carrageentyp aufwiesen (siehe auch Tabelle 9.1 im Anhang). Neben den 16 Carrageenen wurde zusätzlich eine kommerziell erhältliche Furcellaranprobe (FC) für die Analysen herangezogen.

### 3.1 Strukturcharakterisierung der Carrageene

Zur detaillierten Strukturcharakterisierung der Carrageene wurden zunächst die Monosaccharidzusammensetzung nach saurer Hydrolyse sowie der vorliegende Carrageentyp ermittelt. Darüber hinaus wurde eine Bestimmung des Molekulargewichts durchgeführt und der Gehalt an Kationen ( $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$ ) sowie Sulfat analysiert. Die für die Analysen verwendeten Methoden werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert. Eine detaillierte Beschreibung der Arbeitsvorschriften sowie eine Liste der verwendeten Chemikalien und Instrumente sind den Kapiteln 7 und 8 zu entnehmen.

#### 3.1.1 Carrageentyp

Eine häufig verwendete Methode zur Bestimmung des Carrageentyps stellt die NMR-Spektroskopie dar; dabei findet sowohl die  $^1H$ - als auch die  $^{13}C$ -NMR Anwendung (Ciancia *et al.*, 1993a; Stortz *et al.*, 1994). Die NMR-Spektroskopie bietet den Vorteil, dass die Vorbereitung der Proben wenig zeitintensiv ist, da die Carrageene lediglich in  $D_2O$  gelöst werden müssen. Aufgrund der Viskositätserhöhung und der damit einhergehenden Linienverbreiterung werden die Messungen gewöhnlich bei erhöhten Temperaturen (Ciancia *et al.*, 1993a; van de Velde *et al.*, 2004) oder nach Ultraschallbehandlung (Stortz *et al.*, 1994) durchgeführt. Die Identifizierung des Carrageentyps mittels  $^1H$ -NMR kann anhand der Signale der anomeren Protonen der  $\alpha$ -glykosidisch verknüpften Galactose (D- bzw. DA-Einheit) erfolgen, welche sich im Bereich zwischen 5,00 und 5,60 ppm befinden (siehe Tabelle 3.1). Für die  $^{13}C$ -NMR werden die Signale des anomeren Kohlenstoffs der D- bzw. DA-Einheit zwischen 60 und 110 ppm herangezogen, da die anomeren Signale der  $\beta$ -verknüpften Galactoseeinheit im Spektrum überlappen (Ciancia *et al.*,

1993a; Stortz *et al.*, 1994). Bei der NMR-spektroskopischen Analyse wird die chemische Verschiebung der anomeren Signale relativ zu einem internen Standard bestimmt. Verwendete interne Standardsubstanzen sind beispielsweise Methanol, Dimethylsulfoxid, Tetramethylsilan oder das Natriumsalz der 3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure (TSP) (van de Velde *et al.*, 2004).

**Tabelle 3.1:** Chemische Verschiebungen (ppm) der anomeren Protonen der  $\alpha$ -1,4-verknüpften Galactose bzw. 3,6-Anhydrogalactose verschiedener Carrageentypen (van de Velde *et al.*, 2004).

<b>Carrageentyp</b>	$\beta$	$\kappa$	$\mu$	$\iota$	$\nu$	$\lambda$
<b>chemische Verschiebung / ppm</b>	5,074	5,093	5,238	5,292	5,501	5,548

Eine Alternative zur NMR stellt beispielsweise die Fourier-Transform Infrarotspektroskopie (FTIR) dar, welche in der Literatur ebenfalls zur Bestimmung des Carrageentyps eingesetzt wird (Turquois *et al.*, 1996; Aguilan *et al.*, 2003). Die Zuordnung der verschiedenen Typen kann dabei aufgrund des unterschiedlichen Sulfatierungsmusters erfolgen. Das Auftreten eines zusätzlichen Signals bei 800-805  $\text{cm}^{-1}$ , das durch die Sulfatgruppe an der DA-Einheit induziert wird, ermöglicht eine Unterscheidung des  $\iota$ -Carrageens vom  $\kappa$ -Typ (Aguilan *et al.*, 2003). Die Identifizierung von  $\lambda$ -Carrageenen kann anhand der Signale bei 830 und 820  $\text{cm}^{-1}$  erfolgen, welche den Sulfatgruppen an Position O-2 bzw. O-6 der  $\alpha$ -1,4-verknüpften Galactoseeinheit zugeordnet werden können (Turquois *et al.*, 1996). Die FTIR stellt wie die NMR-Spektroskopie eine zerstörungsfreie Analysenmethode dar, welche ebenfalls mit einem geringen Zeitaufwand für die Probenvorbereitung verbunden ist (Turquois *et al.*, 1996). Allerdings sind die Unterschiede in den Spektren der verschiedenen Carrageentypen oftmals nicht sehr deutlich ausgeprägt, weshalb insbesondere die Identifizierung von Hybridcarrageenen mittels FTIR eine Herausforderung darstellt. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung des Carrageentyps im Rahmen dieser Arbeit mittels  $^1\text{H}$ -NMR. Eine Analyse mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR wurde aufgrund der geringen Empfindlichkeit nicht durchgeführt. Für die  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse wurde DMSO als interner Standard gewählt, da dieser eine kostengünstige Alternative zu Standardsubstanzen wie TSP darstellt und aufgrund seines hohen Siedepunktes für Messungen bei 65 °C geeignet ist. Die genaue Durchführung der Analyse kann Kapitel 8.1.1 entnommen werden.

### 3.1.2 Monosaccharidzusammensetzung

Für die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung muss zunächst eine Freisetzung der Monosaccharide aus dem Polymer erfolgen, wofür in der Kohlenhydratanalytik üblicherweise eine saure Hydrolyse durchgeführt wird. Diese würde jedoch zu einem Verlust der säurelabilen Anhydrobrücke führen. Die im Carrageen vorliegende Anhydrogalactose würde demnach als

Galactose erfasst oder zu 5-Hydroxymethylfurfural abgebaut werden (Jol *et al.*, 1999). Bei einer Durchführung der sauren Hydrolyse unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von Methylmorpholinboran (MMB) kann die Anhydrobrücke jedoch erhalten werden. Die durch die Umsetzung erhaltenen Zuckeralkohole können anschließend analysiert werden (Stevenson und Furneaux, 1991; Jol *et al.*, 1999). Für die reduktive Hydrolyse wird zunächst eine Vorhydrolyse mit 2,4 M Trifluoressigsäure (TFA) und MMB für 30 min bei 80 °C durchgeführt. In einem zweiten Schritt erfolgt die vollständige Hydrolyse des Polymers in 2 M TFA und MMB für 1 h bei 120 °C. Dabei wird sowohl nach der Vorhydrolyse als auch nach der zweiten Hydrolyse noch einmal MMB-Lösung zugegeben (Jol *et al.*, 1999). Dies ist notwendig, um eine vollständige Reduktion der Monosaccharide zu gewährleisten, da MMB in verdünnten Säuren schnell abgebaut wird (Stevenson und Furneaux, 1991).

Die Auftrennung der freigesetzten Monosaccharide kann mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (*High Performance Anion Exchange Chromatography*, HPAEC) oder Gaschromatographie (GC) erfolgen. Das Prinzip der HPAEC beruht grundsätzlich auf einem Anionenaustausch an der stationären Phase. Durch Verwendung von 612 mM Natriumhydroxidlösung mit einem pH-Wert von 12,6 als mobile Phase (Jol *et al.*, 1999) liegen Zuckeralkohole sowie Monosaccharide in ihrer polyanionischen Form vor und können mit der stationären Phase wechselwirken, welche mit quartären Alkylammoniumgruppen funktionalisiert vorliegt. Aufgrund des unterschiedlichen Retentionsverhaltens von Monosacchariden und Zuckeralkoholen müssen jedoch auf die jeweilige Anwendung angepasste Trennsäulen verwendet werden. Durch hohe Konzentrationen von Hydroxidionen in der mobilen Phase kann eine Elution der Monosaccharide oder Zuckeralkohole von der Säule realisiert werden. Für die Detektion wird in der Regel ein gepulster amperometrischer Detektor (*Pulsed Amperometric Detector*, PAD) verwendet, welcher unter den verwendeten Bedingungen eine sehr empfindliche Detektion ermöglicht. Die Quantifizierung der Zuckeralkohole kann anhand von Galactose- und 3,6-Anhydrogalactose-Kalibrierlösungen erfolgen, welche zuvor ebenfalls reduktiv hydrolysiert wurden (Jol *et al.*, 1999). Ein Vorteil der HPAEC gegenüber der GC ist, dass die Proben nach Hydrolyse direkt für die Analyse verwendet werden können, während für eine Analyse mittels GC ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt notwendig ist, um die Flüchtigkeit der Analyten zu erhöhen. Hierfür werden die Proben meist acetyliert, um die freigesetzten Zuckeralkohole in ihre Alditolacetate zu überführen (Stevenson und Furneaux, 1991; Jol *et al.*, 1999). Die Detektion der Alditolacetate nach chromatographischer Trennung kann mittels Flammenionisationsdetektion

(FID) oder massenspektrometrischer Detektion erfolgen. Bei beiden Methoden handelt es sich um etablierte Verfahren, welche eine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung ermöglichen. Durch die Notwendigkeit einer Derivatisierung ist die GC-Methode im Vergleich jedoch zeitaufwändiger. Ein zusätzlicher Vorteil der HPAEC-basierten Methode ist, dass auch nicht-reduzierte Monosaccharide erfasst werden können, wodurch die Vollständigkeit der Reduktion überprüft werden kann (Jol *et al.*, 1999). Aufgrund der genannten Vorteile der HPAEC-Methode wurde die Monosaccharidzusammensetzung der Carrageenproben mittels HPAEC-PAD analysiert. Die entsprechende Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 8.1.2 einzusehen.

### 3.1.3 Molekulargewicht

In der Literatur wird zur Bestimmung des Molekulargewichts von Carrageenen üblicherweise die SEC in Kombination mit einem LALLS- (Lecacheux *et al.*, 1985) oder MALLS-Detektor (Singh und Jacobsson, 1994; Spichtig und Austin, 2008) verwendet. Bei der SEC erfolgt eine Auftrennung der Analyten anhand ihres hydrodynamischen Volumens. Dabei eluieren Moleküle mit einem hohen hydrodynamischen Volumen zu Beginn des chromatographischen Laufs, während Moleküle mit einem niedrigen hydrodynamischen Volumen später eluieren. Dies kann durch Verwendung eines porösen Materials mit definierter Porengröße als stationäre Phase realisiert werden. Nur Analyten mit entsprechend kleinem hydrodynamischem Volumen können in die Poren diffundieren und verbleiben dadurch länger auf der Säule als große Moleküle. Als mobile Phase werden für die Analyse von Carrageenen wässrige Salzlösungen verwendet. Dabei ist die Wahl der Ionen allerdings entscheidend, da diese die Konformation des Carrageens in Lösung beeinflussen. Lecacheux *et al.* (1985) empfehlen den Einsatz von 0,1 M Lithiumchloridlösung, um die Aggregation der Polymerketten zu unterdrücken und einer Überbestimmung des Molekulargewichts aufgrund von Aggregatbildung vorzubeugen. Darüber hinaus sollte die Analyse bei erhöhten Temperaturen stattfinden, um zu gewährleisten, dass die Carrageene in der ungeordneten Konformation vorliegen. Der Einsatz eines LALLS- oder MALLS-Detektors in Kombination mit einem RI-Detektor ermöglicht nicht nur die absolute Bestimmung des Molekulargewichts, sondern auch eine Analyse der Molekulargewichtsverteilung (Lecacheux *et al.*, 1985). Eine Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass das Brechungsindexinkrement  $dn/dc$  bekannt ist, welches individuell für die untersuchte Substanz bestimmt werden sollte. Das Molekulargewicht kann ebenfalls durch alleinige Verwendung eines RI-Detektors abgeschätzt werden (Gómez-Ordóñez *et al.*, 2012). In diesem Fall werden Kalibrierstandards mit definiertem

Molekulargewicht benötigt, bei denen es sich oftmals um Dextrane oder Pullulane handelt, die jedoch das chromatographische Verhalten anderer Polysaccharide teilweise nur unzureichend widerspiegeln. Das Molekulargewicht der Carrageenproben wurde anhand einer Analyse mittels HPSEC in Kombination mit einem MALLS-Detektor bestimmt. Entsprechend den Empfehlungen in der Literatur wurde als Elutionsmittel eine 0,1 M Lithiumchlorid-Lösung verwendet und die Analyse bei einer Temperatur von 60 °C durchgeführt, um eine Aggregatbildung der Carrageene zu vermeiden (Lecacheux *et al.*, 1985). Als Trennphase wurde eine TSKgel G6000PW<sub>XL</sub>-Säule der Firma Tosoh Bioscience verwendet, welche eine Auftrennung von Polysacchariden in einem Molekulargewichtsbereich von 40 - 8000 kDa ermöglicht und damit auch einen für Carrageene üblichen Bereich abdeckt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde für alle Carrageenproben unabhängig vom vorliegenden Carrageentyp ein Brechungsindexinkrement  $dn/dc$  von 0,115 mL/g angenommen (Lecacheux *et al.*, 1985). Da es sich bei diesem Parameter um eine substanzspezifische Größe handelt, ist die Richtigkeit der absolut bestimmten Werte für das gewichtsmittlere Molekulargewicht bei Verwendung eines Brechungsindexinkrements aus der Literatur nicht zwangsläufig gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dennoch auf die zeitaufwändige Bestimmung des Brechungsindexinkrements verzichtet werden, da die untersuchten Carrageenproben ausschließlich unter gleichbleibenden Bedingungen analysiert und untereinander verglichen wurden. Eine detaillierte Beschreibung des Arbeitsablaufs ist in Kapitel 8.1.3 zu finden.

### 3.1.4 Sulfatgehalt

Für die Analyse des Sulfatgehaltes von Carrageenen können verschiedene Methoden in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise ionenchromatographische, atomspektroskopische und infrarotspektroskopische Methoden. Für die Ionenchromatographie kann ein HPAEC-System verwendet werden, welches bei Verwendung einer geeigneten Trennphase die Trennung verschiedener anorganischer Anionen aufgrund von Anionenaustauschprozessen an der stationären Phase ermöglicht. Die Detektion der Anionen kann im Anschluss an die chromatographische Auftrennung mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors (*Conductivity Detector*, CD) erfolgen. Um den Sulfatgehalt von Carrageenen bestimmen zu können, müssen die Sulfatgruppen zuvor vom Polymer abgespalten werden. Hierfür werden die Proben mit TFA und Wasserstoffperoxid für 16 h bei 100 °C behandelt und nach Evaporation des Lösungsmittels in bidestilliertem Wasser aufgenommen (Jol *et al.*, 1999). Bei einer Analyse mittels IR kann die Probe hingegen direkt und ohne vorherige Freisetzung des Sulfats verwendet werden. Anhand der

Absorptionsverhältnisse charakteristischer Wellenzahlen kann der Substitutionsgrad der Disaccharideinheiten mit Sulfat bestimmt werden. Die Absorption bei  $1250\text{ cm}^{-1}$  dient zur Berechnung des Gesamtsulfatgehaltes, während die Absorption bei  $845\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $930\text{ cm}^{-1}$  auf Galactose-4-sulfat und bei  $805\text{ cm}^{-1}$  auf 3,6-Anhydrogalactose-2-sulfat zurückzuführen ist. Diese werden ins Verhältnis zur Absorption bei einer Wellenzahl von  $2920\text{ cm}^{-1}$  gesetzt, welche eine Referenz für den Gesamtzuckergehalt darstellt (Rochas *et al.*, 1986). Die IR-Methode stellt eine schnelle und zerstörungsfreie Alternative zur Ionenchromatographie dar, ist jedoch auf einen bestimmten Wertebereich beschränkt. So können für Carrageene mit sehr niedrigem ( $< 4\%$ ) oder sehr hohem Sulfatgehalt ( $> 30\%$ ) mittels IR-Spektroskopie keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden (Rochas *et al.*, 1986). Zudem können Sulfatgruppen an verschiedenen Positionen zur Absorption von Strahlung derselben Wellenlänge beitragen, was die Analyse des Gehalts über Absorptionsverhältnisse zusätzlich erschwert. Der Sulfatgehalt von Carrageenen kann weiterhin anhand des atomspektroskopisch ermittelten Schwefelgehaltes berechnet werden. Dieser kann beispielsweise im Zuge von Multielementanalysen gemeinsam mit dem Kationengehalt bestimmt werden, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird. Aufgrund der beschriebenen Nachteile der IR-Methode wurde der Sulfatgehalt im Rahmen dieser Arbeit anhand einer Analyse mittels HPAEC-CD ermittelt. Die Durchführung ist in Kapitel 8.1.4 beschrieben.

### 3.1.5 Kationengehalt

Zur Bestimmung des Kationengehalts der Carrageene empfiehlt sich eine Analysenmethode, welche verschiedene Ionenarten gleichzeitig erfassen kann. Dies kann beispielsweise mithilfe der Optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, ICP-OES) erreicht werden (Robal *et al.*, 2017). Hierbei werden die Analyten in einem Argonplasma zunächst atomisiert sowie auch ionisiert. Durch die hohe Temperatur des Plasmas können die Atome oder Ionen in einen angeregten Zustand überführt werden. Bei der Rückkehr in den Grundzustand kommt es anschließend zur Emission von Strahlung mit einer elementspezifischen Wellenlänge. Über Kalibrierstandards kann der Gehalt der untersuchten Elemente anhand der Intensität der emittierten Strahlung quantifiziert werden. Eine Analyse des Gehaltes an Kationen kann ebenfalls mittels Atomabsorptionsspektroskopie (Morris und Chilvers, 1983; Belton *et al.*, 1984), ICP-MS (Azevedo *et al.*, 2023; Manseur *et al.*, 2023) oder Ionenchromatographie (Takemasa *et al.*, 2001) erfolgen. Während bei einer Analyse mittels Ionenchromatographie, ICP-OES oder ICP-MS mehrere Elemente gleichzeitig erfasst werden können, kann mittels Atomabsorptionsspektroskopie lediglich ein Element pro Analysengang

bestimmt werden. Darüber hinaus ist die Empfindlichkeit der Atomabsorptionsspektroskopie verglichen mit der ICP-OES und der ICP-MS geringer, weshalb höhere Konzentrationen an Analyten benötigt werden. Besonders mittels ICP-MS können sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden (Yeung *et al.*, 2017). Matrixeffekte, die zur Suppression oder Verstärkung von Analytionen im Plasma führen, können bei einer Analyse mittels ICP-MS jedoch das Ergebnis beeinträchtigen (Olesik, 1991). Eine Bestimmung des Kationengehalts mittels Ionenchromatographie ist im Vergleich zur Atomabsorptionsspektroskopie, ICP-OES oder ICP-MS hingegen mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Analyse des Kationengehalts für die vorliegenden Proben mittels ICP-OES durchgeführt. Dabei wurde neben dem Gehalt an Natrium, Kalium und Calcium zusätzlich der Gehalt an Schwefel bestimmt, welcher zur Berechnung des Sulfatgehaltes herangezogen wurde. Die Durchführung der Analyse ist Kapitel 8.1.5 zu entnehmen.

## 3.2 Freisetzung und Charakterisierung von Carrageen-Oligosacchariden

Um detailliertere Informationen über die Feinstruktur von Polysacchariden zu erhalten, können diese in charakteristische Oligosaccharide gespalten werden, welche anschließend mittels massenspektrometrischer Methoden oder NMR-Spektroskopie analysiert werden. Zur Freisetzung von Oligosacchariden aus Carrageenen können verschiedene Techniken eingesetzt werden. Neben einer klassischen Säurehydrolyse kann die Probe ebenfalls durch Ultraschallbehandlung oder mithilfe von carrageenspaltenden Enzymen in Oligosaccharide abgebaut werden.

Für die säurehydrolytische Spaltung der Carrageene kann eine milde Hydrolyse mittels 0,1 M Salzsäure oder Schwefelsäure bei 60 °C durchgeführt werden. Dabei wird die Probe über einen Zeitraum von 1,5 - 4 h behandelt und anschließend neutralisiert. Eine Abtrennung der Oligosaccharide vom polymeren Material kann beispielsweise mittels Membranfiltration oder Dialyseverfahren erfolgen (Yu *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). Darüber hinaus kann eine partielle reduktive Hydrolyse zur Freisetzung der Oligosaccharide angewandt werden. Hierfür werden die Carrageene mit TFA und MMB bei 65 °C behandelt, die Säure anschließend durch Evaporation entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Während für die partielle reduktive Hydrolyse eines  $\kappa$ -Carrageens die Freisetzung von geradzahligen Oligosacchariden mit einem Polymerisationsgrad (*Degree of Polymerization, DP*)

von 4 - 18 beschrieben wurde, resultierte die milde Hydrolyse mit 0,1 M Schwefelsäure in der Freisetzung von ungeradzahligen  $\kappa$ -Carrageen-Oligosacchariden (Yang *et al.*, 2009). Yang *et al.* (2009) führten dies auf die Instabilität der 3,6-Anhydrogalactose unter mild sauren Bedingungen zurück. Die Autoren vermuteten, dass auch im Fall einer milden Hydrolyse zunächst geradzahlige Oligosaccharide freigesetzt werden, die 3,6-Anhydrogalactose am reduzierenden Ende der Oligomere jedoch unter diesen Bedingungen abgespalten und zu 5-Hydroxymethylfurfural abgebaut wird. Eine Reduktion der 3,6-Anhydrogalactose in das entsprechende Alditol zeigte hingegen einen stabilisierenden Effekt. Eine Substitution der 3,6-Anhydrogalactose in Position O-2 mit einer Sulfatgruppe führte ebenfalls zu einer Stabilisierung der glykosidischen Bindung am nicht-reduzierenden Ende des Monosaccharids, was auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer Freisetzung von geradzahligen Oligosacchariden resultierte (Yang *et al.*, 2009).

Neben der sauren Hydrolyse kann ein Abbau der Carrageene zu Oligosacchariden mittels Ultraschallbehandlung erfolgen. Tecson *et al.* (2021) konnten in einer Studie zeigen, dass bei einer hohen Amplitude (85 %) und einer Behandlungsdauer von 180 min eine Reduktion des Molekulargewichts eines  $\kappa$ -Carrageens um 96,33 % erreicht werden kann. Das Beschallen des Carrageens führte neben dem Bruch der glykosidischen Bindungen jedoch auch teilweise zu einer Abspaltung von Sulfatgruppen (Tecson *et al.*, 2021).

Durch den Einsatz spezifischer Enzyme kann das Carrageen hingegen in charakteristische Oligosaccharide abgebaut werden, ohne dass eine Veränderung der nativen Struktur auftritt. Dabei bleiben auch nicht spaltbare Carrageen-Strukturelemente erhalten. Da dies die Gewinnung detaillierter Informationen zur Carrageenstruktur ermöglicht, wurde in dieser Arbeit die enzymatische Hydrolyse zur partiellen Spaltung von Carrageenen eingesetzt. In der Literatur wurden bereits  $\kappa$ -,  $\iota$ - und  $\lambda$ -Carrageenasen beschrieben, die zur Freisetzung von Oligosacchariden aus den entsprechenden Carrageentypen verwendet werden können (Ekeberg *et al.*, 2001; Knutsen *et al.*, 2001; Guibet *et al.*, 2006; Antonopoulos *et al.*, 2007). Die Enzyme mussten im Zuge dieser Studien jedoch zunächst rekombinant gewonnen werden, da sie kommerziell nicht erhältlich sind. Dies wird im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

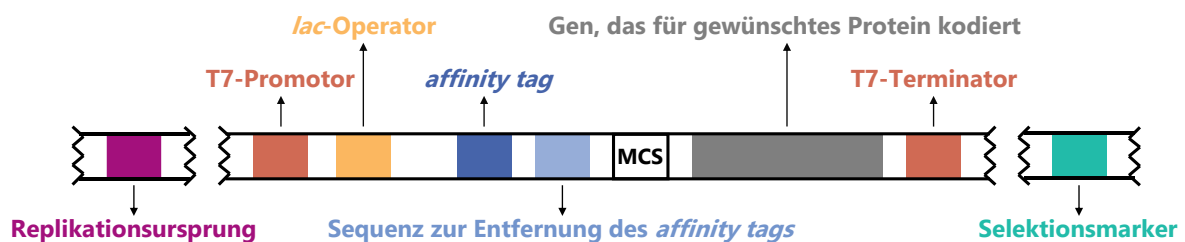
### 3.2.1 Rekombinante Enzymgewinnung

Um das gewünschte Enzym zu erhalten, muss dieses zunächst über heterologe Expression in einem Wirtsorganismus produziert werden. Als Wirtssystem können verschiedene



Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Pilze und einzellige Algen verwendet werden. Das Bakterium *Escherichia coli* ist ein häufig verwendeter Organismus, da es sich durch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit auszeichnet. Darüber hinaus können bei *E. coli*-Kulturen hohe Bakteriendichten erreicht werden. Eine Transformation des Bakteriums mit exogener DNA ist ebenfalls schnell und unkompliziert möglich, was einen weiteren Vorteil darstellt (Rosano und Ceccarelli, 2014). Diese kann einerseits durch Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und anschließendem Hitzeschock für 30 s bei 42 °C erfolgen (Singh *et al.*, 2010), oder alternativ mittels Elektroporation (Sheng *et al.*, 1995). Bei einer Transformation mittels Elektroporation führen kurze Spannungspulse zur Bildung von Poren, durch welche die exogene DNA in die Bakterienzelle eingeschleust werden kann.

Für die heterologe Expression des Enzyms muss zunächst eine Klonierung des entsprechenden Gens in einen Expressionsvektor erfolgen. Als Expressionsvektoren werden üblicherweise Plasmide verwendet, welche ringförmige extrachromosomale DNA darstellen. In Abbildung 3.1 sind die charakteristischen Merkmale eines Expressionsvektors beispielhaft gezeigt.



**Abbildung 3.1:** Aufbau eines Expressionsvektors für die heterologe Expression von Proteinen (Rosano und Ceccarelli, 2014). MCS: *Multiple Cloning Site*.

Der Expressionsvektor enthält eine Sequenz, welche auch als Replikationsursprung bezeichnet wird und eine organismusspezifische Replikation des Plasmids unabhängig vom genetischen Material des Wirtsorganismus ermöglicht. Dabei wird die Anzahl der Kopien ebenfalls durch den Replikationsursprung bestimmt. Das Gen des gewünschten Proteins wird zwischen einen Promotor und einen Terminator kloniert. Der Promotor stellt einen DNA-Abschnitt auf dem Plasmid dar, welcher eine kontrollierte Expression des gewünschten Proteins ermöglicht. Bei einem T7-Promotor wird die Transkription des in den Vektor klonierten Gens durch die Bindung der T7-RNA-Polymerase an den Promotor initiiert. Das T7-Gen wird wiederum durch einen *lac*-Promotor kontrolliert (Rosano und Ceccarelli, 2014). Üblicherweise liegt ein *lac*-Repressor an den *lac*-Promotor gebunden vor, wodurch die Bindung der T7-RNA-Polymerase an den T7-Promotor unterdrückt und eine vorzeitige basale Expression verhindert wird. Die Zugabe von

Lactose oder Lactoseanaloga wie Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welche an den *lac*-Repressor binden, resultiert in einer Freisetzung des Repressors vom *lac*-Promotor. Dies ermöglicht die Bindung der T7-RNA-Polymerase an den T7-Promotor und damit auch die Transkription des Gens, welches für das gewünschte Protein kodiert (Dubendorf und Studier, 1991; Rosano und Ceccarelli, 2014).

Um eine erleichterte Aufreinigung des Proteins aus dem Kulturmedium zu ermöglichen, wird dieses in der Regel mit einem *Affinity Tag* versehen. Bei diesem kann es sich zum Beispiel um eine kurze Aminosäuresequenz handeln, welche an die Aminosäuresequenz des Proteins angefügt wird und zur selektiven Bindung des Proteins an eine stationäre Phase dient. Der *Affinity Tag* kann prinzipiell sowohl am *N*- als auch *C*-terminalen Ende angehängt werden. Häufig genutzte Peptid-*Tags* sind beispielsweise der poly-Arg-, poly-His-, FLAG- c-Myc-, S- oder Strep II-*Tag*. Das Anfügen eines *Affinity Tags* kann jedoch auch negative Effekte auf die Tertiärstruktur oder einen Verlust der biologischen Aktivität des Proteins zur Folge haben. Neben Peptid-*Tags* können auch größere Polypeptide gemeinsam mit dem gewünschten Protein exprimiert werden und als Fusionspartner fungieren. Um negativen Effekten auf Struktur und Funktion vorzubeugen, kann der Peptid-*Tag* oder der Fusionspartner des rekombinanten Proteins nach der Expression und Aufreinigung chemisch oder enzymatisch abgebaut werden. Für einen enzymatischen Abbau des *Tags* mittels Proteasen kann ein Expressionsvektor verwendet werden, welcher Sequenzen aufweist, die für entsprechende Proteaseschnittstellen kodieren. Bei einem chemischen Abbau können Fusionspartner beispielsweise mittels Bromcyan entfernt werden. Die für die Entfernung notwendigen Reaktionsbedingungen können jedoch auch zu einer unerwünschten Modifikation des rekombinanten Proteins führen. Um das Wachstum von plasmidfreien Zellen zu verhindern, enthält der Expressionsvektor zusätzlich ein Resistenzgen, welches zu einer Antibiotikaresistenz der erfolgreich transformierten Bakterien führt. Dabei kann abhängig vom gewählten Expressionsvektor beispielsweise eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol oder Tetracyclin ausgebildet werden. Bei einer Resistenz gegenüber Ampicillin, welche durch das *bla*-Gen vermittelt wird, wird das Enzym  $\beta$ -Lactamase produziert, welches eine Spaltung des  $\beta$ -Lactamrings und somit eine Inaktivierung des Antibiotikums zur Folge hat. Da dieses Enzym jedoch dauerhaft freigesetzt wird, kann es nach einer gewissen Zeit zu einem nahezu vollständigen Abbau von Ampicillin kommen, was wiederum das Wachstum von plasmidfreien Zellen begünstigt (Rosano und Ceccarelli, 2014).

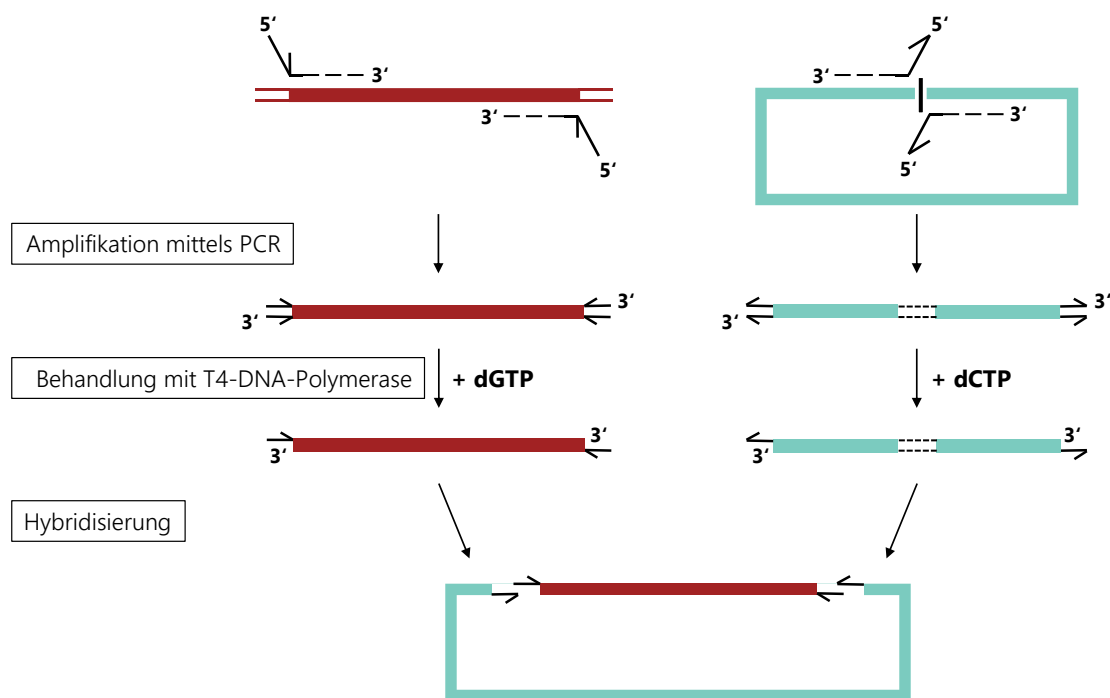
Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die heterologe Expression der Vektor pLIC-SGC1 verwendet. Dieser verfügt über verschiedene Restriktionsschnittstellen, die eine Linearisierung des Vektors mittels Restriktionsenzymen ermöglichen. Durch das Enzym BseRI kann so beispielsweise das *SacB*-Gen entfernt werden. Dieses Gen dient bei nicht-linearisierten Vektoren zur negativen Selektion auf Saccharoseplatten. Der pLIC-SGC1-Vektor enthält zudem einen T7-Promotor unter der Kontrolle eines *lac*-Operators sowie ein Resistenzgen gegenüber Ampicillin (*bla*-Gen). Darüber hinaus enthält der Vektor ein Gen, welches für ein aus 23 Aminosäuren bestehendes Fusionspeptid kodiert, das im Zuge der Expression an das *N*-terminale Ende des rekombinanten Proteins angehängt wird. Dieses Fusionspeptid weist in seiner Aminosäuresequenz sechs aufeinander folgende Histidinmoleküle auf, die als *Affinity Tag* (His-Tag) fungieren.

## KLONIERUNG

Klassischerweise beruht die Klonierung eines Gens in einen Expressionsvektor auf dem Einsatz von Restriktionsenzymen. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Endonukleasen, welche an bestimmten Restriktionsschnittstellen der *Multiple Cloning Site* (MCS) schneiden. Durch die Verwendung zweier verschiedener Restriktionsenzyme kann so ein DNA-Abschnitt des Plasmids entfernt werden, wodurch ein geöffneter Vektor entsteht. Durch das Herausschneiden eines DNA-Abschnitts entstehen bei den üblicherweise verwendeten Enzymen an den Schnittstellen überhängende einzelsträngige Enden, welche auch als *Sticky Ends* bezeichnet werden. Das zu klonierende Gen wird ebenfalls mit den Restriktionsenzymen behandelt, sodass auch dieses überhängende Enden aufweist, welche in ihrer Sequenz komplementär zu den *Sticky Ends* des Expressionsvektors sind. Dabei können sowohl Produkte der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) als auch andere Vektoren, die das entsprechende Gen inklusive entsprechender Überhänge enthalten, zur Klonierung eingesetzt werden. Durch eine Hybridisierung der komplementären Überhänge kann das Gen in den Vektor eingefügt werden. Eine kovalente Verknüpfung der *Sticky Ends* wird durch den Einsatz von Ligasen erreicht. Der Vorteil der restriktionsbasierten Klonierung ist, dass eine Vielzahl an spezifischen Restriktionsenzymen sowie verschiedenste Expressionsvektoren für sehr viele Anwendungen kommerziell erhältlich sind. Der Einsatz von Restriktionsenzymen kann jedoch problematisch sein, wenn das Gen von Interesse interne Restriktionsstellen aufweist, welche der MCS des Expressionsvektors entsprechen. Darüber hinaus ist die Aktivität mancher Endonukleasen gegenüber linearen PCR-Produkten eingeschränkt, was ebenfalls einen Nachteil darstellt (Celie *et*

al., 2016). Dazu können Verunreinigungen in den verwendeten Lösungen zu einer verminderten Aktivität der DNA-Ligasen führen.

Eine Alternative zur restriktionsbasierten Klonierung stellt das *Ligation-independent Cloning* (LIC) dar. Bei dieser Methode, welche von Aslanidis und de Jong (1990) entwickelt wurde und in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt ist, werden sowohl Gen als auch Vektor mittels PCR mit LIC-Überhängen versehen, welche dann die Hybridisierung des Gens in den Expressionsvektor ermöglichen.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung des *Ligation-independent Cloning* (LIC). Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden Gen und Vektor zunächst mit den LIC-Sequenzen versehen. Anschließend werden einzelsträngige Überhänge durch eine Behandlung mittels T4-DNA-Polymerase generiert, was eine Hybridisierung von Gen und Vektor ermöglicht (Aslanidis und de Jong, 1990). DNA: Desoxyribonukleinsäure, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, dCTP: Desoxycytidintriphosphat.

Um den linearisierten Vektor mit den entsprechenden Überhängen zu generieren, wird eine PCR mit Primern durchgeführt, welche komplementär zu bestimmten Regionen der MCS des Plasmids sind. Die Primer enthalten zudem an ihrem 5'-Ende einen identischen LIC-Überhang, welcher bei der Amplifikation des Vektors mit angefügt wird. Da die Überhänge der Primer keine dGMP-Reste aufweisen, besitzt der mit diesen Primern amplifizierte Vektor an den 3'-Enden keine dCMP-Reste. Eine Behandlung mit einer T4-DNA-Polymerase, welche über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität verfügt, führt in Anwesenheit von dCTP zu einem Abbau des Stranges in 3'→5'-Richtung bis in der Basensequenz der erste dCMP-Rest erreicht wird. Auf diese Weise können *Sticky Ends* an den 5'-Enden des Expressionsvektors erzeugt werden. Einen erneuten Ringschluss des Vektors ohne

eingefügtes Gen kann dadurch verhindert werden, dass die Überhänge an den 5'-Enden des Vektors nicht komplementär sind. Das gewünschte Gen, welches in den Expressionsvektor kloniert werden soll, wird ebenfalls mittels PCR vervielfältigt und mit überhängenden Enden versehen. Um eine Hybridisierung von Gen und Vektor zu ermöglichen, werden für die PCR des Gens Primer verwendet, deren LIC-Überhänge keine dCMP-Reste aufweisen. Durch eine Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase in Anwesenheit von dGTP können am 5'-Ende des Gens Überhänge gebildet werden, welche in ihrer Basensequenz komplementär zu denen des Vektors sind. Wird das hybridisierte Produkt, welches nicht kovalent verknüpft vorliegt, in den Wirtsorganismus transformiert, ohne dass es zu einer Dissoziation von Gen und Vektor kommt, kann eine kovalente Verknüpfung im Inneren der Bakterienzelle stattfinden, weshalb bei dieser Klonierungsmethode keine Ligasen benötigt werden (Aslanidis und de Jong, 1990). Zur Transformation wird häufig der *E. coli*-Stamm DH5- $\alpha$  verwendet. Diesem wurden gentechnisch Mutationen eingefügt, die eine Vervielfältigung von Plasmid-DNA begünstigen. So sind die DH5- $\alpha$ -Zellen zum einen Endonuklease I-defizient, wodurch der Abbau von Plasmid-DNA verhindert wird. Zum anderen wird durch eine weitere Mutation die homologe Rekombination in den Zellen und damit einhergehend auch ein Austausch von Nukleotidsequenzen zwischen den Plasmiden unterdrückt (Phue *et al.*, 2008).

Im Anschluss an die Transformation und Vervielfältigung wird das Plasmid aus dem Wirtsorganismus isoliert und einer Sequenzierung unterzogen. Für die Isolation von Plasmiden können verschiedene Methoden eingesetzt werden, die sowohl von der Größe des Plasmids als auch vom verwendeten Bakterienstamm abhängig sind. Grundsätzlich beruhen diese Methoden auf einer Lyse der Bakterienzellen, welche häufig unter alkalischen Bedingungen erfolgt, und einer anschließenden Separierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA (Trevors, 1985). In einer von Birnboim und Doly (1979) vorgestellten Methode erfolgt die Zelllyse durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) und Natriumhydroxid. Dabei wird das Volumen an Natriumhydroxid-Lösung so gewählt, dass ein pH-Wert zwischen 12,0 und 12,5 erreicht wird, da unter diesen Bedingungen eine Denaturierung von chromosomaler DNA, jedoch nicht von Plasmid-DNA stattfindet. Daraufhin wird das Lysat mit einem Gemisch aus Essigsäure und Natriumacetat neutralisiert, wodurch die chromosomale DNA renaturiert und ein unlösliches Netzwerk ausbildet. Die hohe Konzentration an Acetat resultiert zudem in einer Präzipitation von hochmolekularer RNA sowie Protein-SDS-Komplexen. Die Plasmid-DNA kann nach Zentrifugation mittels Ethanolpräzipitation aus dem Überstand gewonnen werden. Da in Anwesenheit von

Acetat lediglich eine Präzipitation von hochmolekularer RNA erfolgt, kann der Überstand nach Zentrifugation neben Plasmid-DNA ebenfalls Rückstände von niedermolekularer RNA enthalten (Birnboim und Doly, 1979). Um die Reinheit des isolierten Plasmids zu verbessern, kann zusätzlich eine Behandlung mit dem Enzym RNase erfolgen, wodurch die Rückstände an RNA abgebaut werden können (Feliciello und Chinali, 1993).

Eine abgewandelte Methode, welche jedoch ebenfalls auf einer alkalischen Lyse beruht, wurde von Kado und Liu (1981) beschrieben. Im Zuge dieser Methode werden die Bakterienzellen durch alkalische SDS-Lösung (pH 12,6) lysiert und anschließend auf Temperaturen zwischen 50 °C und 65 °C erhitzt, um eine Denaturierung der chromosomalen DNA zu erreichen. Im Anschluss an die thermische Behandlung kann die Plasmid-DNA mithilfe eines Gemisches aus Phenol und Chloroform aus dem Lysat extrahiert werden, wodurch gleichzeitig Proteine und andere Rückstände abgetrennt werden (Kado und Liu, 1981). Für die Isolierung der Plasmide kann anstelle einer organischen Extraktion oder einer Ethanolpräzipitation ebenfalls eine Silica-Matrix verwendet werden, da DNA in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen an Silica bindet. Die Elution der Plasmid-DNA von der Silica-Matrix kann nach einem Waschschrift mittels destilliertem Wasser erfolgen. Da das Eluat neben Plasmid-DNA nur geringfügige Mengen an RNA aufweist, kann zudem auf eine Behandlung mittels RNase verzichtet werden. Somit stellt die Verwendung einer Silica-Matrix eine zeitsparende Alternative im Vergleich zu einer klassischen alkalischen Lyse dar, um Plasmid-DNA mit einer hohen Reinheit zu erhalten (Lakshmi *et al.*, 1999). Neben einer alkalischen Lyse kann die Plasmid-DNA ebenfalls durch eine thermische Behandlung aus den Bakterienzellen freigesetzt werden. Hierfür werden die Bakterienzellen für 15 - 40 s in siedendem Wasser behandelt. Unter diesen Bedingungen präzipitiert die chromosomale DNA und kann gemeinsam mit anderen zellulären Bestandteilen mittels Zentrifugation abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA kann anschließend mittels Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt werden (Holmes und Quigley, 1981).

Die isolierte Plasmid-DNA wird anschließend sequenziert, um zu überprüfen, ob das gewünschte Gen erfolgreich in den Expressionsvektor kloniert wurde. Eine klassische Methode zur DNA-Sequenzierung stellt die Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977) dar. Diese beruht grundsätzlich auf einer PCR, wobei jedoch nur ein Primer verwendet wird. Dabei wird der komplementäre Strang eines einzelsträngigen DNA-Templates ausgehend vom Primer durch die Aktivität einer DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Dies geschieht so lange, bis ein Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) in den DNA-Strang eingebaut und ein Kettenabbruch

induziert wird. Da ddNTPs an Position C-3 der Ribose keine Hydroxylgruppe aufweisen, kann kein weiteres Nukleotid an das ddNTP angehängt und dementsprechend auch keine Verlängerung des DNA-Strangs erfolgen. Um die Basensequenz des Templates zu erhalten, werden vier verschiedene Ansätze benötigt. Jeder dieser Ansätze enthält die Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) der vier verschiedenen DNA-Basen (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) sowie die Didesoxy-Variante einer der vier Basen. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, welche an ihrem 3'-Ende die Base aufweisen, die dem entsprechenden Ansatz als ddNTP zugegeben wurde. Die DNA-Fragmente dieser vier Ansätze können mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden. Durch Verwendung von radioaktiv markierten dNTPs können die Banden auf dem Gel detektiert werden. Anhand eines Vergleichs der DNA-Fragmente der vier Ansätze kann so die Basensequenz des zum Template komplementären Stranges bestimmt werden (Sanger *et al.*, 1977).

Da der Einsatz von radioaktiv markierten dNTPs jedoch mit gesundheitlichen Risiken verbunden ist, wurden alternative Möglichkeiten entwickelt, um die DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese zu detektieren. Dies kann beispielsweise durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen erreicht werden, welche an das 5'-Ende des Primers angefügt werden. Dabei wird für jeden Ansatz ein anderer fluoreszierender Farbstoff verwendet, sodass dieser ausschließlich mit einer Art von ddNTP assoziiert wird. Mithilfe eines Lasers können die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide auf dem Gel in einen angeregten Zustand überführt werden. Die bei der Rückkehr in den Grundzustand emittierte elektromagnetische Strahlung kann durch verschiedene Farbfilter aufgetrennt und anschließend detektiert werden. Da durch die Verwendung von vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen jede Farbe genau einer Base zugeordnet werden kann, entspricht die Farbabfolge der Basensequenz des Templates (Smith *et al.*, 1986).

Die Auftrennung der DNA-Fragmente kann ebenfalls mittels Kapillarelektrophorese erfolgen, welche im Vergleich zu einer klassischen Gelelektrophorese deutlich schneller ist und zudem ein höheres Auflösungsvermögen bietet. Darüber hinaus ermöglicht die Kapillarelektrophorese in Kombination mit einer Detektion der DNA-Fragmente über fluoreszierende Farbstoffe eine automatisierte Durchführung der Sequenzierung. Für die Kapillarelektrophorese können Kapillaren aus Quarzglas mit einem Innendurchmesser von 75 µm verwendet werden, welche mit einem Polyacrylamid-Gel gefüllt sind. Analog zu einer klassischen Polyacrylamid-

Gelelektrophorese können die DNA-Fragmente durch das Anlegen einer Spannung entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden (Cohen *et al.*, 1990).

Trotz einer Vielzahl an Modifizierungen hinsichtlich der Auftrennung und Detektion von DNA-Fragmenten ist die Sanger-Sequenzierung nicht für eine Durchführung im Hochdurchsatz geeignet. Darüber hinaus kann mithilfe dieser Sequenzierungsmethode nur bis zu einer Maximallänge von 1000 Basen eine korrekte DNA-Sequenz bestimmt werden. Dennoch wird die Sanger-Sequenzierung für viele Anwendungen standardmäßig eingesetzt, wie beispielsweise zur Überprüfung der DNA-Sequenz von Plasmiden oder PCR-Produkten. Für andere Anwendungen, wie beispielsweise die vollständige Sequenzierung eines Genoms, werden hingegen Methoden benötigt, die eine Sequenzierung langer DNA-Abschnitte im Hochdurchsatz ermöglichen und unter der Bezeichnung *Next-generation Sequencing* oder *Second-generation Sequencing* zusammengefasst werden (Slatko *et al.*, 2018).

Für die rekombinante Gewinnung von Carrageenasen wurden im Rahmen dieser Arbeit entsprechende Gene mittels LIC in den Expressionsvektor pLIC-SGC1 kloniert. Diese Art der Klonierung wurde gewählt, da die LIC-Methode im Vergleich zu einer restriktionsbasierten Klonierung weder Restriktionsenzyme noch Ligasen benötigt und dementsprechend deutlich schneller und einfacher durchführbar ist. Nach einer Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5- $\alpha$  und einer Selektion auf Saccharose/Ampicillin-Platten wurden die Plasmide mithilfe eines Kits der Firma Omega Bio-Tek isoliert. Dieses beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen in Kombination mit einer RNase-Behandlung sowie einer Aufreinigung der freigesetzten Plasmide an einer Silica-Säule. Im Anschluss an die Isolierung erfolgte eine Sequenzierung der Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung, da diese Methode standardmäßig zur Überprüfung der Basensequenz von Plasmiden eingesetzt wird und für kürzere DNA-Abschnitte zuverlässige Ergebnisse liefert.

## EXPRESSION

Die sequenzierten Plasmide werden anschließend erneut in *E. coli* transformiert. Hierfür werden spezielle Protease-defiziente Expressionsstämme verwendet, um einen Abbau des überexprimierten Proteins zu vermeiden. Für die meisten Anwendungen kann zu diesem Zweck eine Transformation des *E. coli*-Stamms BL21 erfolgen. Dieser weist neben einer Protease-Defizienz eine Mutation auf, wodurch die DNA-Methylierung sowie der DNA-Abbau gestört werden, was zu einer Minimierung von Plasmidverlusten führt (Rosano und Ceccarelli,



2014). Nach Kultivierung der mit dem Expressionsvektor transformierten Wirtsstämme wird die Expression des Proteins durch Zugabe von bestimmten chemischen Substanzen induziert. Im Fall eines T7-Promotor-Systems erfolgt die Induktion durch die Zugabe von Lactose oder IPTG. Im Gegensatz zu Lactose wird IPTG nicht verstoffwechselt, sondern bleibt im Kulturmedium erhalten (Rosano und Ceccarelli, 2014). Dadurch kommt es zu einer konstant hohen Expression des Zielproteins. Im Anschluss an die Expression muss das Protein aus den Bakterienzellen freigesetzt und aufgereinigt werden. Für die Lyse der Bakterienzellen können sowohl mechanische als auch nicht-mechanische Methoden verwendet werden. Bei einer mechanischen Behandlung können die Bakterienzellen beispielsweise durch eine Hochdruckhomogenisation oder durch das Mahlen in einem Mörser oder einer *Bead Mill* aufgebrochen werden. Nicht-mechanische Verfahren zum Aufschluss der Bakterienzellen umfassen zum einen physikalische Methoden wie zum Beispiel eine Ultraschallbehandlung. Zum anderen können chemische Verfahren angewandt werden, die beispielsweise auf dem Einsatz von Detergenzien, chaotropen Substanzen, Säuren oder Basen beruhen. Darüber hinaus kann ebenfalls ein enzymatischer Zellaufschluss erfolgen. Hierfür kann das Enzym Lysozym eingesetzt werden, welches die Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand abbaut (Harrison, 1991).

Eine Möglichkeit zur Proteinaufreinigung stellt die immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) dar, welche in der Literatur bereits für verschiedene rekombinant gewonnenen Enzyme angewendet wurde (Shen *et al.*, 2017; Wefers *et al.*, 2017). Hierbei wird die durch den *Affinity Tag* erzeugte Affinität des rekombinanten Proteins gegenüber einem Liganden ausgenutzt. Aminosäuren wie Histidin, die aufgrund ihrer Seitenkette metallbindende Eigenschaften aufweisen, ermöglichen bei Verwendung eines *poly-Histidin-Tags* die Aufreinigung des rekombinanten Proteins an einem metallhaltigen Harz. Der *His-Tag* besteht üblicherweise aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten, welche mit Übergangsmetallen wie  $\text{Ni}^{2+}$  interagieren können (Hochuli *et al.*, 1988). Als Träger für die Nickelionen wird Nitrilotriessigsäure (*Nitrilotriacetic Acid*, NTA) verwendet, welche über vier Koordinationsstellen mit dem Nickelion einen stabilen Komplex ausbildet. Die immobilisierten Nickelionen besitzen zwei weitere freie Koordinationsstellen, die mit den Histidinresten des Proteins interagieren können (Hochuli *et al.*, 1987). Die gebundenen Proteine können zum einen durch Absenkung des pH-Wertes und zum anderen durch Zugabe von Imidazol vom Harz eluiert werden. Eine Senkung des pH-Wertes hat eine Protonierung des Imidazolrings der Histidinreste und damit eine Ablösung des Proteins vom Nickelharz zur Folge, während die Zugabe von hohen Konzentrationen an Imidazol aufgrund von

Verdrängungseffekten zu einer Elution des Proteins führt. Da die Aufreinigung mittels IMAC unter milden Bedingungen stattfindet, können negative Auswirkungen auf die Faltung und biologische Aktivität des Proteins minimiert werden. Darüber hinaus stellt auch der His-Tag aufgrund seiner geringen Länge keine nennenswerte Beeinträchtigung des Proteins dar und muss im Anschluss an die Aufreinigung in der Regel nicht vom Protein entfernt werden. Da das Ni-NTA-Harz zudem unter denaturierenden Bedingungen und über einen breiten pH-Bereich stabil ist, kann diese Art der Aufreinigung ebenfalls für unlösliche Proteine angewandt werden. Die größte Herausforderung bei der IMAC stellen unspezifisch gebundene Proteine dar. Obwohl es sich bei Histidin um eine Aminosäure mit einer geringen Häufigkeit handelt, können Proteine natürlicherweise zwei oder mehr nebeneinanderliegende Histidinreste aufweisen. Diese Proteine zeigen ebenfalls eine Affinität gegenüber Nickel und können dadurch gemeinsam mit dem gewünschten Protein eluiert werden (Bornhorst und Falke, 2000).

Während die Aufreinigung mittels IMAC auf einer spezifischen Affinität des rekombinanten Proteins gegenüber einem Liganden beruht, ermöglicht die Ionenaustauschchromatographie eine Auftrennung aufgrund von Unterschieden in der Ladung der Proteine. Für die Aufreinigung können sowohl Kationen- als auch Anionenaustauscher verwendet werden. Da die Ladung eines Proteins vom pH-Wert abhängig ist, können die chromatographischen Bedingungen abhängig von der Anwendung so gewählt werden, dass die gewünschten Proteine aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an das Austauschermaterial binden. Eine Elution der gebundenen Proteine wird durch eine Erhöhung der Salzkonzentration erzielt, da die in der Salzlösung enthaltenen Ionen mit den Proteinen um die Bindungsstellen des Ionenaustauschers konkurrieren. Die Hydrophobe Interaktionschromatographie basiert auf Unterschieden in der Hydrophobizität der Proteine, welche in unterschiedlichem Ausmaß mit einem hydrophoben Säulenmaterial interagieren und dadurch aufgetrennt werden können. Dadurch stellt sie eine weitere Möglichkeit zur Fraktionierung von Proteinen dar. Bei Proteinen, die sich deutlich in ihrer Molekülgröße unterscheiden, kann zudem eine Separation mittels SEC oder Gelfiltration erfolgen (Owczarek *et al.*, 2019).

Für die Expression der Carrageenasen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Transformation der sequenzierten Plasmide in den *E. coli*-Stamm BL21. Nach einer Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG wurden die Bakterienzellen mittels Ultraschallbehandlung lysiert, da dies eine einfache und schnelle Methode des Zellaufschlusses darstellt. Die Isolierung der Proteine wurde aufgrund des Histidin-Tags mittels IMAC durchgeführt. Die durch den His-Tag erzeugte

Affinität ermöglicht eine spezifische Bindung des rekombinanten Proteins an ein nickelhaltiges Harz, weshalb bei einer Aufreinigung mittels IMAC hohe Reinheiten erzielt werden können. Darüber hinaus kann die IMAC als Batch-Verfahren angewandt werden, was eine schnellere Aufreinigung der Proteine im Vergleich zu anderen chromatographischen Verfahren ermöglicht.

## ENZYMAKTIVITÄT

Schnelle und einfache Methoden zur Überprüfung der Enzymaktivität der isolierten Proteine stellen kolorimetrische Assays wie beispielsweise der 4-Hydroxybenzhydrazid (PAHBAH)-Assay dar. Dieser kann eingesetzt werden, um den Gehalt an freien reduzierenden Zuckern oder Zuckerresten zu bestimmen und kann daher ebenfalls zur Überprüfung der Aktivität von Glykosidasen herangezogen werden. Der Assay beruht auf einer Reaktion des reduzierenden Zuckers mit dem 4-Hydroxybenzhydrazid in alkalischer Lösung, welche in der Bildung eines gelb gefärbten Produktes resultiert. Die Absorption dieses Produktes bei einer Wellenlänge von 410 nm kann zur photometrischen Quantifizierung genutzt werden (Lever, 1972). Bei diesem Assay handelt es sich allerdings um eine unspezifische Methode, bei der durch Miterfassung anderer reduzierender Verbindungen falsch positive Ergebnisse erhalten werden können. Eine spezifischere Methode zur Überprüfung der Aktivität von Carrageenasen stellt hingegen eine Analyse der Molekulargewichtsverschiebung über den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Hydrolyse dar, welche mittels HPSEC bestimmt werden kann. Darüber hinaus kann ebenfalls eine Charakterisierung der durch das Enzym freigesetzten Oligosaccharide erfolgen.

Die Bestimmung der Enzymaktivität der rekombinant gewonnenen Carrageenasen erfolgte anhand einer Analyse mittels HPSEC-RI, da dies eine etablierte Methode darstellt, um die enzymatische Freisetzung von Oligosacchariden zu überprüfen.

### 3.2.2 Strukturaufklärung von Oligosacchariden

Die Identifizierung der enzymatisch freigesetzten Carrageen-Oligosaccharide kann im Anschluss an die Hydrolyse mittels NMR-Spektroskopie oder massenspektrometrischer Methoden erfolgen. Über die charakteristischen Spaltprodukte ist es möglich, Aufschluss über die Feinstruktur des intakten Polymers zu gewinnen, was zur Identifizierung von Hybridcarrageenen beitragen kann. Bei einer Analyse der Oligosaccharide mittels NMR können sowohl eindimensionale  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Experimente als auch verschiedene zweidimensionale Experimente zur Strukturaufklärung herangezogen werden. In der Literatur konnten Oligosaccharide verschiedener Carrageentypen, die auf unterschiedliche Weise aus dem Polymer freigesetzt wurden, bereits erfolgreich mittels

NMR identifiziert werden (Knutsen *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Guibet *et al.*, 2006). Um die einzelnen Oligosaccharide strukturell charakterisieren zu können, wurden diese zuvor mittels chromatographischer Methoden wie beispielsweise der SEC (Knutsen *et al.*, 2001) oder der Gelpermeationschromatographie (Guibet *et al.*, 2006) entsprechend ihres DP aufgetrennt. Da die Carrageen-Oligosaccharide wasserlöslich sind, können diese in D<sub>2</sub>O aufgenommen und direkt für die NMR-Analyse verwendet werden. Üblicherweise werden zusätzlich interne Standardsubstanzen wie beispielsweise TSP oder Aceton zur Probe hinzugegeben (Yu *et al.*, 2002; Guibet *et al.*, 2006). Wie in Abschnitt 3.1.1 bereits beschrieben, liefert das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum Informationen zur Art der vorliegenden Wiederholeinheiten. Darüber hinaus kann bei größeren Oligosacchariden anhand der Signale der anomeren Protonen festgestellt werden, ob es sich um eine Carrabioseeinheit am reduzierenden oder nicht-reduzierenden Ende des Oligomers oder um eine interne Carrabioseeinheit handelt (Guibet *et al.*, 2006). Anhand eines <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-*Correlation Spectroscopy* (COSY)-Experiments, welches die Kopplung von Protonen über zwei oder drei Bindungen abbildet, kann eine Zuordnung der Ringprotonen erfolgen. Heteronukleare zweidimensionale Experimente wie das *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-, *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* (HMQC)- oder *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC)-Experiment können eingesetzt werden, um eine Zuordnung der Kohlenstoffsignale zu ermöglichen (Yu *et al.*, 2002; Guibet *et al.*, 2006; Tecson *et al.*, 2021). Eine Kombination verschiedener NMR-Experimente kann so wertvolle Strukturinformationen liefern und eine Identifizierung des Oligosaccharids ermöglichen. In der Studie von Guibet *et al.* (2006) konnte zudem gezeigt werden, dass anhand einer NMR-Analyse ebenfalls von der Idealstruktur des untersuchten Polymers abweichende Oligosaccharide identifiziert werden können, was verdeutlicht, dass diese Methode ebenfalls dafür geeignet ist, Hybridcarrageene zu charakterisieren. Da es sich bei der NMR-Spektroskopie um ein zerstörungsfreies Verfahren handelt, können die untersuchten Proben im Anschluss ebenfalls für andere Analysen verwendet werden. Nachteilig bei einer Strukturaufklärung mittels NMR ist jedoch, dass hohe Mengen an Oligosacchariden für die Analyse benötigt werden.

Neben der NMR-Spektroskopie kann die Strukturaufklärung von Carrageen-Oligosacchariden ebenfalls mittels MS erfolgen. Dabei können die Oligomere anhand von charakteristischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen ( $m/z$ ) identifiziert werden. In der Literatur beschriebene Studien beruhen häufig auf einer Ionisation der Oligosaccharide mittels Elektrosprayionisation (ESI) und einer anschließenden Analyse der Analytionen mittels MS- bzw. MS/MS-Techniken (Ekeberg *et*

*al.*, 2001; Antonopoulos *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Bei der ESI handelt es sich um eine sanfte Ionisationstechnik, die eine Analyse von nicht-flüchtigen Substanzen aus der flüssigen Phase ermöglicht und dadurch auch in Kombination mit Flüssigchromatographie (*Liquid Chromatography*, LC) verwendet werden kann. Die in der mobilen Phase gelösten Analyten werden durch eine Sprühkapillare geleitet, an der abhängig vom gewählten Messmodus eine negative oder positive Spannung angelegt ist. Das Anlegen der Spannung führt zur Ladungstrennung, durch welche sich Ionen mit gleicher Ladung an der Spitze der Kapillare sammeln und aufgrund der gegenseitigen Abstoßung in Form von feinen Tröpfchen zerstäubt werden. Diese Tröpfchen bewegen sich in Richtung der Gegenelektrode und dabei kommt es zu einer Freisetzung der Analytionen in die Gasphase. Beim *Coulomb Fission Mechanism* wird davon ausgegangen, dass die Erhöhung der Ladungsdichte in den Tröpfchen, die aufgrund der Verdampfung des Lösemittels entsteht, dazu führt, dass die Tropfen zerfallen und dadurch kleinere Tröpfchen bilden. Diese zerfallen weiter, bis letztendlich einzelne Ionen vorliegen. Bei dem Modell der *Ion Evaporation* wird hingegen angenommen, dass die erhöhte Ladungsdichte in den Tröpfchen zur Folge hat, dass die Abstoßungskräfte im Inneren die Oberflächenspannung der Tropfen überwinden, was in einer Freisetzung von Ionen aus der Oberfläche der Tropfen resultiert (Cech und Enke, 2001). Die durch die Ionisierung erhaltenen Analytionen werden im Anschluss in den Massenanalysator geleitet, wo sie entsprechend ihres  $m/z$  selektiert werden. Für eine massenspektrometrische Analyse von Carrageen-Oligosacchariden kann beispielsweise ein Quadrupol als Massenanalysator verwendet werden. Genauere Strukturinformationen können anhand von MS/MS-Analysen erhalten werden, bei denen ein definiertes Ion aufgrund von kollisionsinduzierter Dissoziation (*Collision-induced Dissociation*, CID) weiter fragmentiert und analysiert wird. Anhand von MS- bzw. MS/MS-Techniken konnten in der Literatur bereits säurehydrolytisch sowie enzymatisch freigesetzte Oligosaccharide verschiedener Carrageentypen strukturell charakterisiert werden (Ekeberg *et al.*, 2001; Antonopoulos *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Die Ionisation der Carrageen-Oligosaccharide mittels ESI erfolgt üblicherweise im negativen Modus, da hier aufgrund der über den üblichen pH-Bereich negativ geladenen Sulfatgruppen eine höhere Empfindlichkeit erreicht werden kann. Das Auftreten von mehrfach geladenen Ionen sowie die Adduktbildung mit unterschiedlichen Komponenten resultieren jedoch in sehr komplexen Massenspektren. Darüber hinaus kann aufgrund einer zu hohen Konusspannung oder chemischen Reaktionen, welche durch die mobile Phase verursacht werden, eine Desulfatierung der Oligosaccharide in der Ionenquelle stattfinden und eine Identifizierung zusätzlich erschweren. Das Auftreten von desulfatierten Ionen ist dabei umso häufiger, je größer

das Oligosaccharid ist. Hohe Salzkonzentrationen in der Probe können sich ebenfalls negativ auf die Ionisierung des Analyten auswirken. Eine Analyse mittels MS besitzt gegenüber anderen Techniken zur Strukturaufklärung wie der NMR-Spektroskopie jedoch den Vorteil, dass deutlich niedrigere Konzentrationen an Oligosacchariden für die Analyse benötigt werden. Zudem können mittels MS deutlich niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden, wodurch auch selten vorkommende Strukturelemente detektiert werden können (Ekeberg *et al.*, 2001). So konnte in einer Studie von Ekeberg *et al.* (2001) beispielsweise ein Hybridoligosaccharid mit einem DP von 4, welches sowohl eine  $\kappa$ - als auch eine  $\iota$ -Carrabioseeinheit aufweist, identifiziert werden.

Um die Identifizierung einzelner Strukturen aus dem Hydrolysat nach Säure- oder Enzymbehandlung zu erleichtern, kann das Gemisch aus Carrageen-Oligosacchariden vor der massenspektrometrischen Analyse beispielsweise mittels SEC oder Gelfiltration in Fraktionen aufgetrennt werden, welche dann direkt in das Spektrometer injiziert werden (Ekeberg *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2009). Neben einer Vorfraktionierung ist ebenfalls eine direkte Kopplung von LC und MS möglich, welche eine Auftrennung und Strukturcharakterisierung der Oligosaccharide innerhalb eines chromatographischen Laufs ermöglicht. Um eine Trennung der Analyten zu erreichen, können verschiedene stationäre Phasen in Betracht gezogen werden. In einer Studie von Antonopoulos *et al.* (2007) wurde beispielsweise eine *Porous Graphitic Carbon* (PGC)-Säule verwendet, welche eine Interaktion mit der stationären Phase über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen ermöglicht.

Aufgrund der genannten Vorteile der MS wurde im Rahmen dieser Arbeit eine LC-ESI-MS-Methode entwickelt, um Carrageen-Oligosaccharide nach enzymatischer Hydrolyse zu analysieren. Die für die Hydrolyse verwendeten Carrageenasen wurden zuvor rekombinant gewonnen. Die chromatographische Auftrennung der Oligosaccharide vor der massenspektrometrischen Detektion wurde mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) realisiert, welche besonders für stark polare Substanzen geeignet ist. Dabei interagieren die polaren Analyten mit einer hydrophilen stationären Phase und werden dadurch retardiert. Das Fließmittel weist üblicherweise einen hohen Anteil an organischen Lösemitteln auf. Die Elution der Analyten von der stationären Phase kann durch eine Erhöhung des Wasseranteils in der mobilen Phase erreicht werden (Leijdekkers *et al.*, 2011). Eine detaillierte Beschreibung der HILIC-MS-Methode sowie der heterologen Expression ist den Kapiteln 8.2 und 8.3 zu entnehmen.

### 3.3 Modifizierung von Carrageenen

Für die eiskristallisationsinhibierende Wirkung von Carrageenen sind besonders die am Polymer assoziierten Kationen sowie das Vorliegen von Anhydrogalactose von Bedeutung, da diese ebenfalls eine wichtige Rolle für die Ausbildung der geordneten Konformation und des Gelnetzwerks spielen (siehe Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). Um den Einfluss verschiedener am Carrageen assoziierter Kationen zu untersuchen, müssen zunächst definierte monokationische Formen des Polysaccharids vorliegen. Für die Erzeugung dieser Kationenformen können verschiedene Methoden in Betracht gezogen werden. Bei der von Polowsky und Janaswamy (2015) beschriebenen Methode werden die Carrageene in stark salzhaltigen Lösungen bei erhöhter Temperatur gelöst. Dabei lagert sich bevorzugt das in der Salzlösung stark im Überschuss vorliegende Kation an das Carrageen an und verdrängt dadurch andere Ionenarten. Das gelöste Carrageen wird anschließend in kaltem Isopropanol präzipitiert, gewaschen und getrocknet (Polowsky und Janaswamy, 2015). Diese Art des Kationenaustauschs stellt eine unkomplizierte und schnelle Möglichkeit dar, Carrageene mit einem definierten Kationentyp herzustellen. Bei der Präzipitation des Polysaccharids können jedoch auch freie Kationen aus der Lösung im Präzipitat eingeschlossen werden, welche bei unzureichendem Waschen des Präzipitats nach der Trocknung im Endprodukt verbleiben und zu einem Kationenüberschuss führen.

Eine alternative Methode stellt der Einsatz von Kationenaustauschern dar. Dabei kann das Polysaccharid direkt in die entsprechende monokationische Form überführt werden, indem das Austauscherharz mit dem gewünschten Kation beladen wird (Hermansson *et al.*, 1991; Robal *et al.*, 2017). Darüber hinaus kann das Carrageen über eine Zwischenstufe umgewandelt werden. Hierbei wird mittels Kationenaustauschern zunächst die  $H^+$ -Form des Polysaccharids generiert, welche im Anschluss durch eine Neutralisation mit KOH oder  $Ca(OH)_2$  in die entsprechende Kationenform überführt wird. Um den Gehalt an freien Salzen in der Probe zu minimieren, können im Anschluss an den Kationenaustausch zusätzliche Dialyse- oder Waschschrte erfolgen. Bei einer übermäßigen Dialyse gegen Wasser können die am Carrageen assoziierten Kationen jedoch von  $H^+$ -Ionen verdrängt werden, was zu einer Ansäuerung und Autohydrolyse des Carrageens führen kann (Robal *et al.*, 2017). Um monokationische Formen der Carrageene zu erhalten, wurde aufgrund der einfachen Durchführbarkeit die von Polowsky und Janaswamy (2015) vorgestellte Methode des Kationenaustauschs gewählt, welche in Kapitel 8.4.1 im Detail erläutert ist.

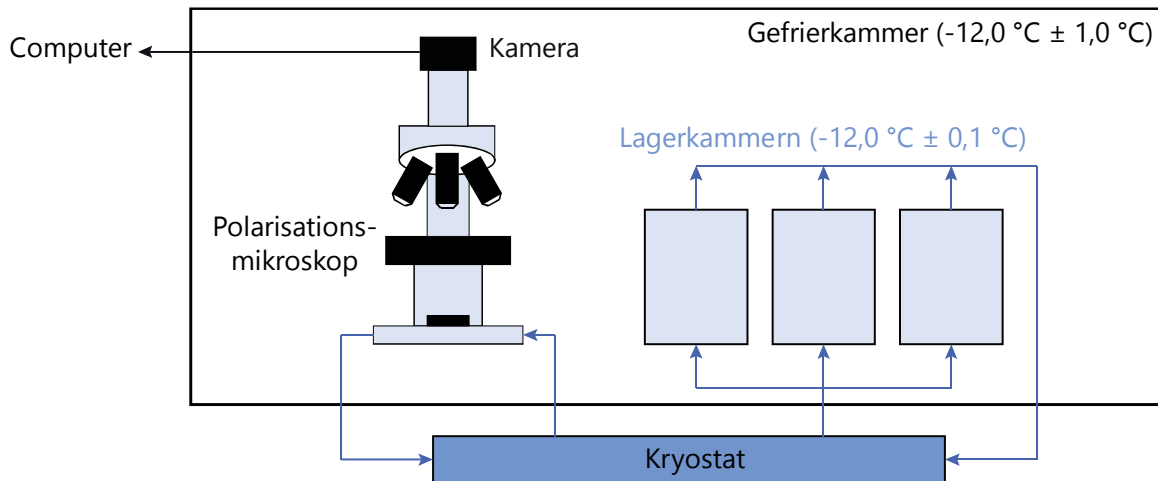
Eine Entfernung von  $\alpha$ -1,4-verknüpften Galactoseeinheiten kann über eine alkalische Behandlung entsprechender Carrageene erfolgen. Bei dieser erfolgt eine Umwandlung von D-Einheiten in die entsprechenden DA-Einheiten. Hierfür werden die Carrageene in Anwesenheit einer Base sowie Natriumborhydrid bei 80 °C über einen definierten Zeitraum behandelt (Ciancia *et al.*, 1993b; Doyle *et al.*, 2010). Die Reaktionszeit für die alkalische Umwandlung ist dabei abhängig vom vorliegenden Carrageentyp. Während die Umwandlung von  $\mu$ - und  $\nu$ -Carrageen in die jeweilige Hauptstufe ( $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen) innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist, ist die Geschwindigkeit der Reaktion für  $\lambda$ -Carrageen deutlich niedriger (Ciancia *et al.*, 1993b). In der Literatur beschriebene Reaktionszeiten variieren von 30 Minuten (Viana *et al.*, 2004) bis hin zu 28 h (Doyle *et al.*, 2010). Die Zugabe von Natriumborhydrid dient dazu, einen Abbau der Polysaccharide aufgrund des *Base Peelings* zu minimieren, besonders bei langen Reaktionszeiten. Bei dieser Reaktion wird das Polymer unter alkalischen Bedingungen ausgehend vom reduzierenden Ende abgebaut. Die Anwesenheit von Natriumborhydrid führt jedoch zu einer Reduktion der Aldehydgruppe am reduzierenden Ende der Polymerketten, wodurch das *Base Peeling* unterdrückt werden kann (Doyle *et al.*, 2010). Im Anschluss an die alkalische Behandlung wird die Reaktion entweder durch eine Neutralisation der Carrageenlösung oder durch eine Dialyse gestoppt (Ciancia *et al.*, 1993b; Doyle *et al.*, 2010). Der entsprechende Arbeitsablauf für die alkalische Behandlung der Carrageenproben ist in Kapitel 8.4.2 zu finden.

### 3.4 Analyse der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität

Eine Beurteilung der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität von Hydrokolloiden kann anhand der Eiskristallgröße sowie deren Veränderung während der Lagerung der Probe über einen längeren Zeitraum erfolgen. Dabei wird meist die Größenverteilung der Kristalle oder der mittlere Eiskristalldurchmesser bestimmt. Klassische Ansätze zur Analyse beruhen auf mikroskopischen Aufnahmen gefrorener Lösungen, anhand derer der mittlere Durchmesser der Eiskristalle ermittelt werden kann. Die Untersuchung der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität kann sowohl in Modelllösungen wie beispielsweise einer 49 % Saccharoselösung (Gaukel *et al.*, 2014; Leiter *et al.*, 2017a; Leiter *et al.*, 2017b; Leiter *et al.*, 2018) als auch in authentischen Lebensmitteln wie Sorbets (Kamińska-Dwórznička *et al.*, 2020) durchgeführt werden. Zunächst wird dem gewählten Testsystem eine festgelegte Konzentration an Hydrokolloid zugegeben und bei erhöhter Temperatur behandelt, bis das Hydrokolloid vollständig gelöst vorliegt. In der von Gaukel *et al.* (2014) beschriebenen Methode wird die Probe anschließend zwischen zwei auf dem Objektträger fixierten Deckgläsern aufgetragen und mit einem dritten Deckglas abgedeckt, dessen Ränder mit



Silikon abgedichtet werden, um ein Ausdampfen der Lösung zu verhindern. Durch diese Methode der Auftragung können höhere Schichtdicken der Probe erreicht werden, welche sich positiv auf die Bildung der Eiskristalle auswirken. Das Einfrieren der Objektträger erfolgt in flüssigem Stickstoff, wodurch die wässrige Lösung direkt in einen glasartigen Zustand übergeht. Die Proben werden über einen Zeitraum von 96 - 150 h bei einer konstanten Temperatur von  $-8\text{ °C}$  oder  $-12\text{ °C}$  in einer Gefrierkammer gelagert (Gaukel *et al.*, 2014; Leiter *et al.*, 2017a; Leiter *et al.*, 2017b; Leiter *et al.*, 2018), deren Aufbau in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt ist.

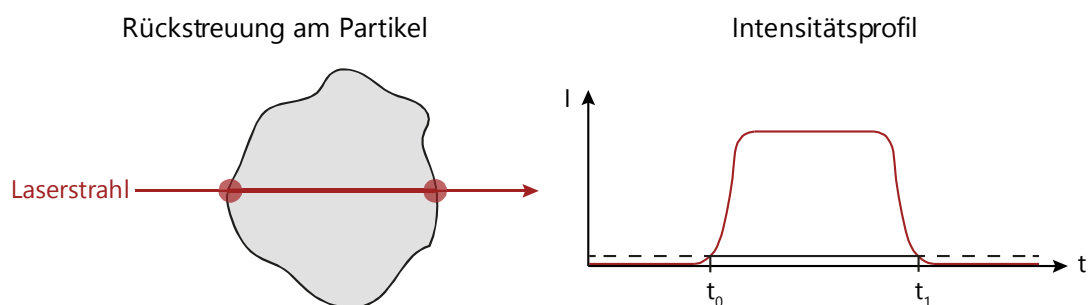


**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität. Die Proben werden in drei kleineren Kammern gelagert, die mithilfe eines externen Kryostaten temperiert werden. Das in der Gefrierkammer befindliche Polarisationsmikroskop ist ebenfalls an den externen Kühlkreislauf angeschlossen. Durch diesen Aufbau können Temperaturschwankungen während der Lagerung und der Aufnahme der Kristallbilder verhindert werden.

Während der Lagerung können mithilfe eines Polarisationsmikroskops in regelmäßigen Abständen Bilder der Eiskristalle aufgenommen werden. Um den mittleren Kristalldurchmesser der Probe zu erhalten, wird der Äquivalentdurchmesser von 300-500 Kristallen pro Objektträger anhand der mikroskopischen Aufnahmen bestimmt und zur Berechnung des mittleren Durchmessers herangezogen (Gaukel *et al.*, 2014). Diese Art der Bildauswertung ist jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv, da die Umrisse der Kristalle nicht automatisch erkannt, sondern händisch umrandet werden müssen, um die Fläche des entsprechenden Kristalls für die Berechnung des Durchmessers zu erhalten. Mikroskopische Aufnahmen bieten jedoch den Vorteil, dass neben der Bestimmung der Kristallgröße ebenfalls das Auftreten von morphologischen Veränderungen während der Lagerung untersucht werden kann, welche für  $\kappa$ -Carrageen in der Literatur bereits beschrieben wurden (Gaukel *et al.*, 2014). Dies kann zum einen anhand einer optischen Beurteilung der Kristallform erfolgen und zum anderen anhand von Parametern wie der

Zirkularität oder verschiedener Seitenverhältnisse, welche neben der Fläche der Kristalle ebenfalls von gängigen Bildauswertungsprogrammen bereitgestellt werden.

Das *Focused Beam Reflectance Measurement* (FBRM) stellt eine alternative Methode zur Bestimmung der Eiskristallgröße dar und wurde in einer Studie von Ndoye und Alvarez (2015) zur Analyse von authentischen Eiscremeproben eingesetzt. Bei dieser Analysentechnik wird eine Suspension mit einem fokussierten Laserstrahl durchstrahlt, der in einer hohen Geschwindigkeit rotiert. Da sich die Suspension ebenfalls in Bewegung befindet, sind hohe Rotationsgeschwindigkeiten des Laserstrahls notwendig, damit die Partikel nahezu unbeweglich erscheinen. Sobald der Laserstrahl auf einem Punkt an der Oberfläche des Partikels auftrifft, wird ein Teil des Lichtes zurückgestreut. Dies geschieht so lange, bis der Laserstrahl das gegenüberliegende Ende des Partikels erreicht. Anhand der verstrichenen Zeit sowie der Scangeschwindigkeit kann daraufhin die sogenannte *Chord Length* des Partikels ermittelt werden (siehe Abbildung 3.4). Diese ist definiert als gerade Linie zwischen zwei beliebigen Punkten des Umrisses. Die während der Messung bestimmten Partikellängen können in Form einer *Chord Length Distribution* in Echtzeit erhalten werden (Ndoye und Alvarez, 2015).



**Abbildung 3.4:** Prinzip des *Focused Beam Reflectance Measurements* (FBRM) zur Bestimmung der *Chord Length* eines Partikels. Die Intensität des beim Durchdringen eines Partikels zurückgestreuten Lichts wird gegen die Zeit aufgetragen. Aus dem resultierenden Intensitätsprofil (rechts) kann unter Berücksichtigung der Scangeschwindigkeit die *Chord Length* erhalten werden (Ndoye und Alvarez, 2015).

Der Nachteil dieser Analysenmethode ist jedoch, dass lediglich eine Längenverteilung anstatt einer Partikelgrößenverteilung bestimmt werden kann und die *Chord Length* die tatsächliche Größe des Partikels eventuell nur unzureichend widerspiegelt. Darüber hinaus können mittels FBRM keine morphologischen Veränderungen der Eiskristalle erfasst werden. Aufgrund der geringen Verbreitung dieser Analysenmethode im Lebensmittelbereich besteht für die Anwendung weiterhin Optimierungsbedarf. Im Vergleich zu einer klassischen Analyse mittels Mikroskopie ist die FBRM jedoch mit deutlich weniger Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden (Ndoye und Alvarez, 2015).

Neben einer direkten Messung der Eiskristallgröße kann die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität eines Hydrokolloids ebenfalls anhand einer Analyse des ungefrorenen Wassers ermittelt werden. Diese Methode beruht auf der Annahme, dass Eis als poröses Medium betrachtet werden kann, in dem die Kristalle die feste Phase darstellen, während das ungefrorene Wasser, welches die Kristalle umgibt, den Porenraum bildet. Kommt es aufgrund von Rekristallisationsprozessen zu Änderungen in der Anzahl und Größe der Kristalle, geht dies mit Veränderungen des Wassernetzwerks einher. Während das Wassernetzwerk bei kleinen Kristallgrößen Adern mit einer geringen Breite und Länge aufweist, kommt es mit einem Anstieg der Kristallgröße ebenfalls zu einer Vergrößerung der Aderdimensionen. Um diese Veränderungen zu charakterisieren, können Methoden herangezogen werden, welche speziell für die Analyse poröser Materialien entwickelt wurden. Eines dieser Verfahren stellt die NMR-Spektroskopie dar. Mithilfe von Relaxationsmessungen oder Messungen der zeitabhängigen Diffusion kann indirekt die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität einer Substanz bestimmt werden (Brown *et al.*, 2014).

Bei einer Bestimmung der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität mittels Relaxationsmessungen wird die  $T_2$ - oder transversale Relaxationszeit bestimmt und daraus anschließend die Porenlängenskala  $l_p$  der Wasseradern berechnet. Im Zuge der transversalen Relaxation kommt es nach einer Auslenkung der Magnetisierung in die x-y- oder Transversalebene zu einem Verlust der Phasenkohärenz und zu einem Auffächern der Kernspins innerhalb dieser Ebene. Bei einer Flüssigkeit, welche in einer festen Phase eingeschlossen ist, verändert sich die  $T_2$ -Relaxationszeit in Abhängigkeit von der Porengröße. Aufgrund des proportionalen Zusammenhangs deutet ein Anstieg in der transversalen Relaxationszeit während der Lagerung der Eisproben demnach auf eine Vergrößerung der Flüssigkeitsadern infolge von Rekristallisationsprozessen hin (Brown *et al.*, 2014).

Die Dimensionen des Adernetzwerks können ebenfalls anhand einer Messung des effektiven zeitabhängigen Diffusionskoeffizienten des eingeschlossenen Wassers untersucht werden. Anhand von Veränderungen des Diffusionskoeffizienten  $D(\Delta)$  während der Beobachtungszeit  $\Delta$  können Rückschlüsse auf die Porengröße gezogen werden. Während kurzen Diffusionszeiten verhält sich der normierte zeitabhängige Diffusionskoeffizient  $D(\Delta)/D_0$  aufgrund der Interaktion der Wassermoleküle im Porenraum mit den festen Grenzflächen der Eiskristalle proportional zu  $S/V_p$ , wobei  $S$  die Porenoberfläche und  $V_p$  das Porenvolumen darstellt. In diesem Zeitraum kann die Porenlängenskala  $l_p$  über den Zusammenhang  $S/V_p \sim 1/l_p$  abgeschätzt werden. Bei längeren Diffusionszeiten nähert sich  $D(\Delta)/D_0$  asymptotisch dem Wert  $1/\alpha$  an, wobei  $\alpha$  die Tortuosität

darstellt. Diese beschreibt das Verhältnis aus der vom Molekül im porösen Medium zurückgelegten Weglänge und der entsprechenden geometrischen Länge und ist ein Maß für die durch das Porennetzwerk hervorgerufene Einschränkung der Bewegung eines Teilchens. Dementsprechend führt ein Anstieg der Kristallgröße, welcher mit einer Vergrößerung der Aderdimensionen des Wassernetzwerks einhergeht, zu einer Abnahme der Tortuosität und damit zu einer Erhöhung der effektiven Diffusionslänge. Eine Messung des Diffusionsverhaltens ermöglicht so eine quantitative Beschreibung der Eiskristallgröße anhand der Porenlängenskala  $l_p$  für kurze und anhand der Tortuosität  $\alpha$  für lange Diffusionszeiten (Brown *et al.*, 2014).

Eine Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität mittels NMR-Spektroskopie bietet den Vorteil einer nicht-destruktiven Analyse, die mit einer einfachen Probenvorbereitung verbunden ist. Die Messung der zeitabhängigen Diffusion geht jedoch mit einem hohen zeitlichen Aufwand einher, da ein Experiment üblicherweise über einen Zeitraum von 8 h aufgenommen wird. Die Messung der transversalen Relaxationszeit ist mit einer Akquisitionszeit von circa 2 min im Vergleich deutlich schneller. Eine quantitative Beschreibung der Porenlänge anhand der  $T_2$ -Zeit ist jedoch nur möglich, wenn die Oberflächenrelaxation bekannt ist, da diese für die Berechnung benötigt wird (Brown *et al.*, 2014). Für eine Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität von Hydrokolloiden mittels NMR muss zudem überprüft werden, ob eine Übertragbarkeit der Methode von basalem Eis auf andere Modellsysteme oder authentische Lebensmittel möglich ist. Die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität von Carrageenen wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von mikroskopischen Aufnahmen ermittelt, da die Mikroskopie trotz zeitintensiver Bildauswertung eine zuverlässige und bereits etablierte Methode zur Bestimmung der Eiskristallgröße darstellt. Die Durchführung der Analyse ist Kapitel 8.5 zu entnehmen.

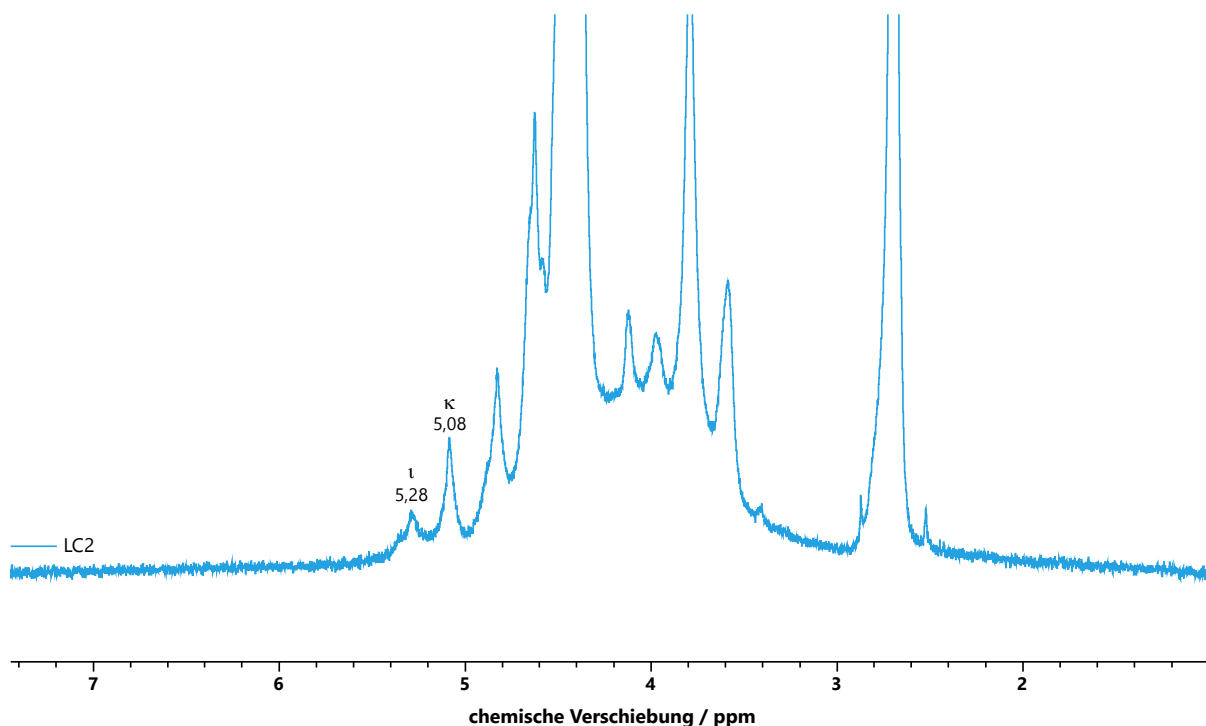
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Strukturcharakterisierung der Ausgangsmaterialien

Zunächst wurden verschiedene kommerzielle Carrageene erworben und hinsichtlich ihrer strukturellen Zusammensetzung charakterisiert. Hierfür wurden der Carrageentyp, die Monosaccharidzusammensetzung, die Gehalte an Sulfat und assoziierten Kationen sowie das mittlere Molekulargewicht der Proben analysiert. Anhand der Ergebnisse der Strukturanalyse sollten Carrageene mit einer möglichst hohen strukturellen Vielfalt für eine detaillierte Charakterisierung ausgewählt werden.

#### 4.1.1 Bestimmung des Carrageentyps

Die Bestimmung des Carrageentyps erfolgte anhand einer Analyse mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und wurde zur Verringerung der Viskosität bei einer Temperatur von  $65\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die für die unterschiedlichen Carrageentypen charakteristischen Signale der D- und DA-Einheiten wurden anhand der in der Literatur beschriebenen chemischen Verschiebungen identifiziert (van de Velde *et al.*, 2004). In Abbildung 4.1 ist beispielhaft das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Probe LC2 dargestellt.



**Abbildung 4.1:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanz ( $^1\text{H-NMR}$ )-Spektrums des kommerziellen Carrageens LC2. Das Spektrum wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Dimethylsulfoxid ( $2,696\text{ ppm}$ ) referenziert. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von  $5,08\text{ ppm}$  bzw.  $5,28\text{ ppm}$  kann dem anomeren Proton der DA-Einheit des  $\kappa$ -Typs bzw.  $\iota$ -Typs zugeordnet werden.

Für Proben, die verschiedene Carrageentypen aufwiesen, wurde über eine Integration der verschiedenen Signale der prozentuale Anteil der einzelnen Carrageentypen bestimmt. Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Analyse der kommerziellen Carrageene sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1:** Mittels  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR) ermittelte Carrageentypen sowie die entsprechenden prozentualen Anteile (n=1).

Probe	Carrageentyp (Anteil / %)	Probe	Carrageentyp (Anteil / %)
KC1	$\kappa$	LC1	$\kappa$ (47), $\iota$ (31), $\nu$ (22)
KC2	$\kappa$	LC2	$\kappa$ (72), $\iota$ (28)
KC3	$\kappa$	LC3	$\kappa$ (42), $\iota$ (37), $\nu$ (21)
FC	$\kappa$	LC4	$\kappa$ (42), $\iota$ (33), $\nu$ (24)
IC1	$\iota$	LC5	$\kappa$ (44), $\iota$ (33), $\nu$ (23)
IC2	$\iota$	LC6	$\kappa$ (59), $\iota$ (41)
IC3	$\kappa$ (27), $\iota$ (73)	C1	$\kappa$ (37), $\iota$ (33), $\nu$ (30)
IC4	$\iota$	C2	$\kappa$ (59), $\iota$ (41)
IC5	$\iota$		

Für die untersuchten  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene konnte mit Ausnahme der Probe IC3 der vom Hersteller deklarierte Carrageentyp bestätigt werden. Das Carrageen IC3, bei welchem es sich laut Herstellerangaben um ein reines  $\iota$ -Carrageen handeln sollte, wies neben dem  $\iota$ -Typ (73 %) auch Anteile des  $\kappa$ -Typs auf (27 %). Da es sich bei Furcellaran (FC) um ein  $\kappa/\beta$ -Hybridcarrageen handelt, konnte für diese Probe erwartungsgemäß der  $\kappa$ -Typ ermittelt werden. Strukturelemente des  $\beta$ -Typs konnten mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse jedoch nicht nachgewiesen werden. Da das charakteristische Signal des  $\beta$ -Typs mit 5,07 ppm eine sehr ähnliche chemische Verschiebung wie das Signal des  $\kappa$ -Typs (5,09 ppm) aufweist (van de Velde *et al.*, 2004), wäre es denkbar, dass diese beiden Carrageentypen aufgrund einer Signalüberlappung nicht voneinander unterschieden werden können.

Auffallend ist, dass keines der untersuchten  $\lambda$ -Carrageene Strukturelemente des  $\lambda$ -Typs aufwies. In allen Fällen handelt es sich entweder um Hybridcarrageene oder Mischungen aus zwei bzw. drei verschiedenen Carrageentypen, welche nicht kovalent verknüpft vorliegen. Hierzu können anhand einer Analyse mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie allerdings keine Rückschlüsse gezogen werden. Für die Proben LC2, LC6 und C2 konnte sowohl der  $\kappa$ - als auch  $\iota$ -Typ bestimmt werden, wobei  $\kappa$ -Strukturelemente in höheren Anteilen vorliegen (72 % bzw. 59 %). Für die übrigen

$\lambda$ -Carrageene sowie die Probe C1 konnte neben dem  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typ ebenfalls der  $\nu$ -Typ identifiziert werden, also die Vorläuferstruktur des  $\iota$ -Carrageens. Die Anteile der einzelnen Carrageentypen variieren dabei im Bereich von 37 - 47 % für  $\kappa$ , 31 - 37 % für  $\iota$  und 21 - 30 % für  $\nu$ .

Anhand der Analyse mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konnten zudem andere niedermolekulare Komponenten wie Glucose oder Saccharose in den Proben identifiziert werden. Diese Zucker werden bei der Herstellung zugesetzt, um bestimmte rheologische Eigenschaften des Endproduktes einzustellen (van de Velde *et al.*, 2002). Für die untersuchten kommerziellen Carrageene konnte in den Proben KC2, IC4 und C2 Saccharose anhand des Signals bei 5,40 ppm nachgewiesen werden, welches dem anomeren Proton der Glucoseeinheit der Saccharose zugeordnet werden kann (siehe Abbildung 9.1 im Anhang). Zu Probe IC3 wurde hingegen Glucose zugesetzt, welche anhand des Signals des anomeren Protons bei 5,22 ppm identifiziert werden kann (vgl. Abbildung 9.2). Neben zugesetzten Substanzen kann das extrahierte Carrageen ebenfalls Rückstände anderer Algenbestandteile aufweisen, die bei der Extraktion nicht vollständig entfernt wurden. So deutet das zusätzliche Signal bei 5,35 ppm in der Probe KC3 (vgl. Abbildung 9.3) auf Rückstände von *Floridean Starch* hin. Bei diesen Polysacchariden handelt es sich um verzweigte  $\alpha$ -D-Glucane, welche als Speicherpolysaccharide in Rotalgen vorkommen (van de Velde *et al.*, 2004).

#### 4.1.2 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung

Ergänzend zu einer Analyse des Carrageentyps mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie kann die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung Aufschluss über das Vorliegen von Carrageenvorläuferstufen liefern. Zur Ermittlung der Monosaccharidzusammensetzung wurde eine reduktive Hydrolyse der Carrageene durchgeführt und die Anteile an Galactose und Anhydrogalactose anschließend mittels HPAEC-PAD bestimmt. Die molaren Anteile an Galactose und Anhydrogalactose (bestimmt über die jeweiligen Zuckeralkohole) sind für die kommerziellen Carrageene Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Die Monosaccharidzusammensetzung der drei  $\kappa$ -Carrageene zeigt nahezu gleiche Anteile an Galactose und Anhydrogalactose, wie für die Idealstruktur eines  $\kappa$ -Carrageens zu erwarten. Dies bestätigt die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, dass es sich bei diesen Proben um reine  $\kappa$ -Carrageene handelt. Für die untersuchten  $\iota$ -Carrageene konnte ein Anteil an Galactose von 69,6 - 74,0 mol% sowie ein Anteil an Anhydrogalactose von 26,0 - 31,1 mol% ermittelt werden. Da diese Carrageene laut NMR-Analyse keine Vorläuferstufen aufweisen und sich auch die Probe IC3,

für die sowohl der  $\kappa$ - als auch  $\iota$ -Typ nachgewiesen wurde, lediglich aus Hauptstufen zusammensetzt, sollten die untersuchten  $\iota$ -Carrageene ungefähr gleiche Anteile an Galactose und Anhydrogalactose aufweisen.

**Tabelle 4.2:** Molare Anteile der Monosaccharide Galactose und Anhydrogalactose (mol%  $\pm$  Range/2, n=2) der kommerziellen Carrageene, bestimmt über eine Analyse der korrespondierenden Zuckeralkohole mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) nach reduktiver Hydrolyse.

Probe	Galactose / mol%	Anhydrogalactose / mol%
KC1	51,2 $\pm$ 0,7	48,8 $\pm$ 0,7
KC2	51,3 $\pm$ 0,2	48,7 $\pm$ 0,2
KC3	51,6 $\pm$ 0,5	48,4 $\pm$ 0,5
FC	39,6 $\pm$ 0,1	60,4 $\pm$ 0,1
IC1	73,8 $\pm$ 0,1	26,2 $\pm$ 0,1
IC2	74,0 $\pm$ 1,2	26,0 $\pm$ 1,2
IC3	69,6 $\pm$ 0,6	30,4 $\pm$ 0,6
IC4	68,9 $\pm$ 0,3	31,1 $\pm$ 0,3
IC5	72,6 $\pm$ 0,4	27,4 $\pm$ 0,4
LC1	76,6 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,1
LC2	56,9 $\pm$ 0,4	43,1 $\pm$ 0,4
LC3	78,8 $\pm$ 0,4	21,2 $\pm$ 0,4
LC4	80,0 $\pm$ 0,1	20,0 $\pm$ 0,1
LC5	69,2 $\pm$ 0,1	30,8 $\pm$ 0,1
LC6	65,4 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 0,1
C1	81,0 $\pm$ 0,6	19,0 $\pm$ 0,6
C2	66,8 $\pm$ 0,4	33,2 $\pm$ 0,4

Anhand der Monosaccharidverteilung der  $\lambda$ -Carrageene kann ebenso wie mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass es sich bei diesen Proben nicht wie vom Hersteller angegeben um reine  $\lambda$ -Carrageene handelt. Wäre dies der Fall, würden die Proben fast ausschließlich Galactose als Monosaccharid aufweisen. In allen kommerziellen  $\lambda$ -Carrageenen konnten jedoch auch Anteile an Anhydrogalactose zwischen 19,0 mol% und 43,1 mol% bestimmt werden. Dies bestätigt den Nachweis von  $\kappa$ - und  $\iota$ -Strukturelementen mittels NMR-Spektroskopie. Die Proben LC2, LC6 und C2, die sich laut NMR-Analyse ausschließlich aus  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten zusammensetzen, sollten dementsprechend einen Anteil an Galactose bzw. Anhydrogalactose von etwa 50 mol% aufweisen. Die ermittelten Anteile an Galactose sind für diese Proben mit 56,9 – 66,8 mol% jedoch höher als erwartet. Die Ergebnisse deuten zudem



darauf hin, dass die molaren Anteile an Galactose umso höher sind, je höher der im Carrageen vorliegende Anteil an  $\iota$ -Strukturelementen ist (vgl. Tabelle 9.2).

Für die Proben LC1, LC3, LC4, LC5 und C1 konnten neben  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten auch Strukturelemente des  $\nu$ -Typs mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Da es sich bei  $\nu$ -Carrageen um die Vorläuferstufe von  $\iota$ -Carrageen handelt, zeichnet sich dieser Carrageentyp durch das fehlende Vorliegen von Anhydrogalactose aus. Entsprechend der Zusammensetzung sollte der Anteil an Galactose für diese Proben in einem Bereich von 60,5 – 65,0 mol% liegen (vgl. Tabelle 9.2). Der Anteil an Galactose, der nach Analyse mittels HPAEC-PAD erhalten wurde, erstreckt sich für die Proben LC1, LC3, LC4, LC5 und C1 über einen Bereich von 69,2 – 81,0 mol% und liegt damit oberhalb des erwarteten Bereichs. Im Gegensatz zu den Proben LC2, LC6 und C2 kann für die Proben mit zusätzlichen  $\nu$ -Einheiten kein Zusammenhang zwischen dem molaren Anteil an Galactose und dem Anteil an  $\iota$ -Strukturelementen festgestellt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die untersuchten Carrageene eine unerwartete Zusammensetzung aufweisen oder ob methodische Schwierigkeiten für die vergleichsweise hohen molaren Anteile an Galactose verantwortlich sind. In der Studie von Jol *et al.* (1999) konnten für ein Carrageen des  $\iota$ -Typs nach reduktiver Hydrolyse gleiche Anteile an Galactose (49 mol%) und Anhydrogalactose (49 mol%) ermittelt werden. Für das untersuchte  $\lambda$ -Carrageen konnte erwartungsgemäß ein hoher Anteil an Galactose (98 mol%) und ein geringer Anteil an Anhydrogalactose (2 mol%) mittels HPAEC-PAD bestimmt werden (Jol *et al.*, 1999). In einer anderen Studie wurden für Carrageene des  $\iota$ - und  $\lambda$ -Typs ähnliche Ergebnisse erhalten (Quemener und Lahaye, 1998). Die Literaturdaten verdeutlichen, dass die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung mittels HPAEC-PAD grundsätzlich für die Untersuchung verschiedener Carrageentypen geeignet ist. Die hohen Anteile an Galactose, die im Rahmen dieser Arbeit sowohl für die verschiedenen  $\iota$ -Carrageene als auch für die Proben LC1 - LC6, C1 und C2 erhalten wurden, müssten jedoch auch mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nachweisbar sein. Daher wird angenommen, dass eine unvollständige Reduktion oder eine Hydrolyse der Anhydrogalactose-Einheiten auftritt. Auch wenn die Durchführung der reduktiven Hydrolyse analog zu der von Jol *et al.* (1999) vorgestellten Methode erfolgte, könnte die Verwendung von unterschiedlichen Chemikalien und Gerätschaften in einer höheren Säurestärke oder Temperatur resultieren, was wiederum eine Hydrolyse der Anhydrogalactose zur Folge haben könnte. Des Weiteren könnte auch eine unvollständige Reduktion der sulfatierten DA-Einheiten zu einem Abbau der säurelabilen Anhydrogruppe führen (Jol *et al.*, 1999). Aufgrund des stabilisierenden

Effekts der Sulfatgruppe an Position O-2 der DA-Einheit (Yang *et al.*, 2009) wäre für den  $\iota$ -Typ auch eine unvollständige Freisetzung von Anhydrogalactose-Einheiten aus dem Polysaccharid als Erklärung für die niedrigen molaren Anteile dieses Monosaccharids denkbar. Die Vermutung, dass die ermittelten hohen molaren Anteile an Galactose auf Limitierungen der Methode zurückzuführen sind, wird durch die absoluten Gehalte der Monosaccharide gestützt, welche Tabelle 9.3 im Anhang zu entnehmen sind. Für einige Proben (z.B. IC4 P2, IC2 P2, LC2 P2) zeigt die ermittelte Konzentration an Galactose eine gute Übereinstimmung mit der ausgehend von der Einwaage erwarteten Konzentration, während der ermittelte Gehalt an Anhydrogalactose den erwarteten Wert unterschreitet. Dies deutet auf eine Hydrolyse der Anhydrogalactose im Zuge der Monosaccharidanalyse hin. Anhand Tabelle 9.3 ist jedoch ebenfalls ersichtlich, dass bei den Carrageenproben IC1, LC1 und LC4 der mittels HPAEC-PAD ermittelte Gehalt an Galactose höher ist als der erwartete Gehalt, was wiederum vermuten lässt, dass die Anhydrogalactose-Einheiten aufgrund einer unvollständigen Reduktion auch teilweise als Galactose erfasst werden. Die anhand des Gehaltes an Monosacchariden, Sulfat und Kationen sowie der Restfeuchte berechneten Summen weisen für die Mehrheit der Proben niedrigere Werte im Vergleich zu den entsprechenden Einwaagen auf. Dies ist einerseits auf das Vorliegen weiterer Bestandteile zurückzuführen, die bei der Berechnung der Summen nicht berücksichtigt wurden (z.B. vorliegende Anionen oder zugesetzte Stoffe wie Glucose und Saccharose). Andererseits kann auch eine unvollständige Freisetzung der Monosaccharide zu der Diskrepanz zwischen den berechneten Summen und den Einwaagen beitragen.

Anhand der Ergebnisse der Monosaccharidanalyse konnten die mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmten Carrageentypen für die untersuchten Proben größtenteils bestätigt werden. So konnte für die Carrageene des  $\kappa$ -Typs gezeigt werden, dass sich diese Proben ausschließlich aus Hauptstufen zusammensetzen. Des Weiteren konnte anhand der Analyse der Monosaccharidverteilung bestätigt werden, dass es sich bei den Proben LC1 - LC6 nicht um reine  $\lambda$ -Carrageene handelt. Aufgrund der beschriebenen methodischen Schwierigkeiten ist die Analyse für Carrageene, die teilweise oder ausschließlich aus  $\iota$ -Einheiten aufgebaut sind, jedoch nur eingeschränkt geeignet.

### 4.1.3 Bestimmung des Molekulargewichts

Im Zuge der strukturellen Charakterisierung der Carrageene wurde neben dem Carrageentyp und der Monosaccharidzusammensetzung ebenfalls das gewichtsmittlere Molekulargewicht  $M_w$  sowie die Polydispersität mittels HPSEC-RI/MALLS bestimmt (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3:** Gewichtsmittleres Molekulargewicht  $M_w$  (kDa  $\pm$  Range/2,  $n=2$ ) und Polydispersität ( $n=2$ ) der kommerziellen Carrageene nach Analyse mittels Hochleistungsgröbenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einem Brechungsindex (RI)-Detektor und einem Mehrwinkellichtstredetektor (MALLS).

<b>Probe</b>	<b><math>M_w</math> / kDa</b>	<b>Polydispersität</b>
KC1	1013 $\pm$ 35	1,9
KC2	965 $\pm$ 23	2,3
KC3	925 $\pm$ 25	1,7
FC	407 $\pm$ 18	2,0
IC1	999 $\pm$ 16	1,9
IC2	621 $\pm$ 25	2,3
IC3	523 $\pm$ 61	1,7
IC4	866 $\pm$ 5	1,8
IC5	915 $\pm$ 3	2,0
LC1	923 $\pm$ 8	2,0
LC2	641 $\pm$ 9	1,8
LC3	1787 $\pm$ 18	2,0
LC4	1499 $\pm$ 2	2,2
LC5	821 $\pm$ 13	1,7
LC6	1081 $\pm$ 26	2,7
C1	1158 $\pm$ 21	2,1
C2	886 $\pm$ 30	2,0

Das niedrigste  $M_w$  mit 407 kDa konnte für die Furcellaranprobe bestimmt werden, während die Probe LC3 mit 1787 kDa das höchste gewichtsmittlere Molekulargewicht aufweist. Die übrigen Carrageene erstrecken sich über einen Molekulargewichtsbereich von 523 - 1499 kDa und liegen damit in einem für Carrageene erwarteten Bereich. In der Literatur finden sich für das gewichtsmittlere Molekulargewicht üblicherweise Werte zwischen 300 kDa und 700 kDa (Lecacheux *et al.*, 1985; Sloomakers *et al.*, 1991; Spichtig und Austin, 2008). Teilweise wurden jedoch auch deutlich höhere  $M_w$  beschrieben, wie beispielsweise 1410 kDa für eine von Spichtig und Austin (2008) analysierte Carrageenprobe. Die Polydispersität der untersuchten Carrageene liegt mit Ausnahme der Probe LC6 (Polydispersitätsindex 2,7) in einem Bereich zwischen 1,7 und 2,3, was auf eine vergleichsweise geringe Breite der Molekulargewichtsverteilung schließen lässt. In der Literatur konnten für die Polydispersität von  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenen vergleichbare Werte ermittelt werden (Sloomakers *et al.*, 1991; Hjerde *et al.*, 1999). Bei einem Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass in Abhängigkeit von der

vorliegenden Konformation der Carrageene sowie der Ionenart des Fließmittels Unterschiede im Molekulargewicht auftreten können (Lecacheux *et al.*, 1985).

#### 4.1.4 Analyse des Sulfatgehalts

Für die Analyse des Sulfatgehalts der Carrageenproben wurden zwei Methoden herangezogen. Neben der Bestimmung mittels HPAEC-CD wurde der Sulfatgehalt auch aus dem mittels ICP-OES bestimmten Schwefelgehalt errechnet. Die Ergebnisse der kommerziellen Carrageene sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

**Tabelle 4.4:** Sulfatgehalt der kommerziellen Carrageene nach Analyse mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektion (CD) (Gew%  $\pm$  Range/2, n=2) sowie nach Analyse mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) (Gew%, n=1).

Probe	HPAEC-CD	ICP-OES
	Sulfatgehalt / Gew%	
KC1	19,4 $\pm$ 0,3	18,1
KC2	17,1 $\pm$ 0,1	16,2
KC3	17,8 $\pm$ 0,1	16,4
FC	14,1 $\pm$ 0,5	13,9
IC1	29,6 $\pm$ 0,3	28,2
IC2	29,3 $\pm$ 0,4	28,8
IC3	22,7 $\pm$ 0,3	21,7
IC4	23,3 $\pm$ 0,9	24,7
IC5	29,5 $\pm$ 0,3	30,1
LC1	29,3 $\pm$ 0,7	29,4
LC2	22,6 $\pm$ 0,1	21,9
LC3	26,9 $\pm$ 0,4	29,7
LC4	31,3 $\pm$ 0,4	35,1
LC5	27,7 $\pm$ 0,4	32,5
LC6	24,0 $\pm$ 0,3	26,7
C1	29,6 $\pm$ 0,1	28,9
C2	17,9 $\pm$ 0,4	17,4

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass anhand beider Analysen vergleichbare Werte erzielt werden können. Für die Carrageene des  $\kappa$ -Typs konnte ein Sulfatgehalt zwischen 17,1 Gew% und 19,4 Gew% nach Analyse mittels HPAEC-CD erhalten werden, die mittels ICP-OES bestimmten Gehalte sind mit 16,2 - 18,1 Gew% etwas niedriger. Die Furcellaranprobe, die aufgrund des

Vorliegens von  $\beta$ -Strukturelementen einen geringeren Sulfatgehalt als die reinen  $\kappa$ -Carrageene aufweisen sollte, zeigt mit 14,1 Gew% (HPAEC-CD) bzw. 13,9 Gew% (ICP-OES) erwartungsgemäß den niedrigsten Sulfatgehalt. Für die untersuchten  $\iota$ -Carrageene liegt der Sulfatgehalt in einem Bereich zwischen 22,7 Gew% und 29,6 Gew%. Da dieser Carrageentyp zwei Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit aufweist und damit eine Sulfatgruppe mehr als der  $\kappa$ -Typ, sind die ermittelten Sulfatgehalte für diese Proben entsprechend höher.

Der für die kommerziellen Carrageenproben ermittelte Sulfatgehalt ist etwas niedriger als die in der Literatur beschriebenen Werte, welche ebenfalls anhand einer Analyse mittels HPAEC-CD erhalten wurden. So konnten beispielsweise Jol *et al.* (1999) für  $\kappa$ -Carrageen einen Sulfatgehalt von 20 Gew% ermitteln, während das in derselben Studie analysierte  $\iota$ -Carrageen einen Gehalt von 33 Gew% aufwies. Dennoch befinden sich die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sulfatgehalte für die meisten Proben in einem vergleichbaren Wertebereich. Die Proben IC3 und IC4 zeigen mit 22,7 Gew% bzw. 23,3 Gew% einen deutlich niedrigeren Gehalt verglichen mit den Literaturdaten. Für die Probe IC3 könnte dies auf das Vorkommen von  $\kappa$ -Einheiten zurückgeführt werden, welche mittels NMR-Spektroskopie festgestellt wurden. Bei Probe IC4 handelt es sich laut  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse hingegen um ein reines  $\iota$ -Carrageen. Da für die Proben IC3 und IC4 ein Zusatz von Glucose bzw. Saccharose mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2 im Anhang), könnte auch dies eine Erklärung für den vergleichsweise niedrigen Sulfatgehalt darstellen.

Für die kommerziellen „ $\lambda$ -Carrageene“ erstrecken sich die mittels HPAEC-CD erhaltenen Werte über einen Bereich von 22,6 - 31,3 Gew%, anhand der ICP-OES konnten Werte zwischen 21,9 Gew% und 35,1 Gew% ermittelt werden. Ein reines  $\lambda$ -Carrageen, welches drei Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit trägt, würde hingegen einen höheren Sulfatgehalt von circa 38 Gew% aufweisen (de Ruiter und Rudolph, 1997). Für die Carrageene LC2, LC6 und C2 konnte bereits mittels  $^1\text{H}$ -NMR gezeigt werden, dass sich diese Proben ausschließlich aus  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten zusammensetzen. Ausgehend von der mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Zusammensetzung sollte sich der Sulfatgehalt in einem Bereich von 23 - 26 Gew% bewegen. Die Proben LC2 und LC6 weisen einen Sulfatgehalt von 22,6 Gew% bzw. 24,0 Gew% (HPAEC-CD) auf und liegen damit innerhalb des erwarteten Bereichs. Für die Probe C2 konnte hingegen ein Sulfatgehalt von 17,9 Gew% (HPAEC-CD) bzw. 17,4 Gew% (ICP-OES) ermittelt werden. Der unerwartet niedrige Sulfatgehalt des Carrageens C2 kann auf das Vorliegen von Saccharose in

dieser Probe zurückgeführt werden, die mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 9.1).

Die Carrageene LC1, LC3, LC4, LC5 und C1 weisen laut  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse neben Strukturelementen des  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typs zusätzlich Einheiten des  $\nu$ -Typs auf. Der Sulfatgehalt, der für diese Proben nach Analyse mittels HPAEC-CD erhalten wurde, erstreckt sich über einen Bereich von 26,9 - 31,3 Gew%. Im Vergleich zu den Proben LC2, LC6 und C2, welche ausschließlich aus  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten zusammengesetzt sind, resultiert das Vorliegen von  $\nu$ -Strukturelementen demnach in einem erhöhten Sulfatgehalt. Da Carrageene des  $\nu$ -Typs drei Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit aufweisen, entspricht dieser Trend den Erwartungen. Ausgehend von der mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Zusammensetzung kann für die Proben LC1, LC3, LC4, LC5 und C1 ein erwarteter Sulfatgehalt abgeschätzt werden. Hierfür wird näherungsweise davon ausgegangen, dass  $\nu$ -Carrageene analog zu  $\lambda$ -Carrageenen einen Sulfatgehalt von circa 38 Gew% aufweisen. Diese Näherung kann erfolgen, da sich Carrageene des  $\nu$ -Typs und des  $\lambda$ -Typs lediglich in der Position der Sulfatgruppe an der G-Einheit unterscheiden. Demnach sollte der Sulfatgehalt der Proben LC1, LC3, LC4, LC5 und C1 zwischen 27 Gew% und 30 Gew% liegen. Der Sulfatgehalt, der für diese Proben nach Analyse mittels HPAEC-CD erhalten wurde (26,9 - 31,3 Gew%), zeigt eine gute Übereinstimmung mit den erwarteten Gehalten.

#### 4.1.5 Analyse des Kationengehalts

Die Art der assoziierten Kationen ist abhängig vom Extraktionsverfahren der Carrageene und beeinflusst die funktionellen Eigenschaften des Endproduktes. Ionenart und -gehalt wurden für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Carrageenproben mittels ICP-OES bestimmt. Die Analyse beschränkte sich dabei auf die am häufigsten vorkommenden Elemente Kalium, Natrium und Calcium. Zusätzlich wurde der Gehalt an Schwefel bestimmt, welcher wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben zur Berechnung des Sulfatgehaltes herangezogen wurde. Die Ergebnisse der Analyse des Kationengehalts mittels ICP-OES sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Für alle untersuchten Carrageene konnte anhand der ICP-OES-Analyse gezeigt werden, dass verschiedene Ionenarten in den Carrageenproben vorliegen. Für die Carrageene des  $\kappa$ -Typs sowie die Furcellaranprobe konnten Kaliumionen als die dominierende Ionenart identifiziert werden (Gehalte zwischen 4,35 – 7,44 g/100 g). Natrium- und Calciumionen sind in diesen Proben nur in geringen Mengen vertreten. Auch für die  $\iota$ -Carrageene konnten hohe Gehalte an Kaliumionen in den Proben nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den  $\kappa$ -Carrageenen zeigen die Carrageene

des  $\iota$ -Typs jedoch eine höhere Variabilität hinsichtlich der vorliegenden Kationentypen. Für die Proben IC1 und IC3 konnten neben Kaliumionen auch hohe Gehalte an Calciumionen (4,00 g/100 g bzw. 2,65 g/100 g) bestimmt werden, während die Probe IC5 einen hohen Gehalt an Natriumionen (4,46 g/100 g) aufweist. Für die Proben IC2 und IC4 liegt hingegen eine Mischung aller untersuchten Kationentypen vor.

**Tabelle 4.5:** Gehalte der Kationen  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  in den kommerziellen Carrageenproben (g/100 g, n=1), bestimmt mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES).

<b>Probe</b>	<b>K<sup>+</sup> / g/100 g</b>	<b>Na<sup>+</sup> / g/100 g</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> / g/100 g</b>
KC1	6,84	0,10	0,82
KC2	7,44	0,08	0,64
KC3	6,81	0,37	0,30
FC	4,35	0,08	0,43
IC1	4,45	0,07	4,00
IC2	4,26	3,15	1,34
IC3	5,71	0,09	2,65
IC4	3,84	1,37	2,96
IC5	5,43	4,46	0,04
LC1	0,98	0,25	5,48
LC2	5,73	0,30	2,33
LC3	1,77	6,12	0,29
LC4	5,36	5,79	0,13
LC5	2,46	6,25	0,26
LC6	1,72	6,59	0,16
C1	1,69	5,58	0,37
C2	4,18	2,39	0,11

Die kommerziellen Carrageene LC3 - LC6 sowie die Probe C1 weisen hohe Gehalte an Natriumionen auf (5,58 – 6,59 g/100 g). Für die Probe LC1 konnte ein hoher Gehalt an Calciumionen festgestellt werden, während die Probe LC2 überwiegend Kaliumionen enthält. Bei der Probe C2 liegt eine Mischung aus Kalium- und Natriumionen vor. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen somit, dass sehr unterschiedliche Bedingungen bei der Herstellung der jeweiligen Carrageene verwendet wurden, was wiederum in einer sehr heterogenen Zusammensetzung resultiert. In der Literatur konnte für verschiedene  $\kappa$ -Carrageene ebenfalls gezeigt werden, dass dieser Carrageentyp überwiegend mit Kaliumionen substituiert vorliegt (Robal *et al.*, 2017). Die in der Studie von Robal *et al.* (2017) untersuchten  $\iota$ -Carrageene wiesen hingegen keinen

einheitlichen Trend hinsichtlich der am Polymer assoziierten Kationen auf, was sich mit den Ergebnissen deckt, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden.

## 4.2 Detaillierte Charakterisierung ausgewählter Carrageene

Zusätzlich zu der bereits beschriebenen Grundcharakterisierung wurde für ausgewählte Proben eine Analyse der Feinstruktur durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein Carrageen des  $\kappa$ -Typs (KC1) sowie ein Carrageen des  $\iota$ -Typs (IC1) verwendet. Bei der Auswahl der Proben wurden aber vor allem auch potentielle Hybridcarrageene mit variierenden Anteilen verschiedener Carrageentypen berücksichtigt. Von diesen potentiellen Hybridcarrageenen wurden drei Proben ausgewählt, in denen mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowohl  $\kappa$ - als auch  $\iota$ -Einheiten nachgewiesen wurden. Während die Proben LC2 und C2 mit 72 % bzw. 59 % einen hohen Anteil an  $\kappa$ -Einheiten zeigen, ist die Probe IC3 mit 72 % überwiegend aus  $\iota$ -Einheiten aufgebaut. Darüber hinaus wurden zwei potentielle Hybridcarrageene (LC1 und C1) ausgewählt, die neben  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten auch Einheiten des  $\nu$ -Typs aufweisen. Das Furcellaran, bei dem es sich um ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridcarrageen handelt, wurde ebenfalls einer detaillierten Charakterisierung unterzogen.

Um mehr Informationen über die Feinstruktur der Hybridcarrageene zu erhalten, wurde eine Methode entwickelt, die auf einer Analyse enzymatisch freigesetzter Carrageen-Oligosaccharide mittels  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenase basiert. Über eine chromatographische Analyse der oligomeren Spaltprodukte kann das Vorliegen von enzymatisch spaltbaren und dadurch längeren  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Abschnitten im Polymer nachgewiesen werden. Dazu erlaubt eine HPSEC-RI-Analyse die Charakterisierung des nicht-hydrolysierten Rückstands sowie eine Einschätzung der Größe der enzymatisch unzugänglichen Abschnitte. In den folgenden Kapiteln wird zunächst die Entwicklung der Methode sowie im Anschluss die Ergebnisse der Charakterisierung für die ausgewählten Carrageene beschrieben.

### 4.2.1 Methodenentwicklung

Im Zuge der Methodenentwicklung mussten zunächst  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenasen rekombinant gewonnen werden, da diese kommerziell nicht erhältlich sind. Anhand einer Literaturrecherche wurden verschiedene Gene ausgewählt, die für carrageenspaltende Enzyme kodieren und für die heterologe Expression der entsprechenden Enzyme genutzt werden sollten. Diese Gene sind Teil des Genoms verschiedener mariner Bakterien wie *Pseudoalteromonas carrageenovora* oder *Zobellia galactanivorans*, welche in der Lage sind, Carrageene als Kohlenhydratquelle zu nutzen



und entsprechend zu verstoffwechseln (Ficko-Blean *et al.*, 2017; Hettle *et al.*, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei  $\kappa$ -Carrageenasen sowie zwei  $\iota$ -Carrageenasen rekombinant gewonnen werden (vgl. Tabelle 4.6), deren Basensequenzen bereits beschrieben wurden. Die  $\kappa$ -Carrageenase Pcar\_0048 aus *Pseudoalteromonas carrageenovora* wurde bereits erfolgreich zur Freisetzung von Oligosacchariden aus einem  $\kappa$ -Carrageen eingesetzt (Lemoine *et al.*, 2009). Für die Carrageenasen Zgal\_236 und Zgal\_4265 aus *Zobellia galactanivorans* konnte gezeigt werden, dass die Gene, die für diese Enzyme kodieren, in Anwesenheit von  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Carrageenen hochreguliert werden. Das Gen, welches für die  $\iota$ -Carrageenase Zgal\_2155 kodiert, wird hingegen in Anwesenheit von D-Galactose verstärkt exprimiert (Ficko-Blean *et al.*, 2017). Eine enzymatische Hydrolyse von Carrageenen mit den Enzymen aus *Zobellia galactanivorans* wurde bisher jedoch nicht durchgeführt.

**Tabelle 4.6:** Genlocus und Kurzbezeichnung der Enzyme aus *Zobellia galactanivorans* und *Pseudoalteromonas carrageenovora*, die mittels heterologer Expression gewonnen werden sollten.

Bakterium	Enzym	Genlocus	Bezeichnung
<i>Zobellia galactanivorans</i>	$\kappa$ -Carrageenase	Zgal_236	$\kappa$ Case1
	$\iota$ -Carrageenase	Zgal_4265	$\iota$ Case1
	$\iota$ -Carrageenase	Zgal_2155	$\iota$ Case2
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	$\kappa$ -Carrageenase	Pcar_0048	$\kappa$ Case2

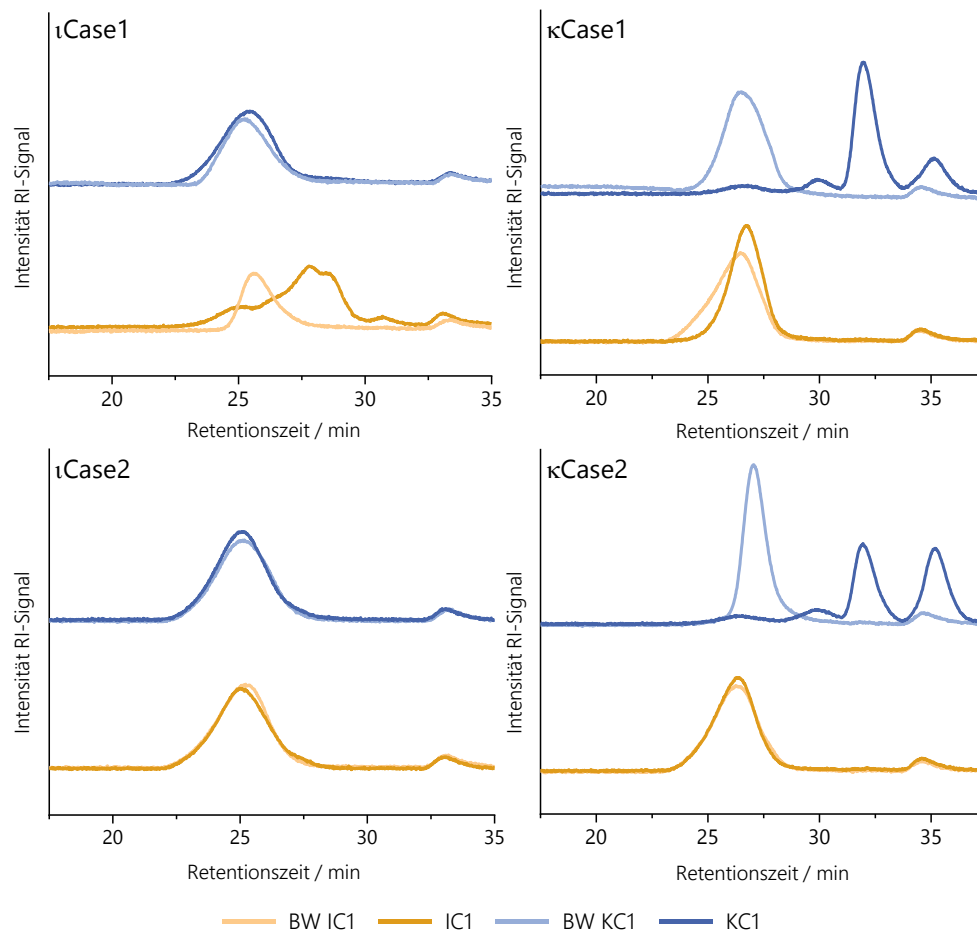
Für die heterologe Expression der Carrageenasen wurden die entsprechenden Gene zunächst aus dem Genom der Bakterien mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden Primer mit entsprechenden LIC-Sequenzen generiert, deren Basensequenzen Tabelle 9.4 im Anhang zu entnehmen sind. Die erfolgreiche Amplifikation der Gene wurde anhand einer Agarosegelelektrophorese überprüft. In allen vier Fällen war eine Bande auf dem Gel ersichtlich, die im erwarteten Größenbereich lag (vgl. Abbildung 9.4 im Anhang). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels der LIC-Methode in den Expressionsvektor pLIC-SGC1 kloniert, welcher zuvor mittels Restriktionsverdau linearisiert wurde. Im Anschluss an die Hybridisierung von Gen und Vektor erfolgte eine Transformation in den *Escherichia coli*-Stamm DH5- $\alpha$ . Nach einer Selektion auf Saccharose-/Ampicillinplatten wurden die Plasmide isoliert und einer Sanger-Sequenzierung unterzogen, um die Basensequenz des eingefügten Gens zu überprüfen. Dies stellt eine notwendige Voraussetzung dar, um Enzyme mit der gewünschten Aktivität zu erzeugen. Anhand der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass in allen vier Fällen ein Plasmid mit der korrekten Gensequenz erhalten wurde. Nach Expression in BL21, Lyse und Aufreinigung konnten jeweils signifikante Mengen rekombinantes Protein gewonnen werden (siehe Tabelle 4.7).

**Tabelle 4.7:** Proteinkonzentrationen (mg/mL, n=1) der Enzymlösungen nach heterologer Expression und Aufreinigung mittels Immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC). Die Analyse des Proteingehaltes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Verwendung von Extinktionsfaktoren, die anhand der Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine vorausgesagt wurden.

<b>Enzym</b>	<b>Proteinkonzentration / mg/mL</b>
κCase1	0,39
κCase2	1,20
ιCase1	1,50
ιCase2	0,70

Um die Enzymaktivität der rekombinant gewonnenen Carrageenasen zu überprüfen, wurde eine enzymatische Hydrolyse von KC1 und IC1 durchgeführt, da es sich bei diesen Proben laut <sup>1</sup>H-NMR-Analyse um reines κ- bzw. ι-Carrageen handelt (vgl. Tabelle 4.1). Für die Hydrolyse wurde eine 0,5 % (w/v) Carrageenlösung bei 37 °C für 24 h mit 50 µL der Enzymlösung inkubiert. Da eine größere Menge an Pufferionen eine im Anschluss durchgeführte chromatographische Trennung der freigesetzten Oligosaccharide stören könnte, wurde die enzymatische Hydrolyse der Proben ausschließlich in Wasser durchgeführt. Der erfolgreiche Abbau der Polysaccharide wurde anhand einer Analyse der Molekulargewichtsverteilung mittels HPSEC-RI überprüft. Hierfür wurden die Proben mit einem Blindwert verglichen, dem bei 95 °C inaktiviertes Enzym zugesetzt wurde. Die Ergebnisse der HPSEC-RI-Analyse nach enzymatischer Hydrolyse sowie der entsprechenden Blindwerte sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

Anhand der Chromatogramme ist ersichtlich, dass die κ-Carrageenasen κCase1 und κCase2 eine Aktivität gegenüber der Probe KC1 aufweisen. So resultierte der enzymatische Verdau im Vergleich zum entsprechenden Blindwert in einem Abbau der früh eluierenden hochmolekularen Carrageene sowie in der Bildung von niedermolekularen Hydrolyseprodukten, welche zu späteren Zeitpunkten eluieren. Bei einer Hydrolyse der Probe IC1 konnte hingegen keine Veränderung im Molekulargewicht detektiert werden. Dies verdeutlicht, dass die Enzyme κCase1 und κCase2 in der Lage sind, selektiv Carrageene des κ-Typs zu spalten. Für die ι-Carrageenase ιCase1 konnte bei Verwendung der Probe IC1 als Substrat eine Freisetzung von niedermolekularen Spaltprodukten festgestellt werden, während in Gegenwart des κ-Carrageens keine Verschiebung der Molekulargewichtsverteilung beobachtet werden konnte. Damit weist auch das Enzym ιCase1 die erwartete Selektivität gegenüber ι-Carrageenen auf. Für die ι-Carrageenase ιCase2 konnte keine Enzymaktivität gegenüber den Proben KC1 und IC1 festgestellt werden.



**Abbildung 4.2:** Chromatogramme der Proben KC1 und IC1 nach enzymatischem Verdau mit den Carrageenasen  $\iota$ Case1,  $\iota$ Case2,  $\kappa$ Case1 und  $\kappa$ Case2. Zum Vergleich sind die Chromatogramme der jeweiligen Blindwerte (BW) gezeigt (Carrageen mit inaktiviertem Enzym). Der Verdau wurde in Wasser durchgeführt und die Molekulargewichtsverteilung mittels HochleistungsgröÙenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einem Brechungsindex (RI)-Detektor analysiert.

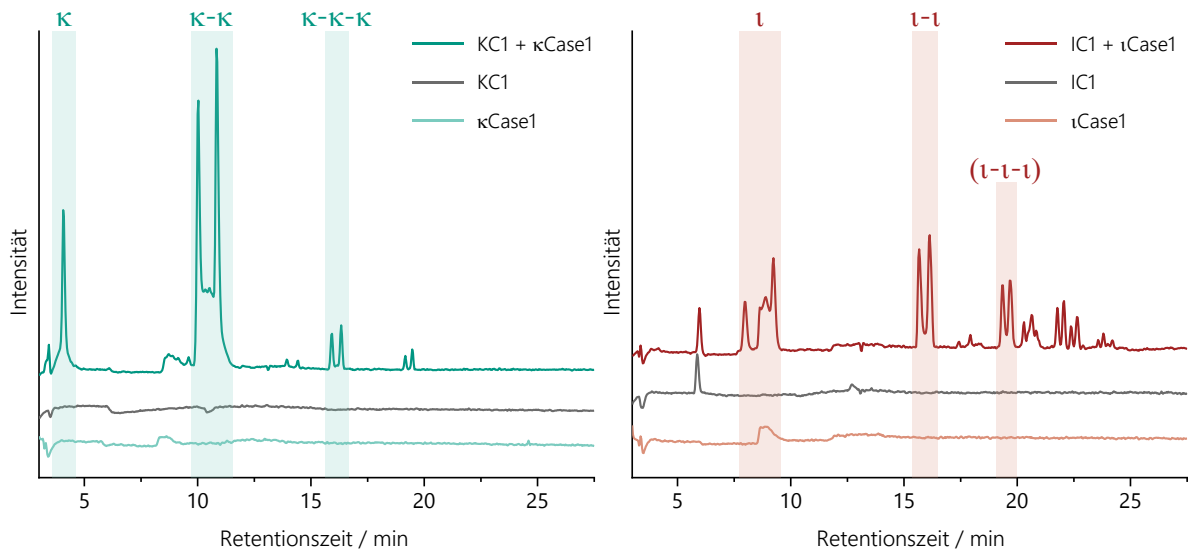
Die chromatographische Trennung der enzymatisch freigesetzten Carrageen-Oligosaccharide wurde mittels HILIC realisiert. Diese Art der Chromatographie wurde unter anderem bereits erfolgreich zur Charakterisierung von uronsäurehaltigen Polysacchariden eingesetzt (Leijdekkers *et al.*, 2011). Für die Analyse der Carrageen-Oligosaccharide wurde als stationäre Phase eine Amid-Säule verwendet. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser gewählt, welches zu Beginn der chromatographischen Trennung einen Anteil an Wasser von 20 % aufweist. Der mobilen Phase wurden zudem 10 mM Ammoniumformiat sowie 0,2 % (v/v) Ameisensäure zugesetzt. Eine Trennung der Oligosaccharide entsprechend ihres DP konnte erreicht werden, indem der Anteil an Wasser während der Laufzeit auf 64 % erhöht wurde. Um eine Identifizierung der Carrageen-Oligosaccharide zu ermöglichen, wurde mittels MS detektiert. Hierfür wurden die Analyten mittels ESI im negativen Modus ionisiert und in einem Single Quadrupol entsprechend ihres  $m/z$  getrennt. Die Analyse wurde im *Full Scan*-Modus durchgeführt und es wurde ein  $m/z$ -Bereich von 250 - 1000 analysiert.

Die entwickelte HILIC-MS-Methode wurde zunächst zur Analyse der im Rahmen der Aktivitätsbestimmung hydrolysierten  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene (KC1 und IC1) verwendet. Anhand dieser Proben konnte eine erfolgreiche Auftrennung der freigesetzten Oligosaccharide demonstriert werden, welche aufgrund einer Aufspaltung der Anomere in Form von Doppelpeaks im *Total Ion Current* (TIC)-Chromatogramm auftreten. Die Identifizierung der Oligosaccharide erfolgte anhand charakteristischer  $m/z$ -Verhältnisse sowie im Fall der  $\kappa$ -Carrabiose und  $\kappa$ -Carratetraose anhand von kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen. Die TIC-Chromatogramme der Proben KC1 und IC1, welche mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 bzw.  $\iota$ Case1 behandelt wurden, sind in Abbildung 4.3 sowie Abbildung 9.9 dargestellt. Die Chromatogramme nach enzymatischer Hydrolyse mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case2 sind in Abbildung 9.5 im Anhang gezeigt. Die Massenspektren der aus den Proben KC1 und IC1 enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide sind Abbildung 9.6, Abbildung 9.7 und Abbildung 9.8 im Anhang zu entnehmen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HPSEC-RI konnte die Selektivität der eingesetzten Carrageenasen auch anhand der HILIC-MS-Analyse bestätigt werden. So konnte für die Probe KC1 nach enzymatischem Verdau mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case1 bzw. für die Probe IC1 nach enzymatischem Verdau mit der  $\iota$ -Carrageenase  $\iota$ Case1 eine Freisetzung von Oligosacchariden nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3). Nach Behandlung der Probe KC1 mit der  $\iota$ -Carrageenase sowie der Probe IC1 mit der  $\kappa$ -Carrageenase konnten hingegen keine enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide detektiert werden (vgl. Abbildung 9.9).

Die enzymatische Behandlung der Probe KC1 mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case1 resultierte in einer Freisetzung von Di- (4,1 min), Tetra- (10,4 min) und Hexasacchariden (16,1 min), wobei letztere eine geringere Signalintensität aufweisen (vgl. Abbildung 4.3). Das Massenspektrum der  $\kappa$ -Carrabiose (4,1 min) zeigt einen Basispeak bei einem  $m/z$  von 403 (siehe Abbildung 9.6), welcher dem Quasimolekülion entspricht und damit eine Identifizierung dieses Oligosaccharids erlaubt. Für  $\kappa$ -Carratetraose (10,4 min) konnten im Spektrum ebenfalls die Ionen  $[M-2H]^{2-}$  und  $[M-H]^{-}$  bei einem  $m/z$  von 394 bzw. 789 identifiziert werden. Das Auftreten des Fragments mit einem  $m/z$  von 709 deutet auf die Abspaltung einer Sulfatgruppe aufgrund von Quellenfragmentierung hin, welche durch einen Massenverlust von 80 gekennzeichnet ist. Dass es innerhalb der ESI-Quelle zu einer Fragmentierung kommt, wird ebenfalls durch das Auftreten des Fragments  $[G4S]^{-}$  ( $m/z$  259) deutlich. Die Identität der  $\kappa$ -Carrahexaose (16,1 min) konnte anhand des Quasimolekülions  $[M-2H]^{2-}$  mit einem  $m/z$  von 587 bestätigt werden. Das Spektrum zeigt zudem das durch die Abspaltung einer Sulfatgruppe entstehende Fragmentation  $m/z = 547$ .

Da die Abspaltung der Sulfatgruppe nicht mit einem Ladungsverlust einhergeht, tritt hierbei lediglich ein Massenverlust von 40 auf. Daneben weist das Massenspektrum der  $\kappa$ -Carrahexaose Fragmente mit einem  $m/z$  von 403 und 385 auf, welche auf die Abspaltung eines Disaccharids in der Quelle hindeuten. Das TIC-Chromatogramm der Probe KC1 zeigt darüber hinaus einen weiteren Peak bei 19,3 min mit einer vergleichsweise geringen Intensität, der jedoch nicht eindeutig einem  $\kappa$ -Carrageen-Oligosaccharid zugeordnet werden konnte.



**Abbildung 4.3:** Total Ion Current (TIC)-Chromatogramm der Probe KC1 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case1 (links) sowie der Probe IC1 nach Behandlung mit der  $\iota$ -Carrageenase  $\iota$ Case1 (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.

Das Chromatogramm für die Probe KC1, welche mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case2 enzymatisch hydrolysiert wurde und in Abbildung 9.5 im Anhang dargestellt ist, zeigt eine vergleichbare Freisetzung von Oligosacchariden wie nach Behandlung mit  $\kappa$ Case1. Auch für  $\kappa$ Case2 resultierte der enzymatische Verdau der Probe KC1 in der Freisetzung von  $\kappa$ -Carrabiose (4,0 min),  $\kappa$ -Carratetraose (10,4 min) und  $\kappa$ -Carrahexaose (16,0 min). Die Massenspektren der Oligosaccharide stimmen weitestgehend mit den Spektren nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 überein und sind Abbildung 9.8 im Anhang zu entnehmen. Ein Vergleich der Chromatogramme beider  $\kappa$ -Carrageenasen zeigt, dass bei dem Einsatz von  $\kappa$ Case2 ein zusätzlicher Peak bei 17,8 min auftritt, welcher jedoch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Da anhand der Probe KC1 gezeigt werden konnte, dass die enzymatische Hydrolyse für beide  $\kappa$ -Carrageenasen vergleichbar ist, wurde für die detaillierte Charakterisierung der potentiellen Hybridcarrageene lediglich das Enzym  $\kappa$ Case1 verwendet.

Anhand des TIC-Chromatogramms der Probe IC1 (siehe Abbildung 4.3) zeigt sich, dass die enzymatische Hydrolyse dieses Carrageens mit der  $\iota$ -Carrageenase  $\iota$ Case1 zur Freisetzung einer höheren Vielfalt an Oligosacchariden führt, was sich in einer höheren Anzahl an Peaks im Chromatogramm widerspiegelt. Von den freigesetzten  $\iota$ -Carrageen-Oligosacchariden konnten ebenfalls das Di- (8,6 min) und Tetrasaccharid (15,9 min) identifiziert werden. Diese eluieren im Vergleich zu den entsprechenden  $\kappa$ -Carrageen-Oligosacchariden aufgrund der zusätzlichen Sulfatgruppe an der DA-Einheit zu späteren Retentionszeiten. Das Massenspektrum (vgl. Abbildung 9.7) von  $\iota$ -Carrabiose (8,6 min) weist sowohl das Quasimolekülion  $[M-H]^-$  als auch das Natriumaddukt  $[M-2H+Na]^-$  mit einem  $m/z$  von 483 bzw. 505 auf, was eine eindeutige Identifizierung ermöglicht. Zudem kann auch für dieses Oligomer eine Abspaltung von Sulfat durch Auftreten des Fragments  $m/z$  403 festgestellt werden. Die Zuordnung der  $\iota$ -Carratetraose (15,9 min) kann anhand des Quasimolekülions  $[M-2H]^{2-}$  ( $m/z$  474) erfolgen. Darüber hinaus zeigt das Massenspektrum eine sukzessive Abspaltung von Sulfatgruppen, die anhand der Fragmente mit einem  $m/z$  von 434 und 394 deutlich wird. Das Fragment mit einem  $m/z$  von 709, welches nach Abspaltung von drei Sulfatgruppen aus der  $\iota$ -Carratetraose resultiert, ist ebenfalls im Spektrum sichtbar.

Bei dem Oligosaccharid, welches eine Retentionszeit von 19,5 min aufweist, könnte es sich entsprechend der Elutionsreihenfolge um ein  $\iota$ -Hexasaccharid handeln. Das Quasimolekülion der  $\iota$ -Carrhexaose konnte allerdings nicht detektiert werden (vgl. Abbildung 9.7). Dies legt die Vermutung nahe, dass ab einer gewissen Anzahl an Sulfatgruppen die Wahrscheinlichkeit einer Abspaltung in der ESI-Quelle so hoch wird, dass das intakte Molekülion nicht mehr detektiert werden kann. Das im Massenspektrum des Oligosaccharids auftretende Fragment mit einem  $m/z$  von 627 kann dem Quasimolekülion  $[M-2H]^{2-}$  eines Hexamers aus einer  $\iota$ - und zwei  $\kappa$ -Disaccharideinheiten zugeordnet werden. Das Spektrum weist zudem ein Fragmention mit einem  $m/z$  von 587 auf, welches ausgehend von  $m/z = 627$  durch Abspaltung einer Sulfatgruppe entsteht. Eine weitere Abspaltung von Sulfat resultiert in dem Fragment mit einem  $m/z$  von 547, welches den Basispeak des Massenspektrums darstellt. Das Natrium-Addukt des Hexasaccharids aus einer  $\iota$ - und zwei  $\kappa$ -Disaccharideinheiten  $[M-4H+2Na]^{2-}$  mit einem  $m/z$  von 650 ist ebenfalls im Spektrum sichtbar. Anhand der identifizierten Fragmente im Massenspektrum könnte vermutet werden, dass die Probe IC1 neben Strukturelementen des  $\iota$ -Typs ebenfalls Einheiten des  $\kappa$ - oder  $\beta$ -Typs im Polymer aufweist. Dies hätte anhand einer Analyse mittels NMR-Spektroskopie jedoch nachweisbar sein müssen. Da mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse gezeigt werden konnte, dass sich

die Probe IC1 ausschließlich aus Einheiten des  $\iota$ -Typs zusammensetzt (vgl. Tabelle 4.1), kann angenommen werden, dass die im Massenspektrum auftretenden Fragmente durch eine Quellenfragmentierung entstanden sind. Aufgrund der Zusammensetzung der Probe sowie des Auftretens mehrerer Fragmente mit einem DP von 6 handelt es sich bei dem Oligosaccharid mit einer Retentionszeit von 19,5 min demnach sehr wahrscheinlich um  $\iota$ -Carrahexaose.

Anhand des TIC-Chromatogramms ist zudem ersichtlich, dass es in einem Retentionszeitbereich von 20,1 - 21,0 min zu einer Coelution zweier Doppelpeaks kommt, die anhand der verwendeten Methode nicht ausreichend getrennt wurden. Daneben zeigt die mittels  $\iota$ Case1 verdaute Probe IC1 zwei weitere Peaks bei 21,9 min und 22,5 min, die jedoch nicht identifiziert werden konnten. Da das Vorliegen größerer Anteile von Strukturelementen anderer Carrageentypen aufgrund der Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Analyse unwahrscheinlich ist, könnte es sich bei diesen Oligosacchariden um höhere Oligomere des  $\iota$ -Typs mit einem DP > 6 handeln.

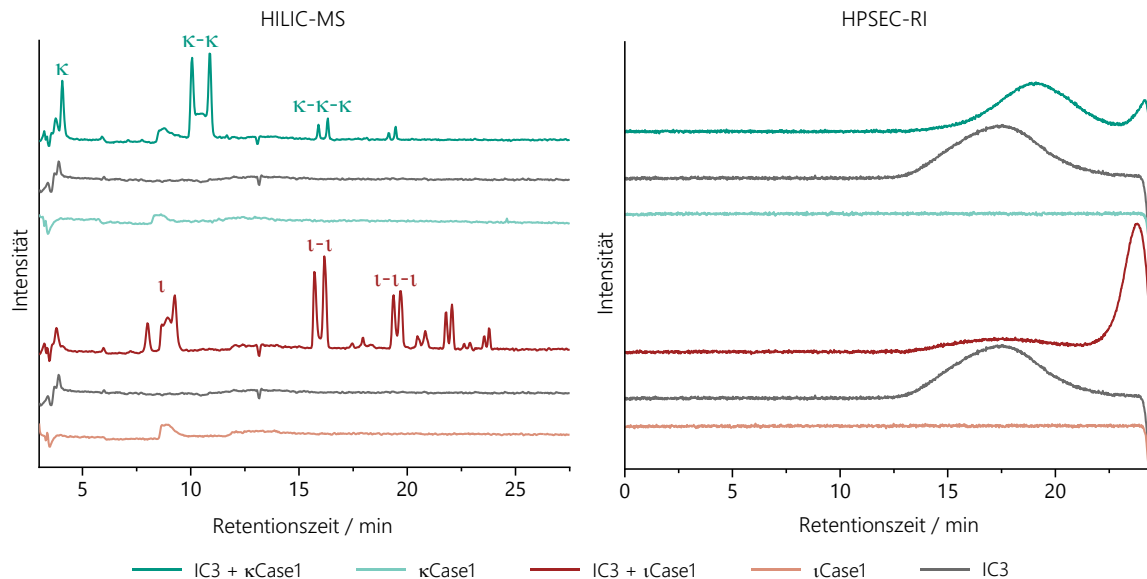
Die Ergebnisse der HILIC-MS-Analyse für ein reines  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen nach enzymatischer Hydrolyse mit einer  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Carrageenase zeigen, dass die chromatographische Methode geeignet ist, um die freigesetzten Oligosaccharide entsprechend ihres DP aufzutrennen. In Kombination mit MS können zudem Oligosaccharide bis zu einem DP von 6 erfolgreich zugeordnet werden. Eine Identifizierung höherer Oligomere stellt jedoch eine Herausforderung unter den verwendeten Bedingungen dar. Aufgrund starker Quellenfragmentierung kommt es zu einer Abspaltung von Sulfatgruppen sowie zu einer Spaltung der glykosidischen Bindungen in der ESI-Quelle. Dies resultiert in einer hohen Anzahl an Fragmenten mit unterschiedlichen Mehrfachladungen, weshalb keine eindeutige Aussage über die Art und den DP des Oligosaccharids getroffen werden kann. Das Auftreten einer Fragmentierung während der MS-Analyse ist besonders im Hinblick auf die Charakterisierung von Hybridcarrageenen problematisch. Bei den aus Hybridcarrageenen freigesetzten Oligosacchariden stellt die Sulfatgruppe den entscheidenden strukturellen Unterschied dar. Da die entsprechenden Quasimoleküle auch über Quellenfragmentierung entstehen könnten, ist eine eindeutige Identifizierung nicht möglich. Um Oligosaccharide aus Hybridcarrageenen und Oligosaccharide mit einem höheren DP mittels MS zu charakterisieren, könnten alternative Ionisierungstechniken verwendet werden, wie beispielsweise die *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI). Diese wurde in Kombination mit einem Flugzeitanalysator in der Literatur schon erfolgreich zur Charakterisierung von Carrageen-Oligosacchariden eingesetzt (Fatema *et al.*, 2010; Anastyuk *et al.*, 2011).

## 4.2.2 Anwendung der Methode auf ausgewählte Hybridcarrageene

Die ermittelten Bedingungen wurden schließlich genutzt, um die zuvor ausgewählten Carrageene IC3, LC1, LC2, C1 und C2 sowie das Furcellaran im Detail zu charakterisieren. Diese Proben wurden jeweils mit  $\kappa$ Case1 und  $\iota$ Case1 in einem separaten Ansatz behandelt und nach der enzymatischen Hydrolyse mittels HILIC-MS und HPSEC-RI analysiert.

Das Chromatogramm der Probe IC3 nach enzymatischer Hydrolyse mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 und einer Analyse mittels HILIC-MS, welches in Abbildung 4.4 dargestellt ist, zeigt eine Freisetzung von Oligosacchariden des  $\kappa$ -Typs mit einem DP von 2, 4 und 6. Diese wurden ebenfalls nach einer enzymatischen Hydrolyse der Probe KC1 erhalten und konnten in der Probe IC3 aufgrund übereinstimmender Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert werden. Wie das Carrageen KC1 weist auch die Probe IC3 einen Doppelpeak bei 19,3 min auf. Anhand einer Analyse mittels HPSEC-RI konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von  $\kappa$ -Carrageen-Oligosacchariden mit einer leichten Verringerung des Molekulargewichts einhergeht, welche anhand einer Verschiebung des Probenpeaks zu höheren Retentionszeiten ersichtlich ist. Der Einsatz der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) resultierte hingegen in einer deutlichen Reduktion des Molekulargewichts. Zudem konnte ein hoher Anteil an Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht mittels HPSEC-RI nachgewiesen werden. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der HILIC-MS-Analyse wider. So konnte für die Probe IC3 nach Verdau mit dem Enzym  $\iota$ Case1 eine Freisetzung von Oligosacchariden des  $\iota$ -Typs festgestellt werden. Neben  $\iota$ -Carrabiose,  $\iota$ -Carratetraose und  $\iota$ -Carrahexaose konnten ähnlich wie für Probe IC1 nicht näher identifizierbare Peaks bei 21,9 min und 23,7 min nachgewiesen werden. Abweichend zum reinen  $\iota$ -Carrageen weist die untersuchte Probe bei einer Retentionszeit von 22,7 min einen Doppelpeak auf, der nicht mit dem Peak der Probe IC1 bei 22,5 min übereinstimmt und auf ein Hybridoligosaccharid hindeuten könnte. Das Massenspektrum dieses Oligosaccharids ist in Abbildung 9.10 im Anhang dargestellt. Allerdings konnte auch dieses Oligosaccharid nicht eindeutig identifiziert werden.



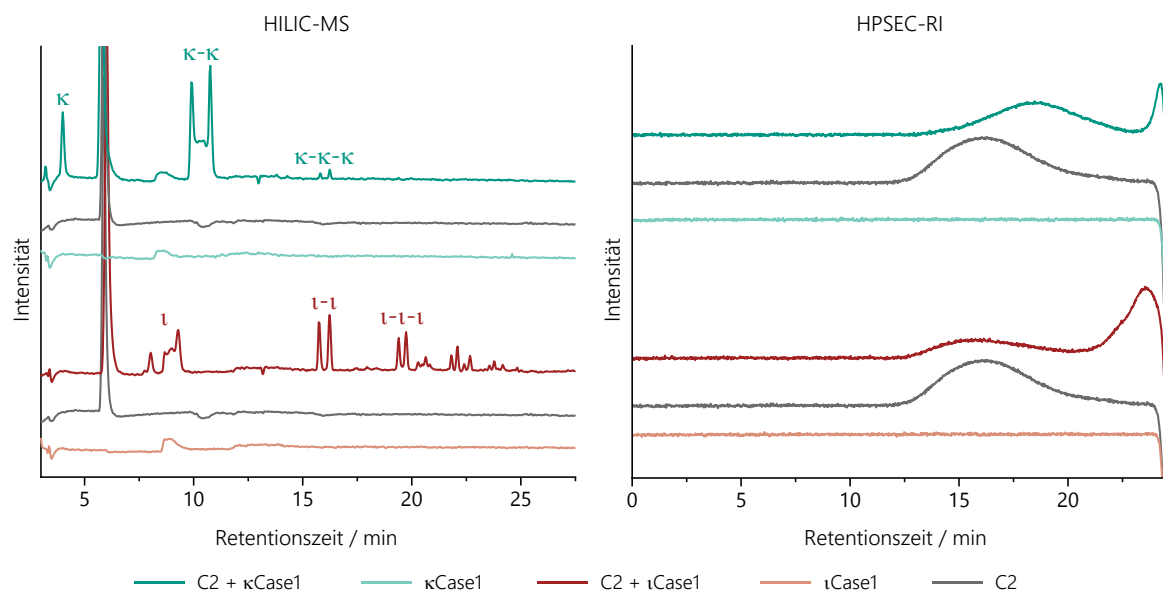


**Abbildung 4.4:** Chromatogramme der Probe IC3 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) beziehungsweise der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) und einer Analyse mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) im Negativmodus (links) sowie nach einer Analyse mittels Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einer Brechungsindex (RI)-Detektion (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzym Lösungen. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.

Anhand der Enzymaktivität der Carrageenasen und den entsprechenden Veränderungen im Molekulargewicht können Rückschlüsse auf die Verteilung der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten im Polymer gezogen werden, die für die Probe IC3 laut NMR-Analyse in Anteilen von 27 % bzw. 73 % enthalten sind. Die Freisetzung von  $\iota$ -Carrageen-Oligosacchariden in Verbindung mit einer deutlichen Reduktion des Molekulargewichts nach enzymatischem Verdau mit  $\iota$ Case1 deutet darauf hin, dass die Strukturelemente des  $\iota$ -Typs lange Blöcke innerhalb des Polymers bilden. Die nach enzymatischer Hydrolyse nachweisbaren unverdauten Anteile, welche eine breite Molekulargewichtsverteilung zeigen, könnten auf längere Abschnitte aus alternierenden Disaccharideinheiten des  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typs bzw. auf kurze alternierende Blöcke von  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten hindeuten. Aufgrund der geringen Veränderung des Molekulargewichts nach Einsatz der  $\kappa$ -Carrageenase kann zudem vermutet werden, dass aufeinanderfolgende  $\kappa$ -Einheiten lediglich in kürzeren Blöcken auftreten. Durch den Einsatz selektiver Enzyme und einer Analyse der freigesetzten Oligosaccharide sowie des unverdauten Rückstands konnte für die Probe IC3 das Vorliegen eines  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageens bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Analyse für Probe C2 (59 %  $\kappa$ , 41 %  $\iota$ ) zeigen eine hohe Ähnlichkeit mit den Ergebnissen der Probe IC3 und sind Abbildung 4.5 zu entnehmen. Für das Carrageen C2 konnte nach enzymatischer Hydrolyse mittels  $\kappa$ Case1 eine Freisetzung von  $\kappa$ -Carrabiose,  $\kappa$ -Carratetraose und  $\kappa$ -Carrahexaose festgestellt werden. Anhand der Ergebnisse der HPSEC-RI-Analyse ist

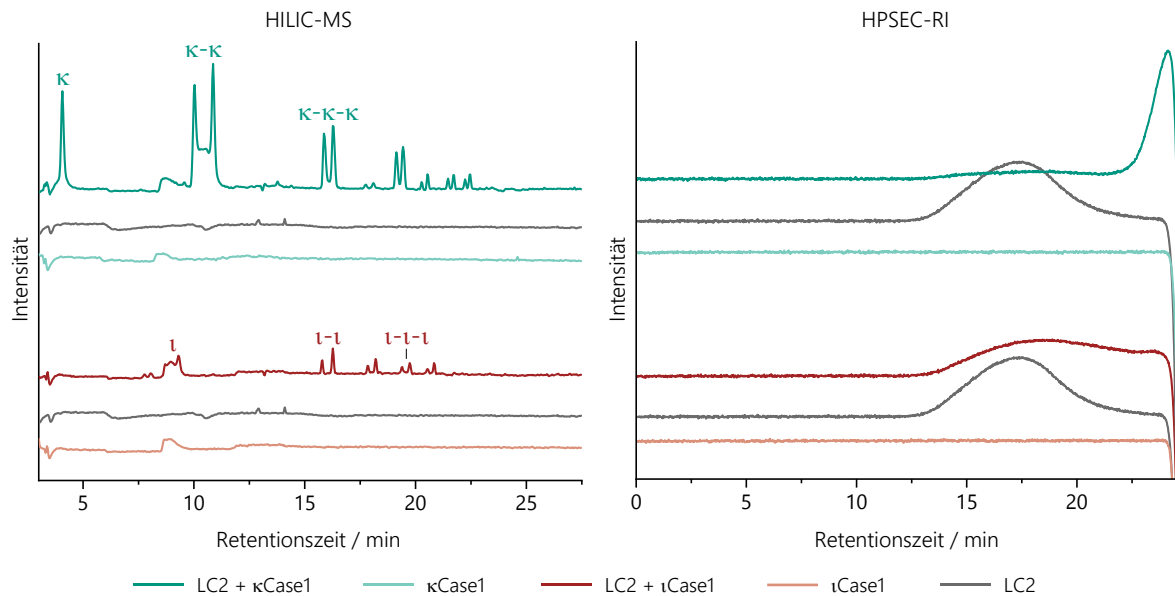
ebenfalls eine Freisetzung von niedermolekularen Verbindungen ersichtlich sowie eine leichte Verringerung des Molekulargewichts. Nach einer Behandlung des Carrageens C2 mit der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) konnten ebenfalls niedermolekulare Verbindungen mittels HPSEC-RI sowie  $\iota$ -Carrageen-Oligosaccharide mittels HILIC-MS nachgewiesen werden. Das erhaltene Oligosaccharidprofil stimmt dabei weitgehend mit den Ergebnissen überein, die für reines  $\iota$ -Carrageen (IC1) nach Behandlung mit  $\iota$ Case1 erhalten wurden. Die enzymatische Freisetzung von  $\iota$ -Carrageen-Oligosacchariden geht zudem mit einer deutlichen Verringerung des Molekulargewichts einher. Verglichen mit der Probe IC3 weisen die niedermolekularen Verbindungen, die nach enzymatischer Hydrolyse mittels  $\iota$ -Carrageenase aus dem Carrageen C2 freigesetzt wurden, eine niedrigere Intensität auf, was auf einen niedrigeren Anteil an  $\iota$ -Einheiten (C2: 41 %  $\iota$ , IC3: 73 %  $\iota$ ) zurückgeführt werden kann. Die durch die  $\kappa$ -Carrageenase freigesetzten niedermolekularen Hydrolyseprodukte zeigen hingegen eine höhere Intensität. Anhand der Ergebnisse der Analysen kann für das Carrageen C2 davon ausgegangen werden, dass es sich ebenfalls um ein  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageen handelt, welches aus längeren Abschnitten von  $\iota$ -Einheiten und vergleichsweise kurzen Blöcken von  $\kappa$ -Einheiten aufgebaut ist.



**Abbildung 4.5:** Chromatogramme der Probe C2 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) beziehungsweise der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) und einer Analyse mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) im Negativmodus (links) sowie nach einer Analyse mittels HochleistungsgröBenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einer Brechungsindex (RI)-Detektion (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.

Für die Probe LC2, die laut NMR-Analyse 72 %  $\kappa$ - und 28 %  $\iota$ -Einheiten aufweist, resultierte die Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) in einer Freisetzung von Oligosacchariden des

$\kappa$ -Typs sowie einem deutlichen Abbau des Polysaccharids (siehe Abbildung 4.6). Nach enzymatischer Hydrolyse mittels  $\kappa$ Case1 konnten  $\kappa$ -Carrabiose,  $\kappa$ -Carratetraose und  $\kappa$ -Carrahexaose nachgewiesen werden. Im Vergleich zu KC1 zeigt die Probe LC2 jedoch bei einer Retentionszeit von 17,9 min, 20,4 min, 21,6 min und 22,3 min weitere Peaks mit einer vergleichsweise geringen Intensität. Bei den jeweiligen Spaltprodukten könnte es sich um  $\kappa$ -Oligomere mit eingestreuten  $\iota$ -Einheiten handeln. Die in Abbildung 9.11 gezeigten Massenspektren der Oligosaccharide erlaubten jedoch keine eindeutige Zuordnung.

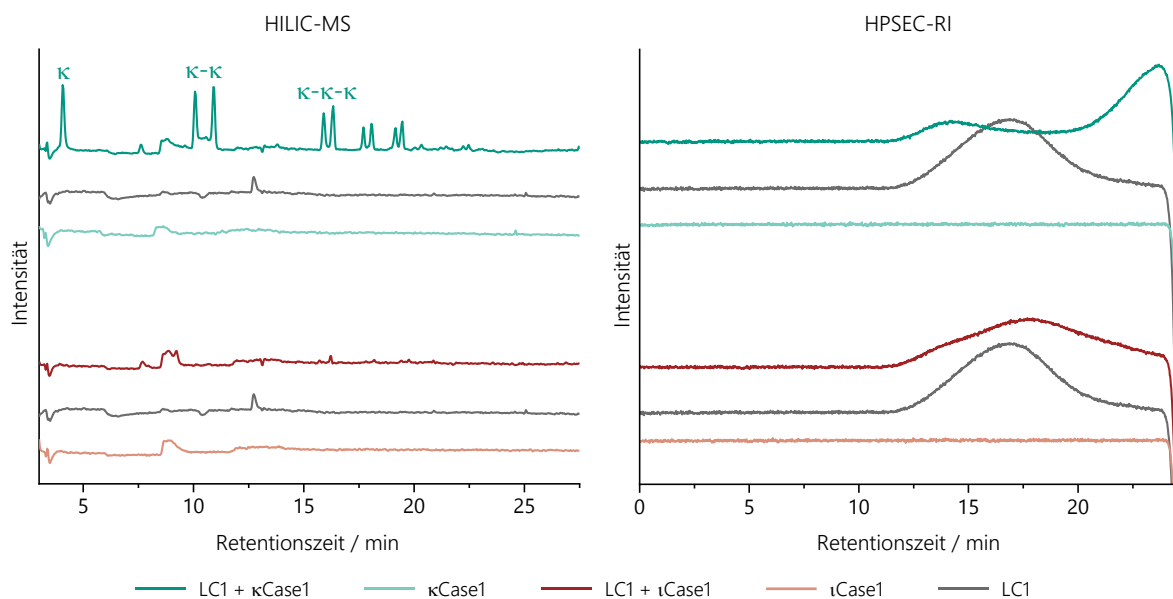


**Abbildung 4.6:** Chromatogramme der Probe LC2 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) beziehungsweise der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) und einer Analyse mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) im Negativmodus (links) sowie nach einer Analyse mittels HochleistungsgröÙenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einer Brechungsindex (RI)-Detektion (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.

Das HPSEC-Chromatogramm der Probe LC2 nach enzymatischer Hydrolyse mittels  $\iota$ Case1 zeigt hingegen nur Spuren von niedermolekularen Hydrolyseprodukten. Zudem konnten auch mittels HILIC-MS nur geringe Mengen an freigesetzten  $\iota$ -Carrageen-Oligosacchariden nachgewiesen werden. Neben den Oligosacchariden, die nach enzymatischer Hydrolyse des reinen  $\iota$ -Carrageens bereits beschrieben wurden, zeigt das Chromatogramm der Probe LC2 einen Peak bei 18,0 min, dessen Massenspektrum Abbildung 9.12 im Anhang zu entnehmen ist. Da sich das Oligomer von der Elutionsreihenfolge zwischen der  $\kappa$ - (16,1 min) und der  $\iota$ -Carrahexaose (19,5 min) befindet, könnte es sich möglicherweise um ein  $\kappa$ -/ $\iota$ -Hexasaccharid handeln. Anhand der Ergebnisse der Analyse mittels HILIC-MS und HPSEC-RI kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Carrageen LC2 um ein  $\kappa$ -/ $\iota$ -Hybridcarrageen handelt, das aus langen Blöcken

aufeinanderfolgender  $\kappa$ -Struktureinheiten aufgebaut ist, während die  $\iota$ -Strukturelemente vereinzelt oder in kurzen Blöcken vorliegen.

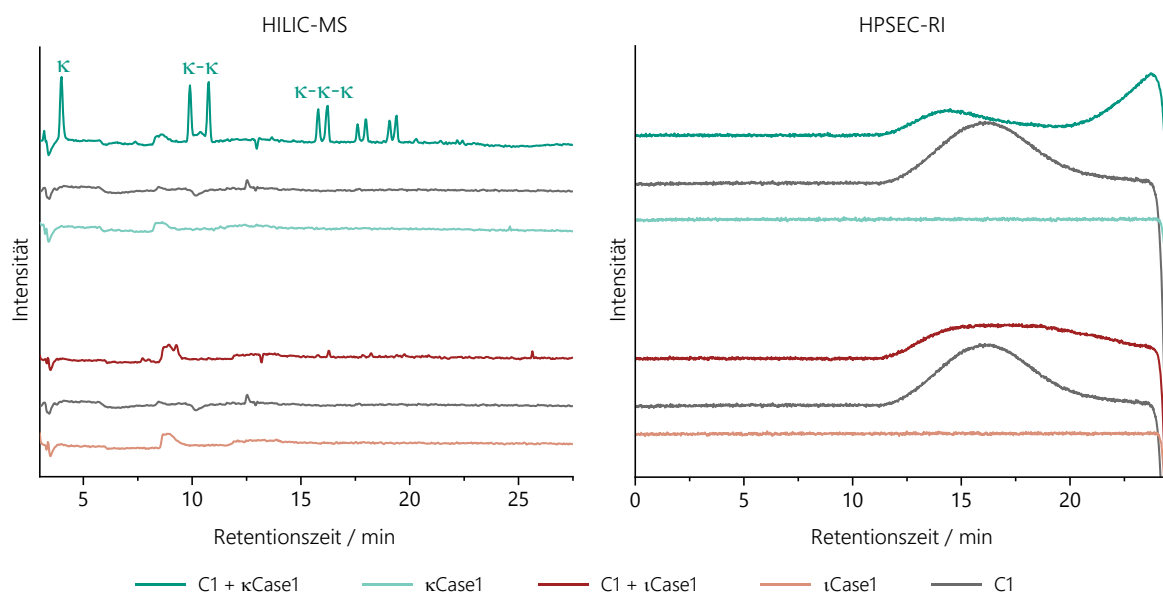
Die HILIC-MS- und HPSEC-RI-Chromatogramme der Proben LC1 und C1, für die neben  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten auch Strukturelemente des  $\nu$ -Typs nachgewiesen wurden, sind in Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8 gezeigt. Bei beiden Proben konnte keine Freisetzung von Oligosacchariden durch die  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) mittels HILIC-MS nachgewiesen werden. Die Chromatogramme der HPSEC-Analyse zeigen nur leichte Veränderungen in der Molekulargewichtsverteilung und es konnten ebenfalls keine niedermolekularen Spaltprodukte nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die  $\iota$ -Einheiten nicht in ausreichend langen Abschnitten vorliegen, um eine enzymatische Spaltung der glykosidischen Bindungen zu ermöglichen. So konnte beispielsweise für die  $\iota$ -Carrageenase aus *Alteromonas fortis* bereits gezeigt werden, dass mindestens vier aufeinanderfolgende Disaccharideinheiten des  $\iota$ -Typs vorliegen müssen, um eine Spaltung zu katalysieren (Jouanneau *et al.*, 2010a).



**Abbildung 4.7:** Chromatogramme der Probe LC1 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) beziehungsweise der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) und einer Analyse mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) im Negativmodus (links) sowie nach einer Analyse mittels HochleistungsgröÙenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einer Brechungsindex (RI)-Detektion (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.

Beim Einsatz der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) zeigten die Ergebnisse der HPSEC-RI hingegen eine deutliche Verringerung des Molekulargewichts, was darauf hindeutet, dass  $\kappa$ -Strukturelemente in längeren Abschnitten innerhalb des Polymers vorkommen. Neben  $\kappa$ -Carrabiose,  $\kappa$ -Carratetraose und  $\kappa$ -Carrahexaose konnte ein weiteres  $\kappa$ -Carrageen-Oligosaccharid mittels HILIC-MS

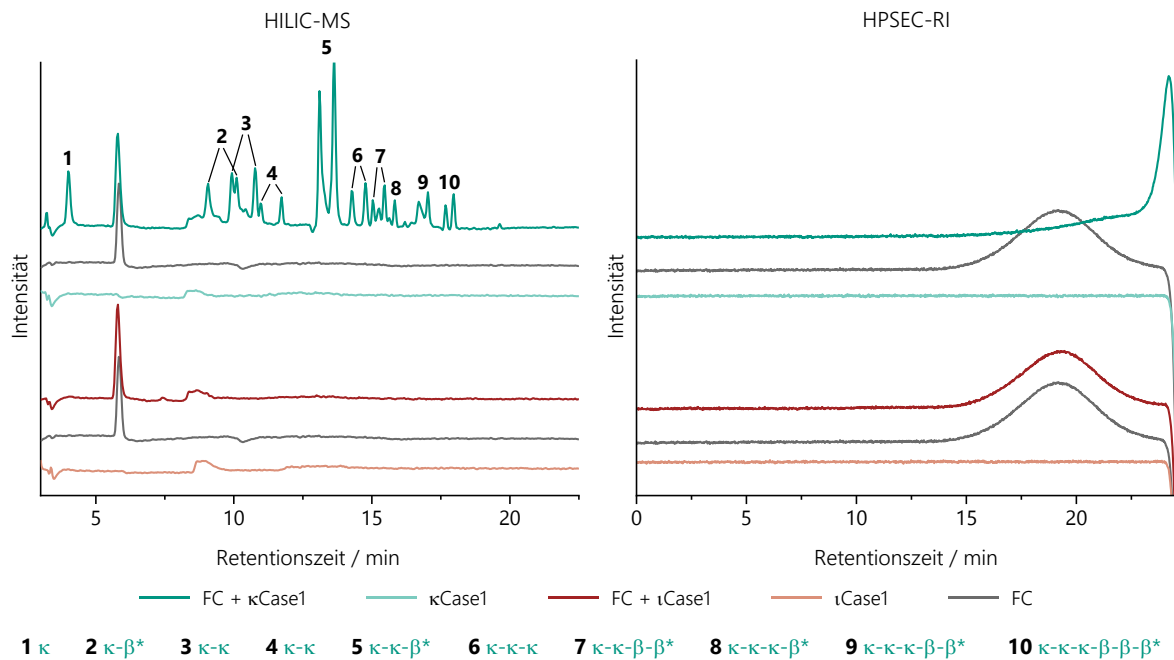
nachgewiesen werden, welches eine Retentionszeit von 17,9 min aufweist. Bei diesem könnte es sich um ein Oligomer mit eingestreuten  $\iota$ - oder  $\nu$ -Einheiten handeln, eine Identifizierung war jedoch nicht zweifelsfrei möglich. Das Massenspektrum dieses Oligosaccharids ist Abbildung 9.13 bzw. Abbildung 9.14 im Anhang zu entnehmen. Der unverdaute Rückstand, der nach Behandlung der Proben LC1 und C1 mittels  $\kappa$ -Carrageenase in den HPSEC-Chromatogrammen ersichtlich ist, deutet darauf hin, dass die in längeren Blöcken angeordneten  $\kappa$ -Strukturelemente durch kurze Abschnitte von  $\iota$ - und  $\nu$ -Einheiten unterbrochen werden. Ausgehend von den Ergebnissen, die für die Proben LC1 und C1 erhalten wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich in beiden Fällen ebenfalls um Hybridcarrageene handelt.



**Abbildung 4.8:** Chromatogramme der Probe C1 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) beziehungsweise der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) und einer Analyse mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) im Negativmodus (links) sowie nach einer Analyse mittels HochleistungsgröÙenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einer Brechungsindex (RI)-Detektion (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.

Die Ergebnisse der detaillierten Charakterisierung des Furcellarans sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Anhand des TIC-Chromatogramms ist ersichtlich, dass die enzymatische Hydrolyse des Furcellarans mit der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) nicht in einer Freisetzung von Oligosacchariden resultierte. Ebenso konnten keine Veränderungen in der Molekulargewichtsverteilung nach Behandlung mit  $\iota$ Case1 festgestellt werden. Dies entspricht den Erwartungen, da es sich bei Furcellaran um ein  $\kappa$ - $\beta$ -Hybridcarrageen handeln sollte und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie auch keine Strukturelemente des  $\iota$ -Typs in der Probe nachgewiesen wurden (vgl. Tabelle 4.1). Nach enzymatischem Verdau des Furcellarans mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) konnte hingegen eine

deutliche Freisetzung von Oligosacchariden mittels HILIC-MS festgestellt werden. Im Vergleich zu anderen Hybridcarrageenen sowie der Probe KC1 zeigt das TIC-Chromatogramm der Furcellaranprobe nach Verdau mit  $\kappa$ Case1 eine deutlich höhere Anzahl an Peaks, was auf eine höhere Vielfalt der freigesetzten Oligosaccharide hindeutet. Darüber hinaus geht die enzymatische Hydrolyse mittels  $\kappa$ -Carrageenase mit einer deutlichen Verringerung des Molekulargewichts einher.



**Abbildung 4.9:** Chromatogramme der Probe FC nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ Case1) beziehungsweise der  $\iota$ -Carrageenase ( $\iota$ Case1) und einer Analyse mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) im Negativmodus (links) sowie nach einer Analyse mittels HochleistungsgröÙenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einer Brechungsindex (RI)-Detektion (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps angegeben, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert. \*Die Anordnung der verschiedenen Strukturelemente innerhalb eines Oligosaccharids kann anhand dieser Analyse nicht bestimmt werden und ist beispielhaft dargestellt.

Der enzymatische Verdau der Furcellaranprobe mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 resultierte unter anderem in der Freisetzung von  $\kappa$ -Carrabiose, welche eine Retentionszeit von 4,0 min aufweist. Die Oligosaccharide bei einer Retentionszeit von 10,4 min sowie 11,4 min zeigen sehr ähnliche Massenspektren (siehe Abbildung 9.15), welche anhand der auftretenden Fragmente der  $\kappa$ -Carratetraose zugeordnet werden können. Unterschiede zwischen beiden Spektren sind hinsichtlich der auftretenden Addukte sowie der Intensität der Fragmente 709, 789 und 834 erkennbar. Das Fragmentation mit einem  $m/z$  von 834 konnte allerdings nicht eindeutig zugeordnet werden. Weiterhin konnte die  $\kappa$ -Carrahexaose ( $m/z = 587$ ) identifiziert werden, welche mit einer Retentionszeit von 14,6 min jedoch früher eluiert als nach enzymatischer Hydrolyse der Probe KC1 (16,1 min). Das Massenspektrum der  $\kappa$ -Carrahexaose, welches für die Furcellaranprobe nach

enzymatischer Hydrolyse mittels  $\kappa$ Case1 erhalten wurde, zeigt weniger Fragmentationen verglichen mit dem Massenspektrum der Probe KC1. Zudem weisen die Spektren Unterschiede in der Intensität der auftretenden Fragmentationen auf. Gemeinsam mit der Verschiebung der Retentionszeit könnte dies auf Unterschiede in der Struktur der Oligosaccharide hinweisen.

Neben Oligosacchariden des  $\kappa$ -Typs konnten auch  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridoligosaccharide nach Verdau des Furcellarans mit  $\kappa$ Case1 nachgewiesen werden, was bestätigt, dass es sich bei diesem Polysaccharid um ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridcarrageen handelt. Die entsprechenden Massenspektren sind Abbildung 9.15 im Anhang zu entnehmen. So konnte die Freisetzung von  $\kappa$ -/ $\beta$ -Carratetraose (9,6 min) anhand des im Massenspektrum auftretenden Quasimoleküls  $[M-H]^-$  mit einem  $m/z$  von 709 festgestellt werden. Darüber hinaus erfolgte ebenfalls die Freisetzung eines Hexasaccharids (13,5 min), welches aus zwei  $\kappa$ -Einheiten und einer  $\beta$ -Einheit aufgebaut ist und anhand des Quasimoleküls  $[M-2H]^{2-}$  mit einem  $m/z$  von 547 identifiziert wurde. Die Anordnung der verschiedenen Disaccharideinheiten innerhalb des Hybridoligosaccharids ( $\kappa$ - $\kappa$ - $\beta$ ,  $\kappa$ - $\beta$ - $\kappa$ ,  $\beta$ - $\kappa$ - $\kappa$ ) kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beurteilt werden. Aufgrund der Selektivität der  $\kappa$ -Carrageenase liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die  $\beta$ -Einheit in der Mitte des Hexasaccharids angeordnet ist. Das Massenspektrum des Oligosaccharids bei 15,3 min kann einer  $\kappa$ -/ $\beta$ -Carraoctaose zugeordnet werden, welche aus jeweils zwei Disaccharideinheiten des  $\kappa$ - und des  $\beta$ -Typs aufgebaut ist. Die Identifizierung dieses Hybridoligosaccharids erfolgte anhand des Quasimoleküls  $[M-2H]^{2-}$  mit einem  $m/z$  von 701. Die Ergebnisse der HILIC-MS-Analyse deuten darauf hin, dass auch ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Octasaccharid, welches drei  $\kappa$ -Einheiten sowie eine  $\beta$ -Einheit aufweist, mittels  $\kappa$ -Carrageenase aus der Furcellaranprobe freigesetzt wurde. Für dieses Octasaccharid (15,8 min) konnten im Massenspektrum die Ionen  $[M-3H]^{3-}$  und  $[M-2H]^{2-}$  bei einem  $m/z$  von 493 bzw. 740 identifiziert werden. Daneben konnten ebenfalls ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Decasaccharid (drei  $\kappa$ - und zwei  $\beta$ -Einheiten) bei einer Retentionszeit von 17,0 min sowie ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Dodecasaccharid (drei  $\kappa$ - und drei  $\beta$ -Einheiten) bei einer Retentionszeit von 17,8 min nachgewiesen werden. Das Massenspektrum der  $\kappa$ -/ $\beta$ -Carradecaose zeigt das entsprechende Quasimolekülion  $[M-3H]^{3-}$  ( $m/z = 596$ ) sowie das nach Abspaltung einer Sulfatgruppe entstehende Fragmention  $[M-2H]^{2-}$  mit einem  $m/z$  von 854. Die  $\kappa$ -/ $\beta$ -Carradodecaose kann anhand des Quasimoleküls  $[M-3H]^{3-}$  ( $m/z = 698$ ) zugeordnet werden. Auch für die Hybridoligosaccharide mit einem DP > 6 kann anhand der vorliegenden Analyse keine Aussage über die Anordnung der verschiedenen Disaccharideinheiten innerhalb des Oligomers getroffen werden. Die Freisetzung von Oligosacchariden des  $\kappa$ -Typs und  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridoligosacchariden

sowie die deutliche Reduktion des Molekulargewichts nach enzymatischer Hydrolyse des Furcellarans mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case1 deuten darauf hin, dass das Polysaccharid längere  $\kappa$ -Abschnitte mit eingestreuten  $\beta$ -Einheiten aufweist.

Die Ergebnisse der detaillierten Charakterisierung der Hybridcarrageene verdeutlichen, dass der Einsatz spezifischer  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenasen geeignet ist, um in Kombination mit der HILIC-MS und der HPSEC-RI die Verteilung verschiedener Strukturelemente in einer Carrageenprobe abzuschätzen. Auch wenn aufgrund der starken Quellenfragmentierung nicht für jedes Oligosaccharid eine eindeutige Identifizierung erfolgen konnte, kann ein Vergleich mit reinem  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen Hinweise auf das Auftreten von Hybridoligosacchariden liefern. Um eine Identifizierung der jeweiligen Oligosaccharide zu ermöglichen, könnten wie bereits erwähnt andere Ionisierungstechniken (z.B. MALDI) eingesetzt werden. Darüber hinaus könnte die enzymatische Hydrolyse ebenfalls in einem präparativen Ansatz durchgeführt werden, um die Isolierung und eindeutige Charakterisierung der freigesetzten Oligosaccharide mittels MS und NMR-Spektroskopie zu ermöglichen.

Für die untersuchten Carrageenproben (IC3, LC1, LC2, C1 und C2) konnte anhand der entwickelten Methode gezeigt werden, dass es sich in allen Fällen um Hybridpolysaccharide handelt. Diese zeigten teilweise deutliche Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der unterschiedlichen Strukturelemente, was die strukturelle Heterogenität kommerzieller Carrageene unterstreicht. Für die Furcellaranprobe konnte eine enzymatische Freisetzung von  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridoligosacchariden nachgewiesen werden, was das Vorliegen eines  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridcarrageens bestätigt.

### 4.3 Analyse von chemisch modifizierten Carrageenen

Die detailliert charakterisierten Hybridcarrageene (IC3, LC1, LC2, C1 und C2) sowie das Furcellaran und die Proben KC1 und IC1 wurden gezielt modifiziert, um Veränderungen in der Struktur bzw. Zusammensetzung herbeizuführen und deren Einfluss auf die eiskristallisationsinhibierende Aktivität untersuchen zu können. Hierfür wurde einerseits ein Kationenaustausch durchgeführt, um monokationische Kalium-, Natrium- und Calcium-Formen der ausgewählten Carrageene zu erhalten. Zum anderen wurde Probe LC1 alkalisch behandelt, um die in diesem Carrageen vorliegenden  $\nu$ -Einheiten in  $\iota$ -Einheiten umzuwandeln. Die auf diese Weise erhaltenen modifizierten Proben wurden strukturell charakterisiert, um sicherzustellen, dass die gewünschte Veränderung herbeigeführt wurde und keine sonstigen Modifikationen vorliegen. Die Analyse der



modifizierten Proben erfolgte analog zur Strukturcharakterisierung der kommerziellen Carrageene.

### 4.3.1 Bestimmung des Carrageentyps

Die Ergebnisse der Bestimmung des Carrageentyps mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie für die monokationischen Formen sowie die Probe nach alkalischer Modifizierung (mLC1) sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

**Tabelle 4.8:** Mittels <sup>1</sup>H-Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) ermittelte Carrageentypen für die chemisch modifizierten Carrageene und die entsprechenden Ausgangsproben sowie die prozentualen Anteile nach Analyse (n=1).

Probe	Carrageentyp (Anteil / %)	Probe	Carrageentyp (Anteil / %)
KC1	κ	LC1	κ (47), ι (31), ν (22)
KC1 K	κ	LC1 K	κ (51), ι (29), ν (20)
KC1 Na	κ	LC1 Na	κ (47), ι (32), ν (21)
KC1 Ca	κ	LC1 Ca	κ (46), ι (30), ν (23)
FC	κ	mLC1 K	κ (53), ι (47)
FC K	κ	mLC1 Na	κ (52), ι (48)
FC Na	κ	C1	κ (37), ι (33), ν (30)
FC Ca	κ	C1 K	κ (37), ι (34), ν (29)
IC1	ι	C1 Ca	κ (38), ι (32), ν (30)
IC1 K	ι	LC2	κ (72), ι (28)
IC1 Na	ι	LC2 K	κ (67), ι (33)
IC1 Ca	ι	LC2 Na	κ (68), ι (32)
IC3	κ (27), ι (73)	LC2 Ca	κ (67), ι (33)
IC3 K	κ (27), ι (73)	C2	κ (59), ι (41)
IC3 Ca	κ (25), ι (75)	C2 K	κ (42), ι (58)
		C2 Ca	κ (40), ι (60)

Mit Ausnahme der Probe C2 konnten für die monokationischen Formen die gleichen Carrageentypen sowie ähnliche Anteile der jeweiligen Strukturelemente bestimmt werden wie vor dem Kationenaustausch. Dies zeigt, dass der Austausch für diese Proben den Erwartungen entsprechend keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Polysaccharids hat. Die Probe C2, welche vor der Modifizierung einen Anteil des κ-Typs von 59 % und des ι-Typs von 41 % aufwies, zeigt nach dem Kationenaustausch sowohl für die Kalium- als auch die Calcium-Form mit 42 % bzw. 40 % κ-Einheiten und 58 % bzw. 60 % ι-Einheiten ein umgekehrtes Verhältnis. Dies ist jedoch

nicht auf eine Strukturveränderung während des Kationenaustausches zurückzuführen. Anhand des Spektrums der unveränderten Probe (C2) (siehe Abbildung 9.16 im Anhang) ist ersichtlich, dass das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 5,40 ppm, welches auf den Zusatz von Saccharose zurückzuführen ist, die Integration des Signals bei 5,28 ppm stört, welches dem anomeren Proton der DA2S-Einheit des  $\iota$ -Typs entspricht. Aufgrund des Präzipitationsschrittes während des Kationenaustauschs können niedermolekulare Substanzen wie Saccharose entfernt werden, was anhand der NMR-Spektren der monokationischen Formen C2 K und C2 Ca deutlich wird (vgl. Abbildung 9.16). Da der Kationenaustausch für die anderen Proben keinen Einfluss auf die vorliegenden Carrageentypen hat, kann davon ausgegangen werden, dass das Verhältnis der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten, welches für die Probe C2 nach dem Kationenaustausch bestimmt wurde, die tatsächliche Zusammensetzung des Polysaccharids wiedergibt und der Anteil an  $\iota$ -Einheiten in der kommerziellen Probe aufgrund des Zusatzes von Saccharose unterbestimmt wird.

Für die alkalisch modifizierte Probe mLC1, welche sowohl in der Natrium- als auch der Kaliumform erzeugt wurde, konnten nach Modifizierung keine  $\nu$ -Einheiten mittels  $^1\text{H}$ -NMR nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass durch die alkalische Behandlung eine vollständige Umwandlung der  $\nu$ - in  $\iota$ -Einheiten stattgefunden hat. Die modifizierten Proben weisen eine Zusammensetzung von 53 % bzw. 52 %  $\kappa$ -Einheiten und 47 % bzw. 48 %  $\iota$ -Einheiten auf.

### 4.3.2 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung

Um die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Analyse des Carrageentyps zu bestätigen, wurde die Monosaccharidzusammensetzung der chemisch modifizierten Proben nach reduktiver Hydrolyse mittels HPAEC-PAD ermittelt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 4.9 dargestellt. Anhand eines Vergleichs mit den Ausgangsproben zeigt sich, dass die relativen molaren Anteile an Galactose bzw. Anhydrogalactose für die verschiedenen Kationenformen weitgehend erhalten bleiben. Die Unterschiede zwischen den monokationischen Formen und den unmodifizierten Proben bewegen sich in einem Bereich  $< 8$  mol%. Dies bestätigt die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse, dass der Kationenaustausch nicht mit Veränderungen in der Zusammensetzung der Carrageene einhergeht.

**Tabelle 4.9:** Molare Anteile der Monosaccharide Galactose und Anhydrogalactose (mol%  $\pm$  Range/2, n=2) der chemisch modifizierten Carrageene sowie der entsprechenden Ausgangsproben, bestimmt über eine Analyse der korrespondierenden Zuckeralkohole mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) und gepulster amperometrischer Detektion (PAD) nach reduktiver Hydrolyse.

<b>Probe</b>	<b>Galactose / mol%</b>	<b>Anhydrogalactose / mol%</b>
KC1	51,2 $\pm$ 0,7	48,8 $\pm$ 0,7
KC1 K	44,9 $\pm$ 0,4	55,1 $\pm$ 0,4
KC1 Na	46,7 $\pm$ 0,3	53,3 $\pm$ 0,3
KC1 Ca	45,7 $\pm$ 0,1	54,3 $\pm$ 0,1
FC	39,6 $\pm$ 0,1	60,4 $\pm$ 0,1
FC K	44,5 $\pm$ 0,1	55,5 $\pm$ 0,1
FC Na	41,4 $\pm$ 0,9	58,6 $\pm$ 0,9
FC Ca	41,1 $\pm$ 0,1	58,9 $\pm$ 0,1
IC1	73,8 $\pm$ 0,1	26,2 $\pm$ 0,1
IC1 K	73,1 $\pm$ 0,1	26,9 $\pm$ 0,1
IC1 Na	70,8 $\pm$ 0,1	29,2 $\pm$ 0,1
IC1 Ca	70,3 $\pm$ 0,8	29,7 $\pm$ 0,8
IC3	69,6 $\pm$ 0,6	30,4 $\pm$ 0,6
IC3 K	64,8 $\pm$ 1,5	35,2 $\pm$ 1,5
IC3 Ca	69,0 $\pm$ 0,2	31,0 $\pm$ 0,2
LC1	76,6 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,1
LC1 K	74,6 $\pm$ 0,9	25,4 $\pm$ 0,9
LC1 Na	74,7 $\pm$ 0,4	25,3 $\pm$ 0,4
LC1 Ca	74,5 $\pm$ 0,1	25,5 $\pm$ 0,1
mLC1 K	55,0 $\pm$ 0,1	45,0 $\pm$ 0,1
mLC1 Na	58,1 $\pm$ 1,1	41,9 $\pm$ 1,1
C1	81,0 $\pm$ 0,6	19,0 $\pm$ 0,6
C1 K	79,6 $\pm$ 1,4	20,4 $\pm$ 1,4
C1 Ca	82,1 $\pm$ 1,3	17,9 $\pm$ 1,3
LC2	56,9 $\pm$ 0,4	43,1 $\pm$ 0,4
LC2 K	56,3 $\pm$ 0,1	43,7 $\pm$ 0,1
LC2 Na	56,1 $\pm$ 0,1	43,9 $\pm$ 0,1
LC2 Ca	55,6 $\pm$ 0,1	44,4 $\pm$ 0,1
C2	66,8 $\pm$ 0,4	33,2 $\pm$ 0,4
C2 K	60,7 $\pm$ 0,8	39,3 $\pm$ 0,8
C2 Ca	59,6 $\pm$ 0,9	40,4 $\pm$ 0,9

Für die Carrageene nach alkalischer Behandlung (mLC1 K und mLC1 Na) konnten im Vergleich mit der Probe LC1 hingegen stärkere Abweichungen in der Monosaccharidzusammensetzung festgestellt werden. Da die erhöhten Gehalte an Galactose in der Ausgangsprobe (76,6 mol%) vermutlich auf das Vorliegen von  $\nu$ -Einheiten zurückzuführen sind, führt die alkalische Behandlung erwartungsgemäß zu einer Reduktion des relativen Anteils an Galactose. Das Carrageen mLC1 sollte bei erfolgreicher alkalischer Modifizierung ausschließlich  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten aufweisen, was für die Idealstruktur einem molaren Anteil an Galactose und Anhydrogalactose von jeweils 50 mol% entsprechen würde. Der mittels HPAEC-PAD analysierte Anteil an Galactose liegt mit 55,0 mol% (mLC1 K) bzw. 58,1 mol% (mLC1 Na) leicht oberhalb des erwarteten Bereichs. Ausgehend von der Monosaccharidzusammensetzung der unmodifizierten Carrageene (siehe Kapitel 4.1.2) wurde bereits vermutet, dass für Carrageene, die sich teilweise oder ausschließlich aus Strukturelementen des  $\iota$ -Typs zusammensetzen, eine unvollständige Reduktion oder eine Hydrolyse der Anhydrogalactose-Einheiten auftritt. Demnach ist der leicht erhöhte Anteil an Galactose, der für die alkalisch modifizierten Proben (mLC1 K und mLC1 Na) ermittelt wurde, vermutlich nicht auf das Vorliegen von Vorläuferstrukturelementen zurückzuführen und es kann von einer vollständigen Umwandlung der  $\nu$ -Einheiten ausgegangen werden.

### 4.3.3 Bestimmung des Molekulargewichts

Für die chemisch modifizierten Carrageene wurde ebenfalls das gewichtsmittlere Molekulargewicht sowie die Polydispersität mittels HPSEC-RI/MALLS bestimmt (siehe Tabelle 4.10). Das Molekulargewicht der monokationischen Carrageene zeigt für den Großteil der Proben eine gute Übereinstimmung mit der Ausgangsprobe. Für die Calciumformen der Proben KC1, IC1 und LC2 konnte jedoch eine merkliche Abnahme des Molekulargewichts nach Kationenaustausch festgestellt werden. Die Differenz zwischen den modifizierten und unmodifizierten Proben bewegt sich dabei in einem Bereich von 150 - 369 kDa. Da die Abnahme des gewichtsmittleren Molekulargewichtes nur für drei der acht Calciumformen festgestellt werden konnte, geht ein Austausch in diese Kationenform demnach nicht zwangsläufig mit einer Reduktion des Molekulargewichts einher. Die verringerten Molekulargewichte, die für die Calciumformen der Proben KC1, IC1 und LC2 nach Kationenaustausch ermittelt wurden, könnten auch auf eine Auflösung von Aggregaten oder eine selektive Ausfällung zurückgeführt werden. Dennoch weisen die erhaltenen Carrageene ein hohes gewichtsmittleres Molekulargewicht von 491 - 838 kDa auf, welches in einem Wertebereich liegt, in dem kein Einfluss auf die eiskristallisationsinhibierende

Aktivität zu erwarten ist. So konnte in einer Studie von Leiter *et al.* (2017b) für ein Carrageen des  $\kappa$ -Typs bereits gezeigt werden, dass eine Reduktion des Molekulargewichts von 1420 kDa auf 262 kDa (Säurehydrolyse) bzw. 219 kDa (Autohydrolyse) nicht mit Veränderungen in der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität einhergeht. Bei einem niedrigeren Molekulargewicht von 23,1 kDa konnte hingegen eine Verschlechterung der funktionellen Eigenschaften im Vergleich zum nativen  $\kappa$ -Carrageen festgestellt werden (Leiter *et al.*, 2017b).

Für die Proben nach alkalischer Modifizierung (mLC1) konnte ebenfalls eine Abnahme des gewichtsmittleren Molekulargewichts verglichen mit der Ausgangsprobe ermittelt werden. Aufgrund des hohen pH-Werts während der Modifizierung kann dies auf das Auftreten des *Base Peelings* zurückgeführt werden, welches den Abbau von Polysacchariden unter alkalischen Bedingungen ausgehend vom reduzierenden Ende beschreibt (Doyle *et al.*, 2010). Weiterhin könnte die Reduktion des Molekulargewichts auf eine partielle Hydrolyse während des Dialyseschrittes zurückgeführt werden (Leiter *et al.*, 2017b). Dabei zeigt die Kaliumform der Probe mLC1 eine stärkere Abnahme im Molekulargewicht mit einer Differenz von 383 kDa im Vergleich zu der Natriumform. Mit einem  $M_w$  von 540 kDa (mLC1 K) bzw. 686 kDa (mLC1 Na) liegen die alkalisch behandelten Proben aber dennoch innerhalb des Molekulargewichtsbereichs der anderen Carrageenproben, daher sind keine signifikanten Unterschiede in der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität zu erwarten. Darüber hinaus zeigt das Carrageen mLC1 K mit 1,6 einen niedrigeren Wert für die Polydispersität verglichen mit der Probe LC1 (Polydispersität 2,1), was auf eine engere Größenverteilung des Polysaccharids hindeutet. Für die Proben FC K und C2 Ca konnte hingegen ein leichter Anstieg der Polydispersität um 0,3 nach Kationenaustausch ermittelt werden. Die Werte für die Polydispersität der modifizierten Carrageene zeigen jedoch generell eine gute Vergleichbarkeit mit den Werten der unmodifizierten Proben (siehe Tabelle 4.10).

**Tabelle 4.10:** Gewichtsmittleres Molekulargewicht  $M_w$  (kDa  $\pm$  Range/2,  $n=2$ ) und Polydispersität ( $n=2$ ) der chemisch modifizierten Carrageene sowie der Ausgangsproben nach Analyse mittels HochleistungsgröÙenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit einem Brechungsindex (RI)-Detektor und einem Mehrwinkellichtstreuungsdetektor (MALLS).

<b>Probe</b>	<b><math>M_w</math> / kDa</b>	<b>Polydispersität</b>
KC1	1013 $\pm$ 35	1,9
KC1 K	919 $\pm$ 8	1,8
KC1 Na	901 $\pm$ 42	1,9
KC1 Ca	644 $\pm$ 14	1,9
FC	407 $\pm$ 18	2,0
FC K	392 $\pm$ 2	2,3
FC Na	382 $\pm$ 6	2,0
FC Ca	356 $\pm$ 6	2,1
IC1	999 $\pm$ 16	1,9
IC1 K	924 $\pm$ 15	2,0
IC1 Na	925 $\pm$ 91	2,0
IC1 Ca	838 $\pm$ 6	1,8
IC3	523 $\pm$ 61	1,7
IC3 K	519 $\pm$ 2	1,7
IC3 Ca	514 $\pm$ 0	1,8
LC1	923 $\pm$ 8	2,0
LC1 K	860 $\pm$ 4	2,1
LC1 Na	831 $\pm$ 5	1,9
LC1 Ca	868 $\pm$ 37	1,9
mLC1 K	540 $\pm$ 27	1,6
mLC1 Na	686 $\pm$ 2	2,1
C1	1158 $\pm$ 21	2,1
C1 K	1068 $\pm$ 55	2,3
C1 Ca	1163 $\pm$ 14	2,2
LC2	641 $\pm$ 8	1,8
LC2 K	639 $\pm$ 15	1,8
LC2 Na	613 $\pm$ 0	1,9
LC2 Ca	491 $\pm$ 12	1,8
C2	886 $\pm$ 30	2,0
C2 K	890 $\pm$ 0	2,2
C2 Ca	825 $\pm$ 16	2,3

### 4.3.4 Analyse des Sulfatgehaltes

Der Sulfatgehalt der chemisch modifizierten Carrageene wurde einerseits mittels HPAEC-CD bestimmt und andererseits anhand des mittels ICP-OES ermittelten Schwefelgehaltes berechnet. Die Ergebnisse beider Methoden sind in Tabelle 4.11 aufgelistet und zeigen, dass der Sulfatgehalt für den Großteil der Proben in einem ähnlichen Bereich liegt wie vor der chemischen Modifizierung. Im Zuge des Kationenaustauschs kommt es jedoch teilweise zu einer Abnahme des Sulfatgehaltes. Dies konnte beispielsweise für die Proben KC1 K, IC1 Ca und LC2 K festgestellt werden, welche eine Verringerung des Sulfatgehaltes um 3,7 - 5,2 Gew% nach Analyse mittels HPAEC-CD gegenüber den Ausgangsformen zeigen. Dieser Trend zeigt sich ebenfalls für die mittels ICP-OES analysierten Sulfatgehalte, auch wenn die Unterschiede verglichen mit den unmodifizierten Carrageenproben weniger deutlich ausgeprägt sind (1,8 - 3,0 Gew%). Eine mögliche Erklärung für die niedrigeren Sulfatgehalte stellen freie Salze in den Proben dar, welche im Zuge des Kationenaustauschs nicht vollständig entfernt wurden. Diese tragen zur Einwaage bei, was in entsprechend niedrigeren Sulfatgehalten resultiert. Für KC1 K und LC2 K spiegelt sich dies auch in den ermittelten Kationengehalten wider (siehe Kapitel 4.3.5). Beide Proben weisen mit 17,59 g/100 g (KC1 K) bzw. 13,42 g/100 g (LC2 K) einen hohen Gehalt an freien Salzen (berechnet als Kaliumchlorid) auf. Für die Probe IC1 Ca konnte hingegen nur ein geringer Salzgehalt von 2,24 g/100 g festgestellt werden (vgl. Tabelle 9.5). Dementsprechend könnte die Verringerung des Sulfatgehaltes für das modifizierte Carrageen IC1 Ca auch auf eine Co-Präzipitation oder auf Verunreinigungen in der Probe zurückgeführt werden.

Für die monokationischen Formen der Proben IC3 und C2 konnte nach Kationenaustausch eine Zunahme des Sulfatgehaltes ermittelt werden. Dies zeigt sich sowohl für die Analyse mittels HPAEC-CD als auch mittels ICP-OES. Eine Erhöhung des Sulfatgehaltes im Zuge des Kationenaustauschs kann für die Proben IC3 und C2 auf das Vorliegen von Glucose bzw. Saccharose in der Ausgangsprobe zurückgeführt werden, welche anhand einer Analyse mittels  $^1\text{H-NMR}$  nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2). Da niedermolekulare Begleitstoffe wie Glucose und Saccharose während des Kationenaustauschs vom polymeren Material abgetrennt werden (siehe Abbildung 9.16 und Abbildung 9.17 im Anhang), tragen diese nicht mehr zur Einwaage bei, was für die monokationischen Formen der Proben IC3 und C2 in einem erhöhten Sulfatgehalt resultiert.

**Tabelle 4.11:** Sulfatgehalt der chemisch modifizierten Carrageene sowie der Ausgangsproben nach Analyse mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektion (CD) (Gew%  $\pm$  Range/2, n=2) sowie nach Analyse mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) (Gew%, n=1).

Probe	HPAEC-CD	ICP-OES
	Sulfatgehalt / Gew%	
KC1	19,4 $\pm$ 0,3	18,1
KC1 K	14,2 $\pm$ 1,2	16,3
KC1 Na	18,6 $\pm$ 0,2	20,0
KC1 Ca	19,0 $\pm$ 0,4	20,4
FC	14,1 $\pm$ 0,5	13,9
FC K	14,1 $\pm$ 0,3	14,8
FC Na	15,0 $\pm$ 2,1	13,4
FC Ca	15,7 $\pm$ 1,6	14,0
IC1	29,6 $\pm$ 0,3	28,2
IC1 K	27,1 $\pm$ 0,5	27,5
IC1 Na	29,8 $\pm$ 1,7	30,2
IC1 Ca	25,9 $\pm$ 0,5	26,4
IC3	22,7 $\pm$ 0,3	21,7
IC3 K	25,2 $\pm$ 0,5	26,9
IC3 Ca	26,1 $\pm$ 0,1	26,0
LC1	29,3 $\pm$ 0,7	29,4
LC1 K	28,6 $\pm$ 0,4	29,5
LC1 Na	28,8 $\pm$ 0,1	30,3
LC1 Ca	27,0 $\pm$ 0,3	27,8
mLC1 K	31,9 $\pm$ 3,1	22,9
mLC1 Na	33,1 $\pm$ 6,7	25,2
C1	29,6 $\pm$ 0,1	28,9
C1 K	28,7 $\pm$ 0,4	29,2
C1 Ca	30,2 $\pm$ 0,3	29,9
LC2	22,6 $\pm$ 0,1	21,9
LC2 K	18,8 $\pm$ 0,3	18,9
LC2 Na	22,9 $\pm$ 0,1	23,1
LC2 Ca	21,8 $\pm$ 0,1	21,8
C2	17,9 $\pm$ 0,4	17,4
C2 K	24,7 $\pm$ 0,7	24,3
C2 Ca	25,6 $\pm$ 0,6	24,3



Für die alkalisch modifizierten Proben mLC1 K und mLC1 Na konnte anhand einer Messung mittels HPAEC-CD ebenfalls eine Zunahme des Sulfatgehaltes festgestellt werden. Allerdings konnte dies anhand der Ergebnisse der ICP-OES-Analyse nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich für die Probe mLC1 K mit 22,9 Gew% und für die Probe mLC1 Na mit 25,2 Gew% eine Abnahme des Sulfatgehaltes verglichen mit der Probe LC1 (29,4 Gew%). Die mittels ICP-OES festgestellte Abnahme des Sulfatgehaltes der alkalisch modifizierten Proben entspricht den Erwartungen, da die in Position O-6 vorliegende Sulfatgruppe der  $\alpha$ -Galactoseeinheit des  $\nu$ -Carrageens im Zuge der alkalischen Modifizierung unter Ausbildung einer 3,6-Anhydrobrücke abgespalten wird. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der Analyse mittels HPAEC-CD stellt die hohe Messunsicherheit dar, die bei der Ermittlung des Sulfatgehaltes der Proben mLC1 K und mLC1 Na erhalten wurde (Range/2 = 3,1 Gew% bzw. 6,7 Gew%). Zusammen mit den Ergebnissen der verschiedenen Kationenformen kann anhand der Analyse des Sulfatgehaltes sowie den anderen Analysen jedoch geschlussfolgert werden, dass durch die chemische Modifizierung die erwarteten Strukturveränderungen erzielt werden konnten.

### 4.3.5 Analyse des Kationengehalts

Der Kationengehalt der chemisch modifizierten Carrageene wurde mittels ICP-OES bestimmt, um zu überprüfen, ob anhand des Kationenaustauschs erfolgreich monokationische Formen der Carrageene erzeugt wurden. Die Ergebnisse für den Gehalt an Kalium, Natrium und Calcium (siehe Tabelle 4.12) zeigen, dass die Carrageene nach dem Austausch das jeweils gewünschte Kation als dominierende Ionenart aufweisen. Die anderen analysierten Kationen liegen lediglich in sehr geringen Gehalten vor, was die erfolgreiche Gewinnung monokationischer Carrageene bestätigt. Für die Calciumformen der Proben KC1, FC und LC2 konnten auch nach dem Kationenaustausch Kaliumgehalte zwischen 0,78 und 0,99 g/100 g ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass ein geringer Anteil an assoziierten Kaliumionen im Zuge des Kationenaustauschs nicht durch Calciumionen ersetzt werden konnte. Da dies insbesondere für Carrageene zutrifft, welche sich ausschließlich oder überwiegend aus Einheiten des  $\kappa$ -Typs zusammensetzen, kann vermutet werden, dass dieser Carrageentyp eine stärkere Affinität gegenüber Kaliumionen im Vergleich zu Calciumionen aufweist. Für diese Proben könnte eine Erhöhung der Konzentration an Calciumchlorid für den Kationenaustausch zu einem stärkeren Verdrängungseffekt führen und damit einen vollständigen Austausch der Kaliumionen ermöglichen. Eine Erhöhung der Konzentration an Calciumchlorid könnte jedoch ebenfalls zu einem erhöhten Überschuss an freien Calciumionen führen.

**Tabelle 4.12:** Gehalte der Kationen K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> in den chemisch modifizierten Carrageenen und den entsprechenden Ausgangsproben (g/100 g, n=1), bestimmt mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES). n.n.: nicht nachweisbar.

<b>Probe</b>	<b>K<sup>+</sup> / g/100 g</b>	<b>Na<sup>+</sup> / g/100 g</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> / g/100 g</b>
KC1	6,84	0,10	0,82
KC1 K	16,14	0,01	0,01
KC1 Na	0,20	8,22	0,01
KC1 Ca	0,99	0,02	4,30
FC	4,35	0,08	0,43
FC K	7,76	n.n.	0,03
FC Na	0,09	5,10	0,01
FC Ca	0,85	n.n.	3,23
IC1	4,45	0,07	4,00
IC1 K	13,42	0,03	0,02
IC1 Na	0,21	7,83	0,02
IC1 Ca	0,29	0,09	5,85
IC3	5,71	0,09	2,65
IC3 K	13,18	0,02	0,01
IC3 Ca	0,44	0,05	5,61
LC1	0,98	0,25	5,48
LC1 K	13,46	0,04	0,02
LC1 Na	0,06	7,84	0,03
LC1 Ca	0,11	0,14	6,03
mLC1 K	11,35	0,05	0,01
mLC1 Na	n.n.	9,06	0,12
C1	1,69	5,58	0,37
C1 K	13,42	0,03	0,02
C1 Ca	0,17	0,12	6,48
LC2	5,73	0,30	2,33
LC2 K	14,76	0,02	0,01
LC2 Na	0,33	6,84	0,01
LC2 Ca	0,78	0,05	4,64
C2	4,18	2,39	0,11
C2 K	12,81	0,02	0,01
C2 Ca	0,50	0,05	5,39

Ausgehend von den mittels ICP-OES bestimmten Kationengehalten wurde der theoretische Schwefelgehalt berechnet, den die Proben aufweisen müssten, wenn die Kationen ausschließlich an den Sulfatgruppen des Polysaccharids assoziiert vorliegen würden. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind Tabelle 9.5 im Anhang zu entnehmen. Anhand eines Vergleichs des theoretischen Schwefelgehaltes mit dem ermittelten Schwefelgehalt können so Rückschlüsse auf das Vorliegen von freien Salzen in den Proben gezogen werden. Für alle untersuchten Polysaccharide, mit Ausnahme des kommerziellen Furcellarans, überschreitet der theoretische Gehalt an Schwefel den tatsächlich ermittelten Gehalt, was auf freie Salze in den Proben hindeutet. Dabei weisen die verschiedenen Kationenformen deutliche Unterschiede hinsichtlich des vorliegenden Salzgehaltes auf. Der Gehalt an freien Salzen (berechnet als Kaliumchlorid) bewegt sich in einem Konzentrationsbereich von 1,71 – 17,59 g/100 g, wobei die niedrigsten Werte für die Calciumformen der Proben LC1 und C1 erhalten wurden und der höchste Wert für die Probe KC1 K (vgl. Tabelle 9.5). Für die Kaliumformen der Carrageene konnte im Vergleich zu den anderen Kationenformen generell ein höherer Überschuss an freien Salzen nach Kationenaustausch ermittelt werden. Das Furcellaran und die alkalisch modifizierte Probe mLC1 weisen hingegen in der Natriumform den höchsten Salzgehalt auf. Für die kommerziell erhältlichen Proben konnte ebenfalls das Vorliegen von freien Salzen festgestellt werden, der Salzgehalt bewegt sich mit 0,22 – 3,65 g/100g (berechnet als Kaliumchlorid) jedoch in einem deutlich niedrigeren Konzentrationsbereich.

Bei einer Analyse der physikochemischen Eigenschaften der monokationischen Carrageene sollte demnach berücksichtigt werden, dass die frei vorliegenden Salze diese Eigenschaften möglicherweise beeinflussen könnten. In einer Studie von Leiter *et al.* (2018) konnte bereits gezeigt werden, dass die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität von Carrageenen durch eine Salzzugabe beeinflusst wird. So konnte für das in dieser Studie untersuchte  $\kappa$ -Carrageen bei einer Konzentration an Kaliumchlorid von 30 mmol/L eine deutliche Verschlechterung der Funktionalität festgestellt werden. Bei einer Zugabe von 0,3 mmol/L Kaliumchlorid konnten hingegen keine Veränderungen in der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität des  $\kappa$ -Carrageens festgestellt werden (Leiter *et al.*, 2018). Bei den Carrageenlösungen, die im Rahmen dieser Arbeit für die Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität verwendet wurden (1 g Carrageen/L), ist ausgehend von den Ergebnissen der ICP-OES-Analyse eine Konzentration an freien Salzen zwischen 0,23 mmol/L und 2,36 mmol/L zu erwarten (vgl. Tabelle 9.5). Da diese Konzentration deutlich unterhalb von 30 mmol/L liegt, kann davon ausgegangen werden, dass

der Einfluss der freien Salze auf die eisrekristallisationshemmende Wirkung der monokationischen Carrageene minimal ist.

Anhand der Strukturcharakterisierung der modifizierten Carrageene konnte gezeigt werden, dass die gewünschten Veränderungen bezüglich der Zusammensetzung und der Struktur erzielt wurden und dass keine unerwünschten Effekte auftraten. Ein Vergleich der verschiedenen monokationischen Carrageene kann daher Aufschluss über den Einfluss des am Polymer assoziierten Ionentyps liefern, während anhand der Probe nach alkalischer Behandlung die Relevanz der Anhydrogalactose für die funktionellen Eigenschaften überprüft werden kann.

## 4.4 Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität

Der Zusammenhang zwischen der Struktur und den daraus resultierenden technofunktionellen Eigenschaften von Carrageenen soll im Zuge dieser Arbeit anhand der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität der Polysaccharide untersucht werden. Dabei soll vor allem der Einfluss der assoziierten Kationen und des Carrageentyps sowie die Auswirkungen des Vorliegens von Hybridcarrageenen und Vorläuferstrukturelementen näher charakterisiert werden. Die eisrekristallisationshemmende Wirkung der unterschiedlichen Carrageenproben wurde anhand einer Bestimmung des mittleren Äquivalentdurchmessers der Eiskristalle beurteilt. Dabei geht ein niedriger mittlerer Eiskristalldurchmesser mit einer hohen eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität einher. Die Bestimmung des mittleren Eiskristalldurchmessers erfolgte anhand von mikroskopischen Aufnahmen der Proben (siehe Kapitel 8.5). Eine quantitative Auswertung wurde für die Eiskristallbilder zu Beginn der Lagerung (nach 4 h) sowie nach 72 h vorgenommen. Da für einzelne Proben beispielhaft gezeigt werden konnte, dass der mittlere Eiskristalldurchmesser innerhalb dieser Zeitspanne kontinuierlich ansteigt (siehe Tabelle 9.6), erfolgte keine quantitative Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen nach 24 h und 48 h. Die Bilder zum Zeitpunkt 72 h wurden als repräsentativer Endpunkt der Lagerung gewählt, da nach 144 h bereits einige Proben geschmolzen vorlagen.

### 4.4.1 Einfluss der Kationenform

Um den Einfluss der am Polysaccharid assoziierten Kationen zu beurteilen, wurden die verschiedenen monokationischen Formen jedes Carrageens miteinander verglichen, um Unterschiede im mittleren Eiskristalldurchmesser bei gleichbleibendem Kohlenhydratrest aufzuzeigen. Zusätzlich zu den Proben wurde ebenfalls eine Kontrolllösung (49 % (w/w) Saccharoselösung) analysiert, um die Veränderungen in der Eiskristallgröße aufgrund von

Rekristallisationsprozessen ohne Zugabe von eiskristallisationshemmenden Substanzen abzubilden. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Kalium- und Calciumformen der Carrageene nach 4 h und 72 h sind in Tabelle 4.13 aufgeführt.

**Tabelle 4.13:** Mittlerer Eiskristalldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ,  $n=4$ ) der monokationischen Carrageene (1 mg/mL) in 49 % (w/w) Saccharoselösung nach 4 h und 72 h bei einer Lagerungstemperatur von  $-12,0\text{ }^\circ\text{C}$ . Bei der Probe „Saccharose“ handelt es sich um die Kontrollprobe ohne Zugabe von Carrageen. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im mittleren Eiskristalldurchmesser bei gleicher Lagerungszeit. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Tukey-Test ( $\alpha=0,05$ ). Bei Inhomogenität der Varianzen wurde die Welch ANOVA verwendet.

Probe	mittlerer Eiskristalldurchmesser / $\mu\text{m}$			
	KALIUMFORM		CALCIUMFORM	
	4 h	72 h	4 h	72 h
KC1	$5,95 \pm 1,87^a$	$8,19 \pm 2,35^A$	$8,65 \pm 2,48^{a,b}$	$13,84 \pm 3,81^C$
IC1	$15,71 \pm 4,03^d$	$23,41 \pm 5,42^D$	$13,81 \pm 3,25^c$	$18,64 \pm 4,69^D$
IC3	$7,65 \pm 2,28^{a,b}$	$11,92 \pm 3,43^B$	$6,88 \pm 1,73^a$	$9,07 \pm 2,36^A$
C2	$6,53 \pm 2,19^a$	$9,32 \pm 2,53^A$	$8,83 \pm 2,45^{a,b}$	$12,85 \pm 3,20^{B,C}$
LC2	$8,15 \pm 2,43^a$	$10,11 \pm 2,79^{A,B}$	$6,68 \pm 2,02^a$	$8,92 \pm 2,26^A$
LC1	$12,57 \pm 3,40^{b,c}$	$19,56 \pm 4,86^C$	$11,41 \pm 2,81^{b,c}$	$13,08 \pm 3,34^{B,C}$
C1	$11,19 \pm 3,15^{a,b,c}$	$18,88 \pm 4,70^C$	$9,76 \pm 2,44^b$	$12,25 \pm 3,00^B$
Saccharose	$21,77 \pm 6,83^e$	$39,13 \pm 10,30^E$	$21,77 \pm 6,83^d$	$39,13 \pm 10,30^E$

Für die Kontrollprobe konnte nach 4 h ein mittlerer Eiskristalldurchmesser von  $21,77 \pm 6,83\ \mu\text{m}$  ermittelt werden, welcher während der Lagerung nach 72 h auf einen Wert von  $39,13 \pm 10,30\ \mu\text{m}$  anstieg. Durch die Zugabe von Carrageen konnte verglichen mit der Kontrollprobe eine deutliche Senkung des mittleren Durchmessers erzielt werden. Dies verdeutlicht, dass alle untersuchten Proben sowohl in der Kalium- als auch in der Calciumform eine eiskristallisationshemmende Aktivität aufweisen. Der höchste mittlere Eiskristalldurchmesser nach 72 h konnte für die Probe IC1 K mit  $23,41 \pm 5,42\ \mu\text{m}$  ermittelt werden. Im Vergleich zur Saccharoselösung stellt dies dennoch eine signifikante Abnahme des mittleren Durchmessers dar. Die höchste eiskristallisationshemmende Aktivität zeigt die Probe KC1 in der Kaliumform, welche nach 72 h einen mittleren Durchmesser von  $8,19 \pm 2,35\ \mu\text{m}$  aufweist. Neben KC1 K zeigen auch die Proben LC2 und IC3 in der Calciumform eine hohe eiskristallisationsinhibierende Aktivität.

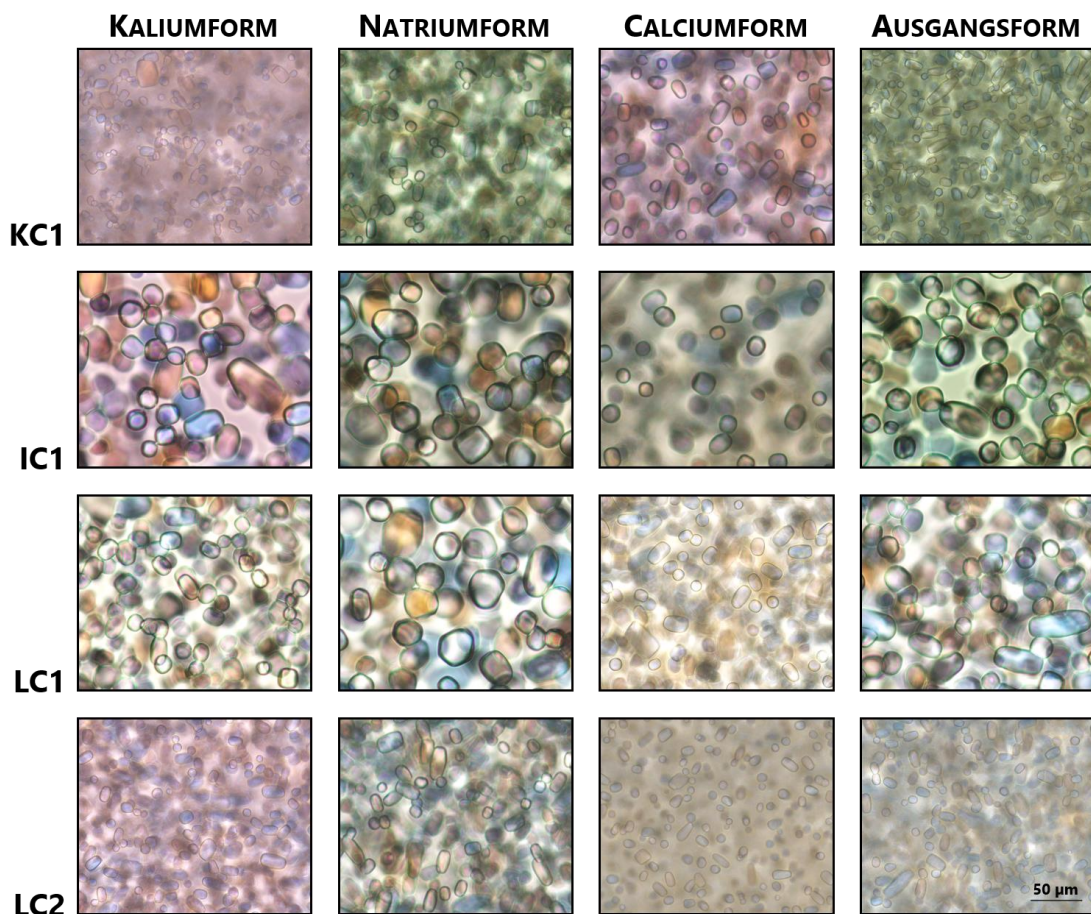
Aus dem Vergleich der beiden monokationischen Formen geht hervor, dass für das reine  $\kappa$ -Carrageen (KC1) die Kaliumform eine stärkere Hemmung der Eiskristallisation bewirkt, während das  $\iota$ -Carrageen (IC1) in der Calciumform eine höhere Aktivität zeigt. Kaliumionen zählen für Carrageene des  $\kappa$ -Typs zu den „monovalenten spezifischen Ionen“ und weisen eine hohe

helixstabilisierende Wirkung auf (Rochas und Rinaudo, 1980; Piculell, 2006). Für Carrageene des  $\iota$ -Typs zeigen hingegen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einen ausgeprägten stabilisierenden Effekt (Nilsson *et al.*, 1989). Da diese Ionenformen auch die höchste eisrekristallisationshemmende Aktivität aufweisen, kann vermutet werden, dass sich die Stabilisierung der geordneten Konformation positiv auf die Hemmung der Eisrekristallisation auswirkt und die vorliegende Sekundärstruktur der Polysaccharide demnach für die Wirkung von Bedeutung ist.

Für die Hybridcarrageene IC3, LC1, LC2 und C1 konnten in der Calciumform die niedrigsten mittleren Eiskristalldurchmesser und damit die höchste eisrekristallisationsinhibierende Wirkung ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss der Kationenform für diese Proben unabhängig von dem Anteil einzelner Carrageentypen im Polymer ist. Abweichend von diesem Trend zeigt das Hybridcarrageen C2 in der Kaliumform eine hohe eisrekristallisationsinhibierende Aktivität. Mit einem mittleren Eiskristalldurchmesser von  $9,32 \pm 2,53 \mu\text{m}$  nach 72 h unterscheidet sich die Probe C2 K nicht signifikant von der Probe KC1 in der Kaliumform ( $8,19 \pm 2,35 \mu\text{m}$ ).

Zusätzlich zu den Kalium- und Calciumformen wurden für die Proben KC1, IC1, LC1 und LC2 die Natriumformen über einen Kationenaustausch gewonnen und analog zu den anderen monokationischen Proben bei  $-12 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen nach 72 h (vgl. Abbildung 4.10) konnte für die Natriumform der Proben IC1, LC1 und LC2 eine niedrigere eisrekristallisationshemmende Aktivität verglichen mit der Kalium- oder Calciumform ermittelt werden, was sich in Form von größeren Eiskristallen widerspiegelt. Da dies bereits anhand einer optischen Betrachtung der Aufnahmen festgestellt werden konnte, erfolgte für die Natriumform dieser Proben keine quantitative Bestimmung des mittleren Eiskristalldurchmessers. Aufgrund der schlechteren eisrekristallisationshemmenden Eigenschaften der Hybridcarrageene LC1 und LC2 in der entsprechenden Natriumform wurde diese Kationenform für die Proben IC3, C2 und C1 nicht gewonnen. Für die Probe KC1 zeigt die Natriumform bei einer optischen Betrachtung der Eiskristallgröße hingegen eine höhere eisrekristallisationsinhibierende Aktivität verglichen mit der Calciumform. Dies deutet darauf hin, dass für den  $\kappa$ -Typ die Assoziation von monovalenten Kationen im Vergleich zu divalenten Kationen mit einer höheren Aktivität einhergeht. Die mikroskopische Aufnahme der Probe KC1 in der Natriumform zeigt dennoch deutlich größere Kristalle als die entsprechende Probe in der Kaliumform. Während Kaliumionen eine starke helixstabilisierende Wirkung für Carrageene des  $\kappa$ -Typs aufweisen, zeigen Natriumionen einen schwächeren stabilisierenden Effekt (Rochas und Rinaudo, 1980). Dies spiegelt sich ebenfalls in der eisrekristallisationshemmenden Wirkung der beiden monovalenten Kationen wider. Die

Ausgangsformen der Proben (siehe Abbildung 4.10), die eine Mischung verschiedener Kationen am Polymer assoziiert aufweisen, zeigen für die Carrageene KC1, IC1 und LC1 schlechtere funktionelle Eigenschaften als die entsprechende monokationische Form mit der höchsten eiskristallisationsinhibierenden Aktivität (vgl. Tabelle 4.13). Lediglich für die Probe LC2 konnte für die Ausgangsform eine ähnliche Eiskristallgröße wie für die Calciumform festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass ein Kationenaustausch von Carrageenen des  $\kappa$ -Typs in die Kaliumform bzw. von Carrageenen des  $\iota$ -Typs sowie Hybridcarrageenen in die Calciumform eine Verbesserung der eiskristallisationshemmenden Wirkung zur Folge hat.



**Abbildung 4.10:** Eiskristallbilder der Proben KC1, IC1, LC1 und LC2 in der Kalium-, Natrium- und Calciumform sowie der entsprechenden Ausgangsform nach einer Lagerungsdauer von 72 h bei  $-12,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alle Aufnahmen sind 40 x vergrößert dargestellt.

Neben Unterschieden in der Eiskristallgröße zeigen die untersuchten Proben ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der Eiskristallform. Während die Eiskristalle in Gegenwart von KC1 eine längliche, rechteckige Form aufweisen, die besonders in der Kaliumform sowie der Ausgangsform ersichtlich ist, zeigen die Eiskristallbilder der Proben IC1 und LC1 Eiskristalle mit einer runden Form. Die Eiskristalle in Gegenwart von LC2 weisen ähnlich wie für das untersuchte  $\kappa$ -Carrageen eine rechteckige Form auf, welche in der Calciumform am stärksten ausgeprägt ist.

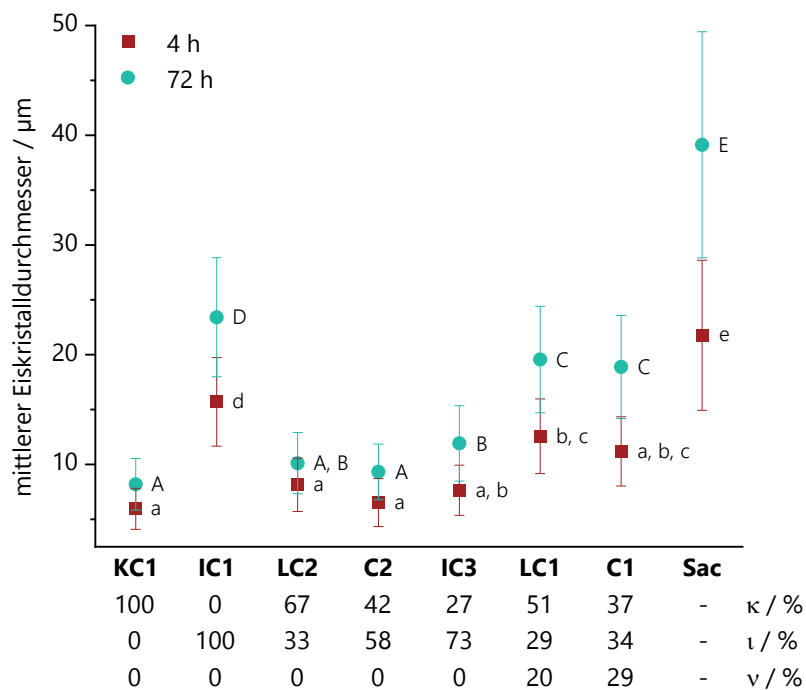
In der Literatur wurde der Einfluss der am Polysaccharid assoziierten Kationen auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität von Carrageenen bisher nicht untersucht, es wurden lediglich die Effekte einer Salzzugabe auf den mittleren Eiskristalldurchmesser ermittelt (Leiter *et al.*, 2017a; Leiter *et al.*, 2018). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer konstanten Salzkonzentration von 0,03 M die Zugabe von Kaliumchlorid oder Calciumchlorid eine deutliche Abnahme der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität des untersuchten  $\kappa$ -Carrageens im Vergleich mit der Probe ohne Salzzugabe zur Folge hat. Der mittlere Eiskristalldurchmesser, der in Gegenwart dieser Salze nach 96 h erhalten wurde, lag in einem ähnlichen Bereich wie der Durchmesser der 49 % Saccharoselösung, welche als Kontrollprobe mitgeführt wurde. Durch die Zugabe von Natriumchlorid konnte ebenfalls eine Erhöhung des mittleren Eiskristalldurchmessers im Vergleich zu der Carrageenlösung ohne Salzzugabe erhalten werden. Die Verschlechterung der Funktionalität war jedoch weniger stark ausgeprägt als in Gegenwart von Kalium- oder Calciumionen (Leiter *et al.*, 2018). Ähnliche Ergebnisse konnten bei einer Zugabe von Natrium- oder Kaliumhydroxid ermittelt werden (Leiter *et al.*, 2017a).

Dies verdeutlicht, dass der Einfluss von freien Salzen und assoziierten Kationen auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität unterschiedlich ist und anhand einer Salzzugabe keine Rückschlüsse auf den Effekt der am Polymer assoziierten Ionen gezogen werden können. Während für die Kaliumform des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten  $\kappa$ -Carrageens (KC1 K) der niedrigste mittlere Eiskristalldurchmesser erhalten wurde, führte in der Literatur die Zugabe von freien Kaliumionen zu einem Verlust der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität (Leiter *et al.*, 2017a; Leiter *et al.*, 2018). Die hohe Konzentration an Kaliumionen bei einer Zugabe von Salzen (30 mmol/L bzw. 60 mmol/L (Leiter *et al.*, 2017a; Leiter *et al.*, 2018)), verglichen mit der Konzentration an freien Kationen nach Kationenaustausch (0,23 - 2,36 mmol/L), könnte in einer verstärkten Aggregation des Polysaccharids und damit in der Ausbildung eines stärkeren Gelnetzwerks resultieren. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die Aggregation von Carrageenen durch die vorliegenden Ionen beeinflusst wird und dabei sowohl die Ionenart als auch die Ionenkonzentration eine Rolle spielen (Funami *et al.*, 2007). Dementsprechend könnten bei einer verstärkten Aggregation weniger Polymerketten für eine Interaktion mit der Oberfläche des Eiskristalls zur Verfügung stehen und dadurch zu einer Abnahme der eisrekristallisationshemmenden Wirkung führen.



### 4.4.2 Einfluss des Carrageentyps

Anhand eines Vergleichs der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität der verschiedenen Carrageentypen bei gleichbleibender Kationenform können Rückschlüsse auf den Einfluss der Polymerzusammensetzung gezogen werden. Die mittleren Eiskristalldurchmesser, die für die untersuchten Carrageene in der Kaliumform nach 4 h und 72 h erhalten wurden (siehe auch Tabelle 4.13), sowie die Zusammensetzung der Proben (vgl. Tabelle 4.8) sind in Abbildung 4.11 dargestellt.



**Abbildung 4.11:** Mittlerer Eiskristalldurchmesser (µm, n=4) der Kaliumformen der Carrageene (1 mg/mL) in 49 % (w/w) Saccharoselösung nach 4 h und 72 h bei einer Lagerungstemperatur von -12,0 °C. Bei der Probe „Sac“ handelt es sich um die Kontrollprobe ohne Zugabe von Carrageen. Die Zusammensetzung der Carrageene wurde mittels <sup>1</sup>H-Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) bestimmt (% , n=1). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im mittleren Eiskristalldurchmesser bei gleicher Lagerungszeit. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Tukey-Test (α=0,05). Bei Inhomogenität der Varianzen wurde die Welch ANOVA verwendet.

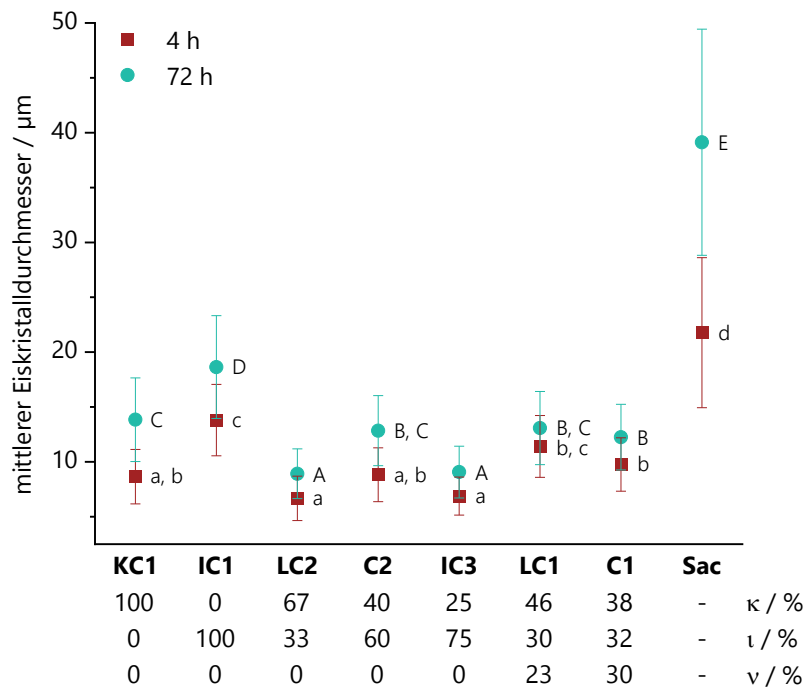
Für die Kaliumformen der verschiedenen Carrageene kann anhand der Ergebnisse für den mittleren Eiskristalldurchmesser vermutet werden, dass für diesen Kationentyp ein Zusammenhang zwischen der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität und dem Anteil an Einheiten des κ-Typs besteht. So zeigt das ι-Carrageen IC1 K von allen untersuchten Proben die niedrigste Aktivität. Für reines κ-Carrageen sowie die Carrageenproben, die sich teilweise aus κ-Einheiten zusammensetzen, konnte hingegen eine höhere eiskristallisationshemmende Wirkung festgestellt werden. Der niedrigste mittlere Eiskristalldurchmesser nach 72 h wurde für das κ-Carrageen KC1 K mit  $8,19 \pm 2,35 \mu\text{m}$  ermittelt. Für die κ/ι-Hybridcarrageene LC2 K und C2

K, welche einen  $\kappa$ -Carrageen-Anteil von 67 % bzw. 42 % aufweisen, konnten nach 72 h jedoch ebenfalls mittlere Eiskristalldurchmesser gemessen werden, welche sich nicht signifikant von der Probe KC1 K unterscheiden. Das Hybridcarrageen IC3 K zeigt nach 72 h einen mittleren Eiskristalldurchmesser von  $11,92 \pm 3,43 \mu\text{m}$  und weist damit eine signifikant niedrigere eiskristallisationshemmende Wirkung im Vergleich zu den Proben KC1 K und C2 K auf. Da die Probe IC3 eine vergleichbare Verteilung der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten wie das Carrageen C2 aufweist (lange Abschnitte von  $\iota$ -Einheiten, kurze Blöcke von  $\kappa$ -Einheiten), könnte die für die Probe IC3 K signifikant niedrigere eiskristallisationsinhibierende Aktivität auf den geringeren  $\kappa$ -Carrageen-Anteil von 27 % zurückgeführt werden. Darüber hinaus kann anhand der Ergebnisse der Proben LC1 und C1 davon ausgegangen werden, dass sich das Vorliegen von  $\nu$ -Einheiten störend auf die eiskristallisationshemmende Wirkung auswirkt, da diese Proben nach 72 h einen signifikant höheren Eiskristalldurchmesser aufweisen als die Hybridcarrageene, die sich aus Strukturelementen des  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typs zusammensetzen.

Der Einfluss des Carrageentyps auf die eiskristallisationshemmende Wirkung wurde ebenfalls anhand der Calciumformen der Proben untersucht. Die mittleren Eiskristalldurchmesser nach 4 h und 72 h (siehe auch Tabelle 4.13) sowie die Zusammensetzung der Proben (vgl. Tabelle 4.8) sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

Die höchste eiskristallisationsinhibierende Aktivität konnte für die Proben LC2 Ca ( $8,92 \pm 2,26 \mu\text{m}$ ) und IC3 Ca ( $9,07 \pm 2,36 \mu\text{m}$ ) festgestellt werden, welche eine Zusammensetzung von 67 %  $\kappa$ - und 33 %  $\iota$ -Einheiten (LC2 Ca) bzw. 27 %  $\kappa$ - und 73 %  $\iota$ -Einheiten (IC3 Ca) aufweisen. Das Hybridcarrageen C2, das hinsichtlich der Verteilung der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten dem Hybridcarrageen IC3 ähnelt, zeigt in der Calciumform nach 72 h einen signifikant höheren mittleren Eiskristalldurchmesser ( $12,85 \pm 3,20 \mu\text{m}$ ) als die Probe IC3 Ca. Da das Carrageen C2 Ca im Vergleich zu IC3 Ca durch einen niedrigeren Anteil an  $\iota$ -Einheiten gekennzeichnet ist, deutet dies darauf hin, dass die Zusammensetzung der Hybridcarrageene bzw. das Verhältnis der unterschiedlichen Strukturelemente einen Einfluss auf die eiskristallisationsinhibierende Aktivität hat. Innerhalb der Gruppe der Hybridcarrageene konnten für die Proben LC1 und C1, welche neben  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten ebenfalls aus Strukturelementen des  $\nu$ -Typs aufgebaut sind, signifikant höhere mittlere Eiskristalldurchmesser nach 72 h als für die  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageene ermittelt werden. Daher kann vermutet werden, dass sich auch für die Calciumform das Vorliegen von  $\nu$ -Einheiten negativ auf die Inhibierung der Eiskristallisation auswirkt. Mit einem mittleren Eiskristalldurchmesser von  $13,84 \pm 3,81 \mu\text{m}$  bzw.  $18,64 \pm 4,69 \mu\text{m}$  weisen die Calciumformen des

$\kappa$ -Carrageens und des  $\iota$ -Carrageens die höchsten Werte nach 72 h auf. Das Vorliegen verschiedener Carrageentypen geht für diese Kationenform demnach mit einer Verbesserung der funktionellen Eigenschaften einher.



**Abbildung 4.12:** Mittlerer Eiskristalldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ,  $n=4$ ) der Calciumformen der Carrageene (1 mg/mL) in 49 % (w/w) Saccharoselösung nach 4 h und 72 h bei einer Lagerungstemperatur von  $-12,0\text{ }^\circ\text{C}$ . Bei der Probe „Sac“ handelt es sich um die Kontrollprobe ohne Zugabe von Carrageen. Die Zusammensetzung der Carrageene wurde mittels  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR) bestimmt (% ,  $n=1$ ). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im mittleren Eiskristalldurchmesser bei gleicher Lagerungszeit. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Tukey-Test ( $\alpha=0,05$ ). Bei Inhomogenität der Varianzen wurde die Welch ANOVA verwendet.

Die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität von Carrageenen des  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typs wurde in der Literatur bereits beschrieben, allerdings wurde die Aktivität von Hybridcarrageenen bisher nicht untersucht. In einer Studie von Kiran-Yildirim und Gaukel (2020) konnte für ein Carrageen des  $\kappa$ -Typs eine höhere eisrekristallisationsinhibierende Aktivität in 49 % Saccharoselösung als für das untersuchte  $\iota$ -Carrageen ermittelt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden. In einer Studie von Kamińska-Dwórznička *et al.* (2020) konnte für diese Carrageentypen hingegen eine vergleichbare Aktivität festgestellt werden. Da die Analyse des mittleren Eiskristalldurchmessers in dieser Studie nicht in einem Modellsystem, sondern in einem authentischen Lebensmittel durchgeführt wurde, könnte dies eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse darstellen. Eine Bestimmung des Carrageentyps sowie eine Charakterisierung der am Polymer assoziierten Kationen wurde in den beschriebenen Literaturstudien allerdings nicht durchgeführt, was die Vergleichbarkeit der Daten erschwert.

### 4.4.3 Einfluss von Vorläufercarrageenen

Neben dem Einfluss der Kationenform und der Polymerzusammensetzung wurde ebenfalls untersucht, ob das Vorliegen von Vorläuferstufen die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität von Carrageenen beeinflusst. Hierfür wurde das Carrageen LC1 alkalisch modifiziert, um die in der Probe vorliegenden  $\nu$ -Einheiten, welche ausschließlich aus Galactose aufgebaut sind, in  $\iota$ -Einheiten umzuwandeln. Für das modifizierte Carrageen (mLC1) wurde ebenfalls eine Bestimmung des mittleren Eiskristalldurchmessers durchgeführt, um den Einfluss der strukturellen Modifizierung auf die Hemmung der Eisrekristallisation zu ermitteln. Die Ergebnisse für die Kaliumform der Probe mLC1 sind gemeinsam mit den Werten für die unmodifizierte Probe in Tabelle 4.14 aufgeführt.

**Tabelle 4.14:** Mittlerer Eiskristalldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ,  $n=4$ ) der Probe LC1 sowie des entsprechenden Polymers nach alkalischer Behandlung (mLC1) in der Kaliumform in 49 % (w/w) Saccharoselösung nach 4 h und 72 h bei einer Lagerungstemperatur von  $-12,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im mittleren Eiskristalldurchmesser bei gleicher Lagerungszeit. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Tukey-Test ( $\alpha=0,05$ ). Bei Inhomogenität der Varianzen wurde die Welch ANOVA verwendet.

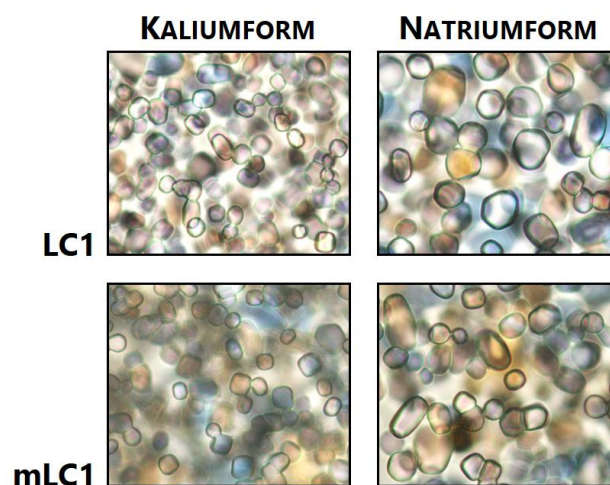
mittlerer Eiskristalldurchmesser / $\mu\text{m}$		
KALIUMFORM		
Probe	4 h	72 h
mLC1	$11,20 \pm 3,04^a$	$19,39 \pm 4,92^A$
LC1	$12,57 \pm 3,40^b$	$19,56 \pm 4,86^A$

Anhand der Ergebnisse für den mittleren Eiskristalldurchmesser ist ersichtlich, dass sich das alkalisch modifizierte Carrageen in der Kaliumform mit einem Durchmesser von  $19,39 \pm 4,92\ \mu\text{m}$  nach 72 h nicht signifikant von der unmodifizierten Probe in der Kaliumform unterscheidet (siehe auch Abbildung 4.13). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die  $\nu$ -Einheiten die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität dieser Probe kaum beeinflussen. Ausgehend von den Ergebnissen, die für die  $\kappa$ -/ $\iota$ - bzw.  $\kappa$ -/ $\iota$ -/ $\nu$ -Hybridcarrageene in der Kaliumform ermittelt wurden (siehe Kapitel 4.4.2), lag die Vermutung nahe, dass eine alkalische Modifizierung mit einer verbesserten eisrekristallisationshemmenden Aktivität einhergeht. Dies konnte für die Probe mLC1 jedoch nicht bestätigt werden. Da die vergleichsweise schlechte eisrekristallisationsinhibierende Wirkung der Probe mLC1 nicht länger auf das Vorliegen von  $\nu$ -Einheiten zurückgeführt werden kann, muss dieses Hybridcarrageen andere strukturelle Eigenschaften aufweisen, die sich negativ auf die Hemmung der Eisrekristallisation auswirken. So könnte beispielsweise die Verteilung der

Einheiten unterschiedlicher Carrageentypen bzw. die Länge der entsprechenden Abschnitte eine entscheidende Rolle für die eiskristallisationsinhibierende Aktivität spielen.

Das  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageen LC2, welches ähnlich wie Probe LC1 ebenfalls aus längeren Abschnitten aufeinanderfolgender  $\kappa$ -Einheiten aufgebaut ist, zeigt mit  $10,11 \pm 2,79 \mu\text{m}$  nach 72 h einen deutlich geringeren mittleren Eiskristalldurchmesser als die alkalisch modifizierte Probe mLC1 K ( $19,39 \pm 4,92 \mu\text{m}$ ). Bei einem enzymatischen Verdau der Proben LC1 und LC2 mittels  $\kappa$ -Carrageenase konnte anhand einer Analyse der freigesetzten Oligosaccharide gezeigt werden, dass das Carrageen LC2 durch das Enzym deutlich besser hydrolysiert wird (siehe Abbildung 9.18). So resultierte die enzymatische Hydrolyse in einer höheren Anzahl an freigesetzten Oligosacchariden, welche im Vergleich zur Probe LC1 auch eine höhere Intensität zeigten. Demnach kann angenommen werden, dass die Länge der aus  $\kappa$ -Einheiten aufgebauten Abschnitte für das Hybridcarrageen LC2 höher ist. Dies unterstützt die These, dass die Verteilung der unterschiedlichen Strukturelemente innerhalb des Hybridcarrageens einen Einfluss auf die Hemmung der Eiskristallisation hat. Es wäre denkbar, dass aufgrund der unterschiedlichen Flexibilität der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten (Schefer *et al.*, 2015) eine definierte Länge der Abschnitte für die Anlagerung des Polysaccharids an die Eiskristalloberfläche von Bedeutung ist.

Im Zuge der alkalischen Modifizierung wurde aufgrund der gewählten Bedingungen ebenfalls die Natriumform der Probe mLC1 erhalten. Ebenso wie für die Kaliumform erfolgte auch für die Natriumform eine Analyse der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität. Die mikroskopischen Aufnahmen beider Kationenformen sowie die der unmodifizierten Probe LC1 nach einer Lagerungszeit von 72 h sind Abbildung 4.13 zu entnehmen.



**Abbildung 4.13:** Eiskristallbilder der Probe LC1 sowie des alkalisch modifizierten Polymers mLC1 in der Kalium- und Natriumform nach einer Lagerungsdauer von 72 h bei  $-12,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Alle Aufnahmen sind 40 x vergrößert dargestellt.

Anhand der Aufnahmen zeigt sich, dass die Eiskristalle für die Natriumform des modifizierten Carrageens (mLC1 Na) eine geringere Größe aufweisen als die entsprechende Probe vor der alkalischen Behandlung. Somit konnte eine Verbesserung der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität durch die Umwandlung der  $\nu$ -Einheiten erreicht werden. Der Einfluss von Vorläufercarrageenen auf die funktionellen Eigenschaften scheint für diesen Kationentyp demnach stärker ausgeprägt zu sein als für die Kaliumform der Probe. Dies könnte möglicherweise auf die unterschiedlichen helixstabilisierenden Eigenschaften von Kalium- und Natriumionen in Gegenwart des  $\kappa$ -Typs zurückgeführt werden (Rochas und Rinaudo, 1980). Trotz einer verbesserten eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität nach alkalischer Modifizierung zeigt die Natriumform der Probe mLC1 dennoch deutlich größere Eiskristalle als die entsprechende Kaliumform (mLC1 K). Die Calciumform des alkalisch modifizierten Carrageens mLC1 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

#### 4.4.4 Einfluss der Sulfatgruppe an der G-Einheit

Um den Einfluss der Sulfatgruppe an der G-Einheit auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität zu untersuchen, wurde die Furcellaranprobe für die Analyse des mittleren Eiskristalldurchmessers herangezogen. Anhand eines Vergleichs mit dem  $\kappa$ -Carrageen (KC1) können so Rückschlüsse darüber gezogen werden, inwiefern die Sulfatgruppe an Position O-4 der G-Einheit die eisrekristallisationshemmende Wirkung des Polymers beeinflusst. Die Ergebnisse für den mittleren Eiskristalldurchmesser sind in Tabelle 4.15 aufgeführt.

**Tabelle 4.15:** Mittlerer Eiskristalldurchmesser ( $\mu\text{m}$ ,  $n=4$ ) der Furcellaranprobe (FC) sowie des  $\kappa$ -Carrageens (KC1) in der Kalium- und Calciumform in 49 % (w/w) Saccharoselösung nach 4 h und 72 h bei einer Lagerungstemperatur von  $-12,0\text{ }^\circ\text{C}$ . Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede im mittleren Eiskristalldurchmesser bei gleicher Lagerungszeit. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Tukey-Test ( $\alpha=0,05$ ). Bei Inhomogenität der Varianzen wurde die Welch ANOVA verwendet.

Probe	mittlerer Eiskristalldurchmesser / $\mu\text{m}$			
	KALIUMFORM		CALCIUMFORM	
	4 h	72 h	4 h	72 h
FC	$9,18 \pm 2,19^b$	$12,61 \pm 2,81^B$	$14,80 \pm 3,53^b$	$28,40 \pm 8,62^B$
KC1	$5,95 \pm 1,87^a$	$8,19 \pm 2,35^A$	$8,65 \pm 2,48^a$	$13,84 \pm 3,81^A$

Anhand der Werte für den mittleren Eiskristalldurchmesser der beiden monokationischen Formen des Furcellarans ist ersichtlich, dass die Kaliumform des Polysaccharids eine höhere eisrekristallisationsinhibierende Aktivität besitzt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für das untersuchte  $\kappa$ -Carrageen, welches in der Kaliumform ebenfalls eine höhere Aktivität zeigt. Somit

zeigen beide Polysaccharide einen übereinstimmenden Trend hinsichtlich des Einflusses der Kationenform auf die Hemmung der Eiskristallisation. Wie bereits in Kapitel 4.4.1 erwähnt, könnte der positive Effekt von assoziierten Kaliumionen auf eine erhöhte Stabilisierung der geordneten Konformation zurückgeführt werden.

Bei einem Vergleich der Werte für den mittleren Eiskristalldurchmesser beider Polysaccharide in der Kaliumform zeigt sich, dass das Furcellaran mit  $12,61 \pm 2,81 \mu\text{m}$  einen signifikant höheren Durchmesser nach 72 h aufweist als das  $\kappa$ -Carrageen ( $8,19 \pm 2,35 \mu\text{m}$ ). Demnach wirkt sich ein verringerter Sulfatgehalt negativ auf die eiskristallisationsinhibierende Wirkung aus. Für die Calciumform des Furcellarans kann ebenfalls ein signifikant höherer Eiskristalldurchmesser verglichen mit der Probe KC1 Ca festgestellt werden. Mit  $28,40 \pm 8,62 \mu\text{m}$  beträgt der Durchmesser für die Probe FC Ca mehr als das Doppelte des Durchmessers, welcher für das  $\kappa$ -Carrageen in der Calciumform erhalten wurde. Die Ergebnisse für die Furcellaranprobe verdeutlichen, dass die Sulfatgruppen eine entscheidende Rolle bei der Hemmung der Eiskristallisation spielen. Polysaccharide mit einem niedrigeren Sulfatgehalt könnten demnach weniger funktionelle Gruppen für eine Interaktion mit der Eiskristalloberfläche aufweisen, was in einer verringerten eiskristallisationsinhibierenden Aktivität resultiert. Darüber hinaus könnten die an Position O-4 der G-Einheit vorliegenden Sulfatgruppen maßgeblich zur Ausbildung und Stabilisierung der Sekundärstruktur beitragen, was ebenfalls eine mögliche Erklärung für die höhere Aktivität des untersuchten  $\kappa$ -Carrageens im Vergleich zur Furcellaranprobe darstellt.

## 4.5 Zusammenfassende Diskussion

Um den Zusammenhang zwischen der Struktur und der eiskristallisationshemmenden Wirkung von Carrageenen zu untersuchen, sollten verschiedene, strukturell möglichst diverse Polysaccharide für die Analyse verwendet werden. Die Carrageenproben wurden kommerziell bezogen und zunächst einer strukturellen Charakterisierung unterzogen. Bei den Proben handelte es sich zum einen um reine  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene, die sich durch ein hohes Molekulargewicht auszeichneten. Die Carrageene des  $\kappa$ -Typs lagen überwiegend mit Kaliumionen und kleineren Anteilen an anderen Ionen substituiert vor, während die  $\iota$ -Carrageene neben Kaliumionen auch Calcium- sowie zum Teil Natriumionen am Polymer assoziiert aufwiesen. Dies deckt sich mit in der Literatur beschriebenen Kationentypen. Darüber hinaus konnte für die  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene teilweise ein Zusatz von Zucker (Saccharose oder Glucose) nachgewiesen werden, was bei einem

Einsatz der Proben in Struktur-Funktionalitätsstudien zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte.

Neben Carrageenen des  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typs umfassten die Proben zum anderen Polysaccharide, die als  $\lambda$ -Carrageen vertrieben wurden, sich jedoch aus mehreren Carrageentypen zusammensetzten und nicht die für  $\lambda$ -Carrageene beschriebenen Strukturelemente enthielten. Dabei konnten sowohl Carrageene identifiziert werden, die aus  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten aufgebaut waren, als auch Carrageene, die neben dem  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typ ebenfalls  $\nu$ -Einheiten aufwiesen. Die Zusammensetzung dieser Polysaccharide war für die Proben mit zusätzlichen  $\nu$ -Einheiten vergleichsweise ähnlich. Für die Carrageene mit  $\kappa$ - und  $\iota$ -Strukturelementen variierten die Anteile an  $\kappa$ -Einheiten zwischen 27 % und 72 %. Darüber hinaus konnten deutliche Unterschiede in Bezug auf das Molekulargewicht (523 - 1787 kDa) und den Sulfatgehalt (17,9 - 31,3 Gew%) ermittelt werden, was verdeutlicht, dass die als  $\lambda$ -Carrageen vertriebenen Polysaccharide eine sehr heterogene Zusammensetzung zeigten. Demnach scheint die Bezeichnung „ $\lambda$ -Carrageen“ als technologischer Überbegriff für Carrageene verwendet zu werden, die sich durch schwache gelbildende Eigenschaften oder lediglich durch eine viskositätserhöhende Wirkung auszeichnen. Des Weiteren stand ebenfalls ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridcarrageen (Furcellaran) zur Verfügung, welches aufgrund der  $\beta$ -Einheiten durch einen niedrigen Sulfatgehalt gekennzeichnet war.

Für einige ausgewählte Proben (IC3, LC1, LC2, C1 und C2) erfolgte ebenfalls eine detaillierte Strukturcharakterisierung. Hierfür wurden spezifische rekombinante Carrageenasen in Kombination mit einer HILIC-MS-Methode sowie HPSEC-RI verwendet. Für die Proben IC3 (27 %  $\kappa$ , 73 %  $\iota$ ) und C2 (59 %  $\kappa$ , 41 %  $\iota$ ) konnte das Vorliegen eines  $\kappa$ / $\iota$ -Hybridcarrageens sowie eine ähnliche Verteilung der unterschiedlichen Strukturelemente innerhalb des Polysaccharids festgestellt werden. Der Einsatz der  $\iota$ -Carrageenase resultierte für beide Carrageene in einer deutlichen Freisetzung von Oligosacchariden sowie einer starken Reduktion des Molekulargewichts, was darauf hindeutet, dass die Polymere aus längeren Abschnitten aufeinanderfolgender  $\iota$ -Einheiten aufgebaut sind. Die enzymatische Freisetzung von Oligosacchariden mittels  $\kappa$ -Carrageenase ging hingegen mit geringen Veränderungen im Molekulargewicht einher, was vermuten lässt, dass die Strukturelemente des  $\kappa$ -Typs in kurzen Blöcken vorliegen.

Durch einen enzymatischen Verdau der Probe LC2 (72 %  $\kappa$ , 28 %  $\iota$ ) mit der  $\kappa$ -Carrageenase konnte ein Großteil des Polysaccharids zu Oligosacchariden abgebaut werden, bei einer Hydrolyse mittels  $\iota$ -Carrageenase konnten jedoch nur geringe Veränderungen im



Molekulargewicht festgestellt werden. Daher kann für das Carrageen LC2 davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Probe ebenfalls um ein  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageen handelt, welches aus blockweise vorliegenden  $\kappa$ -Einheiten und kürzeren Abschnitten von  $\iota$ -Einheiten aufgebaut ist. Da die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse mittels  $\kappa$ -Carrageenase zudem auf die Freisetzung von Hybridoligosacchariden hindeuteten, kann vermutet werden, dass die  $\kappa$ -Blöcke eingestreute  $\iota$ -Einheiten aufweisen.

Für die Proben LC1 (47 %  $\kappa$ , 31 %  $\iota$ , 22 %  $\nu$ ) und C1 (37 %  $\kappa$ , 33 %  $\iota$ , 30 %  $\nu$ ) konnten nach einer Behandlung mittels  $\kappa$ -Carrageenase enzymatisch freigesetzte Oligosaccharide des  $\kappa$ -Typs nachgewiesen werden sowie damit einhergehend eine Reduktion des Molekulargewichts. Dies deutet auf das Vorliegen von längeren Abschnitten von  $\kappa$ -Einheiten hin. Die Hydrolyse mittels  $\iota$ -Carrageenase resultierte hingegen nicht in der Freisetzung von niedermolekularen Spaltprodukten bzw. Carrageen-Oligosacchariden. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die  $\iota$ - und  $\nu$ -Einheiten kurze Blöcke innerhalb des Hybridcarrageens bilden. Ausgehend von der in der Literatur beschriebenen Enzymaktivität der  $\iota$ -Carrageenase aus *Alteromonas fortis* kann zudem vermutet werden, dass die aus  $\iota$ - und  $\nu$ -Einheiten bestehenden Abschnitte weniger als vier aufeinanderfolgende  $\iota$ -Einheiten aufweisen, sodass eine Spaltung der glykosidischen Bindungen mittels  $\iota$ -Carrageenase nicht möglich ist (Jouanneau *et al.*, 2010a).

Für das Furcellaran resultierte die Hydrolyse mittels  $\iota$ -Carrageenase erwartungsgemäß nicht in der Freisetzung von Oligosacchariden. Bei einem Verdau der Probe mittels  $\kappa$ -Carrageenase konnte sowohl eine enzymatische Freisetzung von Oligosacchariden des  $\kappa$ -Typs als auch von  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridoligosacchariden nachgewiesen werden. Die enzymatische Hydrolyse ging zudem mit einer deutlichen Verringerung des Molekulargewichts einher. Damit bestätigen die Ergebnisse, dass es sich bei Furcellaran um ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridcarrageen handelt. Des Weiteren deuten die identifizierten Oligosaccharide darauf hin, dass im Polymer längere  $\kappa$ -Abschnitte mit eingestreuten  $\beta$ -Einheiten vorliegen.

Der Einsatz von rekombinanten Carrageenasen erwies sich in Kombination mit der entwickelten HILIC-MS-Methode und einer HPSEC-RI-Analyse als gut geeignet, um Carrageene detailliert zu charakterisieren. Dadurch können Informationen über die Verteilung von Struktureinheiten verschiedener Carrageentypen im Polymer erhalten werden, die in der Literatur selten beschrieben werden (Guibet *et al.*, 2008; Jouanneau *et al.*, 2010a; Jouanneau *et al.*, 2010b) und besonders für Hybridcarrageene von hohem Interesse sind. Dies stellt einen Vorteil gegenüber klassischen Methoden zur Strukturaufklärung wie zum Beispiel einer Bestimmung des

Carrageentyps mittels NMR-Spektroskopie oder einer Analyse der Monosaccharidzusammensetzung dar, welche nur begrenzt Informationen über die Feinstruktur der Polysaccharide liefern. Eine Identifizierung von enzymatisch freigesetzten Oligosacchariden mit einem DP > 6 war anhand der HILIC-MS-Methode aufgrund starker Quellenfragmentierung, die sowohl zu einem Verlust von Sulfatgruppen als auch zu einer Abspaltung von Monosaccharideinheiten führte, allerdings nicht möglich. Um höhere Oligomere zuzuordnen, könnten diese präparativ isoliert und mittels MS und NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Hierfür könnten auch alternative Ionisierungstechniken wie MALDI eingesetzt werden.

Zur Modifikation der strukturell charakterisierten Carrageene konnte erfolgreich eine Methode zum Kationenaustausch sowie eine Methode zur Entfernung von Vorläufercarrageenen etabliert werden. Die vollständige Umwandlung der  $\nu$ -Einheiten in den  $\iota$ -Typ konnte für die Probe mLC1 anhand einer Bestimmung des Carrageentyps sowie einer Analyse der Monosaccharidverteilung bestätigt werden. Aufgrund der alkalischen Bedingungen war die Entfernung der Vorläuferstufen jedoch mit einer Abnahme des Molekulargewichts verbunden, welche vermutlich auf die *Base Peeling*-Reaktion (Doyle *et al.*, 2010) oder auf eine partielle Hydrolyse während der Dialyse zurückzuführen ist (Leiter *et al.*, 2017b). Da das gewichtsmittlere Molekulargewicht der Proben auch nach alkalischer Modifikation 540 kDa bzw. 686 kDa betrug, war jedoch kein Einfluss auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität zu erwarten (Leiter *et al.*, 2017b).

Anhand einer Analyse des Kationengehaltes mittels ICP-OES konnte bestätigt werden, dass für die Kalium-, Natrium- und Calciumformen der Carrageene das gewünschte Kation als dominierende Ionenspezies erhalten wurde. Der Austausch führte jedoch teilweise zu einem Kationenüberschuss aufgrund von freien Salzen in der Probe. Da die Konzentration an freien Kationen für die monokationischen Carrageene mit 0,23 - 2,36 mmol/L gering war, kann davon ausgegangen werden, dass die eisrekristallisationshemmende Wirkung der Carrageene nicht beeinflusst wurde (Leiter *et al.*, 2017a). Zudem wies auch die Mehrheit der kommerziellen Carrageene einen gewissen Salzüberschuss auf. Für die Calciumformen der Proben KC1, IC1 und LC2 konnte darüber hinaus ein verringertes Molekulargewicht nach Kationenaustausch festgestellt werden, welches jedoch weiterhin in einem Größenbereich lag, der für Carrageenpolysaccharide üblich ist (van de Velde und de Ruiter, 2002; Campo *et al.*, 2009).

Der Einfluss der chemischen Struktur auf die eisrekristallisationshemmende Wirkung der Carrageene wurde in einem Modellsystem (49 % (w/w) Saccharoselösung) untersucht und die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität der Polysaccharide anhand des mittleren

Eiskristalldurchmessers beurteilt. Von den untersuchten Kationenformen wies das reine  $\kappa$ -Carrageen in der Kaliumform die höchste eisrekristallisationshemmende Wirkung auf, während das  $\iota$ -Carrageen in der Calciumform die höchste Aktivität zeigte. Die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität, die für das  $\iota$ -Carrageen ermittelt wurde, war unabhängig von der Kationenform allerdings deutlich niedriger als für das  $\kappa$ -Carrageen. Die Ionenarten, die gegenüber  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Carrageen in einer erhöhten Hemmung der Eisrekristallisation resultierten, weisen für die entsprechenden Carrageentypen auch eine helixstabilisierende Wirkung auf (Rochas und Rinaudo, 1980; Nilsson *et al.*, 1989). Daher kann vermutet werden, dass die vorliegende Sekundärstruktur der Carrageene von Bedeutung für die eisrekristallisationshemmende Wirkung ist. Anhand einer optischen Auswertung der Eiskristallbilder konnte zudem gezeigt werden, dass die Natriumform des untersuchten  $\kappa$ -Carrageens entsprechend ihrer Eiskristallgröße zwischen der Kalium- und der Calciumform eingeordnet werden kann. Demnach resultiert eine Assoziation von monovalenten Kationen für den  $\kappa$ -Typ in einer erhöhten eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität. Die Hybridcarrageene IC3, LC1, LC2 und C1 zeigten, unabhängig von den Anteilen einzelner Carrageentypen, in der Calciumform eine höhere eisrekristallisationsinhibierende Aktivität als in der Kaliumform. Für das Hybridcarrageen C2 konnte hingegen in der Kaliumform eine hohe Aktivität festgestellt werden.

Die Ergebnisse, die für die verschiedenen Carrageene in der Kaliumform ermittelt wurden, deuten darauf hin, dass für diesen Kationentyp ein Zusammenhang zwischen der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität und dem Anteil an  $\kappa$ -Einheiten besteht. Der niedrigste Wert für den mittleren Eiskristalldurchmesser konnte nach 72 h für das reine  $\kappa$ -Carrageen (8,19  $\mu\text{m}$ ) festgestellt werden. Aber auch die  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageene LC2 K und C2 K, welche einen  $\kappa$ -Carrageen-Anteil von 67 % bzw. 42 % aufweisen, zeigten eine hohe eisrekristallisationshemmende Wirkung, welche sich nicht signifikant von der Probe KC1 K unterschied. Die Probe IC3, bei der es sich ebenfalls um ein  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageen handelt, zeigte in der Kaliumform eine signifikant schlechtere eisrekristallisationsinhibierende Aktivität im Vergleich zu den Proben KC1 und C2. Dies könnte für das Carrageen IC3 auf den niedrigeren prozentualen Anteil an  $\kappa$ -Einheiten von 27 % zurückgeführt werden.

In der Calciumform konnte für die Proben LC2 (67 %  $\kappa$ , 33 %  $\iota$ ) und IC3 (25 %  $\kappa$ , 75 %  $\iota$ ) die höchste eisrekristallisationsinhibierende Aktivität ermittelt werden. Für das Hybridcarrageen C2, welches eine ähnliche Verteilung der  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Einheiten wie Probe IC3 aufweist, konnte hingegen eine signifikant schlechtere eisrekristallisationshemmende Wirkung festgestellt werden. Dies

deutet darauf hin, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Strukturelemente einen Einfluss auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität hat. Die Carrageene KC1 und IC1 zeigten in der Calciumform eine niedrigere eisrekristallisationsinhibierende Aktivität als die untersuchten Hybridcarrageene. Demnach scheint sich für diese Kationenform das Vorliegen verschiedener Carrageentypen positiv auf die Hemmung der Eisrekristallisation auszuwirken.

Innerhalb der Gruppe der Hybridcarrageene wiesen die Proben mit zusätzlichen  $\nu$ -Einheiten (LC1, C1) sowohl in der Kalium- als auch der Calciumform höhere Eiskristalldurchmesser als die  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageene auf. Daher kann vermutet werden, dass sich zusätzliche  $\nu$ -Einheiten störend auf die Inhibierung der Eisrekristallisation auswirken. Die Ergebnisse, die für die Probe mLC1 nach Entfernung der Vorläuferstufen erhalten wurden, zeigten jedoch, dass die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität nicht (Kaliumform) bzw. nur geringfügig (Natriumform) durch das Vorliegen von  $\nu$ -Einheiten beeinflusst wurde. Der vergleichsweise hohe mittlere Eiskristalldurchmesser der Probe mLC1 muss demnach in anderen Struktureigenschaften begründet sein. Anhand einer enzymatischen Hydrolyse der Hybridcarrageene LC1 und LC2 mittels  $\kappa$ -Carrageenase konnte gezeigt werden, dass die Probe LC1 kürzere Abschnitte an  $\kappa$ -Einheiten im Vergleich zur Probe LC2 aufweist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Länge der  $\kappa$ -Abschnitte einen Einfluss auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität hat und könnte eine Erklärung für die niedrige Aktivität der Probe LC1 bzw. mLC1 darstellen.

Anhand der Ergebnisse zur eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität des Furcellarans war ersichtlich, dass dieses in der Kaliumform eine signifikant niedrigere Aktivität als das  $\kappa$ -Carrageen zeigte. Dementsprechend resultiert eine verringerte Anzahl an Sulfatgruppen an der G-Einheit in einer Verschlechterung der funktionellen Eigenschaften. Das Vorliegen einer weiteren Sulfatgruppe an Position O-2 der DA-Einheit, was strukturell gesehen einem  $\iota$ -Carrageen entsprechen würde, führte verglichen mit einem  $\kappa$ -Carrageen ebenfalls zu einer Abnahme der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Anzahl und/oder die Position der Sulfatgruppen maßgeblich für die Inhibierung der Eisrekristallisation ist.

Anhand der Daten, die aus der Bestimmung der eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität der strukturell unterschiedlichen Carrageene hervorgehen, zeigt sich, dass die vorliegende Sekundärstruktur eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Eisrekristallisation spielt. So könnte einerseits die Anzahl und die Positionierung der funktionellen Gruppen innerhalb der Helixstruktur für die Adsorption des Polysaccharids an die Oberfläche der Eiskristalle von

Bedeutung sein. Zum anderen wäre ebenfalls denkbar, dass nicht die Anordnung einzelner Strukturelemente, sondern Eigenschaften wie beispielsweise die Flexibilität der ausgebildeten Helix für die Anlagerung an die Eiskristalloberfläche entscheidend ist. Diese strukturellen Voraussetzungen scheinen für die Kaliumform des  $\kappa$ -Carrageens KC1 bestmöglich erfüllt zu sein, da diese Probe von allen untersuchten Carrageenen die höchste eiskristallisationsinhibierende Aktivität zeigte. Die Struktur der geordneten Konformation der Carrageene wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren bestimmt. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass besonders der Einfluss der am Polymer assoziierten Kationenart sowie des Carrageentyps eng miteinander verknüpft sind. Eine hohe helixstabilisierende Wirkung der Kationen scheint sich positiv auf die Hemmung der Eiskristallisation auszuwirken. Dieser stabilisierende Effekt ist jedoch vom vorliegenden Carrageentyp abhängig. Darüber hinaus kann die eiskristallisationsinhibierende Aktivität ebenfalls durch eine Veränderung des Sulfatierungsmusters beeinflusst werden, wie am Beispiel der Furcellaranprobe gezeigt werden konnte. Um den Einfluss einer vollständigen Desulfatierung an Position O-4 der G-Einheit des  $\kappa$ -Carrageens zu untersuchen, könnte in weiterführenden Experimenten eine  $\kappa$ -Carrageen-G4S-Sulfatase herangezogen werden. Durch den Einsatz einer  $\iota$ -Carrageen-G4S-Sulfatase könnte darüber hinaus der Einfluss der Sulfatgruppe an Position O-2 der DA-Einheit untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Vorliegen von Vorläuferstufen innerhalb der Polymerkette für die eiskristallisationsinhibierende Aktivität der Carrageene eine eher untergeordnete Rolle spielt. So könnte gegebenenfalls die Länge der geordneten Abschnitte ( $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Abschnitte) für die Hemmung der Eiskristallisation von größerer Bedeutung sein. Da der Einfluss von Vorläufercarrageenen nur anhand einer ausgewählten Probe untersucht wurde, könnten weitere Proben mit unterschiedlichen Anteilen verschiedener Vorläuferstufen herangezogen werden, um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Carrageene stellen eine Gruppe von Polysacchariden dar, die natürlicherweise in der Zellwand von Rotalgen vorkommen. Als Bestandteil der Algenzellwand tragen Carrageene zur Flexibilität bei und schützen die Pflanze vor Austrocknung. In isolierter Form werden die Polysaccharide als Lebensmittelzusatzstoff verwendet. Dabei werden die viskositätserhöhenden, stabilisierenden und gelbildenden Eigenschaften der Carrageene für verschiedenste Anwendungen in Lebensmitteln, Futtermitteln und im kosmetischen Bereich genutzt. Darüber hinaus weisen Carrageene auch eine eiskristallisationsinhibierende Aktivität auf. Die Eiskristallisation ist ein Prozess, der im Zuge der Lagerung von gefrorenen Lebensmitteln wie Eiscreme auftritt und eine Zunahme der Eiskristallgröße zur Folge hat. Da sich größere Eiskristalle negativ auf die Textur und die sensorischen Eigenschaften des Lebensmittels auswirken, stellt die Eiskristallisation einen unerwünschten Prozess dar. Für Carrageene ist der Mechanismus der eiskristallisationshemmenden Wirkung bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird in der Literatur allerdings davon ausgegangen, dass Carrageene an die Oberfläche der Eiskristalle adsorbieren, wodurch eine Anlagerung weiterer Wassermoleküle in das Kristallgitter unterdrückt wird. Neben dem genauen Mechanismus wurden auch die strukturellen Voraussetzungen der Polysaccharide für die Inhibierung der Eiskristallisation bisher nicht näher beschrieben. Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Struktur und der eiskristallisationshemmenden Wirkung von Carrageenen können daher maßgeblich zum Verständnis dieser funktionellen Eigenschaft beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten definierte Carrageene mit einer möglichst hohen strukturellen Vielfalt für die Analyse der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität eingesetzt werden, um so den Einfluss verschiedener Strukturparameter beurteilen zu können. Die verwendeten Carrageene wurden kommerziell bezogen und zunächst ohne weitere Modifikationen umfangreich strukturell charakterisiert. Mithilfe von Kernspinresonanzspektroskopie, Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (HPSEC) in Kombination mit Brechungsindex- (RI-) und Mehrwinkellichtstreuungsdetektion, Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma konnte gezeigt werden, dass sowohl reine  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageene als auch Proben mit verschiedenen Carrageentypen vorlagen. Diese Gruppe umfasste sowohl Proben mit variierenden Anteilen an  $\kappa$ -Carrageen (27 - 72 %) und  $\iota$ -Carrageen (73 - 28 %) als auch Proben, für die neben dem  $\kappa$ - und  $\iota$ -Typ ebenfalls der  $\nu$ -Typ nachgewiesen

wurde und die eine ähnliche Zusammensetzung zeigten. Diese können sowohl in Form eines Hybridpolymers als auch einer Polymermischung auftreten, bei der die verschiedenen Carrageentypen nicht kovalent verknüpft sind. Die kommerziell bezogenen Proben umfassten ebenfalls sechs als  $\lambda$ -Carrageen deklarierte Polysaccharide, jedoch konnten für keine dieser Proben Strukturelemente des  $\lambda$ -Typs nachgewiesen werden. Des Weiteren lag ebenfalls eine Furcellaranprobe vor, welche sowohl Einheiten des  $\kappa$ -Typs als auch  $\beta$ -Strukturelemente aufwies. Neben unterschiedlichen Polysaccharidstrukturen konnten in den analysierten Carrageenen auch unterschiedliche Mengen an Kalium-, Calcium- und Natriumionen nachgewiesen werden.

Um Informationen über die Feinstruktur der Polysaccharide zu erhalten, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine geeignete Methode zu entwickeln, die eine detailliertere Charakterisierung der Polysaccharide ermöglicht. Dies ist besonders für Hybridcarrageene von Relevanz, da so abgeschätzt werden kann, ob die unterschiedlichen Einheiten kovalent verknüpft sind und wie sie im Polymer verteilt vorliegen. Die entwickelte Methode basierte auf dem Einsatz spezifischer rekombinant gewonnener Carrageenasen und einer anschließenden Analyse der enzymatisch freigesetzten Oligosaccharide mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* in Kombination mit Massenspektrometrie. Zudem wurde der unverdaute Rückstand mittels HPSEC-RI analysiert. Die Eignung dieser Methode zur Charakterisierung der Feinstruktur konnte anhand einer Analyse ausgewählter Carrageenproben demonstriert werden. So konnte für alle untersuchten Proben das Vorliegen eines Hybridcarrageens bestätigt werden. Für die Proben IC3 und C2 konnte festgestellt werden, dass diese aus längeren Blöcken aufeinanderfolgender  $\iota$ -Einheiten sowie kurzen Abschnitten von  $\kappa$ -Einheiten aufgebaut waren. Die Probe LC2 zeigte hingegen eine blockweise Anordnung der  $\kappa$ -Einheiten, während die Strukturelemente des  $\iota$ -Typs vereinzelt oder in sehr kurzen Abschnitten vorlagen. Die Hybridcarrageene LC1 und C1, die aus zusätzlichen  $\nu$ -Strukturelementen aufgebaut waren, wiesen ebenfalls lange Abschnitte von  $\kappa$ -Einheiten auf, wohingegen die  $\iota$ - und  $\nu$ -Einheiten kurze Blöcke innerhalb der Polymerkette bildeten. Anhand einer Analyse des Furcellarans konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesem Polysaccharid um ein  $\kappa$ -/ $\beta$ -Hybridcarrageen handelte, welches aus längeren Abschnitten von  $\kappa$ -Einheiten mit eingestreuten  $\beta$ -Einheiten aufgebaut war.

Um den Einfluss verschiedener Strukturparameter auf die eiskristallisationsinhibierende Aktivität untersuchen zu können, wurden die detailliert charakterisierten Carrageene strukturell modifiziert. Mithilfe eines Kationenaustauschs konnten erfolgreich monokationische Formen (Kalium-, Natrium- und Calciumform) der Carrageene gewonnen werden. Zudem erfolgte für die Probe

LC1 eine Entfernung der  $\nu$ -Einheiten, um den Einfluss von Vorläufercarrageenen auf die eisrekristallisationshemmende Wirkung untersuchen zu können.

Die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität der Polysaccharide wurde in einer Modelllösung (49 % (w/w) Saccharoselösung) anhand des mittleren Eiskristalldurchmessers bestimmt. Anhand der Ergebnisse, die für die unterschiedlichen Carrageentypen in der Kaliumform ermittelt wurden, kann vermutet werden, dass sich für diese Kationenform ein hoher Anteil an Einheiten des  $\kappa$ -Typs positiv auf die Hemmung der Eisrekristallisation auswirkt. So konnte sowohl für das reine  $\kappa$ -Carrageen als auch für Proben mit einem  $\kappa$ -Carrageen-Anteil von 67 % bzw. 42 % eine hohe eisrekristallisationshemmende Wirkung festgestellt werden. Das reine  $\iota$ -Carrageen wies von allen untersuchten Carrageenproben in der Kaliumform die niedrigste eisrekristallisationsinhibierende Aktivität auf.

In der Calciumform konnten für das reine  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageen höhere Eiskristalldurchmesser bestimmt werden als für die untersuchten Hybridcarrageene. Das Vorliegen verschiedener Struktureinheiten resultierte für diesen Kationentyp demnach in einer verstärkten Hemmung der Eisrekristallisation. Die höchste eisrekristallisationsinhibierende Aktivität konnte für die Calciumformen der  $\kappa/\iota$ -Hybridcarrageene LC2 und IC3 ermittelt werden. Während das Carrageen LC2 eine Zusammensetzung von 67 %  $\kappa$ - und 33 %  $\iota$ -Einheiten zeigte, konnte für die Probe IC3 ein Anteil an  $\kappa$ - bzw.  $\iota$ -Carrageen von 25 % bzw. 75 % bestimmt werden. Das Hybridcarrageen C2 (40 %  $\kappa$ , 60 %  $\iota$ ), das hinsichtlich der Verteilung der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Einheiten Probe IC3 ähnelt, zeigte hingegen einen signifikant höheren mittleren Eiskristalldurchmesser nach 72 h. Dies lässt darauf schließen, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Strukturelemente die eisrekristallisationshemmende Wirkung von Hybridcarrageenen beeinflusst.

Die Hybridcarrageene LC1 und C1 wiesen in beiden monokationischen Formen eine vergleichsweise niedrige eisrekristallisationsinhibierende Aktivität auf. In der Kaliumform konnte lediglich für das  $\iota$ -Carrageen ein höherer mittlerer Eiskristalldurchmesser ermittelt werden, während in der Calciumform neben dem  $\iota$ -Carrageen auch das  $\kappa$ -Carrageen einen höheren Durchmesser zeigte. Da für die Proben LC1 und C1 ebenfalls Strukturelemente des  $\nu$ -Typs nachgewiesen wurden, könnte vermutet werden, dass sich diese störend auf die Hemmung der Eisrekristallisation auswirken. Anhand der Ergebnisse für das von Vorläuferstufen befreite Carrageen mLC1 kann der Einfluss dieser Strukturelemente jedoch als gering bewertet werden. Dies deutet darauf hin, dass der Anteil an  $\kappa$ - und  $\iota$ -Strukturelementen sowie die Länge der entsprechenden Abschnitte einen höheren Einfluss auf die Hemmung der Eisrekristallisation hat.



Bei Unterschieden hinsichtlich des Sulfatierungsmusters der Carrageene konnte hingegen ein Einfluss auf die eisrekristallisationshemmende Wirkung festgestellt werden. So zeigte das Furcellaran einen signifikant höheren mittleren Eiskristalldurchmesser als das  $\kappa$ -Carrageen, was darauf schließen lässt, dass sich ein verringerter Sulfatgehalt an Position O-4 der G-Einheit negativ auf die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität auswirkt. Dies könnte auf Veränderungen in der ausgebildeten Sekundärstruktur oder auf eine verringerte Anzahl an funktionellen Gruppen für die Interaktion der Polysaccharide mit der Eiskristalloberfläche zurückzuführen sein.

Zusammenfassend verdeutlichen die Daten zur eisrekristallisationsinhibierenden Aktivität strukturell unterschiedlicher Carrageene, dass die Sekundärstruktur der Polysaccharide für die funktionellen Eigenschaften von großer Bedeutung ist und durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren bestimmt wird. Das Vorliegen einer definierten Helixstruktur könnte eine notwendige Voraussetzung für die Adsorption der Carrageene an die Eiskristalloberfläche darstellen und so die Hemmung der Eisrekristallisation beeinflussen. Dabei könnten sowohl die Position einzelner funktioneller Gruppen als auch Eigenschaften wie die Flexibilität der Helix entscheidend für die eisrekristallisationsinhibierende Aktivität sein.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABLETT, S., CLARK, A. & REES, D. 1982. Assessment of the flexibilities of carbohydrate polymers by proton-NMR relaxation and line shape analysis. *Macromolecules*, 15, 597-602.
- AGUILAN, J., BROOM, J., HEMMINGSON, J., DAYRIT, F., MONTAÑO, M., DANCEL, M., NIÑONUEVO, M. & FURNEAUX, R. 2003. Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. *Botanica Marina*, 46, 179-192.
- ÁLVAREZ-VIÑAS, M., RIVAS, S., TORRES, M. & DOMÍNGUEZ, H. 2023. Microwave-assisted extraction of carrageenan from *Sarcopeltis skottsbergii*. *Marine Drugs*, 21, 83.
- ANASTYUK, S., BARABANOVA, A., CORREC, G., NAZARENKO, E., DAVYDOVA, V., HELBERT, W., DMITRENOK, P. & YERMAK, I. 2011. Analysis of structural heterogeneity of kappa/beta-carrageenan oligosaccharides from *Tichocarpus crinitus* by negative-ion ESI and tandem MALDI mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, 86, 546-554.
- ANDERSON, N., CAMPBELL, J., HARDING, M., REES, D. & SAMUEL, J. 1969. X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for kappa- and iota-carrageenans. *Journal of Molecular Biology*, 45, 85-97.
- ANTONOPOULOS, A., FAVETTA, P., HELBERT, W. & LAFOSSE, M. 2007. On-line liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for kappa-carrageenan oligosaccharides with a porous graphitic carbon column. *Journal of Chromatography A*, 1147, 37-41.
- ASLANIDIS, C. & DE JONG, P. 1990. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18, 6069-6074.
- AZEVEDO, R., OLIVEIRA, A., ALMEIDA, A. & GOMES, L. 2023. Determination by ICP-MS of essential and toxic trace elements in gums and carrageenans used as food additives commercially available in the Portuguese market. *Foods*, 12, 1408.
- BELTON, P., CHILVERS, G., MORRIS, V. & TANNER, S. 1984. Effects of group I cations on the gelation of iota-carrageenan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6, 303-308.
- BELTON, P., GOODFELLOW, B. & WILSON, R. 1989. A variable-temperature fourier-transform infrared study of gelation in iota-carrageenans and kappa-carrageenans. *Macromolecules*, 22, 1636-1642.
- BELTON, P., MORRIS, V. & TANNER, S. 1986. Potassium-39 and rubidium-87 NMR study of chemical shift effects in iota- and kappa-carrageenan gels. *Macromolecules*, 19, 1618-1621.
- BIRNBOIM, H. & DOLY, J. 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-1523.
- BIXLER, H. & PORSE, H. 2010. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*, 23, 321-335.
- BLOND, G. 1988. Velocity of linear crystallization of ice in macromolecular systems. *Cryobiology*, 25, 61-66.
- BONGAERTS, K., PAOLETTI, S., DENEFF, B., VANNESTE, K., CUPPO, F. & REYNAERS, H. 2000. Light scattering investigation of iota-carrageenan aqueous solutions. Concentration dependence of association. *Macromolecules*, 33, 8709-8719.
- BORNHORST, J. & FALKE, J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245-254.
- BROWN, J., SEYMOUR, J., BROX, T., SKIDMORE, M., WANG, C., CHRISTNER, B., LUO, B.-H. & CODD, S. 2014. Recrystallization inhibition in ice due to ice binding protein activity detected by nuclear magnetic resonance. *Biotechnology Reports*, 3, 60-64.

- BUDIAMAN, E. & FENNEMA, O. 1987. Linear rate of water crystallization as influenced by viscosity of hydrocolloid suspensions. *Journal of Dairy Science*, 70, 547-554.
- CAMPO, V., KAWANO, D., DA SILVA, D. & CARVALHO, I. 2009. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis - a review. *Carbohydrate Polymers*, 77, 167-180.
- CECH, N. & ENKE, C. 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20, 362-387.
- CELIE, P., PARRET, A. & PERRAKIS, A. 2016. Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 38, 145-154.
- CHEVENIER, A., JOUANNEAU, D. & FICKO-BLEAN, E. 2023. Carrageenan biosynthesis in red algae: a review. *The Cell Surface*, 9, 100097.
- CIANCIA, M., MATULEWICZ, M., FINCH, P. & CERZO, A. 1993a. Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 238, 241-248.
- CIANCIA, M., NOSEDA, M., MATULEWICZ, M. & CERZO, A. 1993b. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa-iota-series, mu-nu-series and lambda-series. *Carbohydrate Polymers*, 20, 95-98.
- COHEN, A., NAJARIAN, D. & KARGER, B. 1990. Separation and analysis of DNA-sequence reaction-products by capillary gel-electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 516, 49-60.
- COOK, K. & HARTEL, R. 2010. Mechanisms of ice crystallization in ice cream production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 213-222.
- DALGLEISH, D. & MORRIS, E. 1988. Interactions between carrageenans and casein micelles: electrophoretic and hydrodynamic properties of the particles. *Food Hydrocolloids*, 2, 311-320.
- DE RUITER, G. & RUDOLPH, B. 1997. Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 389-395.
- DIENER, M., ADAMCIK, J., SÁNCHEZ-FERRER, A., JAEDIG, F., SCHEFER, L. & MEZZENGA, R. 2019. Primary, secondary, tertiary and quaternary structure levels in linear polysaccharides: from random coil, to single helix to supramolecular assembly. *Biomacromolecules*, 20, 1731-1739.
- DONHOWE, D. & HARTEL, R. 1996. Recrystallization of ice in ice cream during controlled accelerated storage. *International Dairy Journal*, 6, 1191-1208.
- DOYLE, J., GIANNOULI, P., RUDOLPH, B. & MORRIS, E. 2010. Preparation, authentication, rheology and conformation of theta-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 80, 648-654.
- DUBENDORF, J. & STUDIER, F. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219, 45-59.
- EKEBERG, D., KNUITSEN, S. & SLETMOEN, M. 2001. Negative-ion electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) as a tool for analysing structural heterogeneity in kappa-carrageenan oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 334, 49-59.
- FATEMA, M., NONAMI, H., DUCATTI, D., GONCALVES, A., DUARTE, M., NOSEDA, M., CERZO, A., ERRA-BALSELLS, R. & MATULEWICZ, M. 2010. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis of oligosaccharides and oligosaccharide alditols obtained by hydrolysis of agaroses and carrageenans, two important types of red seaweed polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 345, 275-283.
- FELICIELLO, I. & CHINALI, G. 1993. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 212, 394-401.
- FICKO-BLEAN, E., PRÉCHOUX, A., THOMAS, F., ROCHAT, T., LAROCQUE, R., ZHU, Y., STAM, M., GÉNICOT, S., JAM, M., CALTEAU, A., VIART, B., ROPARTZ, D., PÉREZ-PASCUAL, D.,

- CORREC, G., MATARD-MANN, M., STUBBS, K., ROGNIAUX, H., JEUDY, A., BARBEYRON, T., MÉDIGUE, C., CZJZEK, M., VALLENET, D., MCBRIDE, M., DUCHAUD, E. & MICHEL, G. 2017. Carrageenan catabolism is encoded by a complex regulon in marine heterotrophic bacteria. *Nature Communications*, 8, 1685.
- FUNAMI, T., HIROE, M., NODA, S., ASAI, I., IKEDA, S. & NISHINARI, K. 2007. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids*, 21, 617-629.
- GAUKEL, V., LEITER, A. & SPIESS, W. 2014. Synergism of different fish antifreeze proteins and hydrocolloids on recrystallization inhibition of ice in sucrose solutions. *Journal of Food Engineering*, 141, 44-50.
- GEORGE, R. 1993. Freezing processes used in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 134-138.
- GLICKSMAN, M. 1987. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. *Hydrobiologia*, 151, 31-47.
- GOFF, H. 1992. Low-temperature stability and the glassy state in frozen foods. *Food Research International*, 25, 317-325.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E., JIMÉNEZ-ESCRIG, A. & RUPÉREZ, P. 2012. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Talanta*, 93, 153-159.
- GRASDALEN, H. & SMIDSRØD, O. 1981a. Cesium-133 NMR in the sol-gel states of aqueous carrageenan. Selective site binding of cesium and potassium ions in kappa-carrageenan gels. *Macromolecules*, 14, 229-231.
- GRASDALEN, H. & SMIDSRØD, O. 1981b. Iodide-specific formation of kappa-carrageenan single helices. Iodine-127 NMR spectroscopic evidence for selective site binding of iodide anions in the ordered conformation. *Macromolecules*, 14, 1842-1845.
- GUIBET, M., BOULENGUER, P., MAZOYER, J., KERVAREC, N., ANTONOPOULOS, A., LAFOSSE, M. & HELBERT, W. 2008. Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules*, 9, 408-415.
- GUIBET, M., KERVAREC, N., GÉNICOT, S., CHEVOLOT, Y. & HELBERT, W. 2006. Complete assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* lambda-carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 341, 1859-1869.
- HAGIWARA, T. & HARTEL, R. 1996. Effect of sweetener, stabilizer, and storage temperature on ice recrystallization in ice cream. *Journal of Dairy Science*, 79, 735-744.
- HARRISON, S. 1991. Bacterial-cell disruption - a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*, 9, 217-240.
- HARTEL, R. 2013. Advances in food crystallization. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 277-292.
- HERMANSSON, A.-M., ERIKSSON, E. & JORDANSSON, E. 1991. Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 16, 297-320.
- HETTLE, A., HOBBS, J., PLUVINAGE, B., VICKERS, C., ABE, K., SALAMA-ALBER, O., MCGUIRE, B., HEHEMANN, J.-H., HUI, J., BERRUE, F., BANSKOTA, A., ZHANG, J., BOTTOS, E., VAN HAMME, J. & BORASTON, A. 2019. Insights into the kappa/iota-carrageenan metabolism pathway of some marine *Pseudoalteromonas* species. *Communications Biology*, 2, 474.
- HJERDE, T., SMIDSRØD, O. & CHRISTENSEN, B. 1999. Analysis of the conformational properties of kappa- and iota-carrageenan by size-exclusion chromatography combined with low-angle laser light scattering. *Biopolymers*, 49, 71-80.

- HJERDE, T., SMIDSRØD, O., STOKKE, B. & CHRISTENSEN, B. 1998. Acid hydrolysis of kappa- and iota-carrageenan in the disordered and ordered conformations: characterization of partially hydrolyzed samples and single-stranded oligomers released from the ordered structures. *Macromolecules*, 31, 1842-1851.
- HOCHULI, E., BANNWARTH, W., DÖBELI, H., GENTZ, R. & STÜBER, D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnology*, 6, 1321-1325.
- HOCHULI, E., DÖBELI, H. & SCHACHER, A. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography A*, 411, 177-184.
- HOLMES, D. & QUIGLEY, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114, 193-197.
- IKEDA, S., MORRIS, V. & NISHINARI, K. 2001. Microstructure of aggregated and nonaggregated kappa-carrageenan helices visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 2, 1331-1337.
- JOL, C., NEISS, T., PENNINKHOF, B., RUDOLPH, B. & DE RUITER, G. 1999. A novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. *Analytical Biochemistry*, 268, 213-222.
- JOUANNEAU, D., BOULENGUER, P., MAZOYER, J. & HELBERT, W. 2010a. Enzymatic degradation of hybrid iota-/nu-carrageenan by *Alteromonas fortis* iota-carrageenase. *Carbohydrate Research*, 345, 934-940.
- JOUANNEAU, D., GUIBET, M., BOULENGUER, P., MAZOYER, J., SMIETANA, M. & HELBERT, W. 2010b. New insights into the structure of hybrid kappa-/mu-carrageenan and its alkaline conversion. *Food Hydrocolloids*, 24, 452-461.
- KADO, C. & LIU, S.-T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145, 1365-1373.
- KAMIŃSKA-DWÓRZNICKA, A., ANTCZAK, A., SAMBORSKA, K. & LENART, A. 2015. Acid hydrolysis of kappa-carrageenan as a way of gaining new substances for freezing process modification and protection from excessive recrystallisation of ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1799-1806.
- KAMIŃSKA-DWÓRZNICKA, A., JANCZEWSKA-DUPCZYK, A., KOT, A., LABA, S. & SAMBORSKA, K. 2020. The impact of iota- and kappa-carrageenan addition on freezing process and ice crystals structure of strawberry sorbet frozen by various methods. *Journal of Food Science*, 85, 50-56.
- KIRAN-YILDIRIM, B. & GAUKEL, V. 2020. Ice crystal growth in sucrose solutions containing kappa- and iota-carrageenans. *Chemical Engineering & Technology*, 43, 1040-1047.
- KLOAREG, B. & QUATRANO, R. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 26, 259-315.
- KNIGHT, C., CHENG, C. & DEVRIES, A. 1991. Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal-surface planes. *Biophysical Journal*, 59, 409-418.
- KNUTSEN, S., MYSLABODSKI, D., LARSEN, B. & USOVIĆ, A. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, 37, 163-169.
- KNUTSEN, S., SLETMOEN, M., KRISTENSEN, T., BARBEYRON, T., KLOAREG, B. & POTIN, P. 2001. A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa-carrageenase. *Carbohydrate Research*, 331, 101-106.
- KOT, A., KAMIŃSKA-DWÓRZNICKA, A., ANTCZAK, A., JAKUBCZYK, E. & MATWIJCZUK, A. 2022. Effect of iota-carrageenan and its acidic and enzymatic hydrolysates on ice crystal

- structure changes in model sucrose solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 643, 128744.
- KUMAR, P., RASCO, B., TANG, J. & SABLANI, S. 2020. State/phase transitions, ice recrystallization, and quality changes in frozen foods subjected to temperature fluctuations. *Food Engineering Reviews*, 12, 421–451.
- LAKSHMI, R., BASKAR, V. & RANGA, U. 1999. Extraction of superior-quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. *Analytical Biochemistry*, 272, 109–112.
- LAOS, K. & RING, S. 2005. Characterisation of furcellaran samples from Estonian *Furcellaria lumbriicalis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 17, 461–464.
- LECACHEUX, D., PANARAS, R., BRIGAND, G. & MARTIN, G. 1985. Molecular-weight distribution of carrageenans by size exclusion chromatography and low-angle laser-light scattering. *Carbohydrate Polymers*, 5, 423–440.
- LEIJDEKKERS, A., SANDERS, M., SCHOLS, H. & GRUPPEN, H. 2011. Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1218, 9227–9235.
- LEITER, A., EMMER, P. & GAUKEL, V. 2018. Influence of gelation on ice recrystallization inhibition activity of kappa-carrageenan in sucrose solution. *Food Hydrocolloids*, 76, 194–203.
- LEITER, A., LUDWIG, A. & GAUKEL, V. 2017a. Influence of heating temperature, pH and ions on recrystallization inhibition activity of kappa-carrageenan in sucrose solution. *Journal of Food Engineering*, 195, 14–20.
- LEITER, A., MAILÄNDER, J., WEFERS, D., BUNZEL, M. & GAUKEL, V. 2017b. Influence of acid hydrolysis and dialysis of kappa-carrageenan on its ice recrystallization inhibition activity. *Journal of Food Engineering*, 209, 26–35.
- LEMOINE, M., COLLÉN, P. & HELBERT, W. 2009. Physical state of kappa-carrageenan modulates the mode of action of kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Biochemical Journal*, 419, 545–553.
- LEVER, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 47, 273–279.
- MANSEUR, C., GROULT, H., PORTA, M., BODET, P.-E., MERSNI-ACHOUR, R., PETIT, R., ALI-MOUSSA, S., MUSNIER, B., LE CERF, D., VARACAVOUDIN, T., HADDAD, O., SUTTON, A., LEAL, C., ALENCAR-FILHO, E., PIOT, J.-M., BRIDIAU, N., MAUGARD, T. & FRUITIER-ARNAUDIN, I. 2023. A screening approach to assess the impact of various commercial sources of crude marine lambda-carrageenan on the production of oligosaccharides with anti-heparanase and anti-migratory activities. *Marine Drugs*, 21, 295.
- MCKINNON, A., REES, D. & WILLIAMSON, F. 1969. Coil to double helix transition for a polysaccharide. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 13, 701–702.
- MEUNIER, V., NICOLAI, T., DURAND, D. & PARKER, A. 1999. Light scattering and viscoelasticity of aggregating and gelling kappa-carrageenan. *Macromolecules*, 32, 2610–2616.
- MILLER-LIVNEY, T. & HARTEL, R. 1997. Ice recrystallization in ice cream: interactions between sweeteners and stabilizers. *Journal of Dairy Science*, 80, 447–456.
- MORRIS, E., REES, D., NORTON, I. & GOODALL, D. 1980a. Calorimetric and chiroptical evidence of aggregate-driven helix formation in carrageenan systems. *Carbohydrate Research*, 80, 317–323.
- MORRIS, E., REES, D. & ROBINSON, G. 1980b. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 138, 349–362.
- MORRIS, V. & CHILVERS, G. 1983. Rheological studies of specific cation forms of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 3, 129–141.

- NDOYE, F. & ALVAREZ, G. 2015. Characterization of ice recrystallization in ice cream during storage using the focused beam reflectance measurement. *Journal of Food Engineering*, 148, 24-34.
- NILSSON, S. & PICULELL, L. 1991. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 4. Effects of site-specific counterion binding. *Macromolecules*, 24, 3804-3811.
- NILSSON, S., PICULELL, L. & JÖNSSON, B. 1989. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 1. Effects of polyion concentration and counterion valency. *Macromolecules*, 22, 2367-2375.
- NORTON, I., GOODALL, D., MORRIS, E. & REES, D. 1983. Dynamics of cation-induced conformational ordering in solutions of segmented iota-carrageenan. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 79, 2501-2515.
- NORTON, I., MORRIS, E. & REES, D. 1984. Lyotropic effects of simple anions on the conformation and interactions of kappa-carrageenan. *Carbohydrate Research*, 134, 89-101.
- OLESIK, J. 1991. Elemental analysis using ICP-OES and ICP-MS - an evaluation and assessment of remaining problems. *Analytical Chemistry*, 63, 12-21.
- OWCZAREK, B., GERSZBERG, A. & HNATUSZKO-KONKA, K. 2019. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed Research International*, 2019, 4216060.
- PHUE, J.-N., LEE, S., TRINH, L. & SHILOACH, J. 2008. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 831-836.
- PICULELL, L. 2006. Gelling carrageenans. In: STEPHEN, A., PHILLIPS, G. & WILLIAMS, P. (eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications*. Boca Raton, United States of America: CRC Press. 239-287.
- PICULELL, L., HÅKANSSON, C. & NILSSON, S. 1987. Cation specificity of the order-disorder transition in iota-carrageenan: effects of kappa-carrageenan impurities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9, 297-301.
- POLOWSKY, P. & JANASWAMY, S. 2015. Hydrocolloid-based nutraceutical delivery systems: effect of counterions on the encapsulation and release. *Food Hydrocolloids*, 43, 658-663.
- QUEMENER, B. & LAHAYE, M. 1998. Comparative analysis of sulfated galactans from red algae by reductive hydrolysis and mild methanolysis coupled to two different HPLC techniques. *Journal of Applied Phycology*, 10, 75-81.
- REES, D., SCOTT, W. & WILLIAMSON, F. 1970. Correlation of optical activity with polysaccharide conformation. *Nature*, 227, 390-392.
- REES, D., STEELE, I. & WILLIAMSON, F. 1969. Conformational analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some natural polysaccharide sulfates (1). *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, 28, 261-276.
- REGAND, A. & GOFF, H. 2003. Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 95-102.
- RINAUDO, M., KARIMIAN, A. & MILAS, M. 1979. Polyelectrolyte behavior of carrageenans in aqueous solutions. *Biopolymers*, 18, 1673-1683.
- ROBAL, M., BRENNER, T., MATSUKAWA, S., OGAWA, H., TRUUS, K., RUDOLPH, B. & TUVIKENE, R. 2017. Monocationic salts of carrageenans: preparation and physico-chemical properties. *Food Hydrocolloids*, 63, 656-667.
- ROCHAS, C., LAHAYE, M. & YAPHE, W. 1986. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Botanica Marina*, 29, 335-340.

- ROCHAS, C. & RINAUDO, M. 1980. Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, 19, 1675-1687.
- ROCHAS, C., RINAUDO, M. & LANDRY, S. 1989. Relation between the molecular structure and mechanical properties of carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 10, 115-127.
- ROCHAS, C., RINAUDO, M. & LANDRY, S. 1990. Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa-carrageenan gels. *Carbohydrate Polymers*, 12, 255-266.
- ROCHAS, C., RINAUDO, M. & VINCENDON, M. 1980. Structural and conformational investigation of carrageenans. *Biopolymers*, 19, 2165-2175.
- ROSANO, G. & CECCARELLI, E. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467.
- SCHEFER, L., ADAMCIK, J. & MEZZENGA, R. 2014. Unravelling secondary structure changes on individual anionic polysaccharide chains by atomic force microscopy. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 53, 5376-5379.
- SCHEFER, L., USOVIĆ, I. & MEZZENGA, R. 2015. Anomalous stiffening and ion-induced coil-helix transition of carrageenans under monovalent salt conditions. *Biomacromolecules*, 16, 985-991.
- SHEN, J., CHANG, Y., DONG, S. & CHEN, F. 2017. Cloning, expression and characterization of a iota-carrageenase from marine bacterium *Wenyinyingzhuangia fucanilytica*: a biocatalyst for producing iota-carrageenan oligosaccharides. *Journal of Biotechnology*, 259, 103-109.
- SHENG, Y., MANCINO, V. & BIRREN, B. 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Research*, 23, 1990-1996.
- SINGH, M., YADAV, A., MA, X. & AMOAH, E. 2010. Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl<sub>2</sub> treated cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6, 561-568.
- SINGH, S. & JACOBSSON, S. 1994. Kinetics of acid hydrolysis of kappa-carrageenan as determined by molecular weight (SEC-MALLS-RI), gel breaking strength, and viscosity measurements. *Carbohydrate Polymers*, 23, 89-103.
- SLATKO, B., GARDNER, A. & AUSUBEL, F. 2018. Overview of next-generation sequencing technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122, e59.
- SLOOTMAEKERS, D., MANDEL, M. & REYNAERS, H. 1991. Dynamic light scattering by kappa- and lambda-carrageenan solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 17-25.
- SMIDSRØD, O. & GRASDALEN, H. 1982. Some physical properties of carrageenan in solution and gel state. *Carbohydrate Polymers*, 2, 270-272.
- SMITH, L., SANDERS, J., KAISER, R., HUGHES, P., DODD, C., CONNELL, C., HEINER, C., KENT, S. & HOOD, L. 1986. Fluorescence detection in automated DNA-sequence analysis. *Nature*, 321, 674-679.
- SPICHTIG, V. & AUSTIN, S. 2008. Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 861, 81-87.
- STEVENSON, T. & FURNEAUX, R. 1991. Chemical methods for the analysis of sulfated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, 210, 277-298.
- STORTZ, C., BACON, B., CHERNIAK, R. & CERESO, A. 1994. High-field NMR-spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. *Carbohydrate Research*, 261, 317-326.



- SUN, Y., LIU, Y., JIANG, K., WANG, C., WANG, Z. & HUANG, L. 2014. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of kappa-carrageenan oligosaccharides obtained by degradation with kappa-carrageenase from *Pedobacter hainanensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2398-2405.
- SUTTON, R., LIPS, A. & PICCIRILLO, G. 1996a. Recrystallization in aqueous fructose solutions as affected by locust bean gum. *Journal of Food Science*, 61, 746-748.
- SUTTON, R., LIPS, A., PICCIRILLO, G. & SZTEHLO, A. 1996b. Kinetics of ice recrystallization in aqueous fructose solutions. *Journal of Food Science*, 61, 741-745.
- TAKEMASA, M., CHIBA, A. & DATE, M. 2001. Gelation mechanism of kappa- and iota-carrageenan investigated by correlation between the strain-optical coefficient and the dynamic shear modulus. *Macromolecules*, 34, 7427-7434.
- TECSON, M., ABAD, L., EBAJO, V. & CAMACHO, D. 2021. Ultrasound-assisted depolymerization of kappa-carrageenan and characterization of degradation product. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105540.
- THAIUDOM, S. & GOFF, H. 2003. Effect of kappa-carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures. *International Dairy Journal*, 13, 763-771.
- TREVORS, J. 1985. Bacterial plasmid isolation and purification. *Journal of Microbiological Methods*, 3, 259-271.
- TURQUOIS, T., ACQUISTAPACE, S., VERA, F. & WELTI, D. 1996. Composition of carrageenan blends inferred from <sup>13</sup>C-NMR and infrared spectroscopic analysis. *Carbohydrate Polymers*, 31, 269-278.
- TUVIKENE, R., TRUUS, K., ROBAL, M., VOLOBUJEVA, O., MELLIKOV, E., PEHK, T., KOLLIST, A., KAILAS, T. & VAHER, M. 2010. The extraction, structure, and gelling properties of hybrid galactan from the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Baltic Sea, Estonia). *Journal of Applied Phycology*, 22, 51-63.
- UEDA, K., ITOH, M., MATSUZAKI, Y., OCHIAI, H. & IMAMURA, A. 1998. Observation of the molecular weight change during the helix-coil transition of kappa-carrageenan measured by the SEC-LALLS method. *Macromolecules*, 31, 675-680.
- USOV, A. 1998. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*, 12, 301-308.
- VAN DE VELDE, F. 2008. Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocolloids*, 22, 727-734.
- VAN DE VELDE, F. & DE RUITER, G. 2002. Carrageenan. In: STEINBÜCHEL, A., DE BAETS, S. & VANDAMME, E. (eds.), *Biopolymers. Polysaccharides II: polysaccharides from Eukaryotes*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. 245-274.
- VAN DE VELDE, F., KNUTSEN, S., USOV, A., ROLLEMA, H. & CERESO, A. 2002. H1 and C13 high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 73-92.
- VAN DE VELDE, F., PEPELMAN, H., ROLLEMA, H. & TROMP, R. 2001. On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research*, 331, 271-283.
- VAN DE VELDE, F., PEREIRA, L. & ROLLEMA, H. 2004. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research*, 339, 2309-2313.
- VANNESTE, K., MANDEL, M., PAOLETTI, S. & REYNAERS, H. 1994. Molecular weight of the salt-induced conformational transition of iota-carrageenan. *Macromolecules*, 27, 7496-7498.
- VÁZQUEZ-DELFIN, E., ROBLEDO, D. & FREILE-PELEGRÍN, Y. 2013. Microwave-assisted extraction of the carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 26, 901-907.

- VIANA, A., NOSEDA, M., DUARTE, M. & CEREZO, A. 2004. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 58, 455-460.
- VIEBKE, C., BORGSTRÖM, J. & PICULELL, L. 1995. Characterisation of kappa- and iota-carrageenan coils and helices by MALLS/GPC. *Carbohydrate Polymers*, 27, 145-154.
- VOORHEES, P. 1992. Ostwald ripening of two-phase mixtures. *Annual Review of Materials Science*, 22, 197-215.
- WEFERS, D., CAVALCANTE, J., SCHENDEL, R., DEVERYSHETTY, J., WANG, K., WAWRZAK, Z., MACKIE, R., KOROPATKIN, N. & CANN, I. 2017. Biochemical and structural analyses of two cryptic esterases in *Bacteroides intestinalis* and their synergistic activities with cognate xylanases. *Journal of Molecular Biology*, 429, 2509-2527.
- WESTBERRY, B., MANSEL, B., LUNDIN, L. & WILLIAMS, M. 2023. Molecular dynamics simulations and X-ray scattering show the kappa-carrageenan disorder-to-order transition to be the formation of double-helices. *Carbohydrate Polymers*, 302, 120417.
- YANG, B., YU, G., ZHAO, X., JIAO, G., REN, S. & CHAI, W. 2009. Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides. *The FEBS Journal*, 276, 2125-2137.
- YEUNG, V., MILLER, D. & RUTZKE, M. 2017. Atomic absorption spectroscopy, atomic emission spectroscopy, and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Food Analysis*, 129-150.
- YU, G., GUAN, H., IOANOVICIU, A., SIKKANDER, S., THANAWIROON, C., TOBACMAN, J., TOIDA, T. & LINHARDT, R. 2002. Structural studies on kappa-carrageenan derived oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 337, 433-440.
- YUAN, H., ZHANG, W., LI, X., LU, X., LI, N., GAO, X. & SONG, J. 2005. Preparation and in vitro antioxidant activity of kappa-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. *Carbohydrate Research*, 340, 685-692.
- YUGUCHI, Y., THUY, T., URAKAWA, H. & KAJIWARA, K. 2002. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*, 16, 515-522.
- ZABIK, M. & ALDRICH, P. 1967. The effect of cations on the viscosity of lambda-carrageenan. *Journal of Food Science*, 32, 91-97.
- ZHAO, Y. & TAKHAR, P. 2017. Freezing of foods: mathematical and experimental aspects. *Food Engineering Reviews*, 9, 1-12.
- ZIA, K., TABASUM, S., NASIF, M., SULTAN, N., ASLAM, N., NOREEN, A. & ZUBER, M. 2017. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 282-301.







# 7 CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

## 7.1 Chemikalienliste

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller, Reinheit</b>	<b>GHS-Symbole</b>	<b>H-Sätze</b>	<b>P-Sätze</b>
Acetonitril	VWR, MS-Grade	02, 07	225, 302+312+332, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Agar	Sigma-Aldrich	-	-	-
Agarose	Carl Roth	-	-	-
Ameisensäure	Merck, 98 - 100 %	02, 05, 06	226, 302, 314, 331	210, 280, 303+361+353, 304+340+310 305+351+338
Ammoniumformiat	VWR, ≥ 99 %	07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Ampicillin	PanReac AppliChem	07, 08	315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 305+351+338, 342+311
3,6-Anhydro-D- galactose	Dextra Laboratories, ≥ 95 %	-	-	-
Boran-N-methyl- morpholin-Komplex	Sigma-Aldrich, 97 %	02, 07	228, 302+312+332, 315, 319, 335	210, 280, 301+312, 302+352+312, 304+340+312, 305+351+338
Bromphenolblau	Fluka	-	-	-
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth, ≥ 99 % p. a.	07	319	305+351+338
Deuteriumoxid	Deutero, 99,9 %	-	-	-
Dikalium- hydrogenphosphat, wasserfrei	Carl Roth, ≥ 99 %, p. a.	-	-	-

Dimethylsulfoxid	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-
Dinatrium- hydrogenphosphat	Riedel de- Haën, ≥ 99 %	-	-	-
Dithiothreitol	Lancaster, ≥ 99 %, p. a.	05, 07	302, 315, 318	264, 270, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
Ethylendiamin- tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, ≥ 99 %	07, 08	332, 373	260, 314
Eisessig	Sigma-Aldrich, ≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
Ethanol, vergällt	VWR, 99,5 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
D-Galactose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
GelRed ( <i>Nucleic Acid Gel Stain</i> )	Biotium	-	-	-
Glycerin	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-
Hefeextrakt	VWR, <i>ultra pure</i>	-	-	-
Imidazol	Sigma-Aldrich, 99 %	05, 07, 08	302, 314, 360D	260, 280, 301+312, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Isopropyl-β-D- thiogalacto- pyranosid	VWR, <i>ultra pure</i>	07	-	-

				210, 240,
Isopropanol	VWR	02, 07	225, 319, 336	305+351+338, 403+233
Kaliumacetat	Merck	-	-	-
Kaliumchlorid	Merck, p. a.	-	-	-
Kaliumdihydrogen- phosphat	Carl Roth, ≥ 99 %, p. a.	-	-	-
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	07	302, 315, 319	302+352, 305+351+338
Magnesiumacetat	Merck, p. a.	-	-	-
Natriumchlorid	Merck, p. a.	-	-	-
Natriumdi- hydrogenphosphat Dihydrat	VWR p.a.	-	-	-
				280,
Natriumhydroxid	Carl Roth, ≥ 99 %	05	290, 314	301+330+331, 305+351+338, 308+310
Natriumsulfat, wasserfrei	VWR	-	-	-
Neocarrabiose-4- sulfat Natriumsalz	Biosynth, ≥ 95 %	-	-	-
Neocarratetraose- 4,4-disulfat Dinatriumsalz	Biosynth, ≥ 95 %	-	-	-
Ni- Nitrilotriessigsäure- Harz	Thermo Scientific	08	317, 334, 350, 360D, 373, 412	201, 260, 273, 280, 314, 342+311, 405
Saccharose	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-

				210, 220, 280,	
Salpetersäure	Sigma-Aldrich, 65 %	03, 05, 06	272, 290, 330, 314, EUH 071	303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	
Salzsäure	VWR 37 %	05, 07	290, 314, 335	280, 303+361+353, 305+351+338, 310	
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich, ≥ 99 %	05, 06	290, 331, 314, 412, EUH 071	260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 312	
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan-Base	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	-	-	-	
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan-HCl	Carl Roth, ≥ 99 %	-	-	-	
Trypton	VWR	-	-	-	
Wasserstoffperoxid	J. T. Baker, 35 %	05, 07	302, 315, 318, 332, 335	210, 261, 280, 304+340, 305+351+338, 312	
<b>GHS02</b>	<b>GHS03</b>	<b>GHS05</b>	<b>GHS06</b>	<b>GHS07</b>	<b>GHS08</b>
					
Entzündlich	Brand- fördernd	Ätzend	Giftig	Gesundheits- schädlich	Systemische Gesundheits- gefährdung

## 7.2 Puffer und Reagenzien

### **Ampicillin-Stammlösung (steril filtriert)**

- 10 mg Ampicillin/mL in Reinstwasser

### **Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) - Acetat - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (TAE)-Puffer, 50 x (pH 8,0)**

- 242,3 g TRIS (2 M)
- 18,6 g EDTA (0,05 M)
- 57,2 mL Eisessig (1 M)
- pH-Wert von 8,0 mit Salzsäure einstellen und mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen

### **Agarosegel**

- 0,4 g Agarose
- 25 mL 1 x TAE-Puffer
- in der Mikrowelle erwärmen bis Agarose gelöst vorliegt
- nach Abkühlen 4  $\mu$ L *GelRed* hinzufügen

### **Ladepuffer Agarosegel, 6 x**

- 3 mL Glycerin
- 25,0 mg Bromphenolblau
- 7 mL Reinstwasser

### **Klonierungspuffer, 10 x**

- 79,9 mg TRIS (33 mM)
- 129,6 mg Kaliumacetat (66 mM)
- 42,9 mg Magnesiumacetat (10 mM)
- 1,5 mg Dithiothreitol (0,5 mM)
- pH-Wert von 8,0 mit Eisessig einstellen und mit Reinstwasser auf 20 mL auffüllen

***Lysogeny broth (LB)-Medium***

- 10,0 g Trypton
- 5,0 g Hefeextrakt
- 5,0 g Natriumchlorid
- 1 L Reinstwasser
- Medium autoklavieren (121 °C, 20 min)

**Agarplatten**

- 10,0 g Trypton
- 5,0 g Hefeextrakt
- 5,0 g Natriumchlorid
- 15,0 g Agar
- 1 L Reinstwasser
- Medium autoklavieren (121 °C, 20 min)
- nach Abkühlen Ampicillinlösung (sterilfiltriert, Endkonzentration 0,1 mg/mL) sowie 50 % (w/w) Saccharoselösung (sterilfiltriert, Endkonzentration 100 mL/L) zur Selektion zugeben

***Terrific broth (TB)-Medium***

- 12,0 g Trypton
- 24,0 g Hefeextrakt
- 5,0 g Glycerin
- 1 L Reinstwasser

**TB-Salz, 10 x**

- 23,1 g Kaliumdihydrogenphosphat
- 125,4 g Dikaliumhydrogenphosphat
- 1 L Reinstwasser
- TB-Medium und TB-Salz separat autoklavieren (121 °C, 20 min)
- nach Abkühlen 1:10 (TB-Salz:TB-Medium) verdünnen

**Phosphat-Lysepuffer**

- 3,55 g Dinatriumhydrogenphosphat (50 mM)
- 8,77 g Natriumchlorid (300 mM)
- 500 mL Reinstwasser



- pH-Wert von 8,0 einstellen mit:
  - 1,95 g Natriumdihydrogenphosphat x 2 H<sub>2</sub>O (50 mM)
  - 4,38 g Natriumchlorid (300 mM)
  - 250 mL Reinstwasser

#### **IMAC-Elutionspuffer**

- 3,0 g Dinatriumhydrogenphosphat (50 mM)
- 8,77 g Natriumchlorid (300 mM)
- 8,51 g Imidazol (250 mM)
- 500 mL Reinstwasser
- pH-Wert von 8,0 einstellen mit:
  - 0,78 g Natriumdihydrogenphosphat x 2 H<sub>2</sub>O (50 mM)
  - 1,75 g Natriumchlorid (300 mM)
  - 1,70 g Imidazol (250 mM)
  - 100 mL Reinstwasser

#### **IMAC-Waschpuffer**

- 4 mL IMAC-Elutionspuffer auf 100 mL mit Phosphat-Lysepuffer auffüllen

## 7.3 Verwendete Enzyme und Kits

#### **Amplifizierung und Aufreinigung der Gene**

- Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Scientific)
- MicroElute Cycle-Pure Kit (Omega Bio-Tek)

#### **Klonierung**

- T4 DNA Polymerase, 100 U (Thermo Scientific)

#### **Kolonie-PCR**

- One Taq Quick-Load 2x Master Mix mit Standardpuffer (New England BioLabs)

#### **Aufreinigung der Plasmide**

- E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek)

## 7.4 Instrumente

### 7.4.1 Analysengeräte

#### **HPAEC-PAD**

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

#### **HPAEC-CD (/PAD/MS)**

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

#### **HPSEC-RI/MALLS**

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

**UHPLC-MS**

Hersteller:	Shimadzu
Pumpe:	Nexera X2 LC-30AD
Autosampler:	Nexera X2 SIL-30AC
Säulenofen:	CTO-20AC
Detektor:	LCMS-2020

**NMR-Spektrometer (400 MHz)**

Hersteller:	Bruker
Gerätetyp:	Avance Neo 400
Feldstärke:	400 MHz
Probenkopf:	temperierbarer 5 mm-Probenkopf

**NMR-Spektrometer (500 MHz)**

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

**Gefriertunnel**

Kühlkammer:	Gastro 08, Gram
Kryostat:	FP50, Julabo
Polarisationsmikroskop:	BX41, Olympus
Mikroskopkamera:	MircroCam II (5 MP), Bresser

## 7.4.2 Verwendete Säulen

<b>Säule</b>	<b>Partikelgröße / <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Porengröße / nm</b>	<b>Maße (L x ID) / mm</b>	<b>Hersteller</b>
Dionex CarboPac MA1	7,5	-	250 x 4	Dionex, ThermoFisher Scientific
Dionex IonPac AS10	8,5	-	250 x 4	Dionex, ThermoFisher Scientific
TSKgel G2500 PW <sub>XL</sub>	7	< 20	300 x 7,8	Tosoh Bioscience
TSKgel G6000 PW <sub>XL</sub>	13	> 100	300 x 7,8	Tosoh Bioscience
Acquity UPLC BEH Amide	1,7	-	150 x 2,1	Waters Corporation

## 8 ARBEITSVORSCHRIFTEN

### 8.1 Strukturcharakterisierung der Carrageene

#### 8.1.1 Bestimmung des Carrageentyp

- 5 mg Probe einwiegen und mit 1 mL Deuteriumoxid versetzen
- im Wasserbad bei 70 °C behandeln bis die Probe vollständig gelöst vorliegt
- 0,5 µL Dimethylsulfoxid zugeben
- Probe mittels  $^1\text{H}$ -NMR analysieren

#### **Analyse mittels $^1\text{H}$ -NMR**

Referenz:	Dimethylsulfoxid ( $\delta_{\text{H}} = 2,696$ ppm)
Pulsprogramm:	$^1\text{H}$ (zg90)
Temperatur Probenkopf:	65 °C
Anzahl Scans:	16 bzw. 32
<i>Relaxation delay (D)</i> :	25 s
Akquisitionszeit:	2 s
Analytsignal:	$\alpha$ -anomere Protonen der D- bzw. DA-Einheit

#### 8.1.2 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung

- 5 mg Probe einwiegen und mit 1 mL Reinstwasser versetzen
- im Wasserbad bei 70 °C für 2 h behandeln
- 100 µL Carrageenlösung in Vial überführen, 50 µL MMB-Lösung (80 mg/mL) und 100 µL 6 M Trifluoressigsäure zugeben
- für 30 min bei 80°C im Trockenschrank behandeln
- Zugabe von 50 µL MMB-Lösung
- Evaporation bei 50 - 55 °C
- Rückstand in 200 µL 2 M Trifluoressigsäure aufnehmen
- für 1 h bei 120 °C behandeln
- Zugabe von 100 µL MMB-Lösung
- Evaporation bei 50 - 55°C
- Zweimalige Zugabe von 200 µL Ethanol, nach jeder Zugabe evaporieren
- Rückstand in 1 mL Reinstwasser aufnehmen

- Probe mittels HPAEC-PAD analysieren

### Analyse mittels HPAEC-PAD

Injektionsvolumen:	25 µL
Säule:	Dionex CarboPac MA1
Säulentemperatur:	30 °C
Eluent:	612 mM Natriumhydroxid-Lösung (pH 12,6)
Fluss:	0,4 mL/min
Gradientenprogramm:	isokratisch
Detektion:	Gepulst amperometrische Detektion (PAD)

## 8.1.3 Bestimmung des Molekulargewichts

- 2 mg Probe einwiegen und mit 1 mL 0,1 M Lithiumchlorid-Lösung (Eluent) versetzen
- im Wasserbad bei 60 °C behandeln bis Probe vollständig gelöst vorliegt
- Probe mittels HPSEC-RI/MALLS analysieren

### Analyse mittels HPSEC-RI/MALLS

Injektionsvolumen:	50 µL
Säule:	TSKgel G6000PW <sub>XL</sub>
Säulentemperatur:	60 °C
Eluent:	0,1 M Lithiumchlorid
Fluss:	0,5 mL/min
Gradientenprogramm:	isokratisch
Detektion:	Brechungsindexdetektion (RI) Mehrwinkellichtstreuung (MALLS) mit $dn/dc = 0,115 \text{ mL/g}$

## 8.1.4 Sulfatgehalt

- 10 mg Carrageen mit 2,25 mL 2,3 M Trifluoressigsäure und 0,25 mL 35 % (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung versetzen und im Ofen bei 100 °C für 16 h behandeln
- nach Abkühlen für 10 min bei 220 x g zentrifugieren
- 0,25 mL der Lösung evaporieren
- Rückstand in 3,25 mL Reinstwasser aufnehmen und für 15 min bei 70 °C im Wasserbad lösen
- Probe mittels HPAEC-CD analysieren

### Analyse mittels HPAEC-CD

Injektionsvolumen:	20 $\mu$ L
Säule:	Dionex IonPac AS10
Säulentemperatur:	30 °C
Eluent:	30 mM Natriumhydroxid
Fluss:	0,38 mL/min
Gradientenprogramm:	isokratisch
Suppressor:	29 mA
Detektion:	Leitfähigkeitsdetektion (CD)

## 8.1.5 Gehalt an assoziierten Kationen

- 10 mg Carrageen in 10 mL 1 % (v/v) Salpetersäure lösen
- Proben mittels ICP-OES analysieren

Die Durchführung der Messungen erfolgte am Institut für Angewandte Geowissenschaften des KIT.

## 8.2 Gewinnung rekombinanter Enzyme

### 8.2.1 Amplifizierung der Gene

- Reaktionsansatz (20  $\mu$ L) für alle Proben auf Eis pipettieren

**Tabelle 8.1:** Reaktionsansatz für die Vervielfältigung der gewünschten Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion, HF: *High Fidelity*, dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate, DNA: Desoxyribonukleinsäure.

Komponente	Volumen / $\mu$ L	Endkonzentration
Wasser (nukleasefrei)	13,2	-
5x Phusion HF Puffer	4,0	1x
10 mM dNTPs	0,4	200 $\mu$ M je dNTP
10 $\mu$ M Primer A ( <i>forward</i> )	1,0	0,5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Primer B ( <i>reverse</i> )	1,0	0,5 $\mu$ M
DNA	0,2	48,8 ng
Phusion DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	0,2	0,02 U/ $\mu$ L

- *Annealing*-Temperatur und Extensionszeit abhängig von den eingesetzten Primern sowie der Länge der Gensequenz wählen

**Tabelle 8.2:** Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung der Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion.

<b>Zyklusschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Anzahl Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
<i>Annealing</i>	x	30 s	30
Extension	72 °C	30 s/kb	
Letzte	72 °C	10 min	
Extension	4 °C	∞	1

## 8.2.2 Überprüfung der Amplifizierung durch Elektrophorese

- Elektrophoresekammer mit 250 mL 1 x TAE-Puffer füllen
- 2 µL des PCR-Produkts mit 2 µL Ladepuffer und 6 µL Reinstwasser versetzen und Geltaschen beladen
- DNA-Größenstandard ebenfalls auf Gel auftragen
- Gellauf bei einer konstanten Spannung von 120 V für 30 – 40 min durchführen
- Detektion des Gels

## 8.2.3 Aufreinigung der Gene

### E.Z.N.A MicroElute Cycle-Pure Kit

- 18 µL PCR-Produkt in 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführen
- 90 µL CP-Puffer zugeben, vortexen und kurz zentrifugieren
- *HiBind DNA Mini Column* in ein 2 mL Sammelröhrchen einsetzen
- Probe auf Säule geben
- 1 min bei Raumtemperatur und 20.000 x g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen
- Säule mit 700 µL Waschpuffer waschen
- 1 min bei Raumtemperatur und 20.000 x g zentrifugieren
- Filtrat verwerfen
- Waschschrift wiederholen
- leere Säule 2 min bei Raumtemperatur und 20.000 x g zentrifugieren
- Säule in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß einsetzen
- 50 µL Reinstwasser (autoklaviert) auf Säule geben und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei Raumtemperatur und 20.000 x g zentrifugieren



- Bestimmung der Genkonzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm
- gereinigtes PCR-Produkt bei -20 °C lagern

## 8.2.4 Klonierung des Gens in den Vektor

- Reaktionsansatz (10 µL) für PCR-Produkt und Vektor separat pipettieren

**Tabelle 8.3:** Reaktionsansatz für die Klonierung des gewünschten Gens in den linearisierten Vektor. PCR: Polymerase-Kettenreaktion, dCTP: Desoxycytidintriphosphat, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, DNA: Desoxyribonukleinsäure.

PCR-Ansatz		Vektor-Ansatz	
10x Klonierungspuffer	1 µL	10x Klonierungspuffer	1 µL
10 mM dCTP	0,5 µL	10 mM dGTP	0,5 µL
T4 DNA Polymerase (5 U/µL)	0,2 µL	T4 DNA Polymerase (5 U/µL)	0,2 µL
PCR-Produkt	0,1 pmol	Vektor (linearisiert)	0,1 pmol
Wasser (nukleasefrei)	x µL	Wasser (nukleasefrei)	x µL

- Ansatz jeweils vortexen und 3 – 5 s zentrifugieren
- bei Raumtemperatur für 20 min inkubieren
- 0,6 µL 0,5 M EDTA zugeben und vortexen
- *Annealing*-Reaktion: Zugabe von 1 µL des Vektor-Ansatzes zum PCR-Ansatz, vortexen und 3-5 s zentrifugieren
- bei Raumtemperatur für 1 h inkubieren
- *Annealing*-Mix für Transformation verwenden

## 8.2.5 Transformation nach Klonierung

- 20 µL *NovaBlue Competent Cells* mit 2 µL *Annealing*-Mix versetzen
- für 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock für 30 s bei 42 °C im Wasserbad
- für 5 min auf Eis abkühlen
- 1 mL LB-Medium (ohne Antibiotika) zugeben und resuspendieren
- im Schüttelinkubator für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubieren
- 200 µL der Suspension auf Agarplatte ausplattieren
- über Nacht bei 37 °C inkubieren
- bei Bedarf **Kolonie-PCR** durchführen
- 5 mL LB-Medium (50 µL Ampicillin-Stammlösung/5 mL) in *Falcon Tube* geben

- Medium mit einzelner Kolonie beimpfen (3 Kolonien pro Platte)
- über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubieren

## 8.2.6 Kolonie-PCR

- Reaktionsansatz für alle Proben (25 µL) auf Eis pipettieren

**Tabelle 8.4:** Reaktionsansatz für die Vervielfältigung des in das Plasmid eingefügten Gens nach Klonierung.

Komponente	Volumen / µL	Endkonzentration
Wasser (nukleasefrei)	11,5	-
10 µM Primer A ( <i>forward</i> )	0,5	200 nM
10 µM Primer B ( <i>reverse</i> )	0,5	200 nM
2x <i>One Taq Master Mix</i>	12,5	1x

- mit steriler Pipettenspitze Kolonie von Agarplatte abnehmen
- Punkt auf neuer Agarplatte berühren und Platte anschließend über Nacht bei 37 °C inkubieren
- Bakterien an Pipettenspitze durch Einrühren in den Reaktionsansatz überführen
- *Annealing*-Temperatur und Extensionszeit abhängig von den eingesetzten Primern sowie der Länge der Gensequenz wählen

**Tabelle 8.5:** Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung der eingefügten Genabschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion.

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	120 s	1
Denaturierung	94 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	45-68 °C	60 s	30
Extension	68 °C	60 s/kb	
Letzte	68 °C	10 min	1
Extension	10 °C	∞	

- 4 – 6 µL der Proben für Elektrophorese verwenden

## 8.2.7 Aufreinigung der Plasmide

### E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I

- Pipettenspitze aus *Falcon Tube* entfernen
- 1 min bei 4.000 x g zentrifugieren und Überstand abnehmen
- 250 µL Lösung I/RNase A zugeben und resuspendieren

- Suspension in ein frisches 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführen
- 250 µL Lösung II zugeben und vorsichtig wenden bis klares Lysat entsteht
- 350 µL Lösung III zugeben und sofort wenden bis sich flockiges weißes Präzipitat bildet
- 10 min bei 20.000 x g zentrifugieren
- *HiBind DNA Mini Column* in ein 2 mL Sammelröhrchen einsetzen
- Klaren Überstand auf die Säule geben
- 1 min bei 20.000 x g zentrifugieren und Filtrat verwerfen
- 500 µL HBC-Puffer auf Säule geben
- 1 min bei 20.000 x g zentrifugieren und Filtrat verwerfen
- 700 µL DNA-Waschpuffer auf Säule geben
- 1 min bei 20.000 x g zentrifugieren und Filtrat verwerfen
- Waschschrift wiederholen
- Leere Säule 2 min bei 20.000 x g zentrifugieren
- Säule in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß einsetzen
- 50 µL bidest. Wasser (autoklaviert) auf Säule geben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 20.000 x g zentrifugieren
- Bestimmung der DNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm
- Sequenzierung des isolierten Plasmids
- gereinigte Plasmide bei -20 °C lagern

## 8.2.8 Transformation vor Genexpression

- 10 µL BL21 *Star* mit 1 µL Plasmid (sequenziert) versetzen
- für 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock für 30 s bei 42 °C im Wasserbad
- für 5 min auf Eis abkühlen
- 1 mL LB-Medium (ohne Antibiotika) zugeben und resuspendieren
- im Schüttelinkubator für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubieren
- 200 µL der Suspension auf Agarplatte ausplattieren
- über Nacht bei 37 °C inkubieren

## 8.2.9 Induktion der Genexpression

- 5 mL LB-Medium (50 µL Ampicillin-Stammlösung/5 mL) in *Falcon Tube* geben
- Medium mit einzelner Kolonie beimpfen

- für 5-6 h oder über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubieren
- bei Bedarf Glycerolstock anlegen: 300 µL Glycerol mit 700 µL Bakterienlösung versetzen und in einem sterilen Eppendorf-Gefäß bei -80 °C lagern
- 400 mL LB-Medium in Fernbachkolben mit 4 mL Ampicillin-Stammlösung versetzen und mit der restlichen Bakterienlösung inokulieren
- für 4 h bei 37 °C und 225 rpm inkubieren
- Induktion der Genexpression durch Zugabe von 80 µL 500 mM IPTG-Lösung
- über Nacht bei 20 °C und 225 rpm inkubieren

## 8.2.10 Proteinisolation

- Bakterienlösung bei 4.000 x g für 2 min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Bakterienpellet mit 5 mL Phosphat-Lyse-Puffer versetzen
- Sonifikation (auf Eis): Puls 3 x 20 s, Zeit 1 min, Pause 59,9 s, Amplitude 50 %
- Lysat in Eppendorf-Gefäße überführen und 30 min bei 4 °C und 14.000 x g zentrifugieren
- 4 mL Ni-NTA-Harz in *Falcon Tube* geben
- 2 min bei 700 x g zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Harz mit 4 mL IMAC-Waschpuffer waschen, 2 min bei 700 x g zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Überstand des Lysats auf Harz geben
- unter Schütteln für 30 min bei 4 °C inkubieren
- 2 min bei 700 x g und 4 °C zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Harz mit 4 mL IMAC-Waschpuffer waschen, 2 min bei 700 x g und 4 °C zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Waschschrift wiederholen
- Elution zunächst mit 2 mL, dann zweimal mit 1 mL IMAC-Elutionspuffer (jeweils 2 min bei 700 x g und 4 °C zentrifugieren)
- Glycerol (circa 25 %) zugeben und durch Schwenken gut mischen
- Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm
- Proteinlösung gegebenenfalls aliquotieren und bei -20 °C lagern

## 8.3 Detaillierte Charakterisierung von Hybridcarrageenen

### 8.3.1 Enzymatische Hydrolyse

- 1 %ige (w/v) Carrageenlösung in Reinstwasser ansetzen
- für 1 h bei 60 °C im Wasserbad behandeln bis Probe vollständig gelöst vorliegt
- für enzymatische Hydrolyse 250 µL 1 %ige Carrageenlösung mit 200 µL Reinstwasser und 50 µL Enzymlösung versetzen
- für Carrageenblindwert 250 µL 1 %ige Carrageenlösung mit 250 µL Reinstwasser versetzen
- für Enzymblindwert 50 µL Enzymlösung (inaktiviert, 95 °C, 10min) mit 450 µL Reinstwasser versetzen
- für 24 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren
- Inaktivierung für 10 min bei 95 °C
- Hydrolysate mittels HILIC-MS und HPSEC-RI analysieren
- Lagerung der Proben bei -20 °C

### 8.3.2 Analyse mittels HILIC-MS

- 50 µL des Hydrolysats nach Enzymverdau mit 150 µL Acetonitril versetzen zur Abtrennung von polymerem Material
- Zentrifugation für 4 min bei 13.200 rpm
- Überstand abnehmen und mittels HILIC-MS analysieren

#### Analyse mittels HILIC-MS

Injektionsvolumen:	5 µL
Säule:	ACQUITY UPLC BEH Amidsäule (1,7 µm, 150 mm x 2,1 mm)
Säulentemperatur:	35 °C
Eluent:	<b>A</b> 20 %/80 % Acetonitril/Reinstwasser <b>B</b> 80 %/20 % Acetonitril/Reinstwasser + 10 mM Ammoniumformiat und 0,2 % Ameisensäure
Fluss:	0,4 mL/min
Gradientenprogramm:	siehe Tabelle 8.6
MS-Detektion:	ESI im Negativmodus Quadrupol im TIC-Modus ( $m/z$ 250 - 1000)

**Tabelle 8.6:** Gradientenprogramm zur Analyse von enzymatisch freigesetzten Carrageen-Oligosacchariden mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie. Eluent A: 20 %/80 % Acetonitril/Reinstwasser, 10 mM Ammoniumformiat, 0,2 % Ameisensäure, Eluent B: 80 %/20 % Acetonitril/Reinstwasser, 10 mM Ammoniumformiat, 0,2 % Ameisensäure.

Zeit / min	Eluent A / %	Eluent B / %
0,0	0	100
5,0	0	100
31,0	80	20
32,0	0	100
40,0	0	100

### 8.3.3 Analyse mittels HPSEC-RI

- 100 µL des Hydrolysats nach Enzymverdau mit 150 µL 0,1 M Lithiumchlorid-Lösung versetzen (Endkonzentration Carrageen: 2 mg/mL)
- Proben mittels HPSEC-RI analysieren

#### Analyse mittels HPSEC-RI

Injektionsvolumen:	50 µL
Säule:	TSKgel G6000PW <sub>XL</sub>
Säulentemperatur:	60 °C
Eluent:	0,1 M Lithiumchlorid
Fluss:	0,5 mL/min
Gradientenprogramm:	isokratisch
Detektion:	Brechungsindexdetektion (RI)

## 8.4 Modifizierung von Carrageenen

### 8.4.1 Kationenaustausch

- 400 mg Carrageen in 150 mL Salzlösung (100 mM Calciumchlorid, 800 mM Natriumchlorid oder 800 mM Kaliumchlorid) für 2 h im Wasserbad bei 80 °C lösen
- Carrageen in doppeltem Volumen Isopropanol (0 °C) ausfällen
- Rückstand über Filtertuch (Firma Gradl, Qualität A 109 S) abtrennen und mit 80 % bzw. 100 % Isopropanol waschen
- Rückstand bei 50 °C im Trockenschrank trocknen
- getrocknete Probe mahlen und auswiegen

- Analyse der chemischen Struktur wie in Kapitel 8.1 beschrieben

## 8.4.2 Alkalische Modifizierung

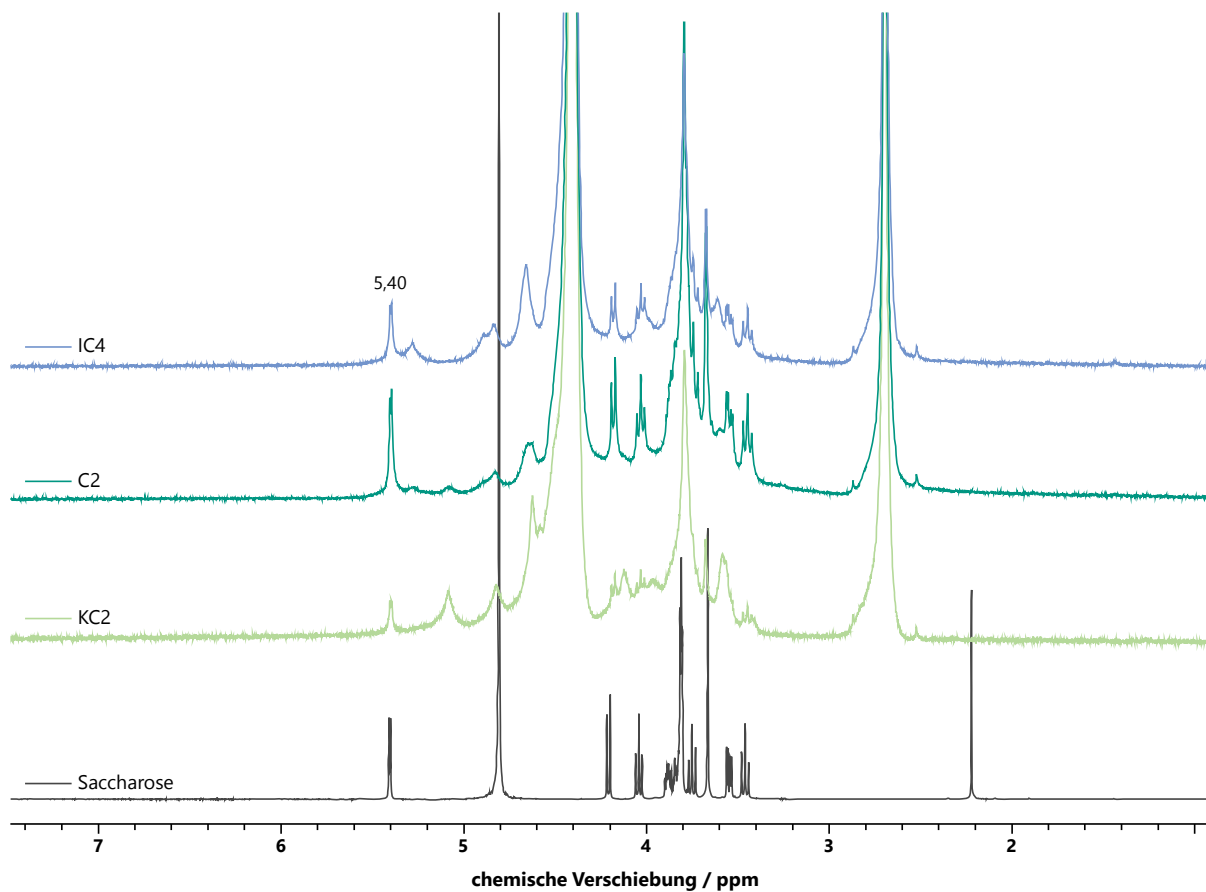
- 0,25 g Carrageen mit 125 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung versetzen
- bei 80 °C für 35 min im Wasserbad behandeln
- Probe auf Eis abkühlen
- Neutralisation mit 1 M Salzsäure
- Volumen auf circa 100 mL mittels Rotationsverdampfer einengen
- Dialyse der Probe gegen Reinstwasser für 20 h, um überschüssige Salze zu entfernen (zweimaliges Wechseln der Dialyselösung)
- Probe gefriertrocknen, mahlen und auswiegen
- Umwandlung in Kaliumform mittels Kationenaustausch (siehe Kapitel 8.4.1)
- Analyse der chemischen Struktur wie in Kapitel 8.1 beschrieben

## 8.5 Analyse der eiskristallisationsinhibierenden Aktivität von Carrageenen

- Zwei Deckgläser (18 x 18 mm) im Abstand von circa 1 cm mit Glaskleber auf einen Objektträger (Superfrost) aufkleben und gut trocknen lassen
- 1 mg Carrageen, 490 mg Saccharose und 509 mg Reinstwasser einwiegen und bei 60 °C im Wasserbad für 1 - 2 h lösen
- 10 µL der Probe auf den Objektträger zwischen die beiden Deckgläser geben, mit einem weiteren Deckglas abdecken und mit Silikon luftdicht verschließen
- Silikon über Nacht trocknen lassen
- Objektträger für circa 8 s in flüssigen Stickstoff tauchen und in Kühlkammer bei einer konstanten Temperatur von 12,0 °C ± 0,1 °C lagern
- nach 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 144 h mithilfe einer an einem Polarisationsmikroskop angebrachten Kamera Kristallbilder aufnehmen
- Kristalldurchmesser von 200 – 300 Kristallen pro Probe mittels der Software *ImagePro Insight* oder *ImageJ* bestimmen und mittleren Kristalldurchmesser berechnen

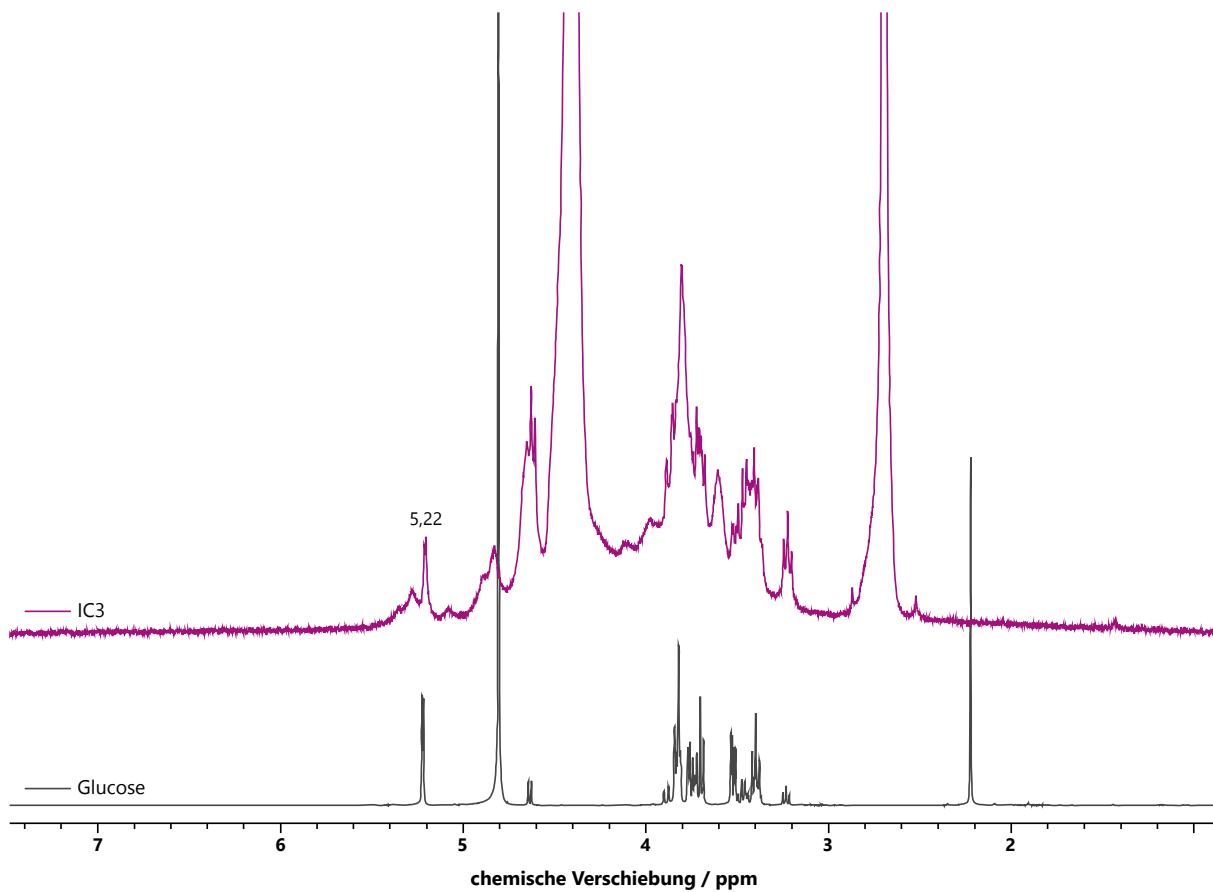
## 9 ANHANG

### 9.1 Abbildungen

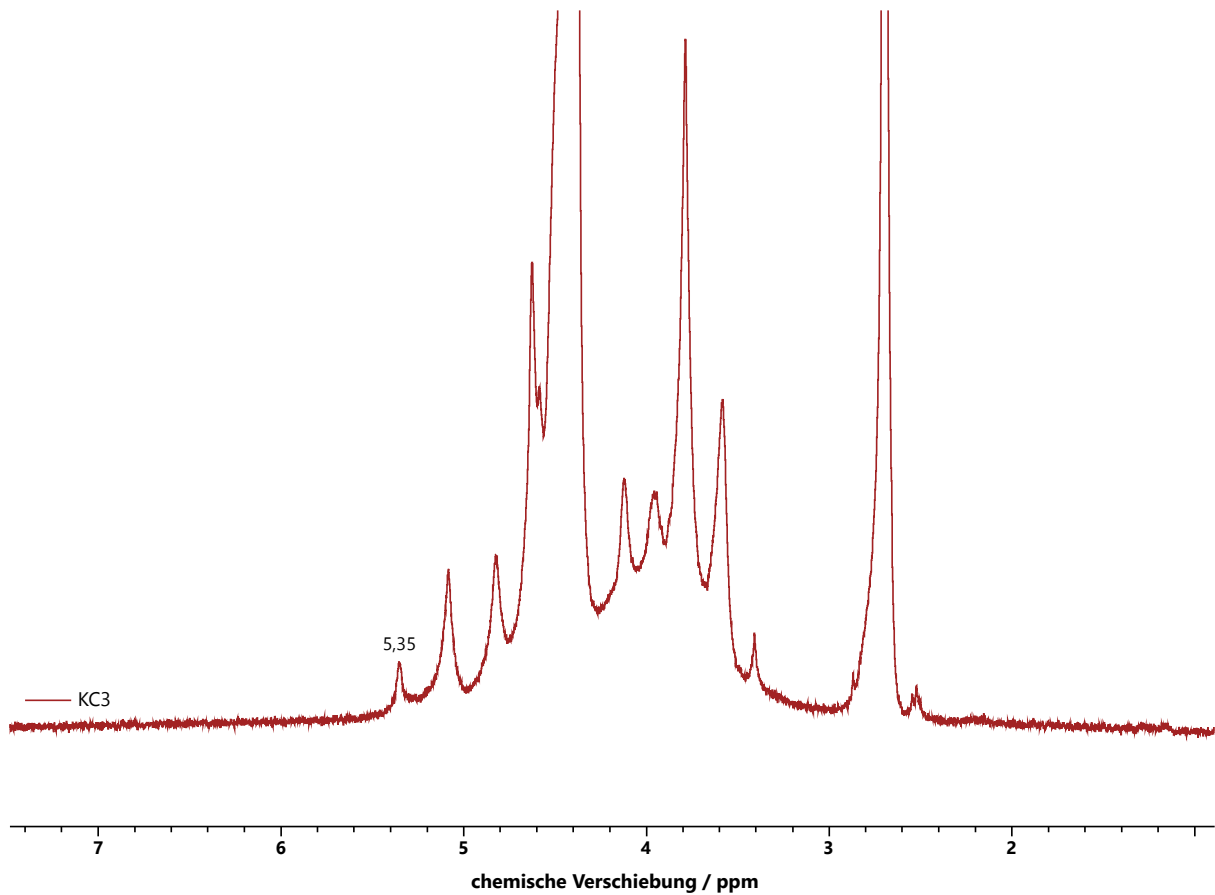


**Abbildung 9.1:** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanz ( $^1\text{H-NMR}$ )-Spektren der kommerziellen Carrageene KC2, C2 und IC4 sowie einer Saccharoselösung. Die Spektren der Carrageenproben wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Dimethylsulfoxid ( $2,696\text{ ppm}$ ) referenziert. Das Spektrum der Saccharoselösung wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Aceton ( $2,22\text{ ppm}$ ) referenziert. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von  $5,40\text{ ppm}$  kann dem anomeren Proton der Glucoseeinheit der Saccharose zugeordnet werden.

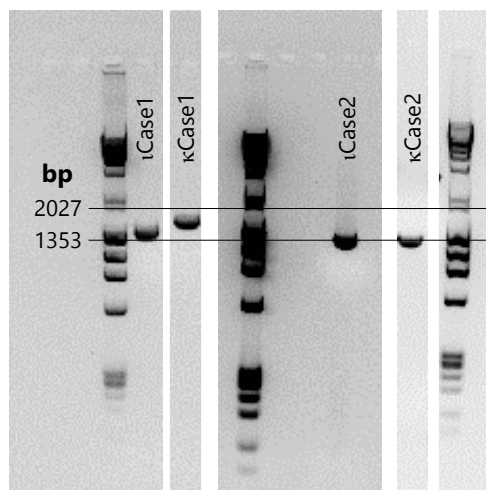




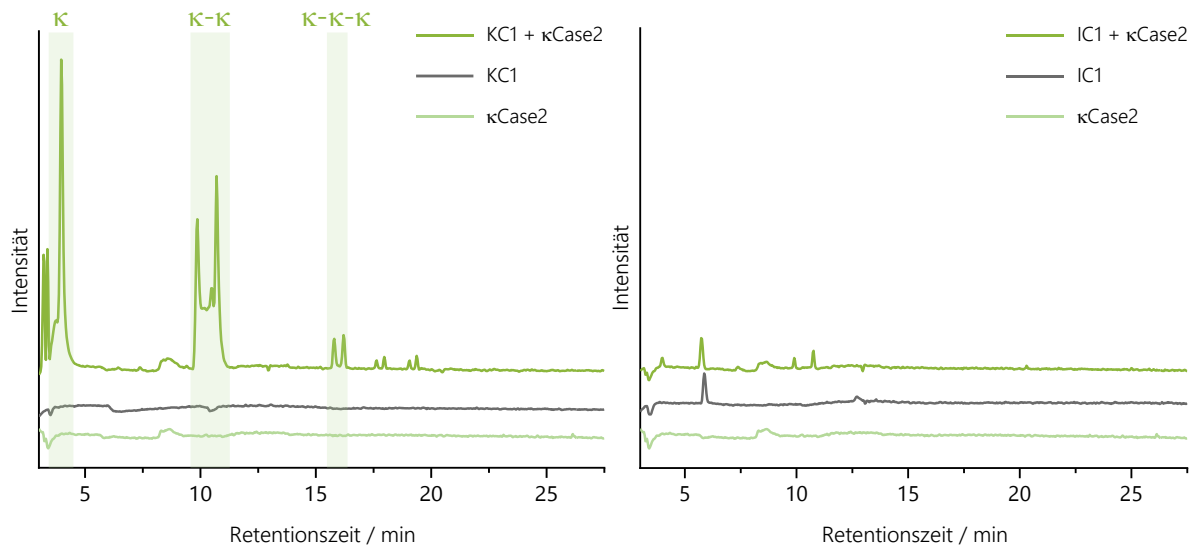
**Abbildung 9.2:** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanz ( $^1\text{H-NMR}$ )-Spektren des kommerziellen Carrageens IC3 sowie einer Glucoselösung. Das Spektrum der Carrageenprobe wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Dimethylsulfoxid ( $2,696\text{ ppm}$ ) referenziert. Das Spektrum der Glucoselösung wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Aceton ( $2,22\text{ ppm}$ ) referenziert. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von  $5,22\text{ ppm}$  kann dem anomeren Proton der Glucose zugeordnet werden.



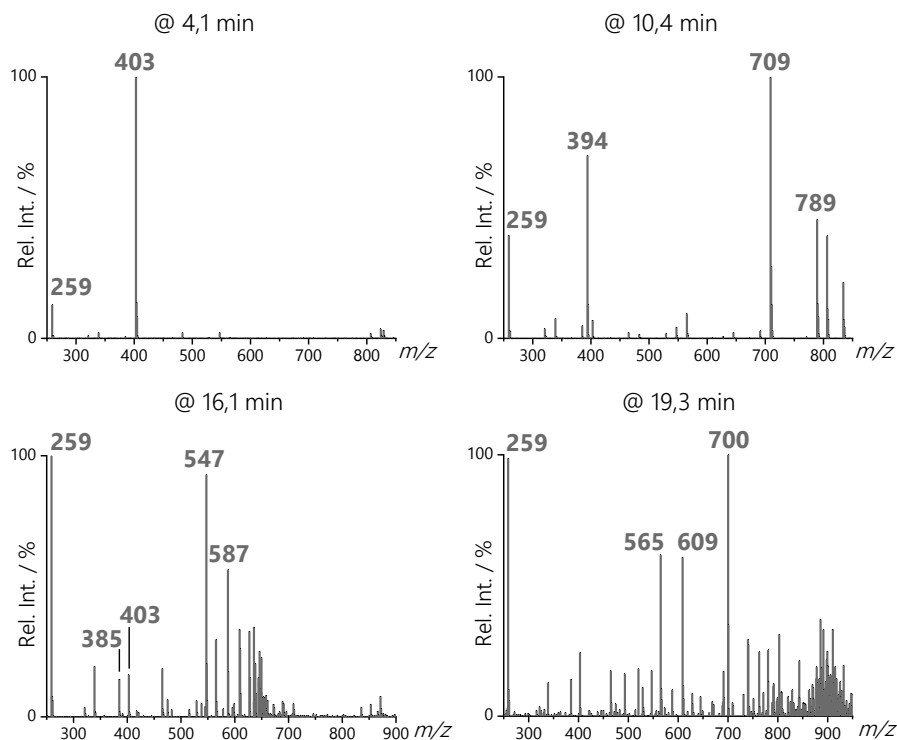
**Abbildung 9.3:** Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanz ( $^1\text{H}$ -NMR)-Spektrums des kommerziellen Carrageens KC3. Das Spektrum wurde in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $65^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Dimethylsulfoxid ( $2,696\text{ ppm}$ ) referenziert. Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von  $5,35\text{ ppm}$  kann dem anomeren Proton der  $\alpha$ -1,4-verknüpften D-Glucopyranose der *Floridean Starch* zugeordnet werden (van de Velde *et al.*, 2004).



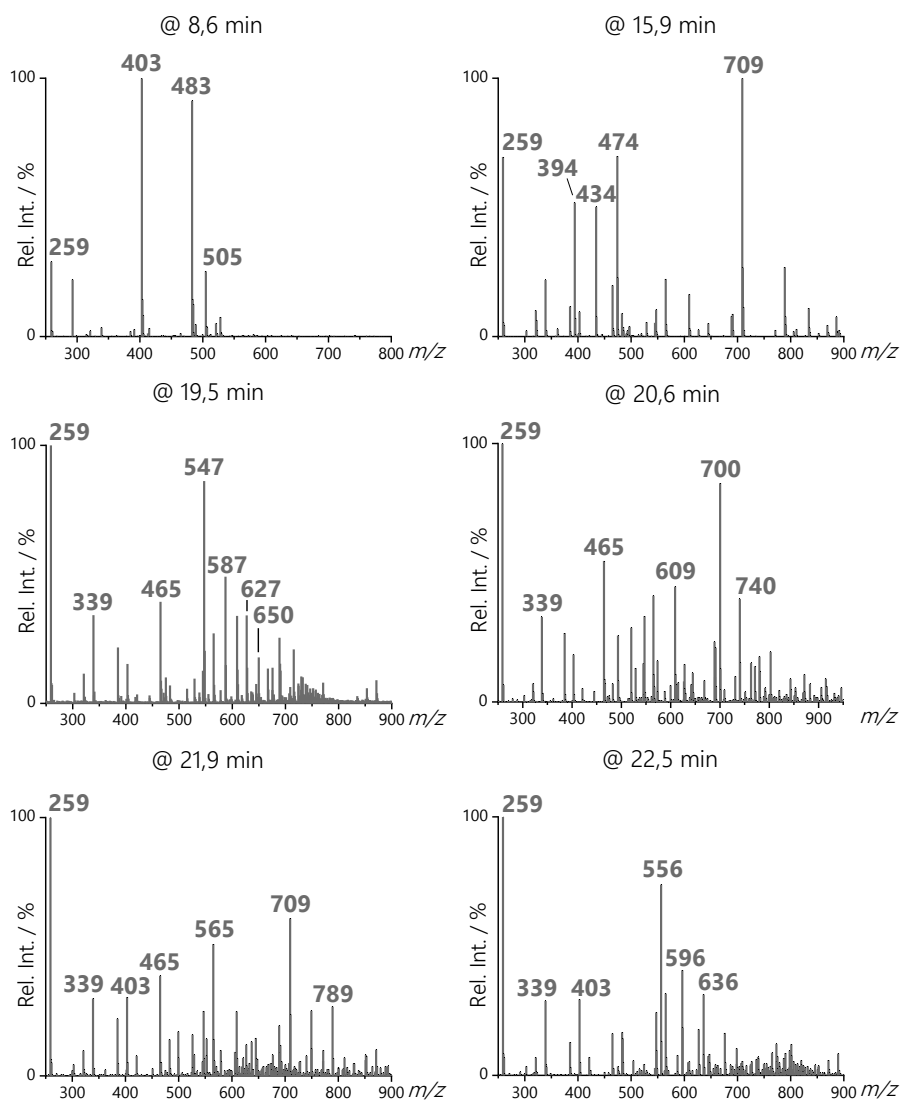
**Abbildung 9.4:** Ausschnitte verschiedener Agarosegele zur Überprüfung der Produkte nach Polymerase-Kettenreaktion. Erwartete Größe der amplifizierten Gene: **iCase1**  $1374\text{ bp}$ , **kappaCase1**  $1554\text{ bp}$ , **iCase2**  $1203\text{ bp}$  und **kappaCase1**  $1119\text{ bp}$ . Zum Vergleich wurde ein Größenstandard aufgetragen. bp: Basenpaare.



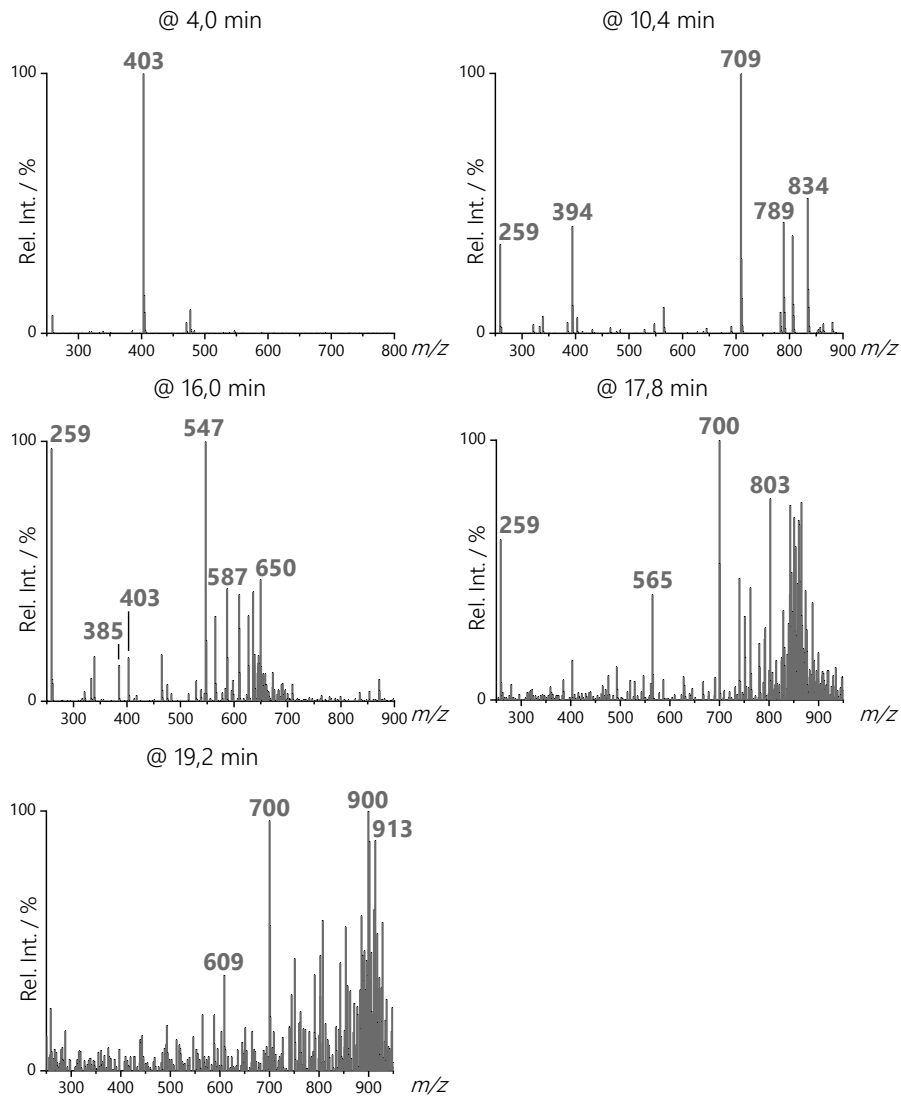
**Abbildung 9.5:** Total Ion Current (TIC)-Chromatogramm der Probe KC1 (links) sowie der Probe IC1 (rechts) nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case2. Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Die identifizierten Oligosaccharide sind mit griechischen Buchstaben des entsprechenden Carrageentyps gekennzeichnet, wobei ein Buchstabe jeweils eine Disaccharideinheit repräsentiert.



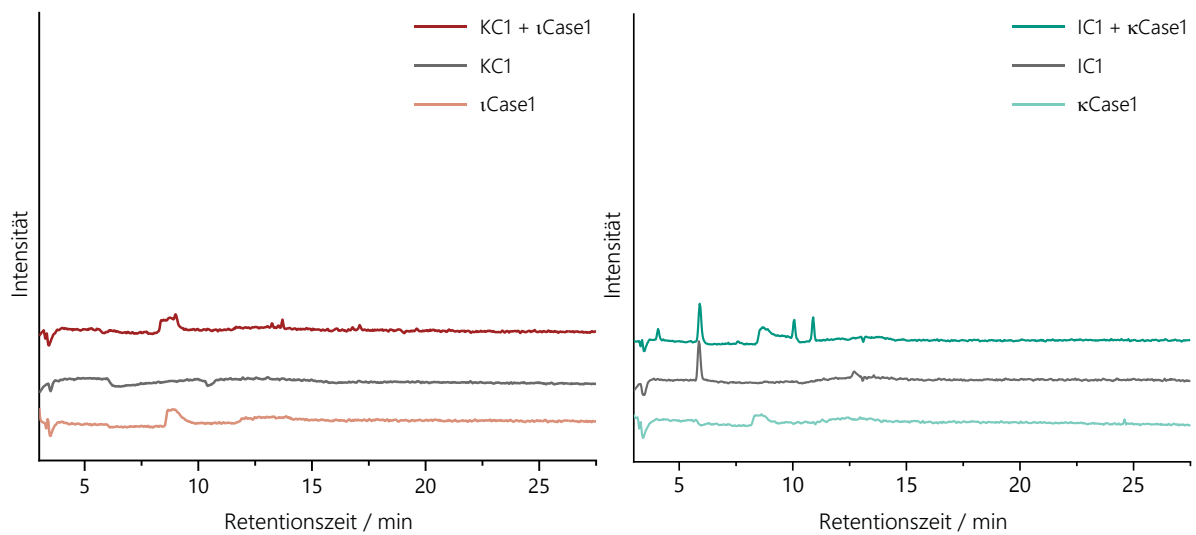
**Abbildung 9.6:** Massenspektren des *Full Scans* der Oligosaccharide der Probe KC1 nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1. Die Retentionszeiten der Oligosaccharide sind jeweils über den Massenspektren dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.



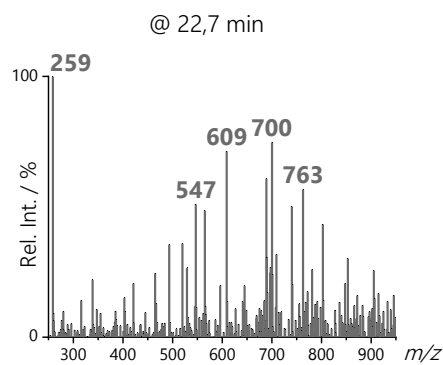
**Abbildung 9.7:** Massenspektren des *Full Scans* der Oligosaccharide der Probe IC1 nach Behandlung mit dem Enzym  $\alpha$ Case1. Die Retentionszeiten der Oligosaccharide sind jeweils über den Massenspektren dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität, *m/z*: Masse zu Ladungs-Verhältnis.



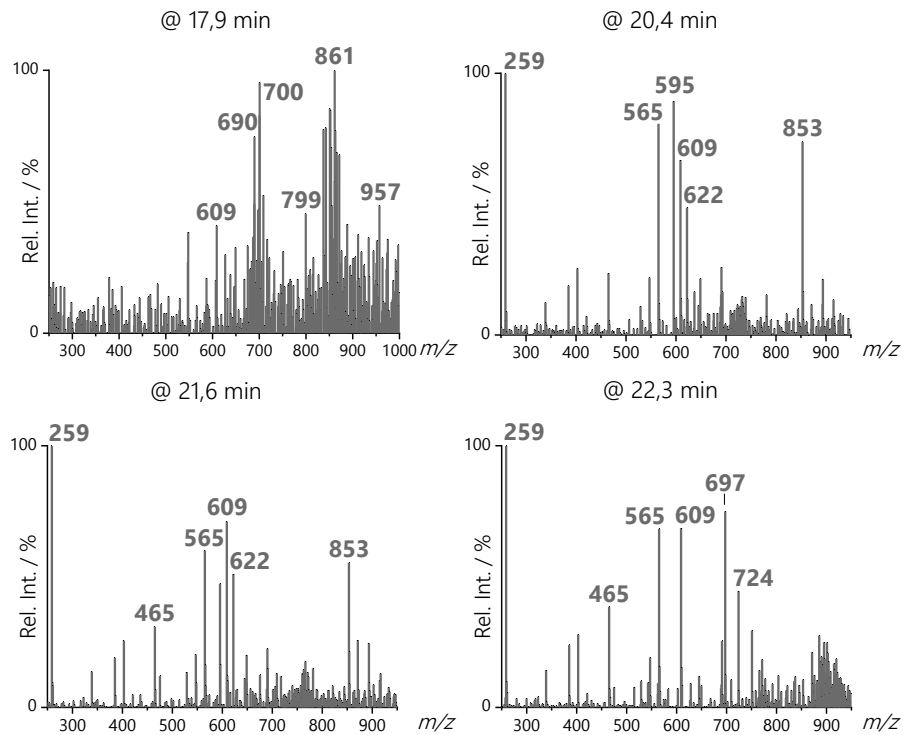
**Abbildung 9.8:** Massenspektren des *Full Scans* der Oligosaccharide der Probe KC1 nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case2. Die Retentionszeiten der Oligosaccharide sind jeweils über den Massenspektren dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.



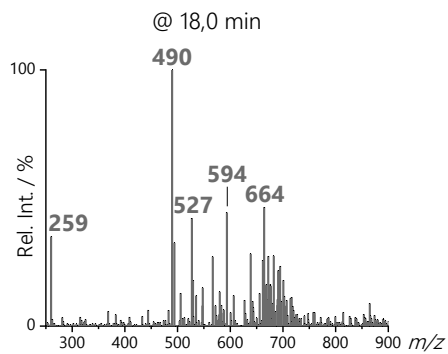
**Abbildung 9.9:** *Total Ion Current* (TIC)-Chromatogramm der Probe KC1 nach Behandlung mit der  $\iota$ -Carrageenase  $\iota$ Case1 (links) sowie der Probe IC1 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa$ Case1 (rechts). Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus.



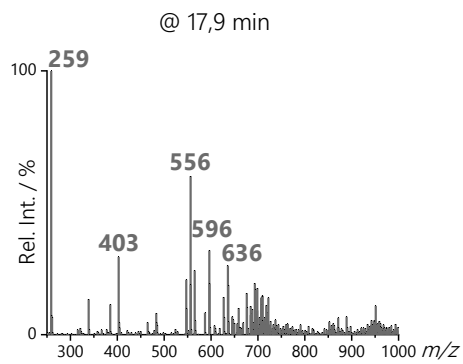
**Abbildung 9.10:** Massenspektrum des *Full Scans* des Oligosaccharids der Probe IC3 nach Behandlung mit dem Enzym  $\iota$ Case1 bei 22,7 min. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.



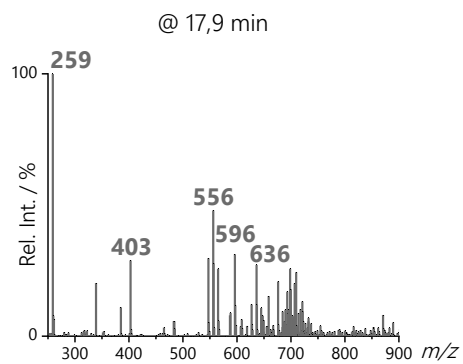
**Abbildung 9.11:** Massenspektren des *Full Scans* der Oligosaccharide der Probe LC2 nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1. Die Retentionszeiten der Oligosaccharide sind jeweils über den Massenspektren dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.



**Abbildung 9.12:** Massenspektrum des *Full Scans* des Oligosaccharids der Probe LC2 nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 bei 18,0 min. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis

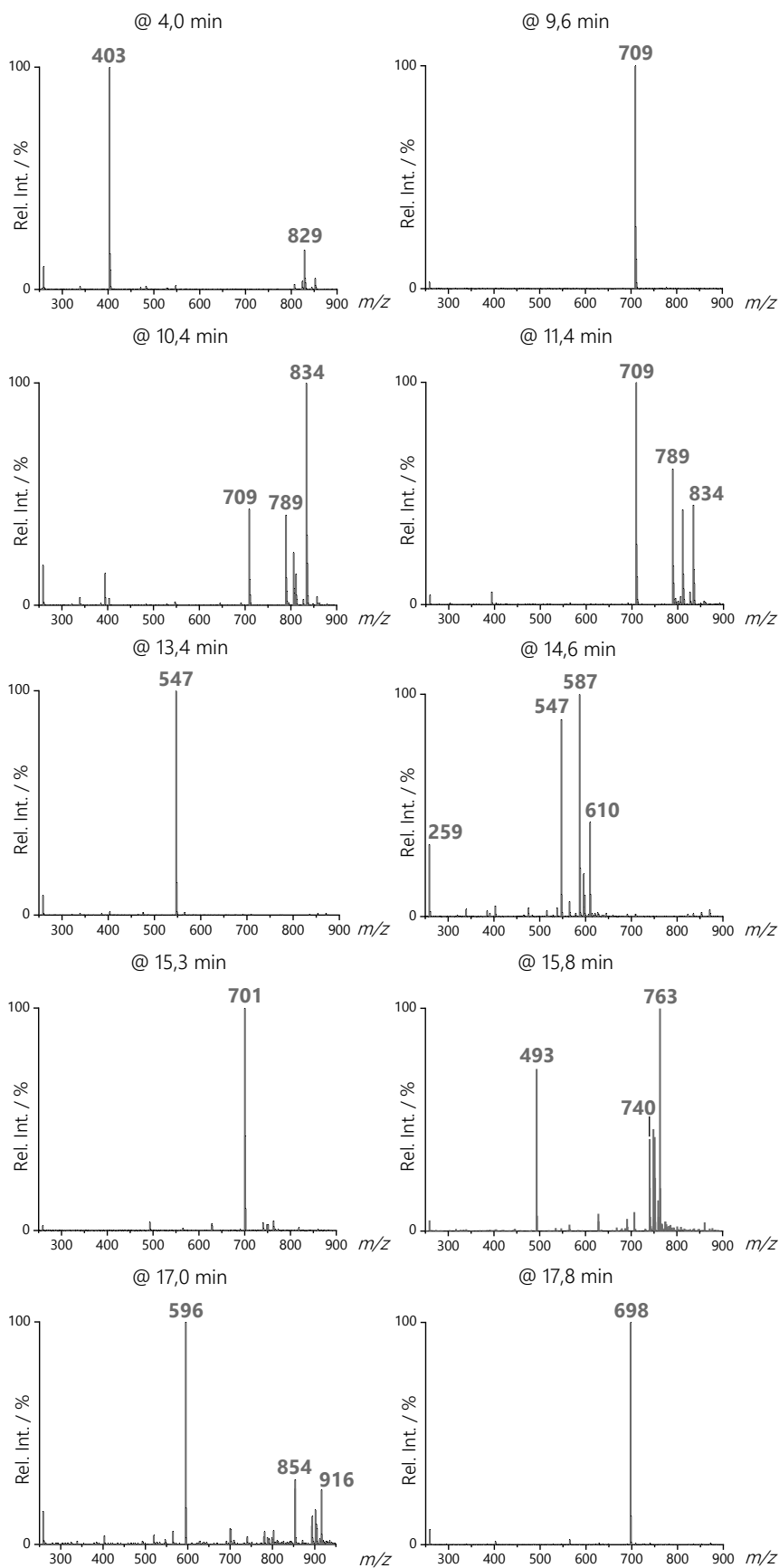


**Abbildung 9.13:** Massenspektrum des *Full Scans* des Oligosaccharids der Probe LC1 nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 bei 17,9 min. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.

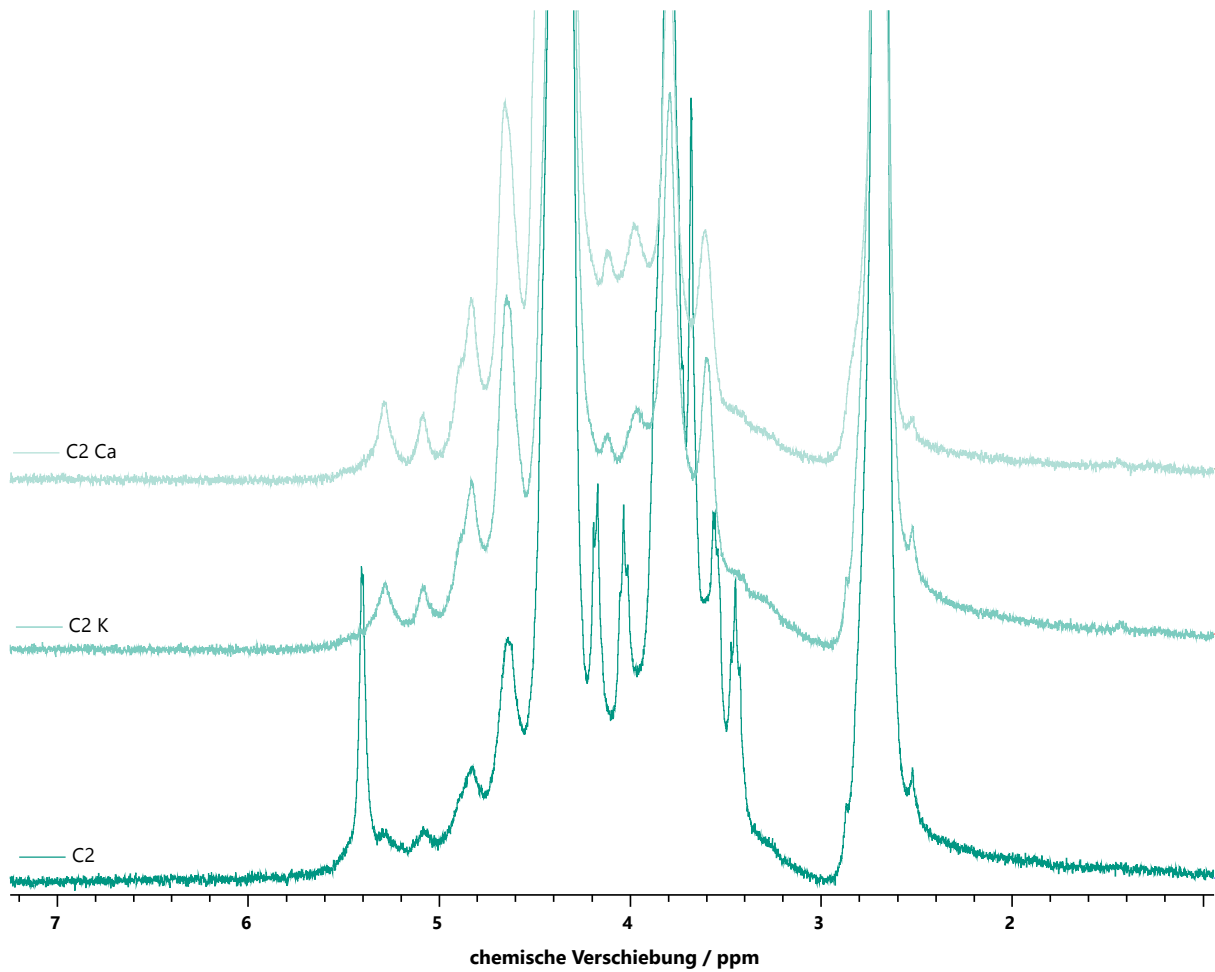


**Abbildung 9.14:** Massenspektrum des *Full Scans* des Oligosaccharids der Probe C1 nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1 bei 17,9 min. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.

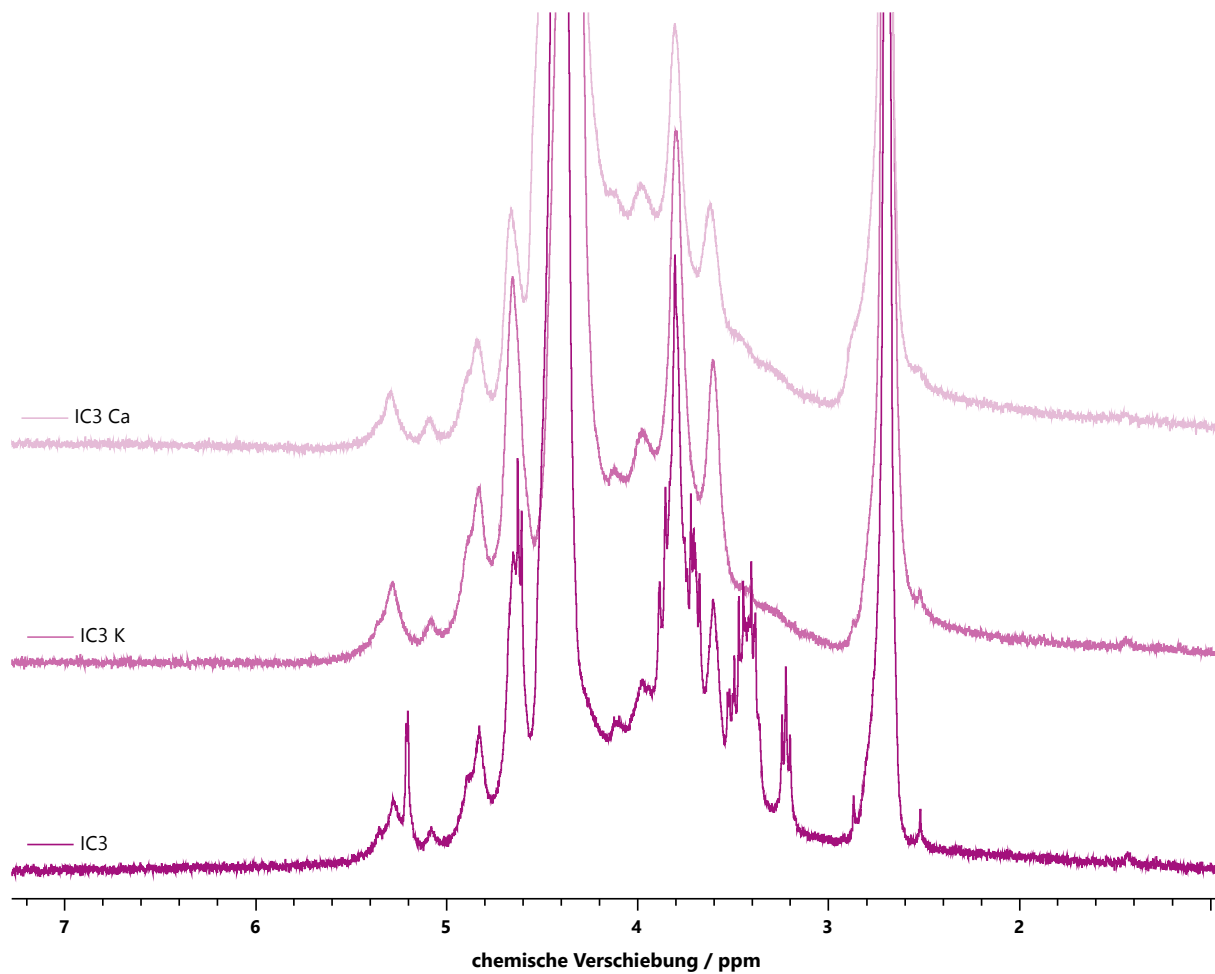




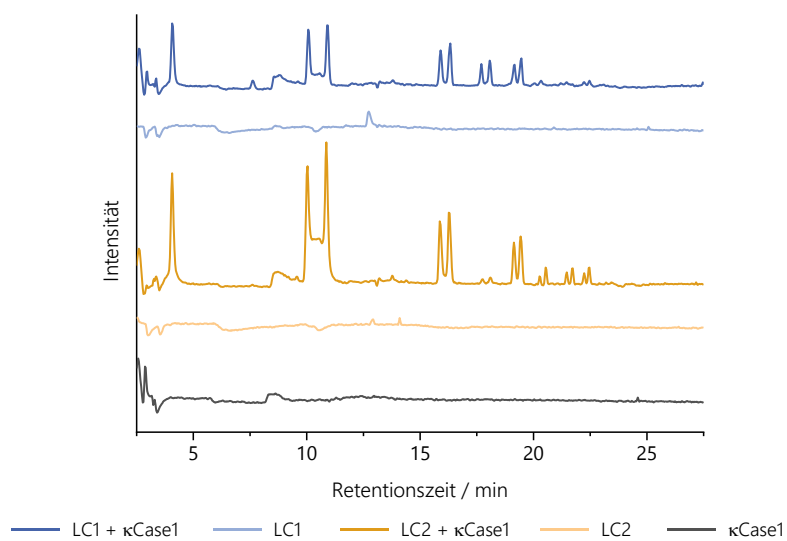
**Abbildung 9.15:** Massenspektren des *Full Scans* der Oligosaccharide der Probe FC nach Behandlung mit dem Enzym  $\kappa$ Case1. Die Retentionszeiten der Oligosaccharide sind jeweils über den Massenspektren dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus. Rel. Int.: relative Intensität,  $m/z$ : Masse zu Ladungs-Verhältnis.



**Abbildung 9.16:** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanz ( $^1\text{H-NMR}$ )-Spektren des kommerziellen Carrageens C2 sowie der entsprechenden Kalium- (C2 K) und Calciumform (C2 Ca). Die Spektren der Carrageenproben wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Dimethylsulfoxid (2,696 ppm) referenziert.



**Abbildung 9.17:** Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -Kernspinresonanz ( $^1\text{H-NMR}$ )-Spektren des kommerziellen Carrageens IC3 sowie der entsprechenden Kalium- (IC3 K) und Calciumform (IC3 Ca). Die Spektren der Carrageenproben wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $65^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die chemische Verschiebung der Signale wurde auf Dimethylsulfoxid (2,696 ppm) referenziert.



**Abbildung 9.18:** Total Ion Current (TIC)-Chromatogramm der Probe LC1 sowie der Probe LC2 nach Behandlung mit der  $\kappa$ -Carrageenase  $\kappa\text{Case1}$ . Dargestellt sind zudem die Chromatogramme der entsprechenden Carrageen- und Enzymlösungen. Die Analyse erfolgte mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) in Kombination mit Massenspektrometrie im Negativmodus.

## 9.2 Tabellen

**Tabelle 9.1:** Carrageentypen der untersuchten kommerziellen Carrageene laut Herstellerangaben.

Probe	Herstellerangabe	Probe	Herstellerangabe
KC1	κ	LC1	λ
KC2	κ	LC2	λ
KC3	κ	LC3	λ
IC1	ι	LC4	λ
IC2	ι	LC5	λ
IC3	ι	LC6	λ
IC4	ι	C1	<i>non-gelling mixture</i>
IC5	ι	C2	<i>type 310C</i>

**Tabelle 9.2:** Ermittelte Carrageentypen sowie die entsprechenden prozentualen Anteile (n=1) der kommerziellen Carrageene nach Analyse mittels <sup>1</sup>H-Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR) sowie die aus der Zusammensetzung resultierenden erwarteten Anteile an Galactose und Anhydrogalactose (mol%). Aufgeführt sind ebenfalls die ermittelten molaren Anteile der Monosaccharide Galactose und Anhydrogalactose (mol%, n=2), bestimmt über eine Analyse der korrespondierenden Zuckeralkohole mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) nach reduktiver Hydrolyse. Gal: Galactose, AnGal: Anhydrogalactose.

Probe	Anteil			erwartete Anteile an Gal		ermittelte Anteile an Gal	
	Carrageentyp / %			und AnGal / mol%		und AnGal / mol%	
	κ	ι	ν	Gal	AnGal	Gal	AnGal
LC1	47	31	22	61,0	39,0	76,6	23,4
LC3	42	37	21	60,5	39,5	78,8	21,2
LC4	42	33	24	62,0	38,0	80,0	20,0
LC5	44	33	23	61,5	38,5	69,2	30,8
C1	37	33	30	65,0	35,0	81,0	19,0
IC3	27	73	-	50,0	50,0	69,6	30,4
LC2	72	28	-	50,0	50,0	56,9	43,1
LC6	59	41	-	50,0	50,0	65,4	34,6
C2	59	41	-	50,0	50,0	66,8	33,2

**Tabelle 9.3:** Gehalt der Monosaccharide Galactose und Anhydrogalactose (mg, bezogen auf die Einwaage (EW) an Carrageen), bestimmt über eine Analyse der korrespondierenden Zuckeralkohole mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC) mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) nach reduktiver Hydrolyse. Sowie der Sulfatgehalt (mg, bezogen auf EW), der Kationengehalt (mg, bezogen auf EW) und die geschätzte Restfeuchte (mg, bezogen auf EW) in den Proben. Die Bestimmung des Sulfatgehaltes erfolgte mittels HPAEC in Kombination mit Leitfähigkeitsdetektion (CD), der Gehalt an Kationen wurde anhand einer Analyse mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) ermittelt. Aufgeführt ist ebenfalls die Summe (mg) aus den Gehalten der Monosaccharide, dem Sulfatgehalt, dem Gehalt an Kationen und der Restfeuchte.

Probe		Gal / mg	AnGal / mg	Sulfat / mg	Kationen / mg	Restfeuchte / mg	Summe / mg	EW / mg
KC1	P1	2,00	1,67	0,99	0,40	0,15	<b>5,21</b>	5,10
	P2	2,34	2,07	1,22	0,49	0,19	<b>6,31</b>	6,30
KC2	P1	1,30	1,12	1,25	0,60	0,22	<b>4,48</b>	7,30
	P2	1,74	1,47	0,97	0,46	0,17	<b>4,82</b>	5,70
KC3	P1	1,74	1,50	0,94	0,40	0,16	<b>4,74</b>	5,30
	P2	1,57	1,30	0,98	0,41	0,17	<b>4,42</b>	5,50
FC	P1	1,29	1,77	0,65	0,22	0,14	<b>4,07</b>	4,60
	P2	1,44	1,98	0,75	0,26	0,16	<b>4,58</b>	5,30
IC1	P1	1,91	0,61	1,54	0,44	0,16	<b>4,66</b>	5,20
	P2	3,22	1,03	2,58	0,74	0,26	<b>7,83</b>	8,70
IC2	P1	1,12	0,33	1,55	0,46	0,16	<b>3,63</b>	5,30
	P2	1,36	0,46	1,44	0,43	0,15	<b>3,84</b>	4,90
IC3	P1	1,69	0,69	1,41	0,54	0,19	<b>4,51</b>	6,20
	P2	1,82	0,70	1,95	0,74	0,26	<b>5,47</b>	8,60
IC4	P1	1,79	0,74	1,49	0,52	0,19	<b>4,74</b>	6,40
	P2	1,64	0,66	1,19	0,42	0,15	<b>4,06</b>	5,10
IC5	P1	1,54	0,51	1,77	0,60	0,18	<b>4,60</b>	6,00
	P2	2,06	0,71	2,24	0,75	0,23	<b>5,99</b>	7,60
LC1	P1	2,48	0,68	1,52	0,35	0,16	<b>5,19</b>	5,20
	P2	2,80	0,77	1,64	0,38	0,17	<b>5,75</b>	5,60
LC2	P1	2,14	1,48	1,31	0,48	0,17	<b>5,59</b>	5,80
	P2	1,78	1,19	1,15	0,43	0,15	<b>4,70</b>	5,10
LC3	P1	1,97	0,47	1,29	0,39	0,14	<b>4,26</b>	4,80
	P2	2,31	0,57	1,35	0,41	0,15	<b>4,79</b>	5,00
LC4	P1	2,33	0,53	1,57	0,56	0,15	<b>5,13</b>	5,00
	P2	2,44	0,55	1,72	0,62	0,17	<b>5,50</b>	5,50
LC5	P1	1,93	0,77	1,66	0,54	0,18	<b>5,08</b>	6,00
	P2	1,70	0,69	1,50	0,48	0,16	<b>4,53</b>	5,40
LC6	P1	1,37	0,35	1,15	0,41	0,14	<b>3,43</b>	4,80
	P2	1,22	0,53	1,15	0,41	0,14	<b>3,44</b>	4,80
C1	P1	2,46	0,54	1,51	0,39	0,15	<b>5,05</b>	5,10
	P2	2,45	0,50	2,01	0,52	0,20	<b>5,69</b>	6,80
C2	P1	1,25	0,57	0,91	0,34	0,15	<b>3,22</b>	5,10
	P2	1,25	0,55	1,00	0,37	0,17	<b>3,35</b>	5,60

**Tabelle 9.4:** Basensequenz der für die Polymerasekettenreaktion verwendeten Primer der  $\kappa$ - und  $\iota$ -Carrageenasen. For: Forward, Rev: Reverse.

Enzym	Primer	Basensequenz (5'→3')
Zgal_236	For	TACTTCCAATCCATGCAACAACCTACGAAGACTTCAAATCCGAAC
	Rev	TATCCACCTTTACTGTTACTCCACGAGTATCTTTTTTGAAACCTCTCC
Zgal_2155	For	TACTTCCAATCCATGTACATCGGGTCGGGAAGCGATC
	Rev	TATCCACCTTTACTGTTATGGGGTGCAGTTTACCTTGTCGTTTTTC
Zgal_4265	For	TACTTCCAATCCATGGTTCCAACCTGAATTGAGGGCCG
	Rev	TATCCACCTTTACTGTCAGTTACACGAAGTAATACTACCTAGATTTTGGTTAC
Pcar_0048	For	TACTTCCAATCCATGGCATCTATGCAACCTCCCATCGC
	Rev	TATCCACCTTTACTGTTA ATTCACCGCAATGGTTAATTTATCTATTTCCCTTTG

**Tabelle 9.5:** Gehalte der Kationen  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  sowie Schwefel in den chemisch modifizierten Carrageenen und den entsprechenden Ausgangsproben (mmol/L, n=1), bestimmt mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES). Der theoretische Schwefelgehalt ( $S_{theor.}$ ) wurde anhand der Kationengehalte berechnet und gibt den Gehalt wieder, den die Probe aufweisen müsste, wenn ausschließlich an das Polysaccharid assoziierte Kationen vorliegen würden. Ausgehend von dem vorliegenden Überschuss an Schwefel in mmol/L wurde der Gehalt an freien Salzen in der Probe als Kaliumchlorid berechnet (Konzentration der Proben: 1 g Carrageen/L). n.n.: nicht nachweisbar.

Probe	$K^+$ / mmol/L	$Na^+$ / mmol/L	$Ca^{2+}$ / mmol/L	S / mmol/L	$S_{theor.}$ / mmol/L	Überschuss / mmol/L	Salzgehalt (KCl) / g/100 g
KC1	1,92	0,05	0,23	2,07	2,42	0,35	2,61
KC1 K	4,00	0,00	0,00	1,65	4,01	2,36	17,59
KC1 Na	0,05	3,50	0,00	2,04	3,56	1,52	11,33
KC1 Ca	0,25	0,01	1,07	2,12	2,41	0,29	2,16
FC	1,15	0,03	0,11	1,49	1,40	-	-
FC K	2,18	n.n.	0,01	1,69	2,20	0,51	3,80
FC Na	0,02	2,26	0,00	1,42	2,29	0,87	6,49
FC Ca	0,21	n.n.	0,78	1,41	1,77	0,36	2,68
IC1	1,19	0,03	1,05	3,09	3,32	0,23	1,71
IC1 K	3,74	0,02	0,00	3,12	3,77	0,65	4,85
IC1 Na	0,05	3,30	0,00	3,05	3,37	0,32	2,39
IC1 Ca	0,08	0,04	1,59	3,00	3,30	0,30	2,24
IC3	1,49	1,18	0,02	2,26	2,72	0,46	3,43
IC3 K	3,91	0,01	0,00	3,24	3,93	0,69	5,14
IC3 Ca	0,12	0,02	1,51	2,92	3,17	0,25	1,86

**Tabelle 9.5:** Fortsetzung.

<b>Probe</b>	<b>K<sup>+</sup> / mmol/L</b>	<b>Na<sup>+</sup> / mmol/L</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> / mmol/L</b>	<b>S / mmol/L</b>	<b>S<sub>theor.</sub> / mmol/L</b>	<b>Überschuss / mmol/L</b>	<b>Salzgehalt (KCl) / g/100 g</b>
LC1	0,35	0,15	1,90	4,25	4,30	0,05	0,37
LC1 K	3,34	0,02	0,00	2,98	3,36	0,38	2,83
LC1 Na	0,02	3,58	0,01	3,31	3,61	0,30	2,24
LC1 Ca	0,03	0,06	1,60	3,06	3,29	0,23	1,71
mLC1 K	2,87	0,02	0,00	2,36	2,90	0,54	4,03
mLC1 Na	n.n.	3,90	0,08	2,59	4,06	1,47	10,96
C1	0,44	2,45	0,09	3,04	3,07	0,03	0,22
C1 K	3,40	0,01	0,01	3,01	3,43	0,42	3,13
C1 Ca	0,05	0,05	1,66	3,20	3,43	0,23	1,71
LC2	1,51	0,14	0,60	2,35	2,84	0,49	3,65
LC2 K	3,74	0,01	0,00	1,95	3,75	1,80	13,42
LC2 Na	0,10	3,48	0,00	2,81	3,59	0,78	5,82
LC2 Ca	0,20	0,02	1,18	2,31	2,59	0,28	2,09
C2	1,11	1,08	0,03	1,88	2,25	0,37	2,76
C2 K	3,50	0,01	0,00	2,70	3,52	0,82	6,11
C2 Ca	0,12	0,02	1,32	2,48	2,78	0,30	2,24

**Tabelle 9.6:** Mittlerer Eiskristalldurchmesser ( $\mu\text{m}$ , n=1) verschiedener monokationischer Carrageene (1 mg/mL) in 49 % (w/w) Saccharoselösung bei einer Lagerungstemperatur von  $-12,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

<b>Probe</b>	mittlerer Eiskristalldurchmesser / $\mu\text{m}$				
	<b>4 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>144 h</b>
KC1 K	6,00 $\pm$ 1,57	6,83 $\pm$ 1,84	7,88 $\pm$ 2,36	8,62 $\pm$ 2,62	9,07 $\pm$ 2,61
KC1 Ca	8,25 $\pm$ 2,01	10,80 $\pm$ 3,02	11,95 $\pm$ 3,18	13,84 $\pm$ 3,95	15,60 $\pm$ 3,76
LC1 K	12,32 $\pm$ 3,52	16,57 $\pm$ 4,27	18,19 $\pm$ 4,30	18,91 $\pm$ 4,56	21,31 $\pm$ 6,26
LC1 Ca	11,68 $\pm$ 3,18	12,30 $\pm$ 3,29	12,56 $\pm$ 3,49	14,01 $\pm$ 3,97	14,67 $\pm$ 4,38
LC2 Ca	6,92 $\pm$ 2,28	7,80 $\pm$ 2,44	8,62 $\pm$ 2,27	9,98 $\pm$ 2,86	10,60 $\pm$ 2,68
IC3 K	6,92 $\pm$ 2,12	8,13 $\pm$ 2,70	10,46 $\pm$ 3,40	11,27 $\pm$ 3,40	13,08 $\pm$ 4,30

# 10 PUBLIKATIONSLISTE

## Publikationen in Fachzeitschriften

GERHÄUSER, J., HALE, J., WEFERS, D., GAUKEL, V. (2024). Furcellaran: Impact of concentration, rheological properties, and structure on ice recrystallization inhibition activity. *Biomacromolecules*. 25: 4535-4544.

KIRAN-YILDIRIM, B., HALE, J., WEFERS, D., GAUKEL, V. (2021). Ice recrystallization inhibition of commercial  $\kappa$ -,  $\iota$ , and  $\lambda$ -carrageenans. *Journal of Food Engineering*. 290: 110269.

SCHÄFER, J., HALE, J., HOFFMANN, C. M., BUNZEL, M. (2020). Mechanical properties and compositional characteristics of beet (*Beta vulgaris* L.) varieties and their response to nitrogen application. *European Food Research and Technology*. 246: 2135-2146.

## Vorträge auf Fachtagungen

HALE, J. Entwicklung einer HILIC-MS-Methode zur Charakterisierung kommerziell erhältlicher Carrageene, *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der LChG, Karlsruhe, 2023*.

## Posterbeiträge auf Fachtagungen

HALE, J. Analyse von Carrageenen mittels Hydrophilic interaction liquid chromatography und Massenspektrometrie (HILIC-MS), *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hamburg, 2022*.

HALE, J. Strukturelle Charakterisierung verschiedener kommerziell erhältlicher Carrageene, *LChG „Tweet-your-poster-event 2020“, online, 2020*.

HALE, J. Charakterisierung der Zellwandbestandteile verschiedener Rübensorten mit unterschiedlicher Stickstoffdüngung, *48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 2019*.



