

Charakterisierung mechanisch-enzymatisch hergestellter
niedrigviskoser Ballaststoffpräparate aus gemüsebasierten
Lebensmittelnebenströmen

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

staatlich geprüfter Lebensmittelchemikerin
Rebekka Elke Schmidt

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
 2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
- Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2025

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 18.12.2024

Rebekka Elke Schmidt

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 GEMÜSEBASIERTE NEBENSTRÖME.....	2
1.1.1 Erbsenschale.....	2
1.1.2 Karottentrester	2
1.2 CHARAKTERISTISCHE NICHT-VERDAUBARE KOHLENHYDRATE DER NEBENSTRÖME.....	3
1.2.1 Ballaststoffe.....	3
1.2.2 Oligosaccharide der Raffinosefamilie	4
1.3 DIE PFLANZLICHE ZELLWAND	5
1.3.1 Aufbau der pflanzlichen Zellwand	6
1.3.2 Strukturen der Zellwandpolysaccharide	6
1.3.2.1 Cellulose	7
1.3.2.2 Hemicellulosen.....	7
1.3.2.3 Pektine.....	10
1.3.3 Zellwandnetzwerk.....	12
1.3.4 Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Zellwandpolysacchariden	13
1.4 MECHANISCHE UND ENZYMATISCHE BEHANDLUNG.....	15
1.4.1 Mikrofluidisierung	16
1.4.2 Enzyme zur Spaltung von Zellwandpolysacchariden	18
1.4.2.1 Cellulasen	19
1.4.2.2 Hemicellulasen.....	19
1.4.2.3 Pektinasen.....	20
2 ZIELSETZUNG	24
3 MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 PROBENMATERIAL UND PROBENBEZEICHNUNG.....	25
3.1.1 enzymatisch-mechanische Behandlung	26
3.1.2 mechanisch-enzymatische Behandlung	27
3.2 CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN ENZYME	28
3.3 CHARAKTERISIERUNG VON ERBSENSCHALE UND KAROTTENTRESTER.....	29
3.3.1 Asche- und Proteingehalt.....	29
3.3.2 Bestimmung freier Mono- und Disaccharide.....	29
3.3.3 Bestimmung der Oligosaccharide der Raffinosefamilie	32
3.3.4 Bestimmung und Isolierung von Ballaststoffen	32
3.3.5 Struktcharakterisierung der Ballaststoffkohlenhydrate	35

3.3.5.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung	35
3.3.5.2	Bestimmung der Bindungsverhältnisse.....	36
3.3.5.3	Analyse der Feinstruktur der Arabinane, (Arabino-)Galactane und Xyloglucane..	38
3.3.5.4	Bestimmung des Veresterungsgrads polymergebundener Galacturonsäuren	41
3.3.5.5	Analyse der Molekulargewichtsverteilung.....	43
3.3.5.6	Analyse von Oligosacchariden	44
3.4	PROFILINGMETHODE ZUR ANALYSE UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGO-SACCHARIDE	48
3.4.1	Gewinnung ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide aus Citruspektin als Standardsubstanzen.....	48
3.4.2	Charakterisierung isolierter Standardsubstanzen	49
3.4.3	Entwicklung und Validierung der Profilingmethode mittels UHPLC-PDA(-MS)	53
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	56
4.1	PROFILINGMETHODE ZUR ANALYSE UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGO-SACCHARIDE	56
4.1.1	Gewinnung ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide aus Citruspektin als Standardsubstanzen.....	56
4.1.2	Charakterisierung isolierter Standardsubstanzen	57
4.1.3	Entwicklung und Validierung der Profilingmethode mittels UHPLC-PDA(-MS)	60
4.2	ÜBERPRÜFUNG DER METHODE ZUR BESTIMMUNG NIEDERMOLEKULARER, LÖSLICHER BALLASTSTOFFE	66
4.3	CHARAKTERISIERUNG EINGESETZTER ENZYME	68
4.4	CHARAKTERISIERUNG VON ERBSENSCHALE UND KAROTTENTRESTER.....	70
4.4.1	Erbsenschale.....	71
4.4.1.1	Unbehandelte Erbsenschale.....	71
4.4.1.2	Enzymatisch-mechanisch behandelte Erbsenschalen	77
4.4.1.2.1	Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung.....	77
4.4.1.2.2	Veränderungen in den Polysaccharidstrukturen.....	79
4.4.1.2.3	Analyse der Oligosaccharide in den NLBS-Fraktionen.....	84
4.4.1.2.4	Funktionelle Eigenschaften.....	86
4.4.1.3	Mechanisch-enzymatisch behandelte Erbsenschalen	87
4.4.1.3.1	Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung.....	88
4.4.1.3.2	Veränderungen in den Polysaccharidstrukturen.....	89
4.4.1.3.3	Analyse der Oligosaccharide in den NLBS-Fraktionen.....	92
4.4.1.3.4	Funktionelle Eigenschaften.....	94
4.4.2	Karottentrester	95
4.4.2.1	Unbehandelter Karottentrester	95

4.4.2.2	Enzymatisch-mechanisch behandelte Karottentrester	100
4.4.2.2.1	Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung.....	100
4.4.2.2.2	Veränderungen in den Polysaccharidstrukturen.....	103
4.4.2.2.3	Analyse der Oligosaccharide in den NLBS-Fraktionen.....	109
4.4.2.2.4	Funktionelle Eigenschaften.....	110
4.4.2.3	Mechanisch-enzymatisch behandelte Karottentrester	110
4.4.2.3.1	Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung.....	111
4.4.2.3.2	Veränderungen in den Polysaccharidstrukturen.....	113
4.4.2.3.3	Analyse der Oligosaccharide in den NLBS-Fraktionen.....	118
4.4.2.3.4	Funktionelle Eigenschaften.....	120
4.5	ZUSAMMENFASENDE DISKUSSION	121
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	131
6	LITERATURVERZEICHNIS	135
7	CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE	149
7.1	CHEMIKALIEN.....	149
7.2	STANDARDSUBSTANZEN	151
7.3	PUFFER, REAGENZIEN UND LÖSUNGEN.....	152
7.4	ENZYME.....	154
7.5	INSTRUMENTE.....	155
7.5.1	Verwendete Säulen	155
7.5.2	Analysegeräte	155
8	ARBEITSVORSCHRIFTEN.....	159
8.1	AUSWAHL MECHANISCH-ENZYMATISCH HERGESTELLTER BALLASTSTOFFPRÄPARATE....	159
8.1.1	Screening auf Mono-, Di- und Oligosaccharide.....	159
8.1.2	Molekulargewichtsverteilung	160
8.2	ENZYMATISCH-MECHANISCHE BEHANDLUNG.....	161
8.3	MECHANISCH-ENZYMATISCHE BEHANDLUNG.....	161
8.4	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYME	162
8.5	BESTIMMUNG FREIER MONO- UND DISACCHARIDE.....	164
8.6	BESTIMMUNG VON OLIGOSACCHARIDEN DER RAFFINOSE-FAMILIE.....	166

8.7 PRÄPARATIVE BALLASTSTOFFISOLIERUNG	167
8.8 ISOLIERUNG NIEDERMOLEKULARER, LÖSLICHER BALLASTSTOFFE	168
8.9 ANALYTISCHE BALLASTSTOFFBESTIMMUNG.....	169
8.10 CHARAKTERISIERUNG VON OLIGO- UND POLYSACCHARIDEN	172
8.10.1 Analyse der Monosaccharidzusammensetzung.....	172
8.10.2 Analyse der Bindungsverhältnisse.....	174
8.10.3 Arabinan- und Galactanscreening	176
8.10.4 Xyloglucanscreening	177
8.10.5 Bestimmung des Veresterungsgrads polymergebundener Uronsäuren	179
8.10.5.1 Photometrische Bestimmung polymergebundener Uronsäuren	179
8.10.5.2 Bestimmung von gebundenem Methanol und Essigsäure	180
8.10.6 Analyse der Molekulargewichtsverteilung	180
8.11 ANALYSE VON OLIGOSACCHARIDEN IN DEN NLBS-FRÄKTIONEN.....	181
8.11.1 Analyse mittels HPAEC-PAD(/MS)	181
8.11.2 Analyse mittels UHPLC(-PDA)-MS	183
8.11.2.1 Identifizierung von Galacturonsäureoligosaccharide.....	183
8.11.2.2 Analyse von ungesättigten Galacturonsäureoligosacchariden	184
8.12 GEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄURE- OLIGOSACCHARIDE AUS CITRUSPEKTIN ALS STANDARDSUBSTANZEN	188
8.12.1 Bildung ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide	188
8.12.2 Präparative Isolierung der ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide.....	190
8.12.3 Charakterisierung isolierter ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide.....	191
9 ANHANG	193
9.1 ABBILDUNGEN	193
9.2 TABELLEN	206
10 PUBLIKATIONSLISTE	215

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	zweidimensional
AOAC	<i>Association of Analytical Chemists</i>
ARA	Arabinanase
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CEL	Cellulase
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
DAC	Acetylierungsgrad (engl.: <i>Degree of Acetylation</i>)
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
DM	Methylierungsgrad (engl.: <i>Degree of Methylation</i>)
DP	Polymerisationsgrad (engl.: <i>Degree of Polymerisation</i>)
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. <i>European Food Safety Authority</i>)
ESI	Elektronensprayionisation
FID	Flammenionisationsdetektor
GAL	Galactanase
GC	Gaschromatographie
GH	Glykosid-Hydrolasen
H2BC	<i>Heteronuclear 2-Bond Correlation</i>
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (engl.: <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPAEC-PAD	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischem Detektor (engl.: <i>High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector</i>)
HPSEC	Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (engl. <i>High Performance Size-Exclusion Chromatography</i>)
HSQC(-TOCSY)	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence (-Total Correlated Spectroscopy)</i>
IStd	interne Standardsubstanz
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LBS	lösliche Ballaststoffe
LOD	Nachweisgrenze (engl. <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. <i>Limit of Quantification</i>)
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MS	Massenspektrometrie
MS ⁿ	mehrdimensionale Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)

NLBS	niedermolekulare, lösliche Ballaststoffe
NMR	Kernspinresonanz (engl.: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)-Spektroskopie
PDA	Photodiodenarraydetektor
PG	Polygalacturonanase
PL	Pektinlyase
PMAA	partiell methylierte Alditolacetate
PME	Pektinmethylesterase
RFO	Oligosaccharide der Raffinosefamilie
RID	Brechungsindexdetektor (engl. <i>Refractive Index Detector</i>)
RRF	relativer Responsefaktor
RRT	relative Retentionszeit
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (engl. <i>Short Chain Fatty Acids</i>)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TMSP	3-Trimethylsilylpropionsäure-2,2,3,3-d ₄
UBS	unlösliche Ballaststoffe
(u)GalA-OS	(ungesättigte) Galacturonsäureoligosaccharide
(U)HPLC	(Ultra-)Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: (<i>Ultra-)</i> <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
UV	ultraviolett
XYL	Xylanase

1 EINLEITUNG

Im Jahr 2020 entstanden in Deutschland entlang der gesamten Lebensmittelwertschöpfungskette, beginnend bei der Primärproduktion bis hin zum Endverbraucher, nach Angaben des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) circa 11 Millionen Tonnen Lebensmittelabfälle. Allein auf die Verarbeitung der Lebensmittel entfiel mit 1,6 Millionen Tonnen Abfällen ein Anteil von 15 %. In der gemüseverarbeitenden Industrie entstehen unter anderem Pressrückstände bei der Produktion von Gemüsesäften oder Schalen, die vor der Extraktion von Stärke und/oder Proteinen beispielsweise aus Erbsen entfernt werden, als Abfallprodukte. Da ein nachhaltiger und bewusster Umgang mit Ressourcen auch in der Lebensmittelindustrie zunehmend an Bedeutung gewinnt, finden bereits heute einige Lebensmittelnebenströme partiell ihren Weg zurück in die Lebensmittelwertschöpfungskette, in Futtermittel oder Futtermittelzusätze. Viele der Nebenströme zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Ballaststoffen aus, für welche diverse ernährungsphysiologisch positive Eigenschaften wie präbiotische und antikanzerogene Wirkungen postuliert werden. Daher empfiehlt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) für Erwachsene eine tägliche Aufnahme von 25 g Ballaststoffen und die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) sogar eine Aufnahme von 30 g Ballaststoffen pro Tag (DGE, 2021; EFSA, 2010). Allerdings zeigen die im Rahmen der nationalen Verzehrsstudie II vom Max-Rubner-Institut (2008) erhobenen Daten, dass 68 % der Männer und 75 % der Frauen mit ihrer täglichen Ernährung den von der DGE vorgeschlagenen Richtwert nicht erreichen. Durch eine Anreicherung verschiedener Lebensmittel mit Ballaststoffen seitens der Lebensmittelindustrie kann ein Beitrag zur Steigerung der täglichen Aufnahmemenge von Ballaststoffen in der Bevölkerung geleistet werden. Abhängig von der Struktur der Ballaststoffe weisen diese verschiedene funktionelle Eigenschaften wie wasserbindende und gelbildende Eigenschaften auf. Folglich ist der Zusatz von Ballaststoffen zu niedrigviskosen Lebensmitteln wie Joghurts oder Getränken ohne sensorische Beeinträchtigung wie Veränderungen in der Textur nur begrenzt möglich. Die funktionellen Eigenschaften von Ballaststoffen können durch eine Veränderung der Ballaststoffstrukturen, insbesondere durch einen Abbau der Polysaccharide zu Oligosacchariden, beeinflusst werden. Ein vielversprechendes Verfahren zum Erzielen besserer funktioneller Eigenschaften stellt die Kombination aus Hochdruckbehandlung und enzymatischer Hydrolyse dar. Damit könnten ballaststoffreiche Nebenströme der gemüseverarbeitenden Industrie gezielt funktionalisiert, zur Anreicherung von Lebensmitteln eingesetzt und somit in die Lebensmittelwertschöpfungskette zurückgeführt werden. Gleichzeitig wird eine Steigerung des ernährungsphysiologischen Werts der damit angereicherten Lebensmittel erreicht.

Zur gezielten Funktionalisierung durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung und zum Verständnis der Veränderungen der funktionellen Eigenschaften auf struktureller Ebene ist eine detaillierte Charakterisierung der Ballaststoffstrukturen vor und nach der Behandlung erforderlich. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Erbsenschalen und Karottentrester aus Lebensmittelnebenströmen mechanisch und/oder enzymatisch behandelt und charakterisiert. Die erhaltenen Ergebnisse sollen dazu beitragen, die kombiniert mechanisch-enzymatische

Behandlung zukünftig effektiv auf andere ballaststoffreiche Nebenströme der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie entsprechend der dominierenden Ballaststoffstrukturen anzupassen.

1.1 GEMÜSEBASIERTE NEBENSTRÖME

Bei der industriellen Verarbeitung von Gemüse fallen verschiedene Nebenprodukte an. Als Reststoffe bleiben bei der Saftherstellung Trester (z. B. Karottentrester) und bei der Stärke- und Proteinisolierung unter anderem Schalen (z. B. Erbsenschalen) zurück, welche zumeist einen hohen Anteil an Ballaststoffen aufweisen.

1.1.1 ERBSENSCHALE

Als Leguminose ist die Erbse (*Pisum sativum L.*) Teil der Familie der Hülsenfrüchtler (Fabaceae) und fällt in die Ordnung der Schmetterlingsblütenartigen (Fabales). Die Erbse ist eine einjährige dikotyle Pflanze, die zu den Öffnungs- bzw. Streufrüchten zählt. Die Frucht der Erbse besteht aus der Schote, dem Perikarp, welches die Samen, auch Erbsen genannt, umschließt. Pro Erbsenschote können vier bis zehn Samen enthalten sein. Der Samen besteht aus den Keimblättern (Kotyledonen), dem Nährgewebe (Endosperm), dem Keimstiel (Hypokotyl) und den Wurzelanlagen und ist von der Samen- bzw. Erbsenschale (Testa) umgeben. Erbsen sind ein geeigneter Rohstoff zur Gewinnung von Stärke und Proteinen, welche nicht nur in der Futtermittelindustrie, sondern auch mit zunehmender Beliebtheit in der Lebensmittelindustrie gefragt sind. In Deutschland wurden 2023 mit 264 Tausend Tonnen nahezu doppelt so viele Erbsen wie vor zehn Jahren geerntet (BMEL, 2024). Allein von führenden Unternehmen der deutschen Stärkeindustrie wurden 2018 75 Tausend Tonnen gelbe Erbsen verarbeitet (Jahn, 2018). Vor der Extraktion von Stärke und Proteinen wird die Erbsenschale, welche circa 5 % des Samens ausmacht, entfernt und fällt als Nebenprodukt an. In der gelben Erbsenschale dominieren die Ballaststoffe (41,8 %), wovon 79,6 % auf die unlöslichen Ballaststoffe (UBS) und 20,4 % auf die löslichen Ballaststoffen (LBS) entfallen. Daneben sind vor allem Stärke (26,8 %), Proteine (13,8 %) und niedermolekulare Kohlenhydrate (7,9 %) in der Erbsenschale enthalten. Letztere umfassen Oligosaccharide der Raffinosefamilie (RFO, 5,0 %), Saccharose (2,6 %), Glucose (0,2 %) und Fructose (0,1 %) (Saldanha do Carmo *et al.*, 2022). Aufgrund des hohen Ballaststoffanteils empfiehlt sich die Erbsenschale nicht nur zum Einsatz als Futtermittel, sondern auch zur Anreicherung von zum Beispiel Back- und Teigwaren mit Ballaststoffen (Jahn, 2018).

1.1.2 KAROTTENTRESTER

Die Karotte (*Daucus carota L.*) ist eine dikotyle Pflanze aus der Familie der Doldenblütler (Apiaceae) und fällt unter die Ordnung der Doldenblütlerartigen (Apiales). Während des Wachstums bildet sich durch Verdickung aus der Pfahlwurzel die Karotte als Speicherorgan der Pflanze. Die Karotte wird durch das im Inneren befindliche Xylem mit Wasser und das darauf

aufgelagerte Phloem mit Nährstoffen versorgt. Nach außen abgeschlossen ist die Karotte durch die Epidermis.

Mit einer weltweiten Produktion von 43 Millionen Tonnen Karotten im Jahr 2020 zählt die Karotte zu den sieben mengenmäßig wichtigsten Gemüsearten. Ein Anteil von 20 % der produzierten Karotten stammt aus Europa, wovon allein in Deutschland 2020 etwa 800 Tausend Tonnen Karotten auf knapp 14 Tausend Hektar angebaut wurden (BLE, 2022). Der Karottensaft ist neben dem Tomatensaft der beliebteste Gemüsesaft (VdF, 2013). Im Jahr 2014 wurden in Deutschland knapp 18 Millionen Liter Karottensaft produziert (Statistisches Bundesamt, 2015). Zu dessen Gewinnung werden die Karotten gewaschen, zerkleinert und anschließend gepresst. Für eine erhöhte Saftausbeute und eine reduzierte Trübung wird die Karotte vor dem Pressen häufig thermisch und/oder enzymatisch behandelt. Bei der Produktion bleiben 30 - 40 % des Rohmaterials als Pressrückstand, dem Karottentrester, zurück (Kumar & Kumar, 2012). Die Zusammensetzung dieses Karottentresters ist variabel, wie stark schwankende Literaturdaten nahelegen. So besteht dieser aus 29,0 - 73,0 % Ballaststoffen, welche sich aus den UBS (30,0 - 57,6 %) und LBS (13,5 - 15,4 %) zusammensetzen; 9,7 - 19,3 % Kohlenhydraten; 0,2 - 8,4 % Proteinen; 0,3 - 1,3 % Fetten; 0,8 - 7,7 % Mineralstoffen sowie Vitaminen, insbesondere Carotinoiden (5,5 - 1109,5 µg/g) (Ahmad *et al.*, 2016; Bellur Nagarajaiah & Prakash, 2015; Chau *et al.*, 2004; Rovai *et al.*, 2021; Trabert *et al.*, 2022; Turksoy & Özkaya, 2011). Hinsichtlich der Kohlenhydrate dominieren Saccharose (3,6 - 4,4 %), Stärke (1,0 %), Glucose (0,6 - 1,7 %), Fructose (0,6 - 1,8 %) und Maltose (0,8 %) (Raees-ul & Prasad, 2015; Trabert *et al.*, 2022). Aufgrund seiner hohen Gehalte an Ballaststoffen, Mineralstoffen und Vitaminen ist der Karottentrester ernährungsphysiologisch wertvoll. Ein großer Anteil des Karottentresters gelangt in die Futtermittelindustrie. Aber auch in der Lebensmittelindustrie finden sich Einsatzmöglichkeiten für Karottentrester, zum Beispiel zur Ballaststoffanreicherung von Keksen oder zur Gewinnung von β-Carotin (Raees-ul & Prasad, 2015; Carle & Schieber, 2006).

1.2 CHARAKTERISTISCHE NICHT-VERDAUBARE KOHLENHYDRATE DER NEBENSTRÖME

Erbsenschalen und Karottentrester aus Lebensmittelnebenstömen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Ballaststoffen aus (vgl. Kapitel 1.1.1 und 1.1.2). Diese Ballaststoffe umfassen auch die RFO, welche ein charakteristischer Bestandteil von Erbsenschalen sind.

1.2.1 BALLASTSTOFFE

Ballaststoffe stellen eine heterogene Gruppe dar. Sie bestehen aus einer Vielzahl an Komponenten, die hauptsächlich aus der pflanzlichen Zellwand stammen. Dabei variiert die Zusammensetzung und Struktur der einzelnen Ballaststoffkomponenten unter anderem mit deren pflanzlichen Ursprung. Die in der Europäischen Union gültige Definition für Ballaststoffe in Lebensmitteln findet sich in der Lebensmittelinformationsverordnung (VO (EU) Nr. 1169/2011) und orientiert sich am Codex Alimentarius von 2009. Gemäß Artikel 2 Absatz 4 in Verbindung mit Anhang I Nummer 12

VO (EU) Nr. 1196/2011 sind Ballaststoffe Kohlenhydratpolymere mit drei oder mehr Monomer-einheiten, die im Dünndarm des Menschen weder verdaut noch absorbiert werden und einer der folgenden Klassen angehören: „Essbare Kohlenhydratpolymere, die in Lebensmitteln, wenn diese verzehrt werden, auf natürliche Weise vorkommen; essbare Kohlenhydratpolymere, die auf physikalische, enzymatische oder chemische Weise aus Lebensmittelrohstoffen gewonnen werden und laut allgemein anerkannten wissenschaftlichen Nachweisen eine positive physiologische Wirkung besitzen oder essbare synthetische Kohlenhydratpolymere, die laut allgemein anerkannten wissenschaftlichen Nachweisen eine positive physiologische Wirkung besitzen.“ Somit fallen unter diese Definition auch Oligosaccharide, die durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung aus Zellwandpolysacchariden freigesetzt werden können. Oligosaccharide bestehen je nach Definition aus drei bis zehn (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC, 1995) bzw. drei bis neunzehn Monomereinheiten (Mussatto, 2007). Hingegen nicht mit eingeschlossen nach der Lebensmittelinformationsverordnung sind Lignine und andere an Zellwandpolysaccharide assoziierte Bestandteile, obwohl diese im Codex Alimentarius von 2009 berücksichtigt und 2001 in die Ballaststoffdefinition der *Cereals & Grains Association* (früher *American Association of Cereal Chemists*) aufgenommen wurden (Codex Alimentarius, 2015; DeVries, 2001). In der menschlichen Ernährung sind die Zellwandpolysaccharide pflanzlicher Lebensmittel die Hauptballaststoffquelle. Daher wird in Kapitel 1.3 auf den Aufbau der pflanzlichen Zellwand sowie auf die darin vorkommenden Polysaccharide genauer eingegangen.

Die Ballaststoffe werden in Abhängigkeit von ihrer Löslichkeit in Wasser und 80%igem Ethanol in UBS, LBS sowie niedermolekulare, lösliche Ballaststoffe (NLBS) unterteilt. Im Falle der Erbsenschale bzw. des Karottentresters bestehen die UBS überwiegend aus Cellulose, die LBS aus Pektinen und die NLBS aus oligomeren Verbindungen, wie die RFO in der Erbsenschale (vgl. Kapitel 4.4).

1.2.2 OLIGOSACCHARIDE DER RAFFINOSEFAMILIE

RFO sind α -Galactosylderivate von Saccharose. Abhängig vom DP sind an das C6 der Glucose-einheit der Saccharose eine (Raffinose), zwei (Stachyose), drei (Verbascose) bzw. vier (Ajugose) α -(1→6)-verknüpfte D-Galactopyranosen glykosidisch gebunden (vgl. Abbildung 1). In der Pflanze sind RFO für den Transport und die Speicherung von Energie sowie die Widerstandsfähigkeit gegen abiotische Stressfaktoren wie Salz und Trockenheit wichtig (Elango *et al.*, 2022). RFO kommen in den Samen von Leguminosen wie Bohnen und Erbsen in relevanten Mengen vor. Hierbei sind nicht nur im Sameninneren, sondern auch in der Samenschale RFO zu finden. In der Schale gelber Erbsen beispielsweise sind Verbascose (3,0 %), Stachyose (1,5 %) und Raffinose (0,5 %) enthalten (Saldanha do Carmo *et al.*, 2022). Abgebaut werden können RFO durch Invertasen, welche als *exo*-Enzyme die β -Fructofuranoseeinheit der Saccharose bzw. RFO abspalten (Singh *et al.*, 2019). Als Invertaseabbauprodukte entstehen Glucose, Melibiose, Manninotriose bzw. das entsprechende Derivat der Verbascose sowie die abgespaltene Fructoseeinheit (vgl. Abbildung 1).

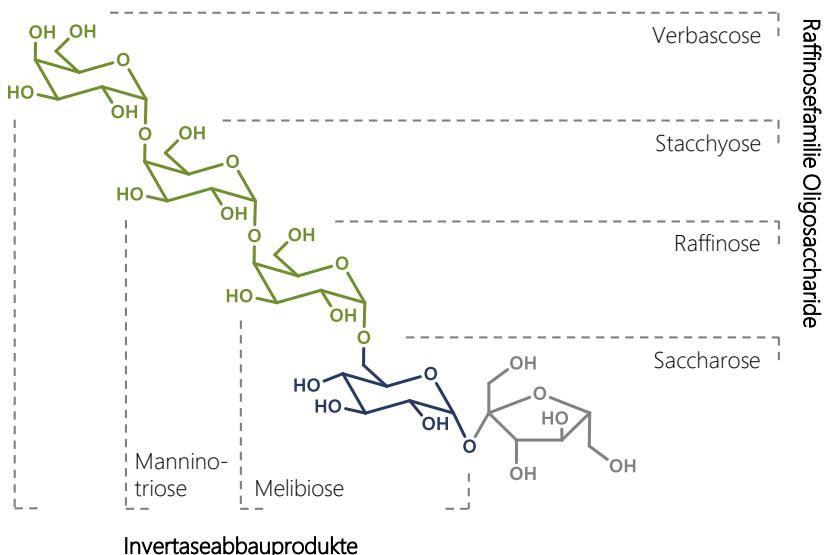


Abbildung 1: Strukturen relevanter Oligosaccharide der Raffinosefamilie sowie deren Invertaseabbauprodukte, grau: β -D-Fructofuranose, blau: α -D-Glucopyranose, grün: α -D-Galactopyranose

Lange Zeit wurden RFO als unerwünschte antinutritive Stoffe eingestuft, da der Verzehr von RFO-haltigen Lebensmitteln wie Linsen, Bohnen und Erbsen zu Blähungen, Bauchkrämpfen und/oder Durchfall führen kann. Die Ursache hierfür ist die Gasbildung (Wasserstoff, Methan, Kohlenstoffdioxid) im Dickdarm (Colon) im Zuge der Fermentation der unverdaulichen RFO durch die Darmbakterien. Jedoch können sich RFO genauso wie die anderen Zellwandpolysaccharide auch positiv auf die Gesundheit insbesondere den Darm auswirken (vgl. Kapitel 1.3.4) und sind daher neuerdings ein erwünschter Bestandteil in der menschlichen Ernährung (Saldanha do Carmo *et al.*, 2022).

1.3 DIE PFLANZLICHE ZELLWAND

Die Zellwand ist als essenzieller Bestandteil jeder pflanzlichen Zelle verantwortlich für die Anatomie, Stabilität und Widerstandsfähigkeit der Pflanze. Sie umschließt die Zelle und verleiht ihr durch Standhaltung des Turgordrucks Form und Stabilität. Zudem bietet die Zellwand Schutz vor verschiedenen äußeren abiotischen und biotischen Einflussfaktoren, wie Austrocknung oder pathogenen Organismen. Die Zellwand fungiert jedoch nicht nur als Barriere, sondern dient auch einem gezielten Austausch von Stoffwechselprodukten, dem Transport von Wasser und Nährstoffen und ist wichtig für die interzelluläre Kommunikation. Darüber hinaus ist die Zellwand maßgeblich beteiligt am Zellwachstum sowie an der Zellentwicklung und -differenzierung und erfährt somit eine stetige Veränderung ihrer Zusammensetzung. Die Hauptkomponenten der pflanzlichen Zellwand sind die Polysaccharide der Cellulose, Hemicellulosen und Pektine (vgl. Kapitel 1.3.2). Damit assoziiert vorliegen können Strukturproteine und phenolische Komponenten wie Lignine. Jede Zellwand ist in ihrer Zusammensetzung einmalig, unter anderem abhängig von der Taxonomie und der Art des Gewebes, des Zelltyps sowie dem Stadium der Entwicklung (Caffall & Mohnen, 2009; Carpita & Gibeaut, 1993; McDougall *et al.*, 1996; Scheller & Ulvskov, 2010; Zhang *et al.*, 2021).

1.3.1 AUFBAU DER PFLANZLICHEN ZELLWAND

Im Allgemeinen besteht die pflanzliche Zellwand aus bis zu drei aufeinander aufgelagerten und miteinander interagierenden Schichten: der Mittellamelle, der primären und der sekundären Zellwand (McDougall *et al.*, 1996). Die pektinreiche Mittellamelle ist im interzellulären Raum lokalisiert, grenzt die einzelnen Zellen voneinander ab und ist verantwortlich für die Zelladhäsion (Zamil & Geitmann, 2017). Im Zuge des Zellwachstums lagert sich die primäre Zellwand auf die Mittellamelle auf. Dikotyle und monokotyle, nicht-commelinide Pflanzen bilden eine primäre Zellwand des Typs I und monokotyle, commelinide Pflanzen eine primäre Zellwand des Typs II aus. Während das Zellwandnetzwerk des Typs I vor allem aus Cellulose, Pektinen, Xyloglucanen und kleineren Anteilen an Heteroxylanen und -mannanen besteht, wird das Zellwandnetzwerk des Typs II von Cellulose und (Glucurono-)Arabinoxylanen neben geringeren Mengen an Pektinen, Xyloglucanen und *mixed-linked*- β -Glucanen dominiert. Bei beiden Zellwandtypen liegen Strukturproteine und, in Abhängigkeit von der Taxonomie, mit Hydroxizimtsäurederivaten veresterte Polysaccharide vor. Auf die primäre Zellwand kann sich zum Ende von Zellwachstum und -differenzierung eine sekundäre Zellwand auflagern. Diese besteht aus einem Verbund aus Cellulose und Xylanen mit Ligninen (ligninifizierte Zellwände) oder selten, wie in den Samenhaaren von Baumwolle (*Gossypium spp.*), ohne Lignine (nicht-ligninifizierte Zellwände) (Harris & Smith, 2006; Zhang *et al.*, 2021). Daneben können auch weitere Verbindungen wie Wachse, Cutine, Suberine oder Tannine an die Zellwand assoziiert vorliegen. Eine sekundäre Zellwand besitzen vorwiegend sklerenchymatische Zellen, die dadurch eine erhöhte Steifigkeit erlangen und somit für eine bessere Stabilität der Pflanze sorgt. Die dazugehörigen Zellen des Xylems können zur Versorgung der Pflanze in ihrem Inneren Wasser transportieren. Daneben weisen die Zellen der Epidermis sowie der Testa, welche das pflanzliche Gewebe nach außen abschließen, im Gegensatz zu den innenliegenden parenchymatischen Zellen, ein sekundäres Breitenwachstum auf (McDougall *et al.*, 1996).

1.3.2 STRUKTUREN DER ZELLWANDPOLYSACCHARIDE

Die Grundbausteine der Zellwandpolysaccharide, welche die Hauptpolymere der pflanzlichen Zellwand darstellen, sind lediglich zehn Monosaccharide: Apiose, Arabinose, Fucose, Galactose, Galacturonsäure, Glucose, Glucuronsäure, Mannose, Rhamnose und Xylose. Diese lassen sich, basierend auf der Anzahl an Kohlenstoffatomen, in Pentosen und Hexosen unterteilen. Zudem ist eine Unterscheidung zwischen der D- und L-Konfiguration sowie zwischen der α - und β -Konfiguration, abhängig von der Stellung der Hydroxygruppe am anomeren Kohlenstoffatom, möglich. Die Monosaccharide können als Sechsring (Pyranose) und/oder Fünfring (Furanose) vorliegen. Bei den Uronsäuren handelt es sich um eine oxidierte Form der Monosaccharide, in der Struktur der Desoxy-Monosaccharide dagegen fehlt eine Hydroxygruppe (vgl. Abbildung 2). Die Verknüpfung der Monosaccharide über glykosidische Bindungen zu Polysacchariden kann aufgrund der vielen Hydroxygruppen an verschiedenen Positionen erfolgen und somit zu einer

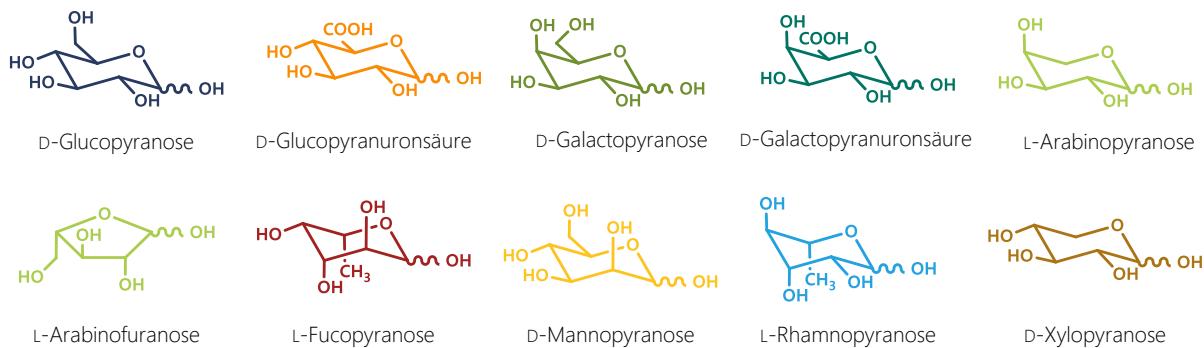


Abbildung 2: Strukturen der für die pflanzliche Zellwand relevantesten Monosaccharide in ihrer bevorzugten Form

komplexen Polysaccharidstruktur führen. Die einzelnen Monosaccharide kommen in den Zellwandpolysacchariden bevorzugt in einer enantiomeren Konfiguration vor, welche in Abbildung 2 dargestellt ist (McDougall *et al.*, 1996).

In den folgenden Kapiteln werden die Strukturen der relevantesten Zellwandpolysaccharide im Detail beschrieben.

1.3.2.1 CELLULOSE

Cellulose gehört zu den Homopolysacchariden und ist aus glykosidisch β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Glucopyranosen aufgebaut. Zur Ausbildung einer linearen Kette liegt jede zweite Glucoseeinheit zur Vorherigen um 180° gedreht vor. Somit ist die kleinste sich wiederholende Einheit in der Cellulosestruktur (vgl. Abbildung 3A) die Cellobiose (McDougall *et al.*, 1996). Der Polymerisationsgrad (engl. *Degree of Polymerisation*, DP) einer einzelnen Glucosekette kann bis zu 15.000 betragen und ist in der primären Zellwand niedriger als in der sekundären Zellwand. Durch die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Cellulosesträngen lagern sich diese zunächst zu Nanofibrillen zusammen, welche im Weiteren „kordelartig“ zu den Mikrofibrillen aggregieren (O'Sullivan, 1997; Zhang *et al.*, 2021). Eine Cellulosemikrofibrille besteht aus 30 bis 200 Strängen und ist strukturgebender Bestandteil des Grundgerüsts der pflanzlichen Zellwand. Die Ausbildung der wasserunlöslichen Mikrofibrillen verleiht der Cellulose ihre kristalline Struktur (O'Sullivan, 1997). Während in der sekundären Zellwand kristalline Cellulose dominiert, sind in der primären Zellwand auch Bereiche mit amorpher Cellulose anzutreffen (McDougall *et al.*, 1996).

1.3.2.2 HEMICELLULOSEN

Die Hemicellulosen verleihen der pflanzlichen Zellwand ihre Festigkeit und bilden die Matrix für die Cellulosemikrofibrillen. Sie umfassen eine heterogene Gruppe von Polysacchariden, die aus einem β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Rückgrat aus Glucose, Mannose oder Xylose bestehen und die gleiche äquatoriale Konfiguration der Hydroxygruppe am C1 und C4 aufweisen (Scheller & Ulvskov, 2010). Die strukturelle Vielfalt entsteht unter anderem durch die Substitution mit verschiedenen Sacchariden in unterschiedlichen Mustern (Zhang *et al.*, 2021). Die Hemicellulosen lassen sich einteilen in

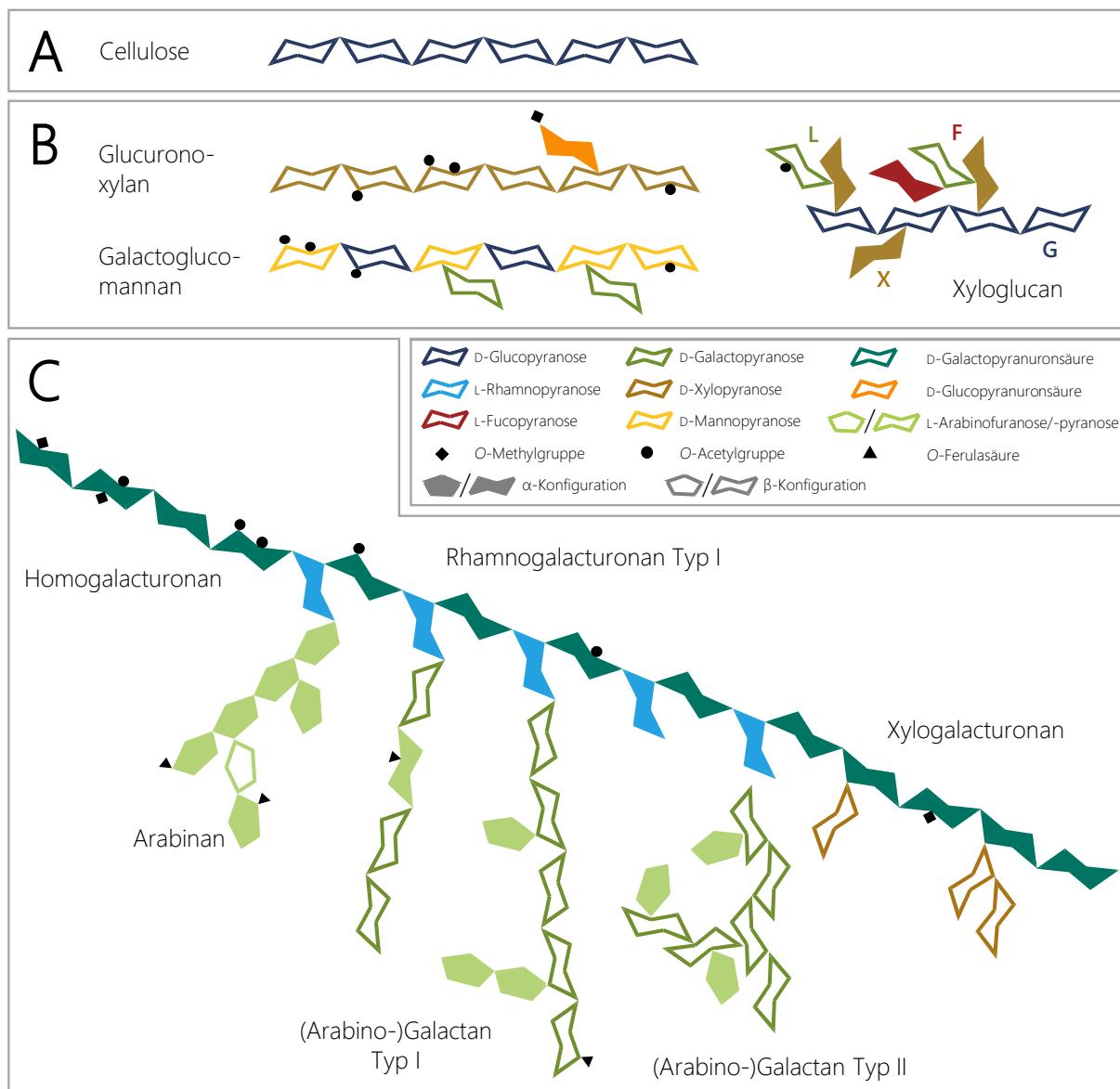


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strukturen der relevantesten Zellwandpolysaccharide dikotyler Pflanzen: Cellulose (A), Hemicellulosen (B) und Pektine (C) ohne Rhamnogalacturonan Typ II, F, G, L, X = Einbuchstabencode zur Benennung von Xyloglucanen nach Fry und Mitarbeitenden (1993)

Xyloglucane, Xylane, Mannane und *mixed-linked* β -Glucane. Letztere bestehen aus einem linearen Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 3)-verknüpften Glucopyranosiden und sind nahezu ausschließlich in der Zellwand von Gräsern (Poaceae) zu finden (Vogel, 2008). Die Strukturen der für Dikotyledonen relevanten Hemicellulosen sind in Abbildung 3B dargestellt.

Xyloglucane besitzen eine große strukturelle Vielfalt und sind als dominierende Hemicellulosen in der primären Zellwand von dikotylen Samenpflanzen (Spermatophyten) mit einem Anteil von etwa 20 % vorzufinden (Scheller & Ulvskov, 2010). Die Xyloglucane sind aus einem β -(1→4)-verknüpften Glucanrückgrat aus 300 bis 3.000 Glucoseeinheiten aufgebaut. Dieses Glucanrückgrat liegt überwiegend mit Xylose, Galactose, Arabinose und/oder Fucose substituiert vor und weist in dikotylen Pflanzen üblicherweise einen Substitutionsgrad von 60 bis 75 % auf (Fry, 1989). Je niedriger der Substitutionsgrad des Xyoglucans ist, desto geringer ist dessen Wasserlöslichkeit. Die

Benennung der aus je einer Glucoseeinheit bestehenden Abschnitte des Rückgrats erfolgt nach dem von Fry und Mitarbeitenden (1993) eingeführten Einbuchstabencode. Am verbreitetsten sind neben der unsubstituierten Glucoseeinheit (G) die vier jeweils am C6 mit α -D-Xylopyranose (X), β -D-Galactopyranose-(1 \rightarrow 2)- α -D-Xylopyranose (L), α -L-Arabinofuranose-(1 \rightarrow 2)- α -D-Xylopyranose (S) bzw. α -L-Fucopyranose-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galactopyranose-(1 \rightarrow 2)- α -D-Xylopyranose (F) substituierten Glucoseeinheiten (Fry *et al.*, 1993; Scheller & Ulvskov, 2010). Da Xyloglucane aus sich wiederholenden Struktureinheiten aufgebaut sind, erfolgt zu deren Beschreibung eine Unterteilung des Glucanrückgrats in je vier Glucoseeinheiten. Abhängig von Art und Anzahl der Substituenten können Xyloglucane im Wesentlichen entweder dem XXXG- oder dem XXGG-Typ zugeordnet werden. Während der höhersubstituierte XXXG-Typ in Xyloglucanen der Nackt- (Gymnospermen) und Bedecktsamern (Angiospermen) anzutreffen ist, beschränkt sich das Vorkommen des XXGG-Typs auf die Xyloglucane der Nachtschattengewächse (Solanaceae) und die monokotylen Pflanzen (Scheller & Ulvskov, 2010; Vincken *et al.*, 1997). Der XXXG-Typ zeichnet sich durch drei von vier mit Xylose substituierte Glucoseeinheiten im Glucanrückgrat einer sich wiederholenden strukturellen Einheit aus. Hierbei liegen 30 bis 50 % der Xyloseeinheiten zusätzlich mit Galactose (L) und vereinzelt mit Galactose und Fucose (F) substituiert vor (Fry *et al.*, 1993; Fry, 1989). Eine Substitution mit Arabinose (S) beschränkt sich auf Xyloglucane der Solanaceae, welche jedoch keine Fucose (F) aufweisen. Beim XXGG-Typ sind lediglich zwei der vier Glucoseeinheiten einer sich wiederholenden Einheit des Glucanrückgrats substituiert. Wie unter anderem für die Xyloglucane der Erbse als Vertreter des XXXG-Typs nachgewiesen werden konnte, können die Galactosereste einfach oder doppelt O-acetyliert vorliegen. Für die Xyloglucane der Solanaceae hingegen wird eine mögliche O-Acetylierung am C6 der Glucoseeinheit im Glucanrückgrat beschrieben (Vincken *et al.*, 1997). Neben der Rolle als strukturgebendes Polysaccharid fungieren unfucosylierte Xyloglucane in den Samen dikotyler Pflanzen auch als Reservespeicher (Fry, 1989).

Xylane sind mit 20 bis 30 % die dominierenden Nicht-Cellulose-Polysaccharide in der sekundären Zellwand dikotyler Pflanzen (Scheller & Ulvskov, 2010). Sie bestehen aus einem β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Xylopyranoserückgrat und sind teilweise in O2-Position mit (4-O-Methyl-) α -D-Gluco-pyranuronsäure zu den sogenannten Glucuronoxylanen verknüpft. Der Acetylierungsgrad (engl. *Degree of Acetylation*, DAc) der (Glucurono-)Xylane kann variieren, ist jedoch häufig hoch. Die Acetylgruppen befinden sich bevorzugt in O3-Position, wenngleich sich auch Acetylgruppen in O2- oder O2- und O3-Position befinden können. Das reduzierende Ende der (Glucurono-)Xylane wird durch das konservierte Pentasaccharid β -D-Xylopyranose-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylopyranose-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhamnopyranose-(1 \rightarrow 2)- α -D-Galactopyranuronsäure-(1 \rightarrow 4)-Xylopyranose gebildet (Scheller & Ulvskov, 2010; Zhang *et al.*, 2021). Die hydrophoben (Acetylgruppen) und hydrophilen Modifikationen (Glucuronsäuren) der Xylane geben ihnen die Fähigkeit, *cross-links* zwischen den Cellulosemikrofibrillen und anderen Zellwandkomponenten auszubilden. Xylane sind somit maßgeblich an der Architektur der Zellwand beteiligt (Simmons *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). In der primären Zellwand der dikotylen Pflanzen können Arabinoxylane, bestehend aus einem teilweise in O2-Position mit Arabinose substituierten Xylosen Rückgrat, als Minorkomponenten

vorhanden sein (Caffall & Mohnen, 2009). In der Erbse wird beispielsweise neben hoch acetylierten (Glucurono-)Xylanen das Vorkommen von Arabinoglucuronoxylanen beschrieben (Ralet *et al.*, 1993). In der Zusammensetzung der primären und sekundären Zellwand von monokotylen Pflanzen hingegen dominieren die (Glucurono-)Arabinoxylane, deren Arabinoseeinheiten partiell mit Hydroxyzimtsäurederivaten wie Ferulasäure verestert vorliegen (Scheller & Ulvskov, 2010).

Mannane sind nicht nur ein strukturgebender Bestandteil der pflanzlichen Zellwand, sondern können auch als Speicherpolysaccharide fungieren (Caffall & Mohnen, 2009; Scheller & Ulvskov, 2010). Aufgebaut sind Mannane aus einem β -(1→4)-verknüpften Rückgrat aus D-Mannopyranosen bzw. im Falle von Glucomannanen aus D-Manno- und D-Glucopyranoseeinheiten. Häufig sind an diesem Rückgrat Acetylgruppen vorzufinden. Weiter können die (Gluco-)Mannane α -(1→6)-verknüpft mit D-Galactopyranose als sogenannte Galacto- bzw. Galactoglucomannane vorliegen. In Gymnospermen sind Galactoglucomannane ein Hauptpolysaccharid der sekundären Zellwand, wohingegen in Spermatophyten (Gluco-)Mannane eine Minorkomponente darstellen (Scheller & Ulvskov, 2010; Zhang *et al.*, 2021).

1.3.2.3 PEKTINE

Pektine sind als Hauptpolysaccharide der Zellwand dikotyler Pflanzen vor allem in der Mittellamelle und der primären aber auch in der sekundären Zellwand präsent. Sie sind insbesondere an den ersten Phasen von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt und tragen damit maßgeblich zur Integrität und Festigkeit, aber auch zur Formbarkeit der Zelle bzw. der pflanzlichen Gewebe bei. So stehen strukturelle Veränderungen der Pektine in direkter Verbindung zu Qualitätsveränderungen von frischem Gemüse beim Lagern oder Prozessieren. Weiter sind die Pektine essenziell für den kontrollierten Transport von Stoffen durch die Zellwand. Zum einen können sie bedingt durch ihren anionischen Charakter den Transport von Ionen und zum anderen durch Steuerung der Porosität der Zellwand die Durchlässigkeit dieser für Enzyme regulieren. Zudem sind Pektine entscheidend für das Wasserhaltevermögen der Zelle. Außerdem sind Pektine sowie aus Pektinen gebildete Oligosaccharide wichtig für Mechanismen zur Abwehr von Pathogenen und zur Heilung von Verletzungen (Voragen *et al.*, 2009).

Auf struktureller Ebene stellen die Pektine eine heterogene Gruppe eng miteinander assoziierter Polysaccharide dar, deren Zusammensetzung und Feinstruktur je nach Pflanzenart und Wachstumsstadium variiert. Die Hauptstrukturelemente sind Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I mit den neutralen Seitenketten der Arabinane und (Arabino-)Galactane Typ I und II. Zu geringeren Anteilen können zudem in den Pektinen Xylogalacturonane und Rhamnogalacturonan Typ II vorliegen. Die Strukturen der einzelnen Polysaccharide der Pektine sind schematisch in Abbildung 3C dargestellt. Auf makromolekularer Ebene werden Pektine üblicherweise mit dem *smooth and hairy regions*-Modell beschrieben. Hierbei bilden Homogalacturonane die *smooth* und Rhamnogalacturonane Typ I die *hairy regions* (De Vries *et al.*, 1982).

Homogalacturonane bestehen aus linear α -(1→4)-verknüpften D-Galactopyranuronsäuren, die an der Carboxygruppe am C6 methylverestert und an O2 und/oder O3 acetyliert vorliegen können

(Voragen *et al.*, 2009). Das Vorkommen von acetylierten Homogalacturonanen in Karotten wurde zuerst von Broxterman und Mitarbeitenden (2017) beschrieben. Die mittlere Kettenlänge von Homogalacturonanen aus Apfel, Citrus bzw. Zuckerrübe umfasst 72 bis 100 Galacturonsäureeinheiten. Sowohl der Methylierungsgrad (engl. *Degree of Methylation*, DM) und DAc als auch die Verteilung der Methyl- und Acetylgruppen über das Molekül variieren unter anderem zwischen den Pflanzenarten und bestimmen grundlegend die physikalischen Eigenschaften der Pektine. Abschnitte der Homogalacturonane, die mehr als zehn aufeinanderfolgende nicht-methylierte Carboxygruppen aufweisen, können über Calciumionen *cross-links* zu anderen Pektinmolekülen ausbilden. Die dadurch entstehende dichte Packung der Pektine wird durch das sogenannte *egg-box* Modell beschrieben und ist verantwortlich für die Bildung stabiler Gele (Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009).

Xylogalacturonane sind mit mono- oder dimeren β -D-Xylopyranoseeinheiten in O3-Position substituierte Homogalacturonane (Caffall & Mohnen, 2009). Der Substitutionsgrad variiert unter anderem abhängig von der Pflanzenart zwischen 25 % (Apfelpektin) und 75 % (Wassermelonenpektin). Die Galacturonsäureeinheiten der Xylogalacturonane können, wie bei den Homogalacturonanen, Methylester ausbilden und/oder acetyliert vorliegen. Xylogalacturonane sind insbesondere in Geweben der Fortpflanzung wie Samen und Früchte anzutreffen (Vincken *et al.*, 2003; Voragen *et al.*, 2009). Untersuchungen von Renard und Mitarbeitenden (1997) deuten auf ein Vorkommen von Xylogalacturonanen in Erbsen hin.

Rhamnogalacturonane Typ I sind aus einem Rückgrat alternierender Einheiten α -(1→2)-verknüpfter L-Rhamopyranosen und α -(1→4)-verknüpfter D-Galactopyranuronsäuren aufgebaut. Die Rhamnoseeinheiten liegen zu 20 bis 80 % in der O4-Position mit neutralen Seitenketten substituiert vor. Diese umfassen sowohl monomere Arabinose und Galactose als auch entsprechende Oligo- bzw. Polymere, die Arabinane bzw. (Arabino-)Galactane Typ I (Voragen *et al.*, 2009). Die Art und Länge der neutralen Seitenketten sowie die Länge des Rückgrats ist von dem Ursprung des Pektins abhängig (Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009). Die Galacturonsäureeinheiten des Rückgrats weisen häufig Acetylgruppen in O2- und/oder O3-Position auf, wohingegen Methylester, mit Ausnahme der Rhamnogalacturonane Typ I aus Flachs, nicht vorzufinden sind (Voragen *et al.*, 2009).

Das Rhamnogalacturonan Typ II ist strukturell hoch konserviert und besteht aus einem Galacturonrückgrat. Dieses ist sieben bis neun Galacturonsäureeinheiten lang und besteht aus vier verschiedenen, komplexen, gut beschriebenen Seitenketten. Diese enthalten zwölf teilweise selten vorkommende Monosaccharide wie D-Apiose und 2-Keto-3-desoxy-D-mannoctulosäure (Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009).

Arabinane bestehen aus einem Rückgrat aus α -(1→5)-verknüpften L-Arabinofuranosen. Diese können am O2 und/oder O3 mit einzelnen α -L-Arabinofuranosen oder dimeren α -(1→3)- bzw. β -(1→3)-verknüpften L-Arabinofuranosen substituiert sein (Voragen *et al.*, 2009; Wefers *et al.*, 2014). Zudem wird für Arabinane eine Veresterung des Rückgrats am O2 oder O5 mit Ferulasäure

beschrieben (Ralet *et al.*, 2005; Wefers *et al.*, 2014). Ein hoher Anteil an Arabinanen ist zum Beispiel in den Pektinstrukturen der Erbse zu finden (Ralet *et al.*, 1993). Karotten hingegen weisen ein ausgeglichenes Verhältnis von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen auf (Houben *et al.*, 2011).

(Arabino-)Galactane Typ I sind wie die Arabinane neutrale Seitenketten der Rhamnogalacturonane Typ I. Sie besitzen ein Rückgrat aus β -(1→4)-verknüpften D-Galactopyranosen, welches (1→4)-verknüpfte α -L-Arabinopyranosen beinhalten oder als terminale Einheit tragen kann (Voragen *et al.*, 2009; Wefers *et al.*, 2014). Weiter können die Galactoseeinheiten des Rückgrats am O3 mit monomerer α -L-Arabinofuranose oder kurzen Ketten aus α -(1→5)-L-Arabinofuranosen bzw. am O6 mit β -D-Galactopyranose verknüpft vorliegen (Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009). Wie die Arabinane können die (Arabino-)Galactane Typ I aus den Pflanzenzellwänden der Familie der Amaranthaceae am O2 der Arabinose- bzw. am O6 der Galactoseeinheiten des Rückgrats mit Ferulasäure verestert sein (Bunzel *et al.*, 2005).

(Arabino-)Galactane Typ II sind aus einem Rückgrat bestehend aus β -(1→3)-verknüpften D-Galactopyranosen aufgebaut und mit (verzweigten) Seitenketten aus ein bis drei β -(1→6)-verknüpften Galactopyranosen mit terminaler α -(1→6)-verknüpfter L-Arabinofuranoseeinheit substituiert. Zusätzlich kann an die Galactoseeinheiten in O3- oder O6-Position α -L-Arabinofuranose gebunden sein (Carpita & Gibeaut, 1993; Voragen *et al.*, 2009). Weiter sind (Arabino-)Galactane Typ II häufig mit Proteinen (Arabinogalactanproteinen) assoziiert. Bisher nicht aufgeklärt ist, inwiefern eine (kovalente) Bindung der (Arabino-)Galactane Typ II zu den eng assoziierten Pektinstrukturen besteht (Vincken *et al.*, 2003).

1.3.3 ZELLWANDNETZWERK

Hinsichtlich der Interaktion und Organisation der Zellwandkomponenten in der pflanzlichen Zellwand existieren verschiedene Modelle, die mit neuen Erkenntnissen auch durch neuere Analysemethoden im Laufe der Zeit angepasst wurden. Eines der ersten Modelle zum Zellwandnetzwerk stellten Keegstra und Mitarbeitende 1972 ausgehend von enzymatischen Abbauprodukten der Zellwandpolysaccharide und -proteine auf. Demnach sind an die Oberfläche der Cellulosemikrofibrillen Xyloglucane gebunden, welche über eine kovalente Bindung von deren reduzierendem Ende zu den Galactanen der Rhamnogalacturonane Typ I eine Verbindung zum Pektinnetzwerk herstellen. Die Pektine wiederum können über die Arabinogalactane der Rhamnogalacturonane Typ I kovalent an Strukturproteine (Extensine) gebunden vorliegen (Carpita & Gibeaut, 1993; Keegstra *et al.*, 1973). Das sogenannte *tethered network model* geht von drei unabhängig voneinander bestehenden Netzwerken aus Cellulose und Xyloglucanen, Pektinen bzw. Strukturproteinen aus. Diese Netzwerke interagieren, anders als von Keengestra und Mitarbeitenden (1972) postuliert wurde, über nicht genauer beschriebene nicht-kovalente Bindungen. Die Xyloglucane sind dabei ein wichtiger Bestandteil des Cellulose-Xyloglucan-Netzwerks. Sie sind zum einen auf die Cellulosemikrofibrillen aufgelagert und zum anderen in den Zwischenräumen der Cellulosemikrofibrillen eingelagert und fungieren so als „Abstandshalter“ (Carpita & Gibeaut, 1993;

Cosgrove & Jarvis, 2012; Hayashi, 1989). In neueren Modellen wird das starre Cellulose-Xyloglucan-Netzwerk als zentrales Element des Zellwandnetzwerks von einer locker verknüpften Polysaccharidmatrix mit eingebetteten Cellulosemikrofibrillen abgelöst. Talbott und Ray (1992) stellten ein „Schichtmodell“ vor, bei dem die Xyloglucane am nächsten an den Cellulosemikrofibrillen liegen. Daran angelagert befindet sich eine Schicht aus Pektinen und schließlich an Arabino-galactane gebundene Proteine. Auch Ha und Mitarbeitende (1997) beschreiben eine klare Abgrenzung der Cellulosemikrofibrillen und Xyloglucane von den Pektinen. Die Interaktion der einzelnen Zellwandkomponenten erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindungen, ionische und/oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen (Caffall & Mohnen, 2009; McDougall *et al.*, 1996). Ein aktuelles Modell, basierend auf Ergebnissen der Festkörper-Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), geht von einer Interaktion aller Strukturelemente in einem einzigen Netzwerk aus. Dabei stehen die Pektine als zentrale Polysaccharide sowohl mit den Cellulosemikrofibrillen als auch den Xyloglucanen in Wechselwirkung (Pérez García *et al.*, 2011). *In vitro* Untersuchungen legten nahe, dass die Pektine über Arabinane und/oder Galactane der neutralen Seitenketten der Rhamnogalacturonane Typ I an die Cellulosemikrofibrillen gebunden sind (Zykwinska *et al.*, 2005). Ähnliche Interaktionen beschrieben Broxterman und Schols (2018) unter anderem in der Zellwand von Karotten. Weiter vermuten sie, dass Pektine die Funktion des Zusammenhalts der Cellulosemikrofibrillen von den Xyloglucanen (teilweise) übernehmen. Pérez Gracia und Mitarbeitende (2011) konnten anhand einer wachstumsfähigen dreifachen Knockout-Mutante mit beeinträchtigter Xyloglucansynthese von *Arabidopsis thaliana* bestätigen, dass Xyloglucane zwar kein essenzieller Bestandteil der Zellwand sind, aber zu deren Festigkeit beitragen.

1.3.4 ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON ZELLWANDPOLYSACCHARIDEN

Für Zellwandpolysaccharide werden viele verschiedene positive ernährungsphysiologische Eigenschaften postuliert. Bei deren Bewertung sollte beachtet werden, dass die menschliche Verdauung sehr komplex ist und von verschiedenen Faktoren abhängt. Die Zellwandpolysaccharide verhalten sich abhängig von ihrer Struktur unterschiedlich im Magen-Darm-Trakt und führen zu verschiedenen metabolischen Effekten (Schweizer & Würsch, 1991).

Insbesondere lösliche Zellwandpolysaccharide wie Pektine binden im Magen-Darm-Trakt Wasser und steigern dadurch die Viskosität des Nahrungsbreis. Dies wird mit einem erhöhten Sättigungsgefühl in Verbindung gebracht. Weiter soll die Aufnahme von Ballaststoffen das Hungergefühl unter anderem über Rückkopplungsmechanismen steigern und somit die Kalorienaufnahme in nachfolgenden Mahlzeiten senken. Folglich wird angenommen, dass sich eine ballaststoffreiche Ernährung, welche häufig auch fett- und proteinärmer ist, bei Übergewicht und Fettleibigkeit günstig auswirkt (McDougall *et al.*, 1996). Zudem tragen Zellwandpolysaccharide durch die erhöhte Viskosität des Nahrungsbreis zu einer verlangsamten Aufnahme von Nährstoffen wie Glucose und Fetten ins Blut bei. Dies spiegelt sich zum Beispiel in einem reduzierten Blutglucosespiegel wider. Daher wird Menschen mit nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus Typ II eine ballaststoffreiche Ernährung empfohlen. Daneben kann eine erhöhte Ballaststoffaufnahme den Cholesterinspiegel

im Blut reduzieren. Hierfür werden je nach Struktur der Zellwandpolysaccharide unterschiedliche Mechanismen wie eine Hinderung bei der Cholesterinaufnahme oder verschiedene Einflüssen auf den Cholesterinstoffwechsel diskutiert (McDougall *et al.*, 1996).

Den Zellwandpolysacchariden wird ein präbiotisches Potenzial zugeschrieben. Sie gelangen weitgehend unverdaut ins Colon. Dort werden sie abhängig von Struktur, Löslichkeit und Assoziation mit anderen Zellwandbestandteilen (z. B. Ligninen) zunächst durch Enzyme saccharolytischer Darmbakterien zu Oligosacchariden abgebaut und anschließend durch verschiedene Darmbakterien weiter zu kurzkettigen Fettsäuren (engl. *Short Chain Fatty Acids*, SCFA), überwiegend Acetat, Propionat und Butyrat, fermentiert. Daneben entstehen Lactat als Intermediat und die Gase Wasserstoff, Methan und Kohlenstoffdioxid. Lösliche Polysaccharide wie Pektine werden vor allem im Ileum und aufsteigenden (ascenderenden) Colon bevorzugt durch die Darmbakterien fermentiert. Die Fermentation unlöslicher Polysaccharide wie Cellulose hingegen läuft im absteigenden (deszenderenden) Colon nur zu einem sehr geringen Umfang ab. Von den wasserlöslichen SCFA werden 90 bis 99 % entweder im Darm absorbiert, über das Blut ins Gehirn, die Muskeln (beide Acetat) oder die Leber (Propionat) transportiert und dort metabolisiert oder von Mikroorganismen verstoffwechselt. Auch sind die SCFA Substrat für andere Darmbakterien und fördern dadurch deren Wachstum über das sogenannte *cross-feeding*. Dies wirkt sich wiederum positiv auf die Darmgesundheit aus. Außerdem führt die Bildung der SCFA zu einer Absenkung des pH-Werts in Darmlumen und Faeces, wodurch unter anderem das Wachstum pathogener Organismen inhibiert und die Aktivität unerwünschter bakterieller Enzyme reduziert wird. Daneben sollen sich die SFCA positiv auf die Integrität und Proliferation der Darmschleimhaut (Mucosa) auswirken. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Darmbakterien ist individuell verschieden. Dabei sind die dominierenden Bakterien Vertreter der Gattungen *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* und *Lactobacillus* (Holscher, 2017; McDougall *et al.*, 1996; Schweizer & Würsch, 1991; Slavin, 2013).

Neben den bereits genannten positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften werden viele weitere, wie eine Risikominimierung für Darmkrebs und kardiovaskuläre Erkrankungen, in Zusammenhang mit einer ballaststoffreichen Ernährung diskutiert (McDougall *et al.*, 1996; Slavin, 2013). Allerdings kann ein hoher Verzehr von Ballaststoffen auch zu Verdauungsproblemen sowie zu einer verminderten Absorption essenzieller Nährstoffe führen (Schweizer & Würsch, 1991).

Neben den Zellwandpolysacchariden werden auch für entsprechende Oligosaccharide ähnliche positive ernährungsphysiologische Eigenschaften postuliert. Allerdings ist eine Aussage über das ernährungsphysiologische Potential von Arabino-, Galacto- und Galacturonsäureoligosacchariden (GalA-OS) bisher nur begrenzt möglich, da die meisten Studien mit Pektinhydrolysaten aus unterschiedlich zusammengesetzten Mischungen dieser Oligosaccharidgruppen durchgeführt wurden. Im Fokus der Studien steht häufig das präbiotische Potential, welches für Oligosaccharide höher eingestuft wird als für die entsprechenden Zellwandpolysaccharide. Dies konnte unter anderem für Pektine und deren Oligosaccharide gezeigt werden (Olano-Martin *et al.*, 2002). Prandi und Mitarbeitende (2018) stellten auf Grundlage der Ergebnissen ihrer *in-vitro* Untersuchungen mit oligosaccharidhaltigen Fraktionen, gebildet aus Zuckerrübenpektin, die Vermutung auf, dass sich

kürzerkettige Pektinoligosaccharide insbesondere Arabinoxylansaccharide (DP = 2 - 3) günstiger auf das Wachstum von Darmbakterien auswirken als längerkettige Arabinoxylansaccharide (DP = 10). Weiter wird von den Autoren vermutet, dass freie Galacturonsäure das Bakterienwachstum hemmt (Prandi *et al.*, 2018). In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass sich ein hoher DM der GalA-OS günstig auswirkt (Olano-Martin *et al.*, 2002). Während der präbiotische Einfluss einer Δ-4,5-ungesättigten Galacturonsäureeinheit, welche auch als Intermediat beim bakteriellen Metabolismus von GalA-OS gebildet wird, noch aufgeklärt werden muss (Holck *et al.*, 2011), sollen GalA-OS (DP = 2 - 7) inhibierend auf die Adhärenz von Bakterien an die Epithelzellen wirken und so das Risiko für Infektionen minimieren (Babbar *et al.*, 2016). Für aus Citruspektin gewonnene Oligosaccharide (galactosereich) wird nach oraler Aufnahme ein hemmender Effekt auf Wachstum und Metastasenbildung von Brust- und Dickdarmkrebszellen in Mäusen beschrieben (Nangia-Makker *et al.*, 2002). Neben den Pektinoligosacchariden werden für Xylooligosaccharide (DP = 2 - 6), Cellooligosaccharide (DP = 2 - 6, vor allem DP = 2 und 3) und RFO präbiotische Effekte postuliert (Elango *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2024; Nieto-Dominguez *et al.*, 2017).

Einige der aufgeführten ernährungsphysiologischen Eigenschaften sind von der *Cereals & Grains Association* bereits in die Ausführungen ihrer Ballaststoffdefinition integriert (DeVries, 2001). In der europäischen Union sind für bestimmte ballaststoffhaltige Lebensmittel gemäß Artikel 13 Absatz 3 der VO (EG) Nr. 1924/2006 in Verbindung mit Artikel 1 Absatz 1 und in Verbindung mit dem Anhang der VO (EU) Nr. 432/2012 aufgelistete gesundheitsbezogene Aussagen zugelassen, sofern eine entsprechend festgeschriebene Mindestmenge der ausgelobten Substanz enthalten ist. So ist etwa die Angabe erlaubt, dass die Aufnahme von Pektinen dazu beiträgt, dass der Blutzuckerspiegel nach der Mahlzeit weniger stark ansteigt, sofern das Lebensmittel 10 g Pektin pro Portion enthält.

1.4 MECHANISCHE UND ENZYMATISCHE BEHANDLUNG

Eine Anreicherung von Lebensmitteln mit Ballaststoffen ist aufgrund derer ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, erstrebenswert. Allerdings ist der Zusatz von Ballaststoffen zu Lebensmitteln unter anderem aufgrund von Gelbildung und Viskositätserhöhung limitiert. Nach Larrauri (1999) sollte das „ideale Ballaststoffpräparat“ konzentriert, neutral in Geruch, Geschmack, Farbe und Textur, lange haltbar sowie preiswert sein. Zudem sollte die Prozessierung entsprechend angereicherter Lebensmittel nicht beeinträchtigt sein und nach deren Verzehr physiologische Effekte erzielt werden (Larrauri, 1999). Zur Herstellung solcher Ballaststoffpräparate aus Lebensmittelnebenströmen stellt eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung einen möglichen Ansatz dar. Die in dieser Arbeit angewandten Verfahren werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

1.4.1 MIKROFLUIDISIERUNG

Die Mikrofluidisierung stellt ein modernes Verfahren der Hochdruckhomogenisierung dar, welches sich durch einen geringen Nährstoffverlust, niedrige Temperaturen, einen kontinuierlichen Betrieb und eine kurze Prozesszeit auszeichnet. Anwendung findet die Mikrofluidisierung bereits in der Milch- und Getränkeindustrie zur Stabilisierung von Emulsionen. Neuer ist der Einsatz zur Modifizierung von Makromolekülen wie Proteinen und Polysacchariden (Ozturk & Turasan, 2022). Der schematische Aufbau eines Mikrofluidizers ist in Abbildung 4 dargestellt.

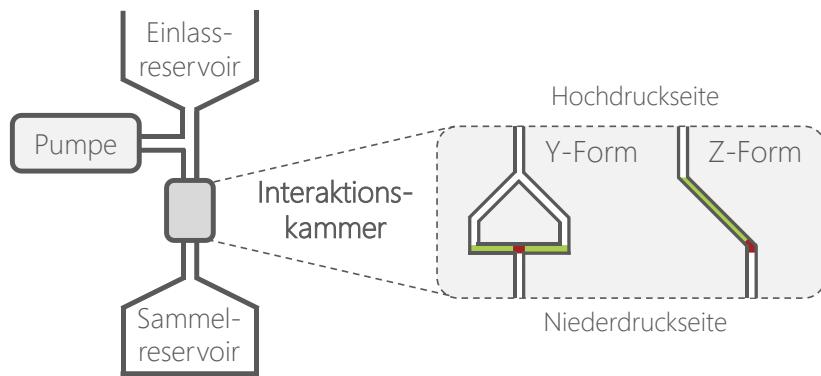


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Mikrofluidizers mit Y- und Z-förmiger Interaktionskammer mit hervorgehobenen Bereichen starker Scherung (grün) und Kollision (rot) (modifiziert nach Guo et al., 2020)

Die sich abwechselnden Druck- und Sogphasen der Pumpe führen zu einem stetigen Wechsel von hohem konstanten und keinem Druck. Während in der Druckphase das Produkt kontinuierlich vom Einlassreservoir durch die Interaktionskammer befördert wird, findet in der Sogphase keine Beförderung statt. Die Höhe des ausgeübten Drucks hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Beförderungsgeschwindigkeit und damit auf die Höhe der im Zuge der Mikrofluidisierung auf das Produkt ausgeübten Kräfte. Das Herzstück des Mikrofluidizers ist die Interaktionskammer, welche je nach Bauart bzw. Geometrie in zwei Typen unterschieden wird. Die Y-Form ist dabei geeigneter zur Mikrofluidisierung von Emulsionen (flüssig-flüssig) und die Z-Form zur Mikrofluidisierung von Suspensionen (fest-flüssig). Bei der Y-förmigen Interaktionskammer wird der Fluss zunächst geteilt, um anschließend die beiden Flüssigkeitsströme kollidieren zu lassen. Die Z-Form besteht aus einem ein- oder mehrfach „zick-zack“-förmig verlaufenden Mikrokanal. Dabei kommt es zu keiner Teilung des Flüssigkeitsstroms und damit im Gegensatz zum Y-förmigen Mikrokanal lediglich zu Kollisionen mit der inneren Oberfläche des Mikrokanals. Je kleiner der Durchmesser der Mikrokanäle ist, desto höher sind die Scherkräfte, der Druck und die Fließgeschwindigkeit. Neben Druck und Scherung sind die Produkte Hochgeschwindigkeitsstöße, Turbulenzen, hochfrequenten Vibrationen, Oszillation, sofortigem Druckverlust und hydrodynamischer Kavitation ausgesetzt. Dadurch werden Partikel zerstört und es entstehen stabile homogene Emulsionen oder Suspensionen mit kleinsten Partikeln geringer Größenverteilung. Gleichzeitig kommt es zu einer Erwärmung des Produkts, weshalb eine anschließende Kühlung erforderlich sein kann. Dennoch zählt die Mikrofluidisierung zu den nicht-thermischen Verfahren. Ein *scale-up* der Mikrofluidisierung für eine breite industrielle Anwendung mit großem Durchsatz wird momentan

insbesondere durch den erforderlichen geringen Durchmesser der Mikrokanäle in der Interaktionskammer limitiert (Guo *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Ozturk & Turasan, 2022).

Die Reduzierung der Partikelgröße geht einher mit einer Vergrößerung und Veränderung der Oberfläche zu einer poröseren, lockereren und/oder fluffigeren Struktur. Gleichzeitig nehmen, wie in der Literatur für Apfelpektin, Erbsenschalen sowie UBS von Pfirsich und Hafer beschrieben, insbesondere die Wasser- und Ölhaltekapazität sowie das Quellvermögen zu (Chen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; He *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2023; Morales-Medina *et al.*, 2020). Die Autoren führen als Erklärung eine durch die Mikrofluidisierung begünstigte Zugänglichkeit von wasser-, öl- oder ionenbindenden Strukturelementen an. Weiter wird der Einschluss von Wasser bzw. Öl in Zwischenräume und/oder Kapillaren des mikrofluidisierten Fasermaterials durch eine porösere Oberflächenstruktur und ausgeprägtere kapillare Anziehungskräfte begünstigt (Chen *et al.*, 2013; Morales-Medina *et al.*, 2020). Für cellulosereiche Fasermaterialien, wie die Erbsenschale, wird insbesondere eine Lockerung der kristallinen Struktur als Ursache für eine bessere Wasserbindung diskutiert. Durch die Mikrofluidisierung kann es abhängig von der Druckintensität zur Auflösung der Aggregation der Cellulosemakrofibrillen und ggf. der fibrillären Struktur der Cellulosemikrofibrillen durch den Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen kommen. In den aufgelockerten (amorphen) Bereichen ist im Gegensatz zu den kristallinen Bereichen der Cellulose eine Einlagerung von Wasser möglich (He *et al.*, 2022; Ji *et al.*, 2023; Morales-Medina *et al.*, 2020). Des Weiteren wird in Zusammenhang mit der Mikrofluidisierung von einem partiellen Übergang von UBS zu LBS und einer damit verbundenen verbesserten Löslichkeit behandelter Fasermaterialien berichtet (Chen *et al.*, 2013; Morales-Medina *et al.*, 2020). Als Ursache wird das Lösen von Interaktionen zwischen Cellulose, Hemicellulosen und Pektinen im zellulären Netzwerk (vgl. Kapitel 1.3.3) sowie ein mechanischer Bruch von glykosidischen Bindungen genannt (Morales-Medina *et al.*, 2020). Auch Chen und Mitarbeitende (2012) führten die von ihnen beobachtete Abnahme im Molekulargewicht bzw. Zunahme an reduzierenden Zuckern in mikrofluidisiertem Apfelpektin ($\text{pH} = 4$) auf einen mechanischen Bruch kovalenter Bindungen zurück. Weitauß naheliegender ist, dass es während der Mikrofluidisierung aufgrund eines geringen pH-Wertes der Polysaccharidsuspensionen, einer prozessbedingten erhöhten Temperatur und einer druckbedingten stärkeren Ionisation des Wassers zu Protonen und Hydroxidanionen (Marshall & Franck, 1981) zu einer chemischen Spaltung von glykosidischen Bindungen durch saure Hydrolyse und/oder β -Eliminierung kommt.

Die Viskosität von Dispersionen ist nach der Mikrofluidisierung zumeist reduziert. Somit beeinflusst die Mikrofluidisierung neben den bereits genannten funktionellen auch die rheologischen Eigenschaften ballaststoffhaltiger Suspensionen (z. B. Erbsenschalen) durch Veränderungen der Viskoelastizität (Morales-Medina *et al.*, 2020). Daneben ist ein Einfluss auf das ernährungsphysiologische Potential zum Beispiel durch erhöhte Bindungskapazitäten zu Glucose und Cholesterin in mikrofluidisierten Erbsenfasern möglich (Ji *et al.*, 2023).

Das Ausmaß der zuvor beschriebenen Veränderungen in den funktionellen und rheologischen Eigenschaften hängt neben dem Druck von der Anzahl der Durchläufe, der Konzentration der

Suspension und der initialen Partikelgröße ab. Während beispielsweise eine Druckerhöhung die Veränderungen begünstigt, werden diese durch eine hohe Konzentration möglicherweise vermindert (Chen *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2023; Morales-Medina *et al.*, 2020).

Für eine weitere Anpassung der funktionellen Eigenschaften von ballaststoffhaltigen Präparaten kann die Mikrofluidisierung mit einer vorherigen oder nachfolgenden enzymatischen Hydrolyse kombiniert werden. Dabei wird in der Literatur als erste durchgeführte Behandlung sowohl eine enzymatische als auch eine mechanische Behandlung (Mikrofluidisierung) zur Lockerung der Zellwandstrukturen von Karotten- bzw. Pfirsichtrester als vielversprechend angesehen (Sankaran *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Zur enzymatischen Hydrolyse eignen sich je nach Ballaststoffquelle verschiedene zellwandpolysaccharidabbauende Enzyme, welche im Folgenden vorgestellt werden.

1.4.2 ENZYME ZUR SPALTUNG VON ZELLWANDPOLYSACCHARIDEN

In der Lebensmittelindustrie sind polysaccharidspaltende Enzyme beispielsweise bei der Saft- oder Brotherstellung gefragt. Hierfür werden die Enzyme durch Mikroorganismen, meist Pilze, generiert, anschließend isoliert und aufgereinigt. Da die Mikroorganismen nicht nur die gewünschten Enzyme erzeugen, weisen diese industriellen Enzympräparate häufig verschiedene Enzymaktivitäten auf. Heutzutage werden daher zur Enzymproduktion vorrangig gentechnisch veränderte Mikroorganismen verwendet. Diese produzieren aufgrund ihres gezielt veränderten Erbguts nur das gewünschte Enzym oder eine Auswahl bestimmter Enzyme. Die resultierenden rekombinanten Enzymisolale weisen im Idealfall ausschließlich die Aktivität des gewünschten Enzyms auf (Dalbøge, 1997). Weiter kann durch die Wahl des Mikroorganismus Einfluss auf die Bedingungen am Aktivitäts optimum der Enzyme genommen werden. So sind Enzyme aus mesophilen Mikroorganismen bei moderaten Temperaturen (30 - 35 °C) am aktivsten, wohingegen die aus thermophilen bei hohen (50 - 90 °C) und die aus psychrophilen bei niedrigen Temperaturen (5 - 20 °C) aktiver sind (Singh *et al.*, 2019). Zur späteren Inaktivierung der Enzyme eignen sich thermische und/oder mechanische Verfahren, deren erforderlichen Bedingungen von den Eigenschaften der Enzyme abhängen.

Polysaccharidabbauende Enzyme führen durch die Spaltung von innenliegenden (*endo*-Aktivität) bzw. endständigen (*exo*-Aktivität) glykosidischen Bindungen, ausgehend vom reduzierenden und/oder nicht-reduzierenden Ende, zur Depolymerisierung der jeweiligen Polysaccharidstruktur. Je nach Spaltungsmechanismus wird unter anderem zwischen Hydrolyasen (hydrolytisch) und Lyasen (oxidativ) unterschieden. Erstere bilden die Mehrheit der polysaccharidabbauenden Enzyme. Ihre Klassifizierung erfolgt nach deren Eigenschaften in eine entsprechende Gruppe der Glykosid-Hydrolasen (GH). Nachfolgend werden die Aktivitäten ausgewählter relevanter Enzyme aus den Gruppen der Cellulasen (CEL), Hemicellulasen und Pektinasen vorgestellt.

1.4.2.1 CELLULASEN

CEL spalten die glykosidischen Bindungen zwischen den Glucoseeinheiten der Cellulose (vgl. Kapitel 1.3.2.1) und sind mit Ausnahme von wenigen oxidativen CEL hydrolytisch aktiv. Differenziert wird zwischen den synergistisch agierenden *endo*-CEL, *exo*-CEL (Cellobiohydrolasen) und β -Glucosidasen (Juturu & Wu, 2014). Die *endo*-CEL spalten mittig die Celluloseketten der amorphen Bereiche. Die resultierenden kürzeren Cellulosestränge liegen zunächst weiterhin an andere Cellulosestränge oder kristalline Cellulosebereiche assoziiert vor. Erst nach einer längeren Hydrolysezeit oder in Verbindung mit einer *exo*-CEL-Aktivität entstehen lösliche Cellooligosaccharide ($DP \leq 6$) (Teeri, 1997). *Exo*-CEL spalten Cellobiose ausgehend vom reduzierenden und/oder nicht-reduzierenden Ende von bereits gebildeten Cellooligosacchariden und/oder Celluloseketten der kristallinen Bereiche ab. Cellobiose kann anschließend von β -Glucosidasen weiter zu einzelnen Gucoseeinheiten hydrolysiert werden. Dies trägt zur Aufrechterhaltung der Aktivität der *exo*-CEL bei, welche durch ihr Produkt (Cellobiose) gehemmt werden können (Gilbert & Hazlewood, 1993; Payne *et al.*, 2015). In den Mikroorganismen liegen die CEL entweder frei (Pilze) oder aggregiert und an die Zelloberfläche assoziiert (Bakterien) vor. Für die industrielle Produktion von CEL eignen sich daher Pilze, insbesondere der Gattungen *Aspergillus* und *Trichoderma* (Juturu & Wu, 2014; Singh *et al.*, 2019). Die gewonnenen CEL-Isolate enthalten zumeist mehrere CEL. Weiter kann eine einzelne CEL neben einer *endo*- auch eine *exo*-CEL-Aktivität sowie eine hydrolytische Aktivität gegenüber Hemicellulosen wie Xylanen aufweisen (Juturu & Wu, 2014; Teeri, 1997).

1.4.2.2 HEMICELLULASEN

Bei den Hemicellulinasen wird je nach Substrat unter anderem zwischen Xylanasen (XYL), Xyloglucanasen und Mannanasen unterschieden. Die XYL spalten die glykosidischen Bindungen im Rückgrat der (Arabinoglucurono-)Xylane (vgl. Kapitel 1.3.2.2). Sie wirken synergistisch mit Arabino-furanosidasen, α -Glucuronidasen und/oder Xylanesterasen, die Arabinose, Glucuronsäure und/oder Acetylgruppen durch Abspaltung der entsprechenden Substituenten der (Arabinoglucurono-)Xylane freisetzen (Gilbert & Hazlewood, 1993). Hinsichtlich der XYL besteht aufgrund der strukturellen Komplexität der (Arabinoglucurono-)Xylane eine große Vielfalt. Dabei wird zwischen verschiedenen *endo*-XYL, (Nicht-)Arabinose-freisetzenenden *endo*-XYL, *exo*-XYL und β -Xylosidasen unterschieden. Letztere setzen aus Xylobiose Xylose frei (Bastawde, 1992). Die *endo*-XYL gehören überwiegend einer der beiden GH-Familien 10 oder 11 an. Während GH10 XYL vor allem aktiv gegenüber kleineren Xylooligosacchariden sind, spalten GH11 XYL bevorzugt längerkettige Xylooligosaccharide ($DP > 8 - 19$). Zudem weisen einige GH11 XYL gegenüber substituierten Xylanen eine geminderte Aktivität auf (Collins *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2000). Die Spaltung von Xylanen mittels GH10 XYL erfolgt vom nicht-reduzierenden Ende aus mit einem Abstand von mindestens zwei glykosidischen Bindungen vom letzten Substituenten. Als Produkt entsteht vorrangig Xylobiose. Das Produktspektrum der GH11 XYL, welche zur Spaltung drei unsubstituierte Xyloseeinheiten im Xylanrückgrat benötigen, wird von Xylobiose und -triose dominiert (Biely *et al.*,

2016). Insgesamt variiert die Spezifität, die bevorzugten Bedingungen und das gebildete Produktspektrum der einzelnen XYL mit dem Ursprungsorganismus. Beispielsweise sind einige XYL robust gegenüber extremen Temperaturen (5 - 105 °C) und/oder pH-Werten (2 - 11). Weiter weisen XYL insbesondere der GH10 Familie häufig eine Aktivität gegenüber Cellulose auf (Collins *et al.*, 2005). Grundsätzlich ist die Zugänglichkeit der (Arabinoglucurono-)Xylanstrukturen besser als die der Cellulosestrukturen, weshalb die enzymatische Hydrolyse der (Arabinoglucurono-)Xylane schneller ablaufen kann (Gilbert & Hazlewood, 1993). Zur Gewinnung von XYL haben sich als Ursprungsorganismen Bakterien der Gattung *Bacillus* bewährt (Collins *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2019).

Xyloglucanases zum Abbau der strukturell variablen Xyloglucane (vgl. Kapitel 1.3.2.2) können in fünf Gruppen unterteilt werden. Die *endo*-Xyloglucanases, *exo*-Xyloglucanases und Xyloglucan-*endo*-Transglycosylasen spalten polymere Xyloglucane in Oligosaccharide mit einem Rückgrat bestehend aus mindestens vier Glucoseeinheiten, welche von β -Celllobiohydrolasen und/oder β -Glucosidasen weiter hydrolysiert werden können. Daneben besitzen Xyloglucanases eine hydrolytische Aktivität unter anderem gegenüber Cellulose und (Glucurono-)Xylanen. Die industrielle Isolierung von Xyloglucanases erfolgt hauptsächlich aus verschiedenen Pilzgattungen wie *Aspergillus*, *Penicillium* und *Paenibacillus* (Rashmi & Siddalingamurthy, 2018).

An der Spaltung von (Gluco-)Mannanen bzw. Galacto(gluco-)mannanen (vgl. Kapitel 1.3.2.2) sind je nach Komplexität verschiedene Mannanasen beteiligt. Das Rückgrat kann dabei von *endo*-Mannanasen, β -Mannosidasen und ggf. β -Glucosidasen gespalten und substituierte Galactose mittels α -Galactosidasen bzw. Acetylgruppen mittels Acetylmannanesterasen abgespalten werden (Puls, 1997).

1.4.2.3 PEKTINASEN

Ein Viertel der weltweit verkauften Lebensmittelenzyme sind Pektininasen, welche als heterogene Gruppe eine Vielzahl an Enzymen zur Spaltung der Pektinstrukturen (vgl. Kapitel 1.3.2.3) umfassen (Jayani *et al.*, 2005). Gewonnen werden diese kommerziellen Pektininasen überwiegend aus Pilzen der Spezies *Aspergillus niger* (Jayani *et al.*, 2005). In Abbildung 5 sind die relevantesten pektinolytischen Enzyme sowie deren Spaltungsstellen in den Pektinstrukturen schematisch dargestellt. Diese bewirken entweder eine Depolymerisierung (Hydrolasen und Lyasen) oder eine Ester-spaltung (Esterasen) entsprechender Pektinstrukturen. Zu den Esterasen gehören Pektinmethyl-esterasen (PME) und Pektinacetylesterasen, welche die Methyl- bzw. Acetylgruppen der veresterten Galacturonsäureeinheiten in Homogalacturonanen hydrolytisch abspalten. Je nach Ursprung sind PME als hoch spezifische Enzyme gegenüber jeder beliebigen methylveresterten Carboxygruppe (fungale PME) oder gegenüber methylveresterten Carboxygruppen ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende bzw. neben einer freien Carboxygruppe (pflanzliche PME) aktiv (Singh *et al.*, 2019; Jayani *et al.*, 2005).

Die Depolymerisierung von Homogalacturonanen kann entweder hydrolytisch katalysiert von Polygalacturonanasen (PG) bzw. Polymethylgalacturonanasen oder über eine β -Eliminierung

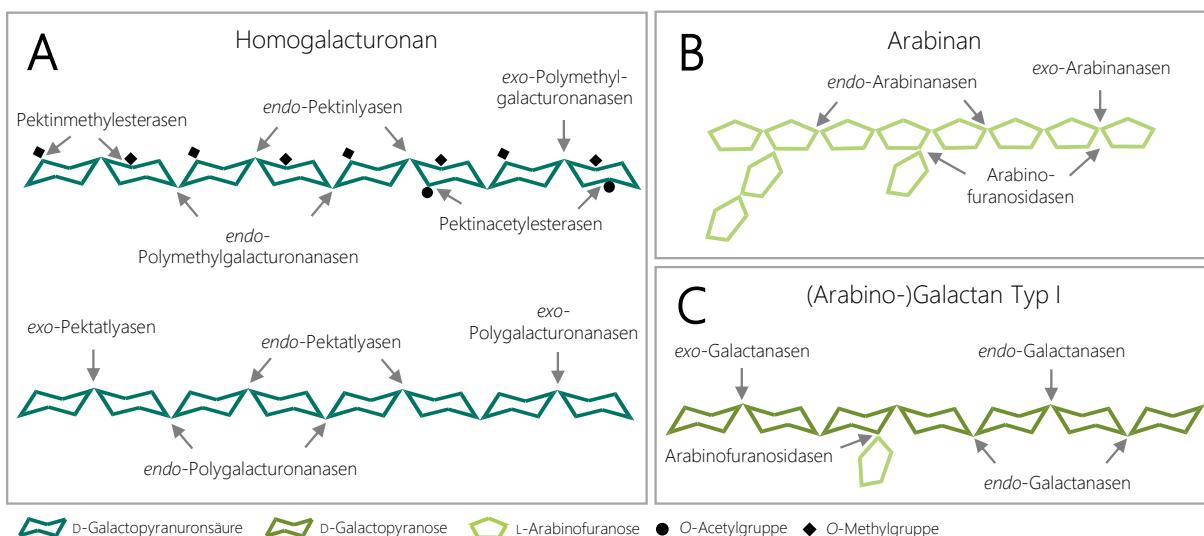


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Spaltungsstellen relevanter pektinolytischer Enzyme in den Pektinstrukturen Homogalacturonane (A), Arabinane (B) und (Arabino-)Galactane Typ I (C)

katalysiert von Pektinlyasen (PL) bzw. Pektatlyasen erfolgen (Jayani *et al.*, 2005). Die beiden Reaktionen zur Spaltung der glykosidischen Bindung sind in Abbildung 6 gezeigt. Die Hydrolyse der glykosidischen Bindung führt durch die Anlagerung eines Wassermoleküls zur Bildung eines neuen reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Endes. Bei der β -Eliminierung hingegen wird die glykosidische Bindung am C4 oxidativ gespalten und das Proton am C5 abstrahiert, sodass das neue nicht-reduzierende Ende von einer Δ -4,5 ungesättigten D-Galacturonsäureeinheit gebildet wird (Jayani *et al.*, 2005). Die Enzyme können exo- oder endo-aktiv sein, mit Ausnahme der PL, für welche bisher ausschließlich endo-Aktivitäten beschrieben sind (Singh *et al.*, 2019). Exo-PG bilden ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende je nach Ursprungsorganismus als kleinste Einheit Galacturonsäure (fungale PG) oder Digalacturonsäure (bakterielle PG). Zudem tolerieren exo-PG Substituenten an den Galacturonsäureeinheiten, sodass sie auch gegenüber Xylogalacturonanen aktiv sind (Jayani *et al.*, 2005; Voragen *et al.*, 2009).

Grundsätzlich nimmt die Aktivität von PG und Pektatlyasen mit steigendem DM der Homogalacturonane ab, während die von Polymethylgalacturonanasen und PL zunimmt (Jayani *et al.*, 2005). Neben dem DM nimmt die Verteilung der Methylester einen entscheidenden Einfluss auf die PL-Aktivität. So wird diese durch eine blockweise Verteilung der Methylester gefördert, während sich eine zufällige Verteilung hemmend auswirken kann. Van Alebeek und Mitarbeitende (2002) zeigten, dass die untersuchte PL aus *Aspergillus niger* acht Bindungsstellen (-5 bis +3) aufweist, wovon in einem aktiven Enzym-Substratkomplex mindestens drei (-1 bis +2) besetzt sein müssen und zwei (+1 und +3) nur mit einer methylveresterten Galacturonsäureeinheit interagieren können (vgl. Abbildung 7). Die übrigen Bindungsstellen der PL tolerieren Galacturonsäureeinheiten mit und ohne Methylester und unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität ($+3 > -2, -4 > -3, -5$). Aufgrund der geringeren Substratspezifität an den Bindungsstellen -5 bis -1 der PL können partiell und/oder unveresterte Abschnitte der Homogalacturonane zu einer Hemmung der PL durch Bildung eines nicht aktiven Enzym-Substratkomplexes führen (van Alebeek *et al.*, 2002). Weiter können sich

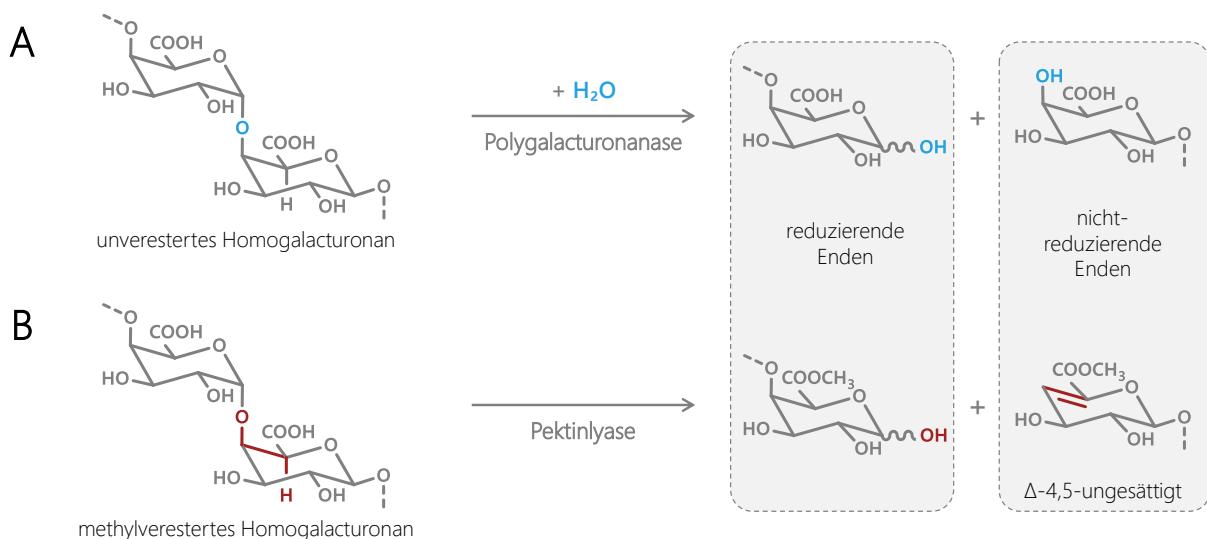


Abbildung 6: Spaltung der glykosidischen Bindungen von (un)veresterten Homogalacturonanen durch Hydrolyse (A) bzw. β -Eliminierung (B) katalysiert durch Polygalacturonanase bzw. Pektinlyase, rot bzw. blau hervorgehoben sind an der Reaktion beteiligte Atome und Bindungen.

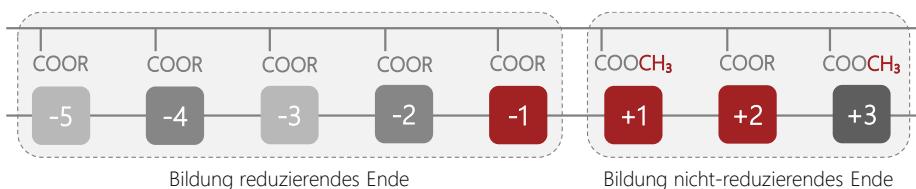


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Bindungsstellen einer Pektinlyase aus *Aspergillus niger* mit entsprechender Spezifität und Affinität gegenüber Homogalacturonanen, rot: essenzielle Bindungsstellen, grau: nicht essenzielle Bindungsstellen mit in Farbintensität abnehmender Affinität, R = Wasserstoffatom (H) oder Methylgruppe (CH_3) (nach van Alebeek *et al.*, 2002)

Calciumionen positiv auf die PL-Aktivität auswirken, sind jedoch nicht wie bei den Pektatlyasen essenziell (Jayani *et al.*, 2005). Die Hauptprodukte der PL sind neben den Tri- und Tetrameren, die Penta- bis Heptamere. Das Monomer wird nicht und die Dimere sowie Oktamere nur in geringem Umfang gebildet (Ralet *et al.*, 2012; van Alebeek *et al.*, 2002).

Zur vollständigen Spaltung insbesondere hochverzweigter Arabinanstrukturen (vgl. Kapitel 1.3.2.3) sind synergistisch agierende *endo*-Arabinanasen (ARA), *exo*-ARA und Arabinofuranosidasen erforderlich. Die ARA hydrolysieren entweder an zufälligen Stellen (*endo*-ARA) oder ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende (*exo*-ARA) die glykosidischen Bindungen im Arabinanrückgrat. Dabei entstehen Arabinojbose und -triose als Hauptprodukte der *exo*-ARA. Dagegen spalten Arabinofuranosidasen α -L-Arabinofuranose ab, die (1 \rightarrow 2)-, (1 \rightarrow 3)- oder (1 \rightarrow 5)-glykosidisch an Arabinose oder andere Zucker gebunden vorliegt. Dabei sind Arabinofuranosidasen je nach GH-Familie aktiv gegenüber Arabinanen, Arabinogalactanen und/oder Arabinoxylanen (Kontogiorgos, 2020).

Die glykosidischen Bindungen im Rückgrat der (Arabino-)Galactane können durch *endo*- und *exo*-Galactanasen (GAL) sowie ggf. β -Galactosidasen hydrolytisch gespalten werden. Für die Depoly-

merisierung von (Arabino-)Galactanen Typ I werden *endo*-(1→4)-GAL und für Typ II *endo*-(1→3)- und/oder *endo*-(1→6)-GAL benötigt. Dabei entstehen als Endprodukte der *endo*-(1→4)-GAL Galactose bzw. Galactobiose und als Endprodukt der *endo*-(1→3)-GAL Galactotriose. *Exo*-GAL und β -Galactosidasen unterscheiden sich dadurch, dass erstere eine höhere Aktivität gegenüber (Arabino-)Galactanen besitzen, während zweitere auch Galactoseeinheiten aus Xyloglucan- und/oder Galacto(gluco-)mannanstrukturen (vgl. Kapitel 1.4.2.2) abspalten können (Kontogiorgos, 2020).

Darüber hinaus existieren weitere pektinolytische Enzyme zur Spaltung des Rückgrats von Rhamnogalacturonanen Typ I und Xylogalacturonanen (Voragen *et al.*, 2009).

2 ZIELSETZUNG

Die Einbringung von ballaststoffreichen Nebenströmen der gemüseverarbeitenden Industrie in Lebensmittel ist einerseits im Sinne der Nachhaltigkeit und andererseits aus ernährungsphysiologischer Sicht erstrebenswert. Jedoch geht die Ballaststoffanreicherung von Lebensmitteln häufig mit sensorischen Beeinträchtigungen, wie einer Veränderung der Konsistenz aufgrund von gelbildenden Eigenschaften vieler Ballaststoffe, einher. Dem kann eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung der ballaststoffreichen Nebenströme entgegenwirken, wodurch deren funktionellen Eigenschaften, wie die Viskosität, gezielt verändert werden können. Je nach Reihenfolge der Behandlungen werden die Zellwandstrukturen zunächst entweder enzymatisch oder mechanisch gelockert, um eine verbesserte Zugänglichkeit dieser bei nachfolgender mechanischer bzw. enzymatischer Behandlung zu erreichen. Es wird postuliert, dass sich bei derartigen Behandlungen neben funktionellen auch strukturelle Eigenschaften der Ballaststoffe der Nebenströme verändern. Jedoch ist die Datenlage zu kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströmen begrenzt. In der Literatur liegt der Fokus zumeist auf den funktionellen Eigenschaften, während sich die chemische Analytik häufig auf die Bestimmung der Ballaststoffanteile und Molekulargewichte beschränkt. Eine detaillierte Struktcharakterisierung der Nebenströme vor und nach einer kombinierten mechanisch-enzymatischen Behandlung kann zur Aufklärung von Zusammenhängen zwischen funktionellen Eigenschaften und Strukturen der Zellwandpolysaccharide beitragen.

In dieser Arbeit sollten zunächst die chemische Beschaffenheit sowie die Strukturen der Zellwandpolysaccharide der Nebenströme Erbsenschale und Karottentrester charakterisiert werden. Davon ausgehend sollten basierend auf den im Nebenstrom dominierenden Zellwandpolysacchariden kommerzielle Enzympräparate für die enzymatische Behandlung ausgewählt werden. Das übergeordnete Ziel der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung war das Erreichen eines Übergangs von UBS in LBS und/oder NLBS, welche sich vermutlich beide günstiger auf die Sensorik und das ernährungsphysiologische Potential der Ballaststoffpräparate auswirken als UBS. Deshalb sollte von den hergestellten Ballaststoffpräparaten die Ballaststoffzusammensetzung analysiert werden. Bei der Behandlung der Nebenströme galt es, die Freisetzung von Mono- und Disacchariden möglichst gering zu halten. Zur Kontrolle sollten die Ballaststoffpräparate auf freie Mono- und Disaccharide hin analysiert werden, weshalb zur Bestimmung letzterer zuerst eine HPAEC-PAD-Methode etabliert werden sollte. Beim enzymatisch-mechanischen Ansatz lag zusätzlich der Fokus auf der Herstellung nicht-sedimentierender Ballaststoffpräparate mit geringer Viskosität, wohingegen beim mechanisch-enzymatischen Ansatz primär ernährungsphysiologisch positiv bewertete Oligosaccharide aus den Zellwandpolysacchariden freigesetzt werden sollten. Daher galt bei der Charakterisierung der Ballaststoffpräparate ein besonderes Interesse den NLBS und darin enthaltenen Oligosacchariden. Zur parallelen Analyse möglichst vieler für die Nebenströme relevanter Oligosaccharide sollten deren Extraktion und Bestimmung mittels HPAEC-PAD optimiert werden. Um die NLBS-Fraktionen umfassend zu charakterisieren, sollten auch Profilingmethoden zur Analyse (methylveresterter) uGalA-OS entwickelt, validiert und eingesetzt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PROBENMATERIAL UND PROBENBEZEICHNUNG

Die getrockneten und gemahlenen gelben Erbsenschalen (Empet E5 B10, Partikelgröße: $\leq 500 \mu\text{m}$) wurden von der Emsland-Stärke GmbH und der getrocknete Karottentrester von der Austria Juice GmbH zur Verfügung gestellt. Bei der Gewinnung des Karottensafts im industriellen Maßstab wurden die Karotten geschält und deren Blattansatz entfernt. Im Weiteren wurden die Karotten gekocht, gemaischt, gemahlen und der Saft dekantiert. Der verbleibende feuchte Karottentrester wurde in einem Stromtrocknungsverfahren getrocknet. Die Erbsenschalen und der Karottentrester wurden von Dr. Rocío Morales-Medina am Department für Lebensmitteltechnologie und -materialwissenschaften, Institut für Lebensmitteltechnologie und -chemie, Fakultät III: Prozesswissenschaften an der Technische Universität Berlin homogenisiert und gemahlen (Partikelgröße: $\leq 140 \mu\text{m}$). Weiter wurde die mechanische Behandlung mittels Microfluidizer® bzw. Hochdruckhomogenisator sowie die vorherige bzw. nachfolgende enzymatische Hydrolyse der Nebenströme von Dr. Rocío Morales-Medina mit entsprechenden 1%igen Suspensionen in Berlin durchgeführt. Die Proben der behandelten Nebenströme wurden gefriergetrocknet, versendet und vor deren Analyse nochmals gemahlen (Partikelgröße: $\leq 200 \mu\text{m}$). Hinsichtlich der Mikrofluidisierung kamen zwei hintereinander geschaltene Z-förmige Interaktionskammern (Innendurchmesser: 200 μm und 100 μm) zum Einsatz. Hierbei wurde die Erbsenschale im Gegensatz zum Karottentrester in einem ersten Durchlauf nur mit der größeren Interaktionskammer mikrofluidisiert. Um dies kenntlich zu machen, werden im weiteren Verlauf der Arbeit die Anzahl an Durchläufen bei der Mikrofluidisierung der Erbsenschale mit 1 + X Durchläufe angegeben.

In dieser Arbeit wird im Weiteren der Wortlaut „kombiniert mechanisch-enzymatisch“ verwendet, wenn die Reihenfolge von enzymatischer und mechanischer Behandlung des Nebenstroms unerheblich ist. Die Bezeichnung der Proben setzt sich wie folgt zusammen: Der erste Buchstabe steht für den Nebenstrom (E: Erbse, K: Karotte), darauf folgen die Art der Behandlung (u: unbehandelt, m: mechanisch behandelt, e: enzymatisch behandelt) und ggf. eine fortlaufende Nummer oder die Anzahl der Durchläufe (Erbsenschalen) bzw. die Höhe des Drucks (Karottentrester) bei der Mikrofluidisierung. Eine Übersicht über die Art der Behandlung der Nebenströme, die untersuchten Proben sowie die Probenbezeichnung können Abbildung 8 und im Anhang Tabelle A - 1 entnommen werden. In einem Teil der Versuchsansätze wurden die Nebenströme zunächst enzymatisch und anschließend mechanisch behandelt. Hierbei wurde die Zusammensetzung der zugesetzten Enzymmischung variiert. Pro Nebenstrom wurden vier niedrigviskose Ballaststoffpräparate (E-em-1/2/3/4 bzw. K-em-1/2/3/4) zur detaillierten Charakterisierung hergestellt. Im zweiten Teil der Versuchsansätze erfolgte zuerst eine mechanische und anschließend eine enzymatische Behandlung der Nebenströme. Dabei wurden von der Erbsenschale zwei Ballaststoffpräparate mit unterschiedlich intensiver mechanischer und gleicher enzymatischer Behandlung (E-me-3x/5x) zur Charakterisierung hergestellt. Aus dem Karottentrester wurde ein Ballaststoff-

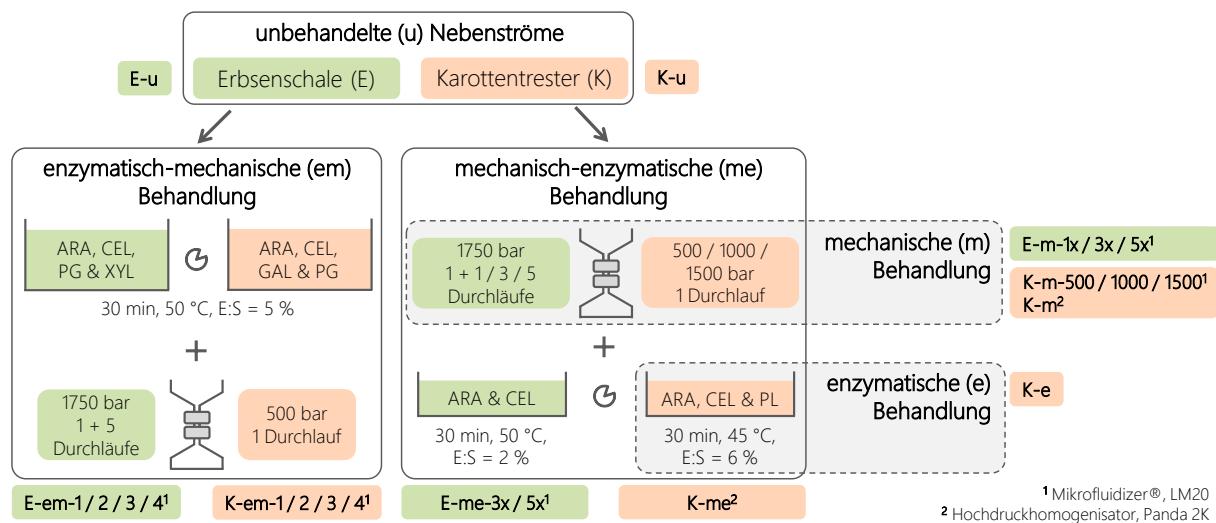


Abbildung 8: Probenübersicht und -bezeichnung der unbehandelten sowie mechanisch und/oder enzymatisch behandelten Nebenströme Erbsenschale (grün) und Karottentrester (orange), ARA = Arabinanase, CEL = Cellulase, GAL = Galactanase, PG = Polygalacturonanase, PL = Pektinlyase, XYL = Xylanase, E:S = Enzym:Substrat-Verhältnis, 1x, 3x, 5x = Anzahl der Durchläufe bzw. 500, 1000, 1500 = Höhe des Drucks in bar bei der Hochdruckbehandlung, 1, 2, ... = fortlaufende Probennummerierung

präparat durch eine mechanisch-enzymatische (K-me) und ein zweites durch eine rein enzymatische Behandlung (K-e) produziert und anschließend charakterisiert. Um Veränderungen in den Ballaststoffen durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung erkennen zu können, erfolgte ebenfalls die Analyse der unbehandelten (E-u bzw. K-u) und rein mechanisch behandelten Nebenströme (E-m-1x/3x/5x, K-m bzw. K-m-500/1000/1500).

Die Auswahl der Enzyme für die Behandlung der Nebenströme erfolgte jeweils auf Grundlage der entsprechend ermittelten dominierenden Zellwandpolysaccharide (vgl. Kapitel 4.4.1.1 bzw. 4.4.2.1). Die enzymatische Hydrolyse wurde mit kommerziellen Enzympräparaten durchgeführt. Zur Behandlung der Erbsenschalen kamen eine ARA, CEL, PG und/oder XYL und zu der des Karottentresters eine ARA, CEL, GAL, PG und/oder PL zum Einsatz (vgl. Abbildung 8). An die enzymatische Behandlung schloss sich eine Hitzeinaktivierung (80 bzw. 95 °C, 10 min) der Enzyme an. Bei der Festlegung der Parameter für die Hochdruckbehandlung (Druck und Durchlaufanzahl) war in erster Linie die Bildung stabiler, nicht-sedimentierender Suspensionen entscheidend. Die Bedingungen der einzelnen enzymatisch-mechanischen und mechanisch-enzymatischen Behandlungen können im Detail den Arbeitsvorschriften 8.2 und 8.3 entnommen werden. Im Folgenden wird die Optimierung der Prozessparameter getrennt nach Reihenfolge der mechanischen und enzymatischen Behandlung genauer beschrieben.

3.1.1 ENZYMATISCH-MECHANISCHE BEHANDLUNG

Der Fokus der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Nebenströme lag auf einer Reduktion der Viskosität sowie einer Erhöhung der Anteile an LBS. Eine parallele Bildung von Oligosacchariden aus den Zellwandpolysacchariden war erwünscht. Durch die enzymatische Hydrolyse sollten die dominierenden Zellwandpolysaccharide teilweise abgebaut und somit eine Lockerung

des Zellwandnetzwerks erreicht werden. Für die anschließende Hochdruckbehandlung in Form der Mikrofluidisierung sollte bestenfalls eine geringere Intensität (Druck, Durchlaufanzahl) zur Herstellung stabiler, nicht-sedimentierender Ballaststoffpräparate im Vergleich zu keiner Vorbehandlung ausreichend sein.

Auf Grundlage der Versuchsergebnisse von Dr. Rocío Morales-Medina wurden als optimale Bedingungen für die Mikrofluidisierung von Suspensionen der Erbsenschale 1750 bar für 1 + 5 Durchläufe bzw. für die des Karottentrester 500 bar und 1 Durchlauf festgelegt. In weiteren Versuchen wurden die Nebenströme vor der Mikrofluidisierung mit je sieben unterschiedlich zusammengesetzten Enzymmischungen (vgl. Tabelle A - 2 im Anhang) für je 30, 120 bzw. 240 min mit einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 5 % bei 50 °C von Dr. Rocío Morales-Medina behandelt. Die Enzymmischungen zur Behandlung der Erbsenschale setzten sich aus CEL (50 - 90 %), XYL (5 - 45 %), ARA und PG (je 2,5 - 22,5 %) und die des Karottentrester aus CEL, PG (je 5 - 90 %), ARA und GAL (je 2,5 - 45 %) zusammen. Basierend auf der von Dr. Rocío Morales-Medina bestimmten Sedimentation, Viskosität, unlöslichen und alkoholunlöslichen Masse der resultierenden Ballaststoffpräparate bzw. deren 1%igen Suspensionen wurden elf (Erbsenschale) bzw. dreizehn (Karottentrester) Proben für ein Screening zur Abschätzung der Anteile an freien Mono-, Di- und Oligosacchariden (vgl. Arbeitsvorschrift 8.1.1) ausgewählt. Es zeigte sich, dass es mit zunehmender Hydrolysezeit vermehrt zu einer unerwünschten Freisetzung von Mono- und Disacchariden kam. Folglich erwiesen sich 30 min als geeignete Hydrolysezeit. Pro Nebenstrom resultierten je vier nicht-sedimentierende oligosaccharidhaltige Ballaststoffpräparate mit einer niedrigen Viskosität der entsprechenden 1%igen Suspensionen (Erbsenschale: 13 - 16 mPa·s, Karottentrester: 7 bzw. 14 - 15 mPa·s) und einem geringen Anteil an freien Mono- und Disacchariden, die von Dr. Rocío Morales-Medina in größeren Mengen (15 - 20 g) hergestellt (vgl. Arbeitsvorschrift 8.2) und im Rahmen dieser Arbeit detailliert charakterisiert wurden (vgl. Abbildung 8 und Tabelle A - 1 im Anhang).

3.1.2 MECHANISCH-ENZYMATISCHE BEHANDLUNG

Das Ziel der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Nebenströme war der Erhalt möglichst oligosaccharidreicher Ballaststoffpräparate. Durch die Hochdruckbehandlung sollte zunächst das Zellwandnetzwerk mechanisch aufgelockert werden, um die Zugänglichkeit der Polysaccharidstrukturen für die Enzyme bei der nachfolgenden Hydrolyse zu verbessern. Weiter sollte die Auswahl entsprechender Enzyme das Oligosaccharidprofil gezielt beeinflussen. Daher lag der Fokus bei diesem Ansatz auf der Optimierung der enzymatischen Hydrolyse. Hierfür wurden je drei mit unterschiedlicher Intensität mikrofluidisierte 1%ige Suspensionen der Erbsenschale (je 1750 bar für 1 + 1, 1 + 3 bzw. 1 + 5 Durchläufe) bzw. des Karottentrester (500, 1000 bzw. 1500 bar für je 1 Durchlauf) direkt im Anschluss an die Mikrofluidisierung enzymatisch behandelt. Die Behandlung erfolgte sowohl mit den einzelnen Enzymen (Erbsenschale: ARA, CEL, PG und XYL, Karottentrester: ARA, CEL, GAL und PL) als auch mit Enzymmischungen in variierenden Enzym:Substrat-Verhältnissen bei 50 °C (Erbsenschale) bzw. 45 °C (Karottentrester) für 10, 30

und/oder 60 min (vgl. Tabelle A - 3 und Tabelle A - 4 im Anhang). Die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse der Erbsenschale wurde von Verena Haitz im Rahmen ihrer Masterarbeit übernommen. Von den hergestellten Ballaststoffpräparaten wurden ergebnisbasiert einzelne ausgewählt, um diese hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung der löslichen Kohlenhydrate (vgl. Kapitel 3.3.5.5) sowie ggf. der Anteile an Mono-, Di- und Oligosacchariden zu analysieren (vgl. Arbeitsvorschriften 8.1.1 und 8.1.2). Angestrebt wurde ein hoher Oligosaccharidanteil sowie ein hoher Anteil löslicher Zellwandbestandteile. Der Zusatz der CEL erwies sich sowohl für die Erbsenschale als auch für den Karottentrester als obligatorisch. Weiter wurden auf Grundlage der Ergebnisse als geeignete Bedingungen zur Behandlung der Erbsenschale eine Mikrofluidisierung mit 1750 bar für 1 + 3 bzw. 1 + 5 Durchläufe und eine nachfolgende enzymatische Hydrolyse mit ARA und CEL (Enzym:Substrat-Verhältnis je 1 %, 30 min, 50 °C) als vielversprechend festgelegt. Hinsichtlich des Karottentresters erwies sich eine Mikrofluidisierung bei 500 bar mit 1 Durchlauf und anschließender enzymatischer Hydrolyse mit ARA, CEL und PL (Enzym:Substrat-Verhältnis je 2 %, 30 min, 45 °C) am geeignetsten. Für eine detaillierte Charakterisierung wurden unter Verwendung dieser Bedingungen von Dr. Rocío Morales-Medina größere Mengen (10 g) der drei Ballaststoffpräparate (zweimal Erbsenschale, einmal Karottentrester) hergestellt. Hierbei erfolgte die mechanische Behandlung des Karottentresters aufgrund eines technischen Defekts des Mikrofluidizer® mittels Hochdruckhomogenisator bei einem konstanten Druck von 500 bar. Basierend auf einer nahezu identischen Reduktion der Partikelgröße mittels Mikrofluidizer® (102 µm) und Hochdruckhomogenisator (109 µm) wurde von einer Vergleichbarkeit der beiden Varianten der Hochdruckbehandlung ausgegangen. Um die Rolle und die Notwendigkeit der Hochdruckbehandlung des Karottentresters vor der enzymatischen Hydrolyse zu testen, wurde dieser zusätzlich einmal nur enzymatisch behandelt (vgl. Arbeitsvorschrift 8.3).

3.2 CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN ENZYME

Um die Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse optimal festlegen zu können, wurden die eingesetzten kommerziellen Enzympräparate hinsichtlich Temperaturoptimum, Nebenaktivitäten und erforderlichen Inaktivierungsbedingungen charakterisiert (vgl. Arbeitsvorschrift 8.4). Hierfür wurden gezielt die entsprechenden Polysaccharide (Arabinan, Erbsenschale für Cellulose, Galactan, hoch- und niedrigverestertes Pektin und Xylan, vgl. Kapitel 7.2) mittels ARA, CEL, GAL, PG, PL bzw. XYL hydrolysiert. Zur Bestimmung des Temperaturoptimums, welches laut Hersteller für alle sechs Enzyme zwischen 40 °C und 50 °C liegt, wurde die Hydrolyse bei verschiedenen Temperaturen (30 - 60 °C) durchgeführt. Der Hersteller gibt als Nebenaktivitäten für die CEL eine ARA, exo-PG- und XYL-Aktivität und für die GAL eine exo-PG- und PME-Aktivität an. Zur Verifizierung dieser und zur Identifizierung möglicher weiterer Nebenaktivitäten wurden alle sechs Substrate mit jedem Enzympräparat einzeln behandelt. Für eine kontrollierte enzymatische Behandlung und zur gezielten Freisetzung von Oligosacchariden ist eine vollständige Inaktivierung der Enzyme wichtig. Daher wurde überprüft, ob es durch die Hitzebehandlung zu einem vollständigen Verlust der Aktivitäten aller sechs Enzyme kam. Hierfür wurden die Enzyme zunächst Hitze (95 °C, 5 bzw. 10 min) ausgesetzt und anschließend das entsprechende Substrat zugegeben. Die Hydrolysate

wurden mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (engl. *High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*, HPAEC-PAD) auf freigesetzte Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide untersucht (vgl. Kapitel 3.3.2 und 3.3.5.6). Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte in Abhängigkeit von Art und Anteil der freigesetzten bzw. nicht freigesetzten Mono-, Di- und Oligosaccharide für jedes Enzym auf dessen Temperatuoptimum, mögliche Nebenaktivitäten und eine erfolgreiche Hitzeinaktivierung geschlossen werden. Diese Charakterisierung der eingesetzten Enzyme war essenziell, um Veränderungen der Zellwandpolysaccharide im Zuge der mechanisch-enzymatischen Behandlung erklären und verstehen zu können.

3.3 CHARAKTERISIERUNG VON ERBSENSCHALE UND KAROTTENTRESTER

Inwiefern eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung der Nebenströme die Ballaststoffe insbesondere die Zellwandpolysaccharide verändert, sollte durch eine umfängliche Charakterisierung aufgeklärt werden. Die angewandten und ggf. angepassten bzw. entwickelten Methoden zur Analyse der Ballaststoffzusammensetzung und -strukturen werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt. Die Charakterisierung der (enzymatisch-)mechanisch behandelten Erbsenschalen wurde größtenteils von Veronika Kurz und die der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen von Verena Haitz jeweils im Rahmen ihrer Masterarbeiten durchgeführt.

3.3.1 ASCHE- UND PROTEINGEHALT

Für eine über die Zellwandpolysaccharide hinausgehende Charakterisierung der Zusammensetzung der Nebenströme erfolgte die Bestimmung der Gehalte an Asche und Proteinen nach dem in der Arbeitsvorschrift 8.9 beschriebenen Vorgehen. Der Aschegehalt, welcher nach dem Veraschen der Probe im Muffelofen ($500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 h) zurückbleibt, wurde gravimetrisch bestimmt. Zur Bestimmung von insbesondere geringen Proteingehalten eignete sich der saure Aufschluss der Nebenströme nach Kjeldahl. Das dabei freigesetzte Ammonium wurde anschließend durch Zugabe von Natronlauge in Ammoniak überführt und mittels Ammoniak-sensitiver Elektrode quantifiziert (Urbat *et al.*, 2019). Die Abschätzung des Proteingehalts erfolgte über den ermittelten Stickstoffgehalt und den allgemeinen Umrechnungsfaktor von 6,25 (Mariotti *et al.*, 2008).

3.3.2 BESTIMMUNG FREIER MONO- UND DISACCHARIDE

Einerseits kommen in Erbsenschalen und Karottentrester natürlicherweise freie Monosaccharide vor (vgl. Kapitel 1.1.1 und 1.1.2). Andererseits kann es bei der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung unter anderem durch die Aktivität von exo-Enzymen (vgl. Kapitel 1.4.2) zur Freisetzung von Mono- und/oder Disacchariden kommen. Diese fallen nicht unter die rechtliche Definition von Ballaststoffen (vgl. Kapitel 1.2.1) und gehen daher mit einer Abnahme des Ballaststoffgehalts einher. Folglich war ein hoher Anteil an Mono- und/oder Disacchariden in den Ballaststoffpräparaten unerwünscht.

Zur Analyse von freien Mono- und Disacchariden stellt die Enzymatik eine klassische Methode dar. Sie basiert auf der gleichzeitigen enzymatischen Umsetzung von Substrat und Cofaktor und einer anschließenden photometrischen Konzentrationsbestimmung des Cofaktors, in der Regel Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) in seiner reduzierten Form (NAD(P)H) (Matissek & Fischer, 2021). Allerdings können mit einem Assay nicht alle Saccharide gleichzeitig quantifiziert werden. Daher sind Methoden, die eine parallele Bestimmung mehrerer Mono- und/oder Disaccharide ermöglichen, je nach Fragestellung vorzuziehen. Hierfür eignen sich verschiedene chromatographische Methoden wie die weitverbreitete Gaschromatographie (GC) zum Beispiel mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) oder die HPAEC-PAD. Die Analyse mittels GC erfordert eine vorherige Derivatisierung der Saccharide, um diese in eine flüchtige Form zu überführen. Zu den gängigsten Derivaten zählen Alditolacetate, Trimethylsilylether und Methylether (Ruiz-Matute et al., 2011). Reduzierende Zucker können je nach Monosaccharid in der Furanose- und/oder Pyranoseform als α - und β -Anomer sowie in Spuren in ihrer offenkettigen Form vorliegen. Uronsäuren können zusätzlich Lactone ausbilden. Da die resultierenden Trimethylsilylether-Derivate der verschiedenen Konformationen bzw. Konfigurationen mittels GC getrennt werden können, erzeugt ein einzelnes Saccharid mehrere Signale. Durch die Reduktion der Carbonylgruppen bzw. der aktivierte Carboxygruppen (vgl. Kapitel 3.3.5.2), in der Regel mittels Natriumborhydrid vor der Umsetzung zu Alditolacetaten, ist die Bildung von Halbacetalen und Lactonen nicht mehr möglich. Zudem ist die Reduktion von Uronsäuren aufgrund einer Verbesserung ihrer Elution essenziell (Ruiz-Matute et al., 2011). Jedoch führt in bestimmten Fällen die Reduktion von Ketosen (z. B. Fructose) und Aldosen (z. B. Glucose, Mannose) zu den gleichen Zuckeralkoholen (Sorbitol, Mannitol). Daher empfehlen Davison und Young (1969) zur Differenzierung von Glucose und Fructose die Umsetzung zu den Trimethylsilylether-Derivaten. Dabei geht meist die Bildung von Oximen zur Reduktion möglicher Trimethylsilylether-Derivate voraus (Ruiz-Matute et al., 2011).

Eine alternative Analysemethode stellt die HPAEC-PAD dar, welche sich durch eine hohe Selektivität und Sensitivität (bis 10 pmol) sowie eine direkte Bestimmung der Saccharide ohne Derivatisierung auszeichnet (Lee, 1990). Die Trennung der Mono- und/oder Disaccharide erfolgt im stark Alkalischen ($\text{pH} = 12,0 - 13,5$) an einer stationären Phase aus quervernetztem sulfonierte Polystyrol agglomeriert mit Latexmikropartikeln, welche mit quartären Ammoniumgruppen funktionalisiert sind. Unter diesen Bedingungen liegen die Saccharide als schwache Säuren partiell oder vollständig als Oxyanionen vor und können mit der stationären Phase interagieren (Corradini et al., 2012; Lee, 1990). Für die Elution neutraler Monosaccharide ist verdünnte Natronlauge als mobile Phase üblich, während zur Elution von Uronsäuren der Zusatz von Natriumacetat aufgrund der höheren Elutionskraft erforderlich ist (De Ruiter et al., 1992; Lee, 1990). Wichtig dabei ist es, den Eintrag von Kohlenstoffdioxid zu vermeiden bzw. zu minimieren, da daraus entstehendes Carbonat zu einer früheren Elution der Saccharide sowie zu einem Verlust von Selektivität und Auflösung führt (Corradini et al., 2012). Die Elutionsreihenfolge wird unter anderem durch den DP (Mono- vor Disacchariden) und die Anzahl an Hydroxygruppen (Desoxyzucker wie Rhamnose vor Mannose) bestimmt (Lee, 1990; Paskach et al., 1991). Für Saccharide hat sich die elektrochemische Detektion

mittels PAD bewährt. Diese benötigt ein alkalisches Milieu und misst den über die Hilfselektrode abfließenden Strom. Dabei ergibt sich der Stromfluss aus dem zwischen der Arbeits- (meist Gold) und Referenzelektrode (Silber-/Silberchlorid oder Palladiumwasserstoff) angelegten Potential und der Oxidation der Analyten an der Arbeitselektrode (Corradini *et al.*, 2012). Um eine irreversible Kontamination der als Arbeitselektrode eingesetzten Goldelektrode mit den Oxidationsprodukten der Saccharide und damit eine Verringerung der Reproduzierbarkeit zu verhindern, erfolgt die Messung gepulst. An das konstante Messpotential schließt sich die reduktive Reinigung (Potentialerniedrigung) der Goldelektrode an. Für eine höhere Robustheit der Goldelektrode hat sich ein anschließender Oxidationsschritt zur Aktivierung der Goldelektrode (Potentialerhöhung) durchgesetzt. Dabei entstehen auf der Oberfläche der Goldelektrode Goldoxide, welche im nachfolgenden Reduktionsschritt (leichte Potentialerniedrigung) wieder zu Gold reduziert werden. Dieses vierstufige Wellenpotential wird als *quadrupol-potential waveform* bezeichnet. Da der PAD-Response mit den Sacchariden sowie der jeweiligen Eluentenzusammensetzung variiert, ist zur Quantifizierung eine entsprechende Standardsubstanz erforderlich (Corradini *et al.*, 2012; Lee, 1990).

Die Quantifizierung der freien Mono- und Disaccharide aus den wässrigen Überständen aller (un)behandelten Nebenströme erfolgte mittels HPAEC-PAD (vgl. Arbeitsvorschrift 8.5). Aufgrund der Vielzahl an zu erwartenden Mono-, Di- und Oligosacchariden in den Ballaststoffpräparaten der Nebenströme war es nicht möglich, in einem Lauf isolierte Signale aller Mono- und Disaccharide zu erhalten. Daher waren zwei Messungen, je einmal zur Bestimmung der Mono- bzw. Disaccharide, mit verschiedenen Gradientenprogrammen nötig. Für die Disaccharidbestimmung wurde je ein Gradientenprogramm, abgestimmt auf die Matrixbestanteile der Erbsenschale bzw. des Karottentresters, entwickelt und mittels Mandeltest auf Linearität im Arbeitsbereich (1 - 30 µM) überprüft. Die Quantifizierung der Mono- und Disaccharide erfolgte über eine externe Kalibrierung mit den entsprechenden Standardsubstanzen unter Zusatz einer geeigneten internen Standardsubstanz (IStd; 2-Desoxy-D-Glucose (25 µM), Melezitose bzw. Lactulose (je 10 µM) und Isomaltotriose (2 µM)) in einer definierten Konzentration zu den Kalibrier- und Probelösungen. Dabei war es erforderlich, Isomaltotriose zur Quantifizierung von Digalacturonsäure geringer zu konzentrieren, da letztere einen geringeren PAD-Response als die übrigen Mono- und Disaccharide sowie die IStd selbst aufwies (De Ruiter *et al.*, 1992). Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Flächenverhältnis der Signale von Analyt zu IStd herangezogen. Dadurch war es möglich, Unterschiede im PAD-Response, wie sie durch Alterung des Fließmittels, Verschmutzungen an der Arbeitselektrode oder aufgrund der Matrixbeschaffenheit zu Stande kommen können, auszugleichen. Außerdem konnten durch den Einsatz einer IStd eine fehlerhafte Injektion oder systembedingte Abweichungen innerhalb einer Messreihe bzw. über mehrere Messreihen hinweg erkannt werden.

3.3.3 BESTIMMUNG DER OLIGOSACCHARIDE DER RAFFINOSEFAMILIE

Die RFO sind ein charakteristischer und ernährungsphysiologisch wertvoller Bestandteil von Erbsenschalen (vgl. Kapitel 1.2.2). Daher erfolgte deren Bestimmung zur volumfänglichen Beschreibung der unbehandelten Erbsenschale als Ausgangsmaterial. Da bei der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung kein entsprechendes Enzym zum Abbau der RFO eingesetzt wurde, wurde der Gehalt an RFO nur aus dem wässrigen Überstand sowie den LBS und der NLBS-Fraktion (vgl. Kapitel 3.3.4) der unbehandelten Erbsenschale mittels HPAEC-PAD bestimmt (vgl. Arbeitsvorschrift 8.6). Die HPAEC-PAD eignet sich nicht nur zur Analyse von Mono- und Disacchariden, sondern auch von Oligosacchariden (vgl. Kapitel 3.3.5.6). Quantifiziert wurde über eine externe Kalibrierung mit IStd (2-Desoxy-D-Glucose) wie bei der Bestimmung der freien Mono- und Disaccharide (vgl. Kapitel 3.3.2).

Eine Alternative bietet die Analyse von RFO mit einem DP von ≤ 6 mittels GC-FID oder GC mit gekoppelter Massenspektrometrie (MS) nach Derivatisierung zu Trimethylsilylthern (Carlsson *et al.*, 1992; Davison & Young, 1969).

3.3.4 BESTIMMUNG UND ISOLIERUNG VON BALLASTSTOFFEN

Die Methoden zur Bestimmung bzw. Isolierung von Ballaststoffen beruhen entweder auf einem enzymatisch-chemischen oder einem enzymatisch-gravimetrischen Ansatz (vgl. Abbildung 9). Ersterer wird von der Englyst- und Uppsala-Methode verfolgt. Hierbei wird zunächst Stärke enzymatisch mit Amylase und Amyloglucosidase abgebaut und im Anschluss der Anteil an (alkohol-)unlöslichen Nicht-Stärkepolysacchariden nach Säurehydrolyse chromatographisch oder photometrisch bestimmt. Die Uppsala-Methode erweitert die Englyst-Methode um die photometrische Bestimmung der Uronsäuren und die gravimetrische Bestimmung von Lignin (Klason-Lignin). Während die Englyst-Methode Ballaststoffe auf Nicht-Stärkepolysaccharide reduziert, wird von der Uppsala-Methode entsprechend der Ballaststoffdefinition des Codex Alimentarius (vgl. Kapitel 1.2.1) der Ligningehalt berücksichtigt (Englyst *et al.*, 1994; Theander *et al.*, 1995). Dennoch werden je nach betrachteter Definition der Ballaststoffe einige zugehörige Substanzen nicht miterfasst. Die Association of Analytical Chemists (AOAC) hat einige offizielle enzymatisch-gravimetrische Methoden zur Bestimmung des Ballaststoffgehalts in Einklang mit der Ballaststoffdefinition eingeführt. Dabei wurde im Laufe der Zeit die ursprüngliche Methode 985.29 erweitert und fortlaufend an Änderungen der Ballaststoffdefinition angepasst. Zum enzymatischen Abbau von Stärke und Proteinen kommen eine thermostabile α -Amylase, Amyloglucosidase und Protease zum Einsatz. Nach Abtrennung der UBS werden die LBS in 80%igem Ethanol präzipitiert und wie die UBS gewaschen, getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Zusätzlich wird eine Korrektur der Gehalte an UBS und LBS um deren Restprotein- und Aschegehalt (vgl. Kapitel 3.3.1) vorgenommen (Proskey *et al.*, 1985). Um resistente Stärke zu erfassen und die menschliche Verdauung besser zu imitieren, erfolgte der Umstieg auf eine α -Amylase aus dem Pankreas sowie eine Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen. Weiter wurde die Methode zur Erfassung von Fructooligo-

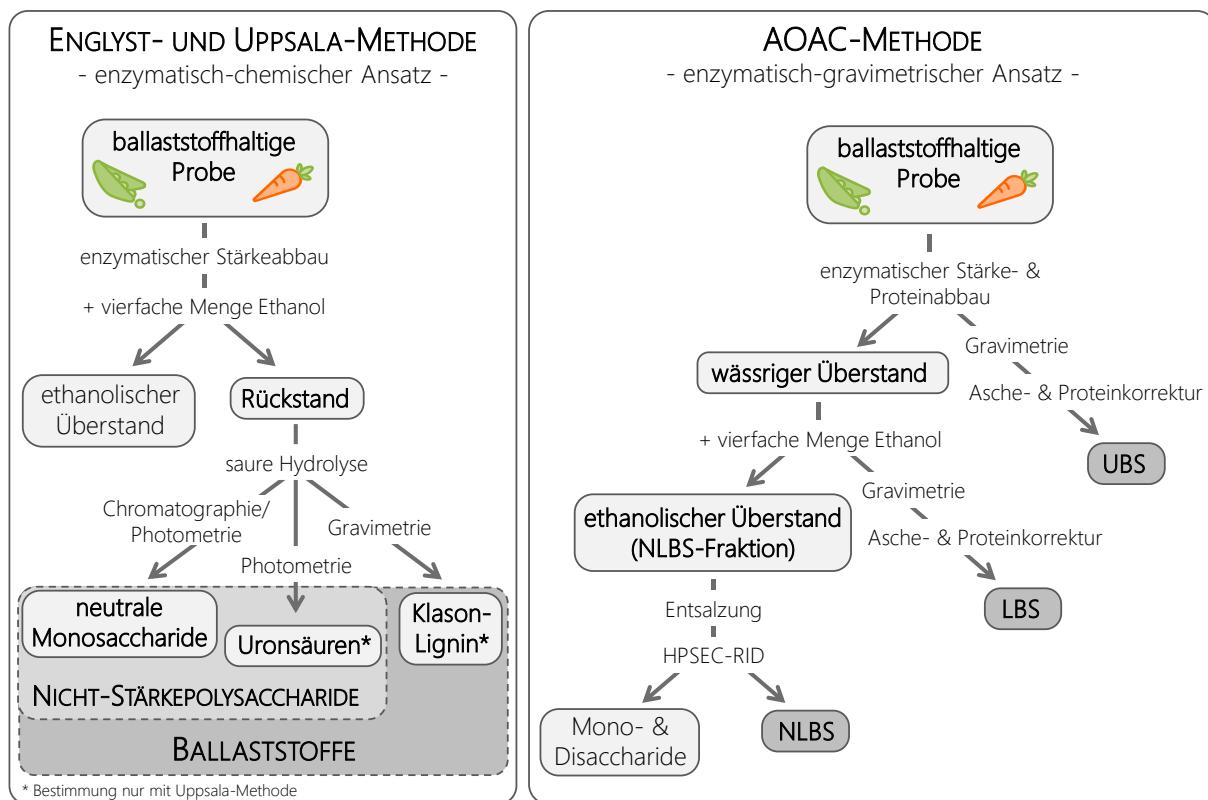


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Methoden zur Bestimmung des Ballaststoffgehalts, AOAC = Association of Analytical Chemists, UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, NLBS = niedermolekulare, lösliche Ballaststoffe, HPSEC-RID = Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie mit Brechungsindexdetektor (modifiziert nach Englyst et al. (1994), McCleary et al. (2013) und Theander et al. (1995))

sacchariden und anderen nicht-verdaubaren Oligosacchariden ($DP \geq 3$) erweitert (McCleary et al., 2013; McCleary et al., 2015). Hierzu werden die NLBS aus dem ethanollöslichen Anteil (NLBS-Fraktion) nach Entsalzung mit Anionen- und Kationenaustauscher mittels Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (engl. *High-Performance Size-Exclusion Chromatography*, HPSEC) mit Brechungsindexdetektor (engl. *Refractive Index Detector*, RID) bestimmt. Dabei werden alle Substanzen, die bis zum Übergang von Maltotriose auf Maltose eluieren, den NLBS zugerechnet (McCleary et al., 2015).

Die analytische Ballaststoffbestimmung der (un)behandelten Nebenströme erfolgte nach dem Vorgehen von McCleary und Mitarbeitenden (2010) jedoch unter Verwendung einer thermostabilen α -Amylase (Prosky et al., 1994), da die Nicht-Stärkepolysaccharide von zentralem Interesse waren. Bei der chromatographischen Analyse der NLBS wurden die von McCleary und Mitarbeitenden (2019) beschriebenen Modifikationen der analytischen Ballaststoffbestimmung berücksichtigt. In Erbsenschale und Karottentrester war insbesondere nach der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung mit dem Vorkommen verschiedener Oligosaccharide (Arabino-, Cello-, Galacto-, Galacturonsäure-, Manno-, Xylooligosaccharide und/oder RFO) zu rechnen. Daher wurde die NLBS-Bestimmung nach McCleary und Mitarbeitenden (2019) in Hinsicht auf die (vollständige) Erfassung der zu erwartenden Oligosaccharidgruppen untersucht. Dazu wurde zum einen das Elutionsverhalten relevanter Di- und Trisaccharide mittels HPSEC-RID betrachtet (vgl.

Arbeitsvorschrift 8.9). Zum anderen wurde der Einfluss der Entsalzung mittels Ionenaustauscher durch Bestimmung der Wiederfindungsraten von Arabinobiose und -triose, Cellobiose und -triose sowie von Mono-, Di- und Trigalacturonsäure (vgl. Arbeitsvorschrift 8.9) nach entsprechender Entsalzung mittels HPAEC-PAD mit IStd (Raffinose bzw. Isomaltotriose) und externer Kalibrierung ermittelt. Bei der Analyse mittels HPAEC-PAD stellte sich die Verwendung einer Aminotrap-Vorsäule als notwendig heraus, um eine Coelution der Saccharide mit Aminokomponenten zu unterbinden, die durch das ammoniumbasierte Anionenaustauschermaterial eingetragen wurden. Andere über die Ionenaustauscher eingetragene Substanzen ohne Aminogruppe konnten chromatographisch von Mono-, Di- und Trigalacturonsäure abgetrennt werden.

Im Fokus der Arbeit stand zudem eine detaillierte Charakterisierung der NLBS-Faktion hinsichtlich der darin enthaltenen Oligosaccharide. Dazu sollte unter anderem die Analyse mittels HPAEC-PAD/MS herangezogen werden (vgl. Kapitel 3.3.5.6). Die bei der analytischen Ballaststoffbestimmung erhaltene NLBS-Faktion weist einen hohen Gehalt an Puffersalzen auf. Da sich Puffersalze negativ auf die Reproduzierbarkeit und das Retentionsverhalten der Analyse mittels HPAEC-PAD/MS auswirken, wurde eine salzfreie NLBS-Faktion benötigt. Diese kann entweder durch Entsalzen der vorliegenden NLBS-Faktion aus der analytischen Ballaststoffbestimmung oder durch eine separate pufferfreie Isolierung erhalten werden. Die Entsalzung kann mittels Ionenaustauscher oder Dialyse erfolgen. Veronika Kurz konnte in ihrer Masterarbeit zeigen, dass der Einsatz der Ionenaustauschermaterialien, die bei der analytischen Ballaststoffbestimmung verwendet werden, zu einem Eintrag unerwünschter Substanzen in die NLBS-Faktion führte. Auch ein mehrfaches Waschen der Ionenaustauschermaterialien brachte keine Verbesserung (Kurz, 2023). Die Entsalzung mittels Dialyse ging mit einem Verlust an Oligosacchariden einher und war daher auch keine geeignete Option (Haitz, 2024). Daher entwickelte Verena Haitz im Rahmen ihrer Masterarbeit in Anlehnung an das Vorgehen von Prosky (1994) und McCleary (2010) sowie deren Mitarbeitenden eine wässrige Extraktionsmethode der NLBS-Faktion. Dabei werden nach Aufnahme des Probenmaterials in Wasser vorhandene Maltooligosaccharide mittels Amyloglucosidase abgebaut, bevor zuerst die UBS und nach Präzipitation in 80%igem Ethanol die LBS abgetrennt werden (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8). Nach dieser Methode wurden in dieser Arbeit NLBS-Faktionen aus den (un)behandelten Nebenströmen für eine weitere Charakterisierung präparativ isoliert.

Die zusätzlich zur analytischen Ballaststoffbestimmung, welche der Ermittlung der Anteile an UBS, LBS und NLBS diente, durchgeführte präparative Ballaststoffisolierung der UBS und LBS ermöglichte eine detaillierte Charakterisierung enthaltener unlöslicher bzw. löslicher Poly- und Oligosaccharide. Dabei kamen bei der präparativen Ballaststoffisolierung andere Enzympräparate als bei der analytischen Ballaststoffbestimmung zum Einsatz (vgl. Arbeitsvorschriften 8.7 und 8.9). Zudem wurde bei den präparativ isolierten UBS und LBS keine Protein- und Aschekorrektur vorgenommen. Alle analytisch bzw. präparativ isolierten UBS und LBS wurden einem Jod-Stärke-Nachweis zur Kontrolle auf einen vollständigen Stärkeabbau unterzogen.

Die präparativ isolierten UBS, LBS und NLBS-Faktionen waren Ausgangsmaterial für eine weitere Charakterisierung in Hinblick auf enthaltene Poly- bzw. Oligosaccharide. Die hierfür eingesetzten

und ggf. angepassten bzw. entwickelten Methoden werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

3.3.5 STRUKTURCHARAKTERISIERUNG DER BALLASTSTOFFKOHLENHYDRATE

Die Zellwandpolysaccharide und daraus resultierende Oligosaccharide sind eine heterogene Gruppe, bestehend aus unterschiedlichsten Strukturen, die nebeneinander vorliegen und miteinander interagieren können (vgl. Kapitel 1.3.2). Für eine möglichst umfassende (Struktur-)Charakterisierung ist es daher erforderlich, die Ergebnisse verschiedenster Analysemethoden zu kombinieren. Die Monosaccharidanalyse nach Spaltung der glykosidischen Bindungen (vgl. Kapitel 3.3.5.1) gibt Aufschluss über die Monomerzusammensetzung der vorliegenden Poly- bzw. Oligosaccharide. Die Methylierungsanalyse (vgl. Kapitel 3.3.5.2) liefert ergänzende Informationen über die Bindungsverhältnisse der einzelnen Monosaccharide und die enzymatisch-chromatographischen Screeningmethoden (vgl. Kapitel 3.3.5.3) über die Verteilung der Substituenten in den Poly- bzw. Oligosaccharidstrukturen sowie die anomere Konfiguration der einzelnen Monosaccharideinheiten. Zur weiteren Charakterisierung von methylveresterten und/oder acetylierten Strukturen, wie Pektinen und Xylanen, bietet sich die Bestimmung von deren DM und/oder DAc an (vgl. Kapitel 3.3.5.4). Für eine Beschreibung von Depolymerisationsprozessen durch die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung der Nebenströme war zudem die Betrachtung der Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide aus den LBS (vgl. Kapitel 3.3.5.5) und insbesondere die Analyse freigesetzter und in den NLBS-Faktionen vorliegender Oligosaccharide (vgl. Kapitel 3.3.5.6) von Interesse.

3.3.5.1 BESTIMMUNG DER MONOSACCHARIDZUSAMMENSETZUNG

Anhand der Monosaccharidzusammensetzung des untersuchten Zellwandmaterials konnte abgeschätzt werden, welche Polysaccharidstrukturen dominierten und welche eine untergeordnete Rolle spielten. Jedoch galt es zu beachten, dass das Vorkommen der einzelnen Monosaccharide in der Regel nicht auf einzelne Polysaccharidstrukturen limitiert ist (vgl. Kapitel 1.3.2). Im Allgemeinen besteht die Monosaccharidanalyse aus der Freisetzung und der anschließenden Analyse der Monosaccharide. Insbesondere die Methode zur Freisetzung der Monosaccharide hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis. So sollte diese einen guten Kompromiss zwischen einer vollständigen Depolymerisierung und einem möglichst geringen Abbau freigesetzter Monosaccharide darstellen (Willför *et al.*, 2009). Die Wahl der Freisetzungsmethode sollte auf die vorliegenden Polysaccharide sowie die Fragestellung abgestimmt werden. Üblicherweise wird zur Spaltung der glykosidischen Bindungen eine saure Hydrolyse oder Methanolysis und selten eine enzymatische Hydrolyse eingesetzt (Albersheim *et al.*, 1967; De Ruiter *et al.*, 1992; Seaman *et al.*, 1945; Willför *et al.*, 2009). Weit verbreitet ist die zweistufige Schwefelsäurehydrolyse nach Seaman und Mitarbeitenden (1945), welche bevorzugt zur Spaltung von glykosidischen Bindungen in den kristallinen Bereichen der Polysaccharidstrukturen genutzt wird (Willför *et al.*, 2009). Daher empfiehlt sich die Schwefelsäurehydrolyse zur Analyse von cellulosehaltigen Zellwandmaterialien

wie den UBS. Eine Alternative stellt die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (engl. *Trifluoroacetic Acid*, TFA) von Alberheim und Mitarbeitenden (1967) dar. Jedoch werden bei den beiden genannten Hydrolysemethoden Uronsäuren in Folge einer unzureichenden Hydrolyse von uronsäurehaltigen Polysacchariden, wie Pektinen, nur partiell erfasst. Weiter wird in Verbindung mit der Schwefelsäurehydrolyse eine Unterbestimmung von 6-Desoxyzuckern wie Rhamnose beschrieben (De Ruiter *et al.*, 1992; Willför *et al.*, 2009). Aus diesem Grund empfehlen De Ruiter und Mitarbeitende (1992) zur Analyse von uronsäurehaltigen Polysacchariden eine saure Methanolyse mittels methanolischer Salzsäure, gefolgt von einer TFA-Hydrolyse. Im Zuge der Methanolyse werden die Monosaccharideinheiten als Methylglykoside freigesetzt, von welchen bei der anschließenden TFA-Hydrolyse die Methylgruppen wieder abgespalten werden (De Ruiter *et al.*, 1992). Durch diese Hydrolyse wird der Anteil an Uronsäuren in der Monosaccharidzusammensetzung besser abgebildet. Im Gegensatz zu Schwefelsäure können methanolische Salzsäure und TFA durch Evaporation vollständig entfernt werden, wodurch die nachfolgende Analyse der Monosaccharide erleichtert wird (Albersheim *et al.*, 1967; De Ruiter *et al.*, 1992). Allerdings sind die kristallinen Bereiche der Cellulose resistent gegenüber Methanolyse und TFA-Hydrolyse und werden somit nicht miterfasst (De Ruiter *et al.*, 1992; Willför *et al.*, 2009). Unabhängig von der Hydrolysemethode kann die Analyse der freigesetzten Monosaccharide mittels GC-FID nach Derivatisierung oder mittels HPAEC-PAD erfolgen (vgl. Kapitel 3.3.2).

Zur Hydrolyse der Polysaccharide der UBS wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Schwefelsäurehydrolyse als auch die Methanolyse mit nachfolgender TFA-Hydrolyse durchgeführt, um neben kristallinen Polysacchariden wie Cellulose das Vorkommen anderer nicht kristalliner und ggf. uronsäurehaltiger Polysaccharidstrukturen möglichst realitätsnah zu erfassen. Die LBS und NLBS-Fraktionen, in welchen vor allem Pektinstrukturen zu erwarten waren, wurden lediglich einer mit Methanolyse kombinierten TFA-Hydrolyse unterzogen. Die freigesetzten Monosaccharide wurden anschließend mittels HPAEC-PAD über eine externe Kalibrierung mit 2-Desoxy-D-Glucose als IStd bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.2). Die genaue Durchführung kann der Arbeitsvorschrift 8.10.1 entnommen werden.

3.3.5.2 BESTIMMUNG DER BINDUNGSVERHÄLTNISSE

Über die Verknüpfungsstellen der einzelnen Monosaccharideinheiten in den (un)löslichen Zellwandpolysacchariden kann die Methylierungsanalyse Aufschluss geben. Hierbei werden zunächst alle freien Hydroxygruppen der Polysaccharide methyliert. Die einzelnen partiell methylierten Monosaccharide werden durch saure Hydrolyse freigesetzt, anschließend reduziert, acetyliert und mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID quantifiziert. Um gebundene Uronsäureeinheiten für die Methylierungsanalyse zugänglich zu machen, ist es erforderlich, deren Carboxygruppe zuvor durch Zugabe von Carbodiimid zu aktivieren und mit Natriumbordeuterid zu reduzieren. Zur Reduktion methylveresterter Carboxygruppen hingegen ist eine Aktivierung dieser mit Carbodiimid nicht notwendig. Somit kann bei der Durchführung der Reduktion in zwei Ansätzen (mit und ohne Carbodiimid) zwischen freien und methylveresterten Carboxygruppen differenziert sowie deren

Verhältnis abgeschätzt werden. Die im Zuge der Reduktion gebildeten 6,6'-Dideuteriozucker können später von den entsprechenden neutralen Zuckern aufgrund unterschiedlicher Masse-zu-Ladungsverhältnisse (*m/z*) der Fragmente im Massenspektrum unterschieden werden (Kim & Carpita, 1992; Pettolino *et al.*, 2012). Da bei der Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide der beiden Nebenströme die Bindungsverhältnisse der neutralen Monosaccharideinheiten im Vordergrund standen, wurde auf eine entsprechende Vorbehandlung zur Erfassung von Uronsäureeinheiten verzichtet.

Für die Methylierung wird ein aprotisches Lösungsmittel (meist Dimethylsulfoxid), eine starke Base (meist wasserfreies Natriumhydroxid) sowie das methylierende Agens (Methyliodid) benötigt (Ciucanu & Kerek, 1984). Wichtig ist dabei, dass die Methylierung der freien Hydroxygruppen möglichst vollständig abläuft, da ansonsten bei diesem Schritt nicht methylierte Hydroxygruppen bei der späteren Auswertung der Ergebnisse nicht vorhandene Verknüpfungsstellen vortäuschen. Eine solche Untermethylierung kann beispielsweise dadurch angezeigt werden, dass das Verhältnis von „verzweigten“ zu terminalen Monosaccharideinheiten hoch ist. Zur Minimierung von Untermethylierung empfiehlt sich vor allem bei unlöslichem Probenmaterial, dieses in Dimethylsulfoxid zu erhitzen, mit Ultraschall zu behandeln und/oder über Nacht vorzuquellen. Zudem kann die Methylierung ein zweites Mal durchgeführt werden. Dabei ist vor der zweiten Methylierung auf eine vollständige Entfernung des Wassers ohne Verlust von unvollständig methyliertem Probenmaterial zu achten (Pettolino *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde für eine möglichst vollständig ablaufende Methylierung das Probenmaterial in DMSO gelöst, mit Ultraschall behandelt und über Nacht vorgequollen sowie zweimal hintereinander methyliert.

Die anschließende hydrolytische Spaltung der methylierten Polysaccharide mittels TFA führt zum Verlust der Information über die anomere Konfiguration (α/β) der Monosaccharideinheiten in der Polysaccharidstruktur. Im Weiteren kommt es bei der Reduktion mit Natriumbordeuterid zur Ringöffnung und zur Markierung des C1 Atoms durch Deuterierung (Pettolino *et al.*, 2012). Um die Flüchtigkeit der erhaltenen partiell methylierten Alditole für deren Analyse mittels GC zu erhöhen, hat sich die durch 1-Imidazol katalysierte Acetylierung mit Acetanhydrid bewährt (Blakeney *et al.*, 1983; Pettolino *et al.*, 2012). Zur Trennung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) eignet sich die GC mit polarer Säule. Bei der anschließenden Detektion ist zur Identifizierung die Kopplung mit MS und zur Quantifizierung die Kopplung mit FID gängig. Die Erzeugung der Ionen in der MS erfolgt zumeist mittels Elektronenstoßionisation, welche zu den harten Ionisationstechniken zählt. Dabei werden Elektronen mit einer kinetischen Energie von meist 70 eV erzeugt, die durch Kollision mit den Analytmolekülen zur Bildung von positiv geladenen Molekülionen sowie zu deren partiellen Fragmentierung führen. Die resultierenden Fragmentionen bzw. deren Verhältnisse sind für jedes PMAA charakteristisch, sodass beispielsweise zwischen den coeluierenden (1→2)- und (1→4)-verknüpften Xylopyranosen, welche typischerweise in Xyloglucanen und Xylanen (vgl. Kapitel 1.3.2.2) vorkommen, unterschieden werden kann (Pettolino *et al.*, 2012; Steck *et al.*, 2021). Die Identifizierung der gebildeten PMAA erfolgte über den Abgleich von Elutionsreihenfolge und Massenspektren mit der in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phyto-

chemie am KIT aufgebauten Datenbank, einer Online-Datenbank sowie Literaturdaten (CCRC, 2007; Jansson *et al.*, 1976; Sasaki *et al.*, 2005; Sims *et al.*, 2018). Die molare Verteilung der identifizierten PMAA wurde nach Analyse mittels GC-FID semiquantitativ über die von Sweet und Mitarbeitenden empfohlenen Responsefaktoren bestimmt, welche die Autoren auf Basis des *effective carbon response* ermittelt und überprüft haben (Sweet *et al.*, 1975).

Bei einem alternativen Vorgehen erfolgt die Freisetzung der partiell methylierten Monosaccharide durch Methanolysen. Die entstehenden Methylglykoside weisen ein Gleichgewicht zwischen den anomeren Konfigurationen (α/β) auf. Bei den aus in Position 4 und 5 substituierten Monosaccharid-einheiten gebildeten, partiell unsubstituierten (Position 4 und 5) Methylglykosiden ist zudem eine Umwandlung der Ringform (Pyranose, Furanose) möglich. Die anschließende Derivatisierung erfolgt mittels Silylierung unter Beibehaltung der entsprechenden Konfigurationen. Folglich resultieren bis zu vier verschiedene silylierte Methylglykoside pro Monosaccharid, welche mittels GC-MS bzw. GC-FID analysiert werden können (Laine *et al.*, 2002; Pettolino *et al.*, 2012). Aufgrund des komplexen Produktspektrums eignet sich diese Variante jedoch eher für einzelne Polysaccharide und weniger für komplexe Mischungen verschiedener Polysaccharidstrukturen wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war.

In dieser Arbeit erfolgte die Durchführung der Methylierungsanalyse in Anlehnung an das Vorgehen von Wefers und Bunzel (2016a) und kann im Detail der Arbeitsvorschrift 8.10.2 entnommen werden. Bestimmt wurden die Bindungsverhältnisse ausschließlich von den Polysacchariden in den UBS und LBS der unbehandelten Erbsenschale und des unbehandelten Karottentresters. Damit sollten weitere strukturelle Erkenntnisse über die dominierenden Zellwandpolysaccharide gewonnen werden, um Enzyme für die enzymatische Behandlung der Nebenströme (vgl. Kapitel 3.1) gezielter auswählen zu können. Da zu erwarten war, dass die Bindungstypen der behandelten Nebenströme mit denen der unbehandelten vergleichbar sind und alle relevanten Informationen über die behandelten Nebenströme aus anderen Analysen erhalten werden können, wurde bei diesen auf die Durchführung der Methylierungsanalyse verzichtet.

3.3.5.3 ANALYSE DER FEINSTRUKTUR DER ARABINANE, (ARABINO-)GALACTANE UND XYLOGLUCANE

Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung der Feinstruktur der Polysaccharide, hinsichtlich Verteilung von Substituenten, Konfiguration (α/β) der monomeren Einheiten und Substitutionsgrad, bietet ein enzymatisch-chromatographischer Analyseansatz. Hierfür wurden in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am KIT drei Screeningmethoden zur Untersuchung von Arabinan-, (Arabino-)Galactan- und Xyloglucanstrukturen entwickelt (Steck *et al.*, 2021; Wefers & Bunzel, 2016a). Das Prinzip dieser basiert auf einer enzymatischen Spaltung der Polysaccharide (Arabinane, (Arabino-)Galactane bzw. Xyloglucane) mit einem spezifischen *endo*-Enzym (*endo*-Arabinanase, *endo*-Galactanase bzw. *endo*-Xyloglucanase) in Oligosaccharide, welche im Anschluss mittels HPAEC-PAD bzw. HPAEC-PAD/MS analysiert werden (Steck *et al.*, 2021; Wefers & Bunzel, 2016a). Die semiquantitative Bestimmung der molaren Verteilung der freigesetzten Oligosaccharide erfolgt dabei über die von Steck und Mitarbeitenden (2021) bzw. Wefers und

Bunzel (2016a) bestimmten relativen Responsefaktoren (RRF) bezogen auf eine IStd (Isomaltotriose bzw. Raffinose). Hierfür wurden von den Autoren relevante Arabino-, (Arabino-)Galacto- bzw. Xyloglucanoligosaccharide (vgl. Abbildung A - 1, Abbildung A - 2 und Abbildung A - 3 im Anhang) als Standardsubstanzen isoliert und charakterisiert. Diese standen in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung.

In der Arabinan- bzw. (Arabino-)Galactanscreeningmethode kann zur Verbesserung der enzymatischen Zugänglichkeit der Arabinan- bzw. (Arabino-)Galactanstrukturen eine vorherige Lockerung der Zellwandstrukturen durch Hitzebehandlung (121 °C, 40 min) erfolgen (Wefers & Bunzel, 2016a). Bei den UBS der unbehandelten Erbsenschale bzw. des unbehandelten Karottentresters resultierte dies zwar in einer vermehrten Freisetzung von Arabino- bzw. (Arabino-)Galactooligosacchariden, allerdings blieb die molare Verteilung unverändert. Daher wurde auf eine vorherige Hitzebehandlung zur Analyse der Arabinan- bzw. (Arabino-)Galactanstrukturen verzichtet. Hinsichtlich der zugegebenen Menge an *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase war eine Anpassung an die UBS bzw. LBS der Nebenströme nötig, um eine Endpunktfermentation der vorliegenden Arabinane bzw. (Arabino-)Galactane zu gewährleisten. Eine nicht bis zum Endpunkt abgelaufene Hydrolyse zeigt sich an einem hohen Anteil der linearen Trisaccharide (Arabinotriose bzw. Galactotriose) als intermediäre Abbauprodukte (Wefers & Bunzel, 2016a). Die Analyse der freigesetzten Arabino- bzw. (Arabino-)Galactooligosaccharide erfolgte mit den von Wefers und Bunzel (2016a) entwickelten Gradientenprogrammen mittels HPAEC-PAD (vgl. Arbeitsvorschrift 8.10.3). Die Identifizierung der Oligosaccharide erfolgte über einen Abgleich mit den relativen Retentionszeiten (RRT) der entsprechenden Standardsubstanzen in Bezug auf Raffinose (IStd). Die Ergebnisse dieser Identifizierung wurden für ausgewählte Proben durch eine parallele massenspektrometrische Detektion mittels HPAEC-PAD/MS abgesichert. Die Bestimmung der molaren Verhältnisse über die RRF erfordert den Zusatz von Raffinose als IStd (Wefers & Bunzel, 2016a). Da die so ermittelten molaren Verhältnisse vom Gehalt an Raffinose in der Probelösung unbeeinflusst bleiben, eigneten sich die beiden Screeningmethoden auch zur Analyse der Erbsenschalen, welche nativ Raffinose enthalten (vgl. Kapitel 4.4.1.1). Um den Abbau von Arabinan- und (Arabino-)Galactanstrukturen im Zuge der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung zwischen den einzelnen behandelten Erbsenschalen bzw. Karottentrester vergleichend einschätzen zu können, wurden die über die RRF absolut bestimmten Gehalte an den freigesetzten Arabino- und (Arabino-)Galactooligosacchariden betrachtet. Jedoch sind diese absoluten Gehalte im Falle der Erbsenschale aufgrund der enthaltenen Raffinose fehlerbehaftet. Dennoch erfolgte ein Vergleich der absoluten Gehalte an Arabino- und (Arabino-)Galactooligosacchariden der (un)behandelten Erbsenschalen unter der Annahme, dass der Anteil an Raffinose in allen (un)behandelten Erbsenschalen ähnlich und somit der Fehler in der Bestimmung der absoluten Gehalte in allen Erbsenschalen vergleichbar war. Eine Alternative zur Bestimmung mittels HPAEC-PAD der enzymatisch freigesetzten Arabino- bzw. (Arabino-)Galactooligosaccharide stellt die Analyse mittels zweidimensionaler (2D) NMR mit dem *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment dar. Allerdings ist die Empfindlichkeit dieser NMR-Screeningmethode gering, weshalb

im Vergleich zur Analyse mittels HPAEC-PAD die 50 bis 100-fache Menge an Ausgangsmaterial und Enzym eingesetzt werden muss (Wefers & Bunzel, 2016b).

Bei der Xyloglucanscreeningmethode kommt eine *endo*-Xyloglucanase zum Einsatz. Dabei ist je nach Spezifität dieser auch eine Aktivität gegenüber Cellulose möglich (vgl. Kapitel 1.4.2.2), was sich vor allem bei cellulosereichen Materialien in einem erhöhten Anteil an den Cellooligosacchariden GG, GGG und GGGG und einem geringeren Substitutionsgrad der Xyloglucane als üblich (vgl. Kapitel 1.3.2.2) widerspiegelt. Daher wurden bei der Bestimmung der molaren Verhältnisse der cellulosereichen Erbsenschale bzw. des Karottentrester (vgl. Kapitel 4.4.1.1 und 4.4.2.1) die freigesetzten Cellooligosaccharide nicht berücksichtigt. Bei der Analyse mittels HPAEC-PAD/MS wird die selektive Trennung und sensitive Detektion, verbunden mit einer eindeutigen Identifizierung über das *m/z*, ausgenutzt, sodass die Xyloglucanoligosaccharide einerseits über die RRT zu Isomaltotriose (IStd) und andererseits über die Massen (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM)-Spur der entsprechenden *m/z* eindeutig identifiziert werden können (Steck et al., 2021). Jedoch ist die Kopplung von HPAEC-PAD mit MS (vgl. Abbildung 10) anspruchsvoll und daher wenig verbreitet. So sind zur Trennung und Detektion der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD alkalische Eluenten mit hoher Salzlast notwendig (vgl. Kapitel 3.3.2 und 3.3.5.6), welche mit der MS nicht kompatibel sind. Daher wird das Eluat nach der Trennsäule mittels Splitter geteilt, so dass etwa ein Drittel über den PAD und zwei Drittel zur Entsalzung über einen elektrolytisch regenerierenden Suppressor mit Wasser im Gegenstrom und weiter zur MS geleitet werden. An den Elektroden im Suppressor wird das Wasser elektrolytisch gespalten und die entstehenden Oxoniumionen mit den Natriumionen aus dem Eluat durch eine ionen-sensitive Membran ausgetauscht. Die gebildete Natronlauge sowie entstandener Wasser- und Sauerstoff werden mit dem Regenerant entfernt, während die Analyten sowie die Hydroxid- und Acetationen als Wasser bzw. Essigsäure im Eluat verbleiben. Ein nachgeschalteter Leitfähigkeitsdetektor überwacht die vollständige Entfernung der Kationen. Im Weiteren werden für die MS Ionen mittels Elektronensprayionisation (ESI, vgl. Kapitel 3.3.5.6) im positiven Modus erzeugt. Durch separat zugeführtes Lithiumchlorid wird die Bildung von Lithiumaddukten gefördert, welche in einem Single-Quadrupol-Spektrometer (vgl. Kapitel 3.3.5.6) nach ihren *m/z* aufgetrennt und anschließend mittels Sekundärelektronenvervielfacher detektiert werden.

Zum einen sollten mit Hilfe der drei Screeningmethoden die Feinstrukturen der Arabinane, (Arabino-)Galactane und Xyloglucane in der unbehandelten Erbsenschale bzw. dem unbehandelten Karottentrester beschrieben werden. Zum anderen sollten strukturelle Veränderungen der Arabinane, (Arabino-)Galactane und/oder Xyloglucane durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung identifiziert werden. Die Durchführung der drei Screeningmethoden (vgl. Arbeitsvorschriften 8.10.3 und 8.10.4) erfolgte jeweils mit den UBS und LBS beider (un)behandelten Nebenströme. Davon ausgenommen war im Falle der behandelten Erbsenschalen die Galactanscreeningmethode, welche mit den behandelten Erbsenschalen nicht durchgeführt wurde, da die untersuchten Erbsenschalen kaum Galactanstrukturen enthielten (vgl. Kapitel 4.4.1.1).

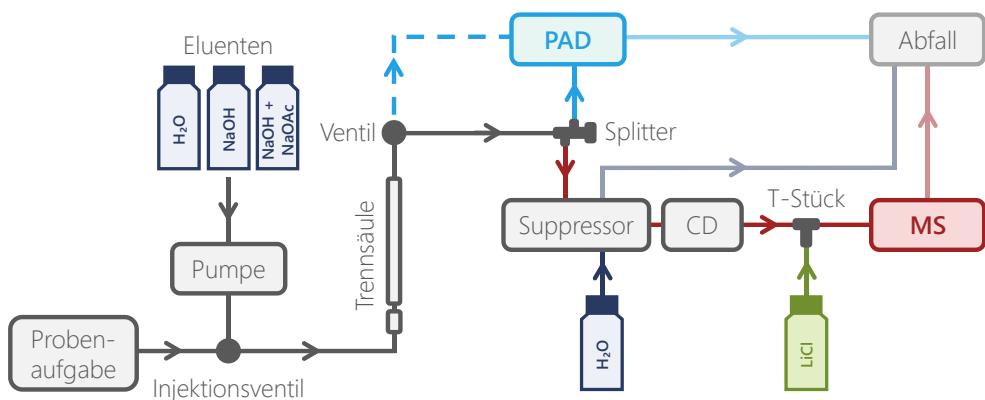


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie gekoppelt mit paralleler gepulst amperometrischer Detektion (PAD) und Massenspektrometrie (MS), CD = Leitfähigkeitsdetektor, H₂O = Wasser, NaOH = Natronlauge, NaOAc = Natriumacetat, LiCl = Lithiumchlorid

Bei der Analyse der Xyloglucanstrukturen der LBS kam es zu Coelutionen mit anderen Matrixbestandteilen sowie Verschiebungen der Retentionszeiten, vermutlich aufgrund von eingeschlossenen Puffersalzen während der Präzipitation der LBS. Daher beschränkte sich die Analyse der LBS auf einen qualitativen Nachweis freigesetzter Xyloglucanoligosaccharide.

3.3.5.4 BESTIMMUNG DES VERESTERUNGSGRADS POLYMERGBUNDENER GALACTURONSÄUREN

Der Veresterungsgrad der Pektinstrukturen (vgl. Kapitel 1.3.2.3), insbesondere der Homogalacturonane, hat einen maßgeblichen Einfluss auf deren funktionelle Eigenschaften. So neigen Pektine mit hohem DM bevorzugt bei pH-Werten < 3,5 und in Gegenwart hoher Gehalte an löslichen Substanzen (z. B. Saccharose) und Pektine mit niedrigem DM bei pH-Werten von 2 - 6 in Anwesenheit von divalenten Ionen (z. B. Calciumionen) zur Ausbildung von Gelen (Harris & Smith, 2006). Acetylgruppen hingegen wirken sich durch eine sterische Hinderung der Wechselwirkungen mit Calciumionen negativ auf die durch Calciumionen induzierte Gelbildung aus. Gleichzeitig kann ein hoher DAC die Emulgereigenschaften der Pektine verbessern (Leroux *et al.*, 2003). Zu einem besseren Verständnis der Veränderungen der funktionellen Eigenschaften durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung von Erbsenschalen und Karottentrester auf struktureller Ebene kann die Bestimmung des DM und DAC entsprechender uronsäurehaltiger Polysaccharide beitragen.

Hierfür kommt in der Industrie häufig eine einfache Titration zum Einsatz. Dabei werden zunächst die freien Carboxygruppen mit Natronlauge titrimetrisch bestimmt. Anschließend erfolgt nach Verseifung mit fünffach höher konzentrierter Natronlauge und Neutralisation mit äquivalenter Menge Salzsäure die Bestimmung des methylveresterten Anteils an Carboxygruppen ebenfalls durch Titration mit Natronlauge. Als Indikator dient Phenolphthalein. Der DM berechnet sich aus den beiden zur Titration benötigten Volumina an Natronlauge (Food Chemical Codex, 1972). Allerdings erfordert diese Bestimmung zum einen mit 5 g eine große Menge an Probe, und zum anderen reagieren ggf. andere Matrixbestandteile mit Natronlauge und führen somit zu einer Überbestimmung des DM (Müller-Maatsch *et al.*, 2014). Alternative Methoden zur direkten Bestimmung des DM und DAC stellen die ¹H-NMR nach alkalischer Verseifung der Ester (Bédouet *et al.*, 2003)

und die ^{13}C -NMR dar (Bédouet *et al.*, 2003; Sinitya *et al.*, 1998). Vor allem Letztere ist aufgrund der gelbildenden Eigenschaften von Pektinen und der daraus resultierenden geringen spektralen Auflösung, insbesondere für Pektine mit einem geringen DAc, weniger geeignet (Müller-Maatsch *et al.*, 2014; Sinitya *et al.*, 1998).

Weitere Analyseansätze ermitteln den DM und DAc, indem durch alkalische Hydrolyse freigesetztes Methanol und Essigsäure bestimmt und zum separat ermittelten Gehalt an gebundenen Galacturonsäuren in Bezug gesetzt werden. Bei der Monosaccharidanalyse (vgl. Kapitel 3.3.5.1) wird der molare Anteil an Galacturonsäure bestimmt, wenngleich auch die Berechnung des absoluten Gehalts möglich ist. Jedoch ist hierbei methodisch bedingt eine Unterbestimmung aufgrund von Decarboxylierung, Lactonisierung und Abbau im Zuge der langen Säurebehandlung wahrscheinlich. Stattdessen ist eine photometrische Bestimmung der Uronsäuren nach schwefelsaurem Abbau üblich. Dabei entstehende Furanderivate werden mit einem Farbreagenz wie Carbazol oder 3-Phenylphenol zu Chromophoren umgesetzt und deren Pinkfärbung photometrisch erfasst (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Dische, 1947). Die Reaktion mit Carbazol nach Dische (1947) wird jedoch unter anderem durch Salze unterdrückt. Zudem ist der resultierende Farbkomplex instabil (Bitter & Muir, 1962). Im Vergleich dazu ist die Reaktion mit 3-Phenylphenol sensitiver und selektiver und ist daher zu bevorzugen (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). Jedoch kommt es auch bei dieser Reaktion zu Interferenzen mit anderen Uronsäuren (z. B. Glucuronsäuren) sowie Neutralzuckern (Garna *et al.*, 2006; Kintner Iii & Van Buren, 1982). Allerdings ist der genaue Reaktionsmechanismus der Farbreaktion bisher nicht aufgeklärt. Durch das Mitführen eines Blindwerts kann die Richtigkeit der Uronsäurebestimmung erhöht werden, indem von der für die Probe gemessenen Absorption die der weiteren Reaktionsprodukte aus dem sauren Abbau subtrahiert wird. Neben der photometrischen Bestimmung von Galacturonsäure kann auch eine Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (Rumpunen *et al.*, 2002) oder HPAEC-PAD (Garna *et al.*, 2006) erfolgen. Die Galacturonsäuren werden zuvor entweder durch eine saure, enzymatische oder kombinierte saure-enzymatische Hydrolyse freigesetzt (Garna *et al.*, 2006; Rumpunen *et al.*, 2002). Dabei ist es entscheidend, eine möglichst vollständige Depolymerisierung zu erreichen und den Abbau bereits freigesetzter Galacturonsäure zu minimieren. Die Bestimmung des Uronsäuregehalts in dieser Arbeit erfolgte photometrisch nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) über eine externe Kalibrierung. Für jeden Ansatz wurde ein eigener Blindwert mitgeführt. Zudem wurden die UBS zur Lockerung der Zellwandstrukturen einer Vorbehandlung mit Schwefelsäure unterzogen (vgl. Arbeitsvorschrift 8.10.5.1).

Zur Analyse von Methanol und/oder Essigsäure nach Verseifung sind verschiedene chromatographische Methoden wie HPLC-RID (Levigne *et al.*, 2002; Luzio & Cameron, 2013; Voragen *et al.*, 1986) oder *headspace*-GC-FID (Huisman *et al.*, 2004) bzw. GC-MS auch in Kombination mit einer Festphasenmikroextraktion zur Aufreinigung (Savary & Nuñez, 2003) in der Literatur beschrieben. Dabei werden zur Trennung mittels HPLC Kationenaustauscher-, Ionenausschluss- oder Umkehrphasensäulen (engl. *reversed phase*, C18) eingesetzt. Je nach Säulenmaterial und alkalischer

Behandlung ist eine Beeinträchtigung der Bestimmung durch Coelution mit anderen Matrixkomponenten, insbesondere Abbauprodukten von Pektinen aus der alkalischen Behandlung, möglich (Levigne *et al.*, 2002; Voragen *et al.*, 1986). Müller-Maatsch und Mitarbeitende (2014) entwickelten eine alternative schnelle spektroskopische Methode. Mit dieser können Methanol und Essigsäure nach Freisetzung mit Natriumhydroxid in Deuteriumoxid unter Zugabe des Natriumsalzes vom 3-(Trimethylsilyl)propionat-*d*₄ (TMSP) als IStd absolut ohne Kalibrierung mittels ¹H-NMR quantifiziert werden. Die Bestimmung ist aufgrund der isolierten Signale der Methylgruppen von Methanol (3,36 ppm) und Essigsäure (1,92 ppm) sehr empfindlich (Müller-Maatsch *et al.*, 2014).

Der DM und DAc der polymergebundenen Uronsäuren in den UBS und LBS der unbehandelten Erbsenschale sowie des (un)behandelten Karottentresters wurden über den mittels ¹H-NMR bestimmten Gehalt an freigesetzten Methanol und Essigsäure nach Müller-Maatsch und Mitarbeitenden (2014), bezogen auf den nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) bestimmten Uronsäuregehalt, ermittelt (vgl. Arbeitsvorschrift 8.10.5). Bei den behandelten Erbsenschalen war eine Betrachtung des DM und DAc nicht relevant, da die polymergebundenen Uronsäuren der Erbsenschale nahezu vollständig unverestert vorlagen (vgl. Kapitel 4.4.1.1).

3.3.5.5 ANALYSE DER MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNG

Eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung kann zu einer Veränderung der Polysaccharide auf makromolekularer Ebene führen. Es wurde mit einer Verringerung der Molekulargewichte gerechnet, wie es beispielsweise für die Polysaccharide aus den LBS von Karotten nach einer thermischen Behandlung beschrieben ist (Svanberg *et al.*, 1995). Ein reduziertes Molekulargewicht der Polysaccharide in den Ballaststoffpräparaten kann sich ggf. günstig auf deren ernährungsphysiologische und funktionelle Eigenschaften auswirken. Die mit einem reduzierten Molekulargewicht einhergehenden kürzerkettigen Polysaccharide könnten zum einen durch die Darmbakterien besser fermentiert werden und zum anderen zu einer Erniedrigung der Viskosität entsprechender Suspensionen der Ballaststoffpräparate beitragen (Svanberg *et al.*, 1995). Bei der Optimierung der enzymatischen Behandlung (vgl. Kapitel 3.1.2) wurde daher angestrebt, Ballaststoffpräparate mit möglichst geringem Molekulargewicht zu erhalten.

Die Analyse der Molekulargewichtsverteilung erfolgt üblicherweise mittels Größenausschlusschromatographie. Hierbei werden die Moleküle nach ihrer Größe bzw. ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt. Kleinere Moleküle dringen tiefer in die Poren der stationären Phase ein, während größere Moleküle (partiell) ausgeschlossen werden und somit zuerst eluieren. Die stationären Phasen sind zumeist auf Basis eines porösen Silicas oder Polymers (z. B. polymeres Methacrylat) aufgebaut. Letztere werden aufgrund ihrer höheren Stabilität gegenüber erhöhten Temperaturen und pH-Werten bevorzugt eingesetzt (Churms, 1996). Im Wässrigen können Polysaccharide wie Pektine durch ionische Wechselwirkungen Aggregate ausbilden. Diese haben ein größeres hydrodynamisches Volumen und eluieren folglich früher als die entsprechenden isoliert vorliegenden Polysaccharide. Zum Unterbinden von ionischen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen sowie zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit kann es abhängig von der

strukturellen Beschaffenheit der Polysaccharide notwendig sein, die Ionenstärke des Eluenten zu erhöhen. Häufig wird dazu dem Eluenten Natriumnitrat zugesetzt, da es zum alternativ verwendeten Natriumchlorid weniger korrosiv wirkt (Churms, 1996; Gómez-Ordóñez *et al.*, 2012). Die Detektion kann unter anderem durch Messung des Brechungsindex, der Absorption im ultavioletten (UV)-Bereich oder der Lichtstreuung erfolgen. Weitverbreitet ist der Einsatz des RID. Dieser eignet sich gut für die isokratische Messung der Molekulargewichtsverteilung, besitzt jedoch eine geringe Sensitivität. Weniger gängig ist die UV-Detektion, da Saccharide üblicherweise im UV-Bereich kein Licht absorbieren und daher vor der Messung derivatisiert werden müssen. Die Abschätzung der Molekulargewichte erfolgt im Allgemeinen über Dextrane und/oder Pullulane, die auch als sekundäre Standardsubstanzen bezeichnet werden. Ein Nachteil dabei ist, dass die linearen Dextrane bzw. Pullulane verglichen mit verzweigten Polysacchariden mit gleichem Molekulargewicht ein anderes hydrodynamisches Volumen besitzen und folglich ein anderes Elutionsverhalten aufweisen. Abhilfe kann der Einsatz eines Mehrwinkellichtstreuendetektors schaffen, welcher eine absolute Bestimmung des Molekulargewichts sowie der mittleren Molekülgröße ermöglicht (Churms, 1996; Gómez-Ordóñez *et al.*, 2012; He *et al.*, 2018; Svanberg *et al.*, 1995).

Zur Analyse der Molekulargewichtsverteilung ist es erforderlich, dass die Polysaccharide in Lösung vorliegen. Daher erfolgte diese Analyse lediglich mit den LBS der (un)behandelten Nebenströme. Die Analyse der Molekulargewichtsverteilung zielte primär auf den Vergleich zwischen den unbehandelten und den verschieden behandelten Erbsenschalen bzw. Karottentrester sowie auf eine grobe Einordnung der Molekulargewichte ab. Hierfür wurde die Analyse mittels HPSEC-RID mit Dextranstandardsubstanzen unterschiedlichen Molekulargewichts als geeignet angesehen und eingesetzt (vgl. Arbeitsvorschrift 8.10.6).

3.3.5.6 ANALYSE VON OLIGOSACCHARIDEN

Einen zentralen Punkt dieser Arbeit stellte die Analyse der Oligosaccharide in den niedrigviskosen Ballaststoffpräparaten dar. Diese entstehen als Abbauprodukte der Polysaccharide unter anderem im Zuge einer kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung. Dabei war ein möglichst hoher Gehalt an Oligosacchariden wünschenswert, da diese verglichen mit den entsprechenden Polysacchariden meist ein höheres ernährungsphysiologisches Potential besitzen (vgl. Kapitel 1.3.4) und wässrige Lösungen mit geringerer Viskosität ausbilden.

Zur Analyse von Oligosacchariden aus komplexen Gemischen ist zunächst eine Trennung dieser, zum Beispiel mittels Kapillarelektrophorese, HPLC oder HPAEC, erforderlich. Hinsichtlich der HPLC sind je nach Fragestellung zur Trennung unter anderem Umkehrphasen, Phasen aus porösem Graphit sowie hydrophile Umkehr-Umkehrphasen geeignet. Für die anschließende Detektion wird der Einsatz universeller Detektoren wie RID, Lichtstreuendetektor oder MS und selektiver Detektoren wie PAD in Verbindung mit HPAEC oder UV- bzw. Fluoreszenzdetektoren nach Derivatisierung beschrieben (Corradini *et al.*, 2012; Hemström & Irgum, 2006; Leijdekkers *et al.*, 2011; Westphal *et al.*, 2010). Die Analyse der Oligosaccharide erfolgte in dieser Arbeit aufgrund der hohen Sensitivität und Selektivität mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 3.3.2). Zur Elution der längerkettigen Oligo-

saccharide wurde dabei die stärkere Elutionskraft von Natriumacetat gegenüber Natronlauge ausgenutzt. Eine Vorhersage über die Elutionsreihenfolge basierend auf der Struktur und dem DP der Oligosaccharide ist nur begrenzt möglich (Corradini *et al.*, 2012; Paskach *et al.*, 1991). Bedingt durch das stark alkalische Milieu werden gebundene Methyl- und Acetylgruppen hydrolytisch abgespalten, sodass keine Informationen über mögliche Esterbindungen erhalten werden. Dies wurde in Kauf genommen, da der Fokus auf dem Polymerisierungsgrad der Oligosaccharide lag. Zur Trennung der Oligosaccharide wurde das von Schäfer (2024) entwickelte und von Verena Haitz im Rahmen ihrer Masterarbeit erweiterte Gradientenprogramm genutzt. Die quantitative Bestimmung der Arabino-, Cello-, Xylo- (je DP = 3 - 6) und GalA-OS (DP = 3 - 4) erfolgte, wie die Quantifizierung freier Mono- und Disaccharide (vgl. Kapitel 3.3.2), über je eine externe Kalibrierung mit IStd (Isomaltotriose, vgl. Arbeitsvorschrift 8.11.1). Die Kopplung der HPAEC-PAD mit MS (vgl. Kapitel 3.3.5.3) ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der Oligosaccharide sowie das Erkennen möglicher Coelutionen bei einzelnen repräsentativ ausgewählten Proben. Mit zunehmender Salzlast im Verlauf des Gradientenprogramms wird die Kapazitätsgrenze der Entsalzung des Suppressors überstiegen, so dass ab diesem Zeitpunkt die MS nicht mehr als Detektor genutzt werden kann. Dies beschränkt die Identifizierung nur mit hoher Salzlast eluierender Oligosaccharide auf einen Retentionszeitenvergleich mit entsprechenden Standardsubstanzen. Jedoch ist die Verfügbarkeit von Standardsubstanzen, insbesondere von längerkettigen Oligosacchariden (DP > 6), begrenzt.

Die hydrophile Interaktionschromatographie (engl.: *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC), welche überwiegend auf dem Prinzip der Verteilungschromatographie basiert, ermöglicht ebenfalls eine parallele Trennung von neutralen und sauren Oligosacchariden (Leijdekkers *et al.*, 2011). Im Gegensatz zur HPAEC gehen dabei keine Informationen über Esterbindungen verloren und die Kopplung mit MS ist durch die höhere Flüchtigkeit von Acetonitril begünstigt. Die stationären Phasen bei der HILIC bestehen zumeist aus einer Silicabasis, die mit Amid-, Diol-, Amino- oder Aminopropylgruppen modifiziert ist (Hemström & Irgum, 2006). Die weitverbreiteten Aminophasen sind jedoch hydrolyselabil und können reduzierende Zucker durch Ausbildung von Iminen (Schiff'sche Base) irreversibel adsorbieren (Wuhrer *et al.*, 2009). Inzwischen ist der Einsatz von Amidsäulen zur Analyse von Oligosacchariden gängig (Leijdekkers *et al.*, 2011). Auf der Oberfläche der stationären Phase bildet sich aufgrund der hydrophilen Gruppen eine dünne, partiell immobilisierte, mit Wasser angereicherte Schicht aus. Die Analyten können durch Wasserstoffbrückenbindungen, ionische und/oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit dieser wässrigen Phase interagieren. Zur Elution wird ein Gemisch aus organischem Modifier, meist Acetonitril und Wasser, eingesetzt, welches ab einem Wasseranteil von über 50 % die Elution polarer Analyten zunehmend begünstigt (Hemström & Irgum, 2006; Wuhrer *et al.*, 2009). Limitiert wird die Analyse polarer Oligosaccharide durch deren Präzipitation in Eluenten mit hohem organischen Anteil, wie es zu Beginn der Gradientenelution der Fall sein kann (Wuhrer *et al.*, 2009). Weiter kann es bei reduzierenden Zuckern zu einer unerwünschten Auftrennung ihrer α - und β -Anomere kommen. Dies kann durch höhere Temperaturen ($\geq 35^{\circ}\text{C}$), welche zu einer beschleunigten Mutarotation

führen, verhindert werden (Leijdekkers *et al.*, 2011). Zur Unterbindung von ionischen Interaktionen zwischen nicht derivatisierten, deprotonierten Silanolgruppen der stationären Phase und geladenen Analyten eignet sich ein niedriger pH-Wert (pH = 3) sowie der Zusatz von Puffersalzen wie Ammoniumformiat oder -acetat. Diese sind aufgrund ihrer hohen Flüchtigkeit kompatibel mit einer nachfolgenden Detektion mittels MS (Hemström & Irgum, 2006; Leijdekkers *et al.*, 2011).

Die Ionisation mittels ESI bietet einen idealen Übergang der Analyten aus der flüssigen Phase in der HPLC in die Gasphase und ins Hochvakuum der MS. Dabei kommt es beim Durchfluss durch die positiv oder negativ geladene Sprühkapillare zur Ladungstrennung. Am Ende der Sprühkapillare bildet sich der sogenannte Taylor-Konus, von welchem Lösungsmitteltröpfchen unter Bildung eines Aerosols ausgestoßen werden. Die Vernebelung wird durch ein Sprühgas (meist Stickstoff) unterstützt. Im Weiteren begünstigt das entgegengerichtete Desolvatationsgas (meist Stickstoff) die Verdampfung des Lösungsmittels und damit die Zunahme der Ladungsdichte in den Tröpfchen. Die genauen Vorgänge zur Freisetzung der Analytionen aus den Lösungsmitteltröpfchen sind nicht abschließend geklärt. Aktuell anerkannt ist die Bildung von Mikrotröpfchen nach der Theorie der Coulomb-Explosion oder der *Droplet Jet Fission*, gefolgt von der Freisetzung der „nackten“ Analytionen nach dem *Charged Residue-* oder *Evaporative*-Modell (Cole, 2000; El-Aneed *et al.*, 2009). Die ESI ist eine sanfte Ionisationsmethode, bei der je nach Modus positiv oder negativ geladenen Quasimolekülionen entstehen. Diese weisen mit zunehmender Molekülgröße eine doppelte bzw. mehrfache Ladung auf. Die Trennung der Quasimolekülionen nach ihrem m/z erfolgt anschließend im Massenanalysator. Ein Vertreter ist der einfache, weitverbreitete Single-Quadrupol, welcher aus vier quadratisch angeordneten zylindrischen Stabelektroden besteht. Durch das Überlagern einer Gleichspannung mit Wechselspannung wird gezielt die Flugbahn eines oszillierenden Analytions mit einem bestimmten m/z stabilisiert. Dieses kann im nachfolgenden Detektor (meist Sekundärelektronenvervielfacher) registriert werden. Für eine zielgerichtete (engl. *targeted*) Analyse von Substanzen mit bekanntem m/z empfiehlt sich der SIM-Modus. Dabei können nur Analytionen mit entsprechend festgelegtem m/z den Quadrupol passieren, während beim *Full Scan*-Modus ein definierter m/z -Bereich gescannt wird. Das daraus resultierende *Total Ion Chromatogram* (TIC) ist vor allem bei einer nicht-zielgerichteten (engl. *non-targeted*) Analyse bzw. nicht bekannten m/z hilfreich. Der Einsatz von mehrdimensionaler MS (MS^n) ermöglicht es, substituierte bzw. veresterte Monosaccharideinheiten in einem Oligosaccharid zu identifizieren. Die neuste Technik stellt die Orbitrap (MS^2) dar. Hierbei werden die Analytionen im elektrischen Feld einer spindelförmigen Zentralelektrode abhängig von ihrem m/z in eine Schwingung mit bestimmter Frequenzen versetzt. Dadurch wird wiederum ein elektrisches Feld (*ion image current*) induziert, welches von den äußeren Elektroden detektiert wird. Anschließend kann die gemessene zeitliche Entwicklung der Spannung (Zeitdomäne) durch Fouriertransformation in ein Massenspektrum (Frequenzdomäne) umgewandelt werden. Wichtig ist dabei ein diskontinuierlicher Ionenstrom in die Zentralelektrode. Daher werden bei einer kontinuierlichen Ionenerzeugung, wie der ESI, die Ionen zunächst in einem elektrischen Feld (C-Trap) gefangen, bevor sie in Pakete gebündelt weitergeleitet werden. Dabei kann eine Kollisionszelle zur Fragmentierung der

Quasimolekülien der Orbitrap bzw. der C-Trap vorgeschaltet werden. Über die Stärke des elektrischen Feldes in dieser Kollisionszelle kann das Ausmaß der Fragmentierung gesteuert werden. Oligosaccharide fragmentieren bevorzugt an den glykosidischen Bindungen unter Bildung der charakteristischen, von Domon und Costello (1988) beschriebenen C- bzw. Z- und/oder B- bzw. Y-Fragmente. Anhand dieser ist es zum Beispiel möglich, festzustellen, welche Carboxygruppen von (u)GalA-OS eine Methylgruppe tragen (vgl. Kapitel 4.1.1).

In dieser Arbeit wurde neben der HPAEC-PAD/MS die HILIC verbunden mit der MS zur Analyse der GalA-OS eingesetzt, da auch ohne vorhandene Standardsubstanzen über die MS der DP sowie mögliche Ester identifiziert werden können. Letztere können die funktionellen Eigenschaften der Ballaststoffpräparate maßgeblich mitbestimmen (vgl. Kapitel 3.3.5.4). Für die Trennung methylveresterter GalA-OS mittels HILIC ist eine blockweise Elution entsprechend der Nettoladung beschrieben (Leijdekkers *et al.*, 2011), wenngleich eine Differenzierung bezüglich der Verteilung der Methylester nur durch Kopplung mit *traveling-wave* Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (Leijdekkers *et al.*, 2015) erreicht werden kann. Entsprechende ungesättigte und/oder acetylierte GalA-OS eluieren, aufgrund weniger freier Hydroxygruppen, früher (Leijdekkers *et al.*, 2011). Die Trennung der (u)GalA-OS erfolgte in dieser Arbeit in Anlehnung an Leijdekkers und Mitarbeitende (2011) auf einer Amidsäule durch Gradientenelution mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser mit Ammoniumformiat und Ameisensäure an einer Ultra (U)HPLC-Anlage. Diese toleriert gegenüber der herkömmlichen HPLC höhere Rückdrücke und ermöglicht somit den Einsatz von Trennsäulen mit deutlich kleineren Partikeln, welche für eine besser aufgelöste und schnellere Trennung sorgen. Die gesättigten GalA-OS wurden mittels MS detektiert. Da der Response der MS jedoch stark matrixabhängig ist und entsprechende (stabilisotopenmarkierte) Standardsubstanzen nicht verfügbar waren, war mit dieser Analyse nur eine qualitative Aussage über den DP und vorliegende Ester der gesättigten GalA-OS möglich. Angewandt wurde die für die Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am KIT von Jan Steffan angepasste UHPLC-MS-Methode von Leijdekkers und Mitarbeitenden (2011). Die uGalA-OS sind aufgrund ihrer Doppelbindung UV-aktiv. Daher wurde vor die MS ein Photodiodenarraydetektor (PDA) geschaltet, wodurch eine Quantifizierung der uGalA-OS möglich war. Hierfür erforderliche Standardsubstanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert und damit eine Profilingmethode mittels UHPLC-PDA(-MS) zur Bestimmung von DP und Veresterungsgrad der uGalA-OS entwickelt und validiert (vgl. Kapitel 3.4).

Die Analyse der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD(/MS), UHPLC-MS bzw. UHPLC-PDA(-MS) erfolgte für alle (un)behandelten Erbsenschalen und Karottentrester nach den Arbeitsvorschriften in Kapitel 8.11 aus den isolierten NLBS-Fraktionen (vgl. Kapitel 3.3.4). Daher konnten bei diesen Analysen nur Oligosaccharide, die in 80%igem Ethanol löslich sind, erfasst werden. Wie Vorversuche mit den wässrigen Extrakten zeigten, wurden dabei jedoch keine relevanten Oligosaccharide in bedeutsamen Mengen ausgeschlossen.

3.4 PROFILINGMETHODE ZUR ANALYSE UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE

uGalA-OS entstehen vor allem aus hochmethylveresterten Homogalacturonanen durch den enzymatischen Abbau mit PL (vgl. Kapitel 1.4.2.3) oder durch β -Eliminierung. Folglich wurde deren Vorkommen im mechanisch-enzymatisch und im enzymatisch behandelten Karottentrester (vgl. Kapitel 3.1) erwartet. Bevor jedoch eine Profilingmethode zu deren Analyse entwickelt und validiert werden konnte, mussten entsprechende uGalA-OS als Standardsubstanzen isoliert und charakterisiert werden, da diese kommerziell nicht verfügbar waren. Das Vorgehen der Standardisolierung und -charakterisierung sowie die Entwicklung und Validierung der Profilingmethode wird in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

3.4.1 GEWINNUNG UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE AUS CITRUSPEKTIN ALS STANDARDSUBSTANZEN

Zur Gewinnung von uGalA-OS als Standardsubstanzen müssen diese zuerst gebildet werden. Dies kann entweder enzymatisch mittels PL oder chemisch durch β -Eliminierung aus Homogalacturonanen erfolgen. Aufgrund der höheren Spezifität und der damit verbundenen Bildung von weniger Nebenprodukten, empfiehlt sich die erste Variante. Als Ausgangsmaterial eignen sich Pektine mit einem hohen Anteil an gebundenen Galacturonsäuren und einem hohen DM. In Vorversuchen wurden zehn verschiedene Pektine und zwei PL in Hinblick auf eine umfangreiche Freisetzung von uGalA-OS mit möglichst wenig Nebenprodukten verglichen. Am günstigsten erwies sich die enzymatische Hydrolyse des Citruspektins Classic CU 201 mit einer kommerziell erhältlichen PL aus einem gentechnisch modifizierten Organismus (vgl. Kapitel 4.1.1). Die enzymatische Hydrolyse des Citruspektins mit PL erfolgte im großen Maßstab unter den, hinsichtlich einer maximalen Ausbeute an uGalA-OS mit verschiedenen DP optimierten, Hydrolysebedingungen (Temperatur, Zeit, Enzym:Substrat-Verhältnis). Nach thermischer Inaktivierung der PL wurde die Bildung der uGalA-OS mittels HPAEC-PAD überprüft (vgl. Arbeitsvorschrift 8.12.1). Vor der chromatographischen Isolierung der uGalA-OS ist es von Vorteil, verbleibende lösliche Polymere zu entfernen, um Interaktionen mit diesen zu vermeiden. Hierfür wurden die Hydrolysate zur Präzipitation der Polymere mit der vierfachen Menge Ethanol versetzt. Die aus dem Citruspektin enzymatisch freigesetzten uGalA-OS unterschieden sich nicht nur in ihrem DP, sondern wiesen auch verschiedene DM auf (vgl. Kapitel 4.1.1). In Vorversuchen zeigte sich, dass der PDA-Response der methylveresterten uGalA-OS bei 235 nm mit dem der entsprechenden unveresterten uGalA-OS vergleichbar ist (vgl. Kapitel 4.1.1), sodass der Fokus auf die Isolierung der unveresterten uGalA-OS gelegt wurde. Zur Spaltung der Methylester kann eine PME (vgl. Kapitel 1.4.2.3) oder eine alkalische Hydrolyse eingesetzt werden. Prinzipiell ist die enzymatische Hydrolyse aufgrund ihrer Spezifität und den milderden Reaktionsbedingen vorzuziehen. Allerdings konnte mit der zur Verfügung stehenden PME keine vollständige Entesterung erzielt werden, weshalb eine alkalische Hydrolyse mit Natronlauge durchgeführt wurde. Dabei wird die konkurrierende β -Eliminierung mit

abnehmender Temperatur zunehmend minimiert (Kravtchenko *et al.*, 1992), wie ein Vergleich der Reaktion bei 5 °C und 20 °C bestätigte. Als ideale Bedingungen für die alkalische Hydrolyse mit Natronlauge (50 mM, pH ~ 12) ergab sich eine Temperatur von 5 °C für 30 min. Das Hydrolysat wurde umgehend mit Salzsäure neutralisiert (pH ~ 5). Die alkalische Entesterung wurde auf Vollständigkeit und das Ausbleiben der Bildung von Nebenprodukten mittels UHPLC-PDA (vgl. Arbeitsvorschrift 8.12.1) überprüft.

Die präparative HPLC ermöglicht die Verwendung hochskalierter Säulen zur Trennung hoher Analytkonzentrationen in großen Probenvolumina bei hohen Flussraten. Zur Trennung von uGalA-OS eignet sich, wie in Kapitel 3.3.5.6 beschrieben, die HILIC, im Speziellen die Amidphase, welche als präparative Säule zur Verfügung stand. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 235 nm. Anhand des aufgenommenen UV-Chromatogramms wurde die Fraktionierung mittels automatisiertem 16-Wege-Ventil vorgenommen (vgl. Abbildung A - 4 im Anhang). Der zeitliche Versatz zwischen der Detektion des Analyten und dessen Ankunft im Fraktionierventil war aufgrund der hohen Flussrate (5 mL/min) und der geringen Wegstrecke vernachlässigbar. Wie in Kapitel 3.3.5.6 beschrieben, ist bei der HILIC der Zusatz von Puffersalzen zu den Eluenten üblich. Jedoch müssen diese anschließend aus den Fraktionen zum Beispiel mittels Dialyse oder Ionen-austausch aufwendig entfernt werden. Daher ist es von Vorteil, einen pufferfreien Eluenten zu wählen. Als geeignet erwies sich ein Acetonitril-Wasser-Gradient mit Zusatz von 0,2 % Ameisensäure. Die zwölf gesammelten uGalA-Fraktionen wurden anschließend getrocknet und zur vollständigen Entfernung der Ameisensäure mehrfach in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Das Vorgehen zur präparativen Isolierung der uGalA als Standardsubstanzen kann im Detail der Arbeitsvorschrift 8.12.2 entnommen werden.

3.4.2 CHARAKTERISIERUNG ISOLIERTER STANDARDSUBSTANZEN

Strukturell bestehen uGalA-OS ausschließlich aus Galacturonsäureeinheiten (vgl. Abbildung 11). Daher bot sich für eine erste Charakterisierung der zwölf isolierten uGalA-OS hinsichtlich deren Identität und Reinheit die Monosaccharidanalyse (vgl. Kapitel 3.3.5.1) an, welche auch nur sehr geringe Probenmengen erfordert. Dabei lag der Fokus auf den Galacturonsäureeinheiten, weshalb die Freisetzung der Monomereinheiten durch Methanolysen mit nachfolgender TFA-Hydrolyse erfolgte. Die freigesetzten Monosaccharide wurden anschließend mittels HPAEC-PAD mit externer Kalibrierung und 2-Desoxy-D-Glucose als IStd bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.2 und Arbeitsvorschift 8.12.3). Weitere Informationen lieferte die Analyse mittels UHPLC-PDA-MS (vgl. Kapitel 3.3.5.6), wofür ebenfalls eine geringe Menge ausreichend ist. Hierbei konnte zum einen die Molekülmasse und zum anderen die Reinheitsbestimmung mittels UV-Spektroskopie bei bestimmten Wellenlängen der einzelnen uGalA-OS ermittelt werden. Die vorherige Trennung erfolgte auf einer HILIC-Phase (Amidsäule) und zur anschließenden Detektion wurde eine ESI-MS (Single-Quadrupol-Spektrometer) im negativen Modus verwendet (vgl. Arbeitsvorschift 8.12.3). Aus den ermittelten *m/z* der Quasimolekülionen ($[M-H]^-$) konnte auf den DP der isolierten uGalA-OS geschlossen werden.

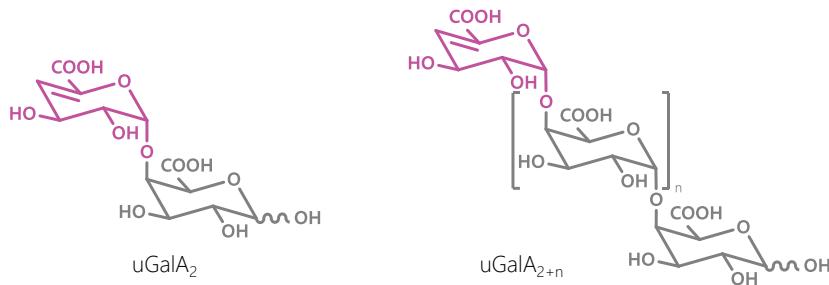


Abbildung 11: Strukturen der unveresterten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) mit einem Polymerisierungsgrad von 2 bzw. $2 + n$, $n = \text{Anzahl mittelständiger Galacturonsäureeinheiten}$, grau: gesättigte und rosa: ungesättigte D-Galactopyranuronsäure

Für eine weitere Strukturaufklärung bezüglich der Verknüpfungsstellen der monomeren Einheiten kann die Methylierungsanalyse (vgl. Kapitel 3.3.5.2) hilfreiche Informationen liefern. Jedoch ist diese für uronsäurehaltige Saccharide aufgrund eines zusätzlichen Schritts sehr aufwendig. Mittels MS^n kann durch die schrittweise Abspaltung einzelner Monosaccharideinheiten oder Substituenten wie Acetyl- oder Methylgruppen die Position von Substituenten bestimmt werden (Wefers & Bunzel, 2016a). Da die isolierten uGalA-OS jedoch linear aufgebaut sind und Methylester alkalisch entfernt wurden (vgl. Kapitel 3.4.1), liefern weder die Methylierungsanalyse noch die Analyse mittels MS^n weitere Informationen über den strukturellen Aufbau der uGalA-OS. Daher wurden die beiden Methoden zur Charakterisierung der uGalA-OS in dieser Arbeit nicht angewandt.

Zur Strukturaufklärung in Hinblick auf Konstitution und Konfiguration der Monomereinheiten in den Oligosacchariden sowie zur Reinheitsbestimmung durch absolute Quantifizierung kann die NMR eingesetzt werden. Jedoch sind zur Analyse aufgrund der geringen Empfindlichkeit größere Substanzmengen ($\geq 1 \text{ mg}$) erforderlich. Zur Strukturaufklärung empfehlen sich neben dem ein-dimensionalen ^1H -Experiment insbesondere 2D-Experimente wie *Correlated Spectroscopy* (COSY), HSQC, HSQC-*Total Correlated Spectroscopy* (TOCSY), *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) und *Heteronuclear 2-Bond Correlation* (H2BC). Die Kombination der aus den verschiedenen NMR-Spektren gewonnenen Informationen gibt weitere Einblicke in die Strukturen der Oligosaccharide. Allerdings ergeben sich Limitierungen bei der Unterscheidung linear aufgebauter Homosaccharide, wie den uGalA-OS, nach ihrem DP aufgrund einer mit dem DP zunehmenden Überlagerung von charakteristischen Signalen der mittleren Monosaccharideinheiten. Die isolierten uGalA-OS wurden zur Analyse mittels NMR in Deuteriumoxid gelöst. Dies führte einerseits zu vereinfachten ^1H -NMR-Spektren mit reduziertem Wassersignal, da die aziden Protonen der Hydroxygruppen mit Deuterium ausgetauscht und folglich bei der NMR-Messung nicht mehr erfasst wurden. Die Signale reduzierten sich somit auf die direkt an Kohlenstoff gebundenen Protonen. Andererseits konnte mit Hilfe des Signals von Deuteriumoxid (*lock signal*) die Stärke des Magnetfelds während der Messung konstant gehalten werden. Zur Referenzierung der NMR-Spektren wurde Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2,22 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 30,89 \text{ ppm}$, Gottlieb *et al.*, 1997) zugesetzt. Für die Zuordnung der Signale wurden zum einen die NMR-Spektren von monomerer Galacturonsäure und zum anderen Literaturdaten zu ungesättigten Uronsäuretrimeren (Heyraud *et al.*, 1996)

herangezogen. Das eindimensionale ^1H -NMR-Spektrum ist zur Strukturaufklärung aufgrund vieler überlagerter Signale, überwiegend Multipletts, wenig aussagekräftig. Zumeist finden sich lediglich die anomeren Protonen bei höherer chemischer Verschiebung ($\delta_{\text{H}} = 4,6 - 6,1 \text{ ppm}$) als isolierte Doublets wieder und dienen als Ausgangspunkt einer weiteren Spektreninterpretation. Aufgrund von Mutarotation im wässrigen Milieu liegen die α - und β -Anomere reduzierender Zucker, wie das reduzierende Ende der uGalA-OS, in einem Gleichgewicht nebeneinander vor und führen zu separaten Signalen in den NMR-Spektren. Dabei korreliert die vicinale Kopplung zwischen den Protonen an C1 und C2 mit dem dazwischen liegenden Diederwinkel (vgl. Abbildung 12). In Abhängigkeit von diesem leitet sich aus der Karplusgleichung für die Protonen der α -Anomere eine Kopplungskonstante ($^3J_{\text{H,H}}$) von 1 - 4 Hz und für die der β -Anomere von 6 - 10 Hz ab (Karplus, 1963).

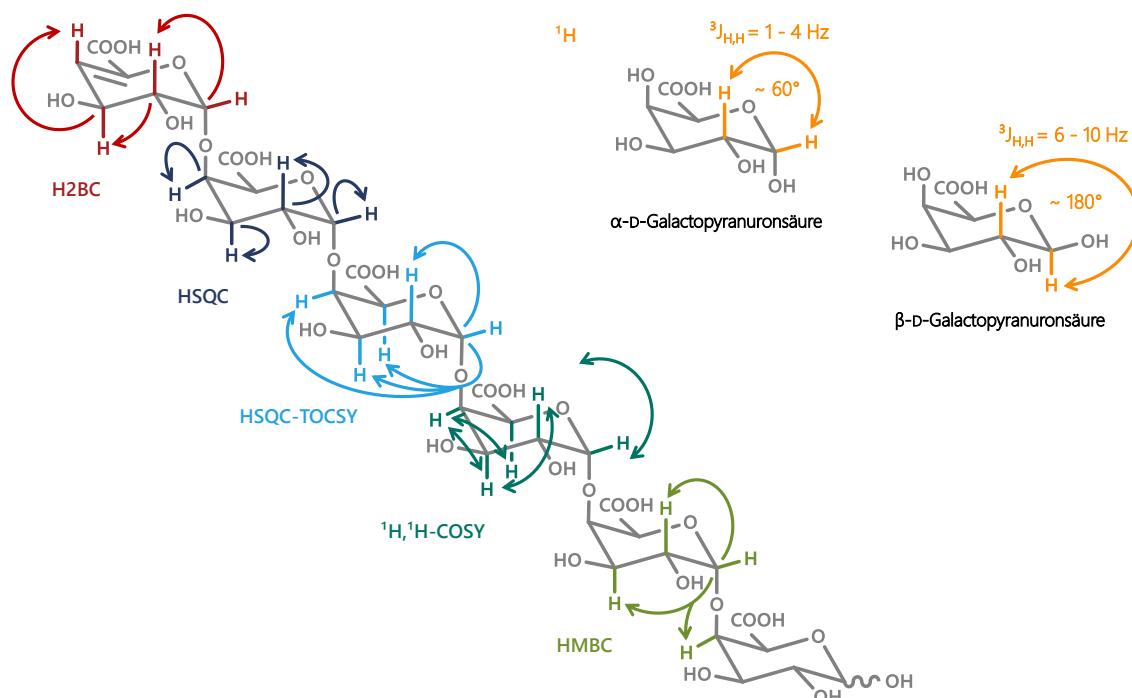


Abbildung 12: Kopplungskonstanten (3J) und Diederwinkel der α - und β -Anomere am Beispiel von D-Galactopyranuronsäure (orange) sowie die Kopplungen zwischen ausgewählten Protonen (^1H) und Kohlenstoffkernen (^{13}C) in den einzelnen Experimenten der zweidimensionalen Kernspinresonanzspektroskopie am Beispiel der ungesättigten Hexagalacturonsäure, H2BC = Heteronukleare 2-Bond Correlation (rot), HSQC(-TOCSY) = Heteronukleare Single Quantum Coherence (dunkelblau) (- Total Correlated Spectroscopy (hellblau)), COSY = Correlated Spectroscopy (türkis), HMBC = Heteronukleare Multiple Bond Correlation (grün)

Die Betrachtung der homo- bzw. heteronuklearen Korrelationen zwischen Protonen bzw. Protonen und ^{13}C -Kernen bei den 2D-Experimenten (vgl. Abbildung 12) ermöglicht eine detaillierte Strukturaufklärung. Hierbei wird durch die Auftragung der chemischen Verschiebungen der Protonen bzw. ^{13}C -Kerne (F1-Dimension) gegen die der Protonen (F2-Dimension) eine Auflösung der Signale in die zweite Dimension erreicht. Die im ^1H , ^1H -COSY-Spektrum zu sehenden Kreuzsignale können auf die Kopplung ($^3J_{\text{H,H}}$) benachbarter Protonen zurückgeführt werden. Das HSQC-Spektrum zeigt die Kopplungen ($^1J_{\text{H,C}}$) der direkt an den Kohlenstoff gebundenen Protonen und ermöglicht somit eine Differenzierung zwischen den C2 - 4/5/H2 - 4/5 der einzelnen (ungesättigten) Galacturonsäure-

einheiten. Das HSQC-TOCSY-Experiment gibt die Korrelationen zwischen allen Protonen und ^{13}C -Kernen in einem isolierten Spinsystem wieder (vgl. Abbildung 12). Da die Protonen und ^{13}C -Kerne einer jeden Monosaccharideinheit ein eigenes Spinsystem bilden, ist es möglich, die Signale der Protonen den einzelnen Monosaccharideinheiten zuzuordnen. Komplettiert wird die Strukturaufklärung durch das H2BC- und HMBC-Experiment, welche C-H-Kopplungen ($^2\text{J}_{\text{H,C}}$ / $^3\text{J}_{\text{H,C}}$) über zwei bzw. zwei und drei Bindungen hinweg erfassen (vgl. Abbildung 12). Dies ermöglicht zum einen, ausgehend von den anomeren C1/H1-Signalen, eine schrittweise Zuordnung der C2 - 4/5/H2 - 4/5 zu den übrigen Signalen (H2BC) und zum anderen eine Identifizierung benachbarter Spinsysteme basierend auf der Kopplung von Kernen über die glykosidische Bindung hinweg (HMBC).

Die NMR als zerstörungsfreie und valide Methode empfiehlt sich besonders zur Quantifizierung diverser Substanzen. Dazu sind im Gegensatz zu anderen Methoden weder entsprechende Referenzsubstanzen noch molare Extinktionskoeffizienten erforderlich. Die Intensität der Signale im ^1H -NMR-Experiment ist direkt proportional zu der Anzahl angeregter Kerne. Daher kann die Konzentrationsbestimmung entweder über eine externe Kalibrierung mit einer beliebigen Substanz oder schnell und einfach über eine IStd erfolgen. Diese sollte vollständig löslich und nicht hygroskopisch sein sowie idealerweise ein isoliertes Singulett-Signal im ^1H -NMR-Spektrum besitzen. Zudem sollte ihre Konzentration und Relaxationszeit mit dem Analyten vergleichbar sein und mit diesem keine Interaktionen eingehen (Bharti & Roy, 2012). Als IStd zur Konzentrationsbestimmung verschiedener Oligosaccharide hat sich die Verwendung von Acetanilid bewährt. Die Protonen dessen Methylgruppe führen zu einem isolierten Singulett-Signal mit geringer chemischer Verschiebung ($\delta_{\text{H}} = 2,17 \text{ ppm}$) (Steck *et al.*, 2021; Wefers & Bunzel, 2016a). Bei der Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren zur Quantifizierung muss auf eine ausreichende Relaxation der Kerne geachtet werden. Die Zeit zwischen den einzelnen Scans sollte dabei mindestens das fünffache der longitudinale Relaxationszeit der am langsamsten relaxierenden Kerne betragen. Es kann angenommen werden, dass in dieser Zeit 99 % der angeregten Kerne in den Ausgangszustand zurückgekehrt sind (Bharti & Roy, 2012). Die Quantifizierung der in dieser Arbeit isolierten uGalA-OS erfolgte mit Acetanilid als IStd über das isolierte H1-Signal (Dublett) der ersten Galacturonsäureeinheit neben dem nicht-reduzierenden Ende im ^1H -NMR-Spektrum. Da im Falle des Di- und Trimers eine Quantifizierung über dieses H1-Signal nicht möglich war (vgl. Kapitel 4.1.2), wurde die Konzentration dieser beiden uGalA-OS über das H1-Signal (Dublett) des α -Anomers der reduzierenden Galacturonsäureeinheit, unter Berücksichtigung des Gleichgewichts der Anomere (α/β), bestimmt. Aus der Einwaage und der mittels NMR absolut bestimmten Konzentration wurde die Reinheit der einzelnen uGalA-OS berechnet. Das genaue Vorgehen kann der Arbeitsvorschrift 8.12.3 entnommen werden.

3.4.3 ENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG DER PROFILINGMETHODE MITTELS UHPLC-PDA(-MS)

Das Ziel der Profilingmethode ist es, den Gehalt an uGalA-OS in den isolierten NLBS-Faktionen des (un)behandelten Karottentresters (vgl. Kapitel 3.3.4) getrennt nach DP bestimmen zu können. Zusätzlich waren Informationen über den Veresterungsgrad der einzelnen uGalA-OS in Hinblick auf mögliche Veränderungen in den funktionellen Eigenschaften im Zuge der Behandlung von Interesse. Daher wurde die Profilingmethode zweigleisig aufgezogen (vgl. Abbildung 13). Ein Ansatz ermöglicht die Quantifizierung der uGalA-OS nach ihrem DP und ein zweiter Ansatz die Analyse der Anzahl an veresterten Carboxygruppen innerhalb eines DP. Für die Untersuchung hinsichtlich des DP empfiehlt sich eine hydrolytische Abspaltung der Ester vor der chromatographischen Trennung, um die Anzahl der uGalA-OS pro DP auf eines zu reduzieren und damit die nachfolgende chromatographische Trennung zu erleichtern. In der Profilingmethode angewandt wird die alkalische Hydrolyse mit Natronlauge. Dabei ist es neben der exakten pH-Wert-Einstellung wichtig auf milde Reaktionsbedingungen ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min) und eine umgehende Neutralisation zu achten, um den Ablauf unerwünschter Abbaureaktionen zu minimieren (vgl. Kapitel 3.4.1). Für die Abschätzung der Anzahl an veresterten Carboxygruppen können die vorliegenden uGalA-OS direkt analysiert werden. Zur Trennung der (un)veresterten uGalA-OS bot sich die HILIC, im Speziellen die Amidphase, auf einer UHPLC-Anlage (vgl. Kapitel 3.3.5.6) an. Das Gradientenprogramm wurde ausgehend von dem von Leijdekkers und Mitarbeitenden (2011) beschriebenen auf die unveresterten bzw. veresterten uGalA-OS angepasst. Als Detektoren wurden der PDA und die MS eingesetzt. Mit Ersterem können die einzelnen uGalA-OS über deren Absorption bei 235 nm (Leijdekkers *et al.*, 2011) mittels im Zuge der Methodenvalidierung ermittelte RRF quantifiziert werden. Die Identifizierung der unveresterten uGalA-OS erfolgt dabei über die RRT der entsprechenden Signale im PDA (vgl. Kapitel 4.1.3) bezogen auf eine IStd (Acarbose). Im Zweifelsfall kann das Ergebnis mittels MS abgesichert werden. Zur Identifizierung der veresterten uGalA-OS hingegen ist die MS als zweiter Detektor wegen fehlender Standardsubstanzen und möglichen Coelutionen aufgrund der Vielzahl an Analyten obligatorisch. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, wird mittels SIM gezielt nach den in der ESI im negativen Modus erzeugten Ionen der (un)veresterten uGalA-OS gesucht.

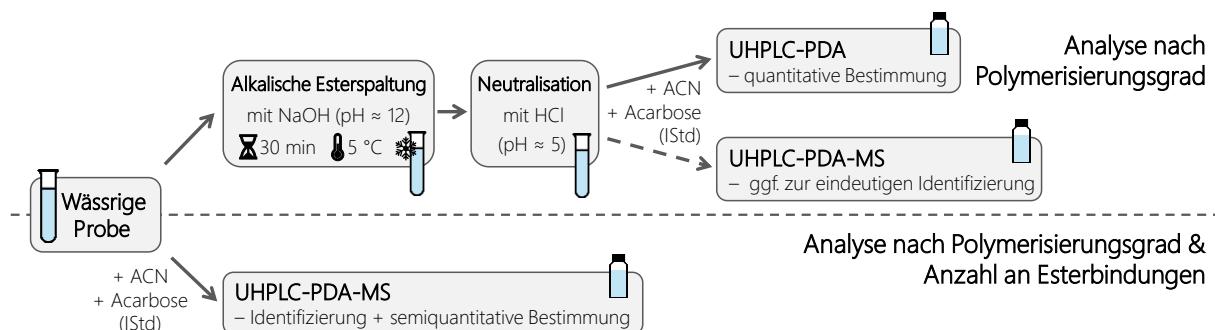


Abbildung 13: Schema der Profilingmethode zur Analyse (un)veresterter ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) gekoppelt mit Photodiodenarraydetektion (PDA) und Massenspektrometrie (MS), NaOH = Natronlauge, HCl = Salzsäure, ACN = Acetonitril, IStd = interne Standardsubstanz

Die Validierung der UHPLC-PDA-Profilierungsmethode zur Bestimmung unveresterter uGalA-OS umfasste neben der Ermittlung der RRF die Bestimmung und Überprüfung gängiger Parameter wie Linearität, Nachweisgrenze (engl. *Limit of Detection*, LOD), Bestimmungsgrenze (engl. *Limit of Quantification*, LOQ), Präzision, Richtigkeit und Robustheit. Bei der Herstellung der Standardlösungen der isolierten uGalA-OS wurde die mittels NMR bestimmte Reinheit nur für die uGalA-OS mit einer ermittelten Reinheit von unter 90 % (DP = 2, 3 und 11, vgl. Kapitel 4.1.2) berücksichtigt. Die Messungen der kürzerkettigen uGalA-OS (DP = 2 - 10) erfolgten jeweils aus einem Standardmix, während die längerkettigen uGalA-OS (DP = 11 - 13) aufgrund einer geringeren Löslichkeit separat gemessen wurden. Die Konzentrationsbestimmung über RRF bietet den Vorteil, dass nicht für jede Messreihe erneut kalibriert werden muss und somit weniger von aufwendig isolierten oder teuren Standardsubstanzen benötigt wird. Jedoch ist der Einsatz einer IStd notwendig, die aber zusätzlich zum Ausgleich von Messunsicherheiten genutzt werden kann. Diese IStd sollte chromatographisch von den Analyten getrennt werden können, UV-aktiv (235 nm), löslich in 50%igem Acetonitril, kommerziell verfügbar und preiswert sein sowie nicht nativ in Pflanzen vorkommen. Weiter sollte die IStd so konzentriert werden, dass die Absorption mit der der uGalA-OS im mittleren Konzentrationsbereich (50 µM) vergleichbar ist. Als IStd für die Profilierungsmethode wurde Acarbose, ein Pseudotetrasaccharid mikrobiellen Ursprungs, ausgewählt und den Messlösungen in einer Konzentration von 1 mM zugegeben. Die Struktur von Acarbose mit der für die UV-Absorption verantwortlichen hervorgehobenen Doppelbindung ist in Abbildung 14 dargestellt. Zur Bestimmung der RRF wurden pro uGalA-OS drei unabhängig voneinander pipettierte Kalibrierreihen (65 - 190 µM (dimeres uGalA) bzw. 10 - 100 µM) unter Zusatz von Acarbose (1 mM) mittels UHPLC-PDA gemessen. Anschließend wurde das Produkt aus der Konzentration eines jeden uGalA-OS und der Fläche des Signals von Acarbose gegen das Produkt aus der Konzentration von Acarbose und der Fläche des Signals des entsprechenden uGalA-OS aufgetragen. Die Steigung der daraus resultierenden Ursprungsgeraden entspricht dem RRF. Die Linearität wurde mittels Mandeltest und die Präzision anhand der Dreifachbestimmung überprüft bzw. berechnet. Die LOD und LOQ wurden für alle uGalA-OS durch Injektion absteigender Konzentrationen ($\leq 21 \mu\text{M}$) ermittelt. Dabei sollte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis an der LOD 3:1 und an der LOQ 10:1 betragen. Nach Bestimmung von LOD und LOQ wurden zur Verifizierung dieser zwei weitere Standardlösungen mit entsprechender Konzentration mittels UHPLC-PDA gemessen. Die Richtigkeit der Profilierungsmethode wurde dreifach für alle uGalA-OS aus Matrix und aus wässriger Lösung, dotiert mit je 200 µM uGalA-OS, nach Verdünnung bestimmt. Dabei diente die im Wässrigen isolierte NLBS-Faktion des unbehandelten Karottentresters (vgl. Kapitel 3.3.4), welche nachweislich keine uGalA-OS enthielten, als Matrix. Die Konzentration wurde über die zuvor bestimmten RRF ermittelt und in Bezug zu der aus der Einwaage berechneten Konzentration gesetzt. Aus den Messergebnissen der Dreifachbestimmung zur Ermittlung der Richtigkeit ließ sich außerdem die Methodenpräzision ableiten.

Die entwickelte und validierte Profilierungsmethode wurde zur Analyse von uGalA-OS in den NLBS-Faktionen des unbehandelten sowie enzymatisch-, mechanisch- und mechanisch-enzymatisch

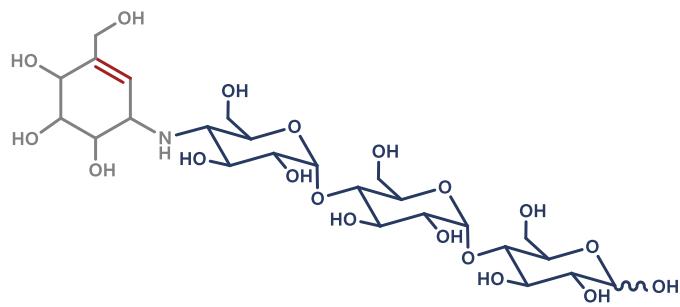


Abbildung 14: Struktur der internen Standardsubstanz Acarbose, blau: D-Glucopyranose, rot: für Absorption bei 235 nm verantwortliche Doppelbindung an modifizierter Monosaccharideinheit (grau)

behandelten Karottentresters eingesetzt. Hierbei wurde sowohl die Verteilung nach DP bestimmt als auch die Anzahl an Methylestern innerhalb eines DP analysiert. Das genaue Vorgehen kann der Arbeitsvorschrift 8.11.2.2 entnommen werden.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nachfolgend wird zuerst auf die Standardisolierung und -charakterisierung der uGalA-OS sowie die Entwicklung und Validierung der Profilingmethode mit diesen eingegangen. Anschließend werden die Eignung der AOAC-Methode zur Bestimmung der NLBS betrachtet und die Ergebnisse der Charakterisierung der Enzympräparate sowie der Erbsenschale und des Karottentresters vor und nach einer mechanischen und/oder enzymatischen Behandlung vorgestellt.

4.1 PROFILINGMETHODE ZUR ANALYSE UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGO-SACCHARIDE

4.1.1 GEWINNUNG UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE AUS CITRUSPEKTIN ALS STANDARDSUBSTANZEN

Das zur Gewinnung der uGalA-OS eingesetzte Citruspektin (Classic CU 201) wurde hinsichtlich seiner Monomerzusammensetzung, dem absoluten Gehalt an Uronsäuren und dem Veresterungsgrad (DM und DAc) untersucht. Die Monosaccharidzusammensetzung des Citruspektins nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse (vgl. Abbildung A - 5 im Anhang) legte nahe, dass dieses überwiegend aus den aus Galacturonsäureeinheiten (54 mol%) aufgebauten Homogalacturonanen bestand. Der nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973) bestimmte Gehalt an Uronsäuren, vermutlich hauptsächlich Galacturonsäure, des Citruspektins lag in Einklang mit den Herstellerangaben (88 %) bei 79 %. Weiter wurde nach Müller-Maatsch und Mitarbeitenden (2014) ein DM von 69 % (Hersteller: 72 %) und ein DAc von 1,7 % bestimmt. Folglich war das galacturonsäurereiche, hochmethylveresterte Citruspektin ein ideales Substrat für den enzymatischen Abbau mittels PL (vgl. Kapitel 1.4.2.3). Die eingesetzte PL besaß auch eine PG-Aktivität (vgl. Kapitel 4.3), die jedoch aufgrund ihrer Spezifität bei der Hydrolyse des hochmethylveresterten Citruspektins stark unterdrückt wurde. Dies zeigte sich bei der Analyse eines entsprechenden PL-Hydrolysats mittels HPAEC-PAD. Hierbei wurden gesättigte GalA-OS nur in geringem Umfang detektiert, während vorrangig uGalA-OS mit einem DP von zwei bis sechzehn vorlagen (vgl. Abbildung A - 6 im Anhang). Jedoch wurden durch Präzipitation der polymeren Bestandteile in 80%igem Ethanol die längerkettigen uGalA-OS partiell ($DP = 10 - 13$) bzw. vollständig ($DP > 13$) mit entfernt. Da die spätere Analyse der uGalA-OS aus den NLBS-Fraktionen des Karottentresters, welche nach Präzipitation in 80%igem Ethanol isoliert wurden, erfolgen sollte, wurden die längerkettigen uGalA-OS ($DP > 13$) bei der Standardisolierung nicht weiter berücksichtigt. Das Produktspektrum der PL wurde hinsichtlich der Anzahl an Methylester mittels UHPLC-PDA-MS auf einer Amidphase genauer analysiert. Dabei konnten uGalA-OS mit einem DP von zwei bis zwölf mit mindestens einer freien und ab einem DP von drei mit mindestens zwei methylveresterten Carboxygruppen detektiert und über ihr m/z eindeutig identifiziert werden (vgl. Kapitel 4.1.3). Als Hauptprodukt konnte das Tetramer, gefolgt vom Penta- und Hexamer, mit je einer freien Carboxygruppe identifiziert werden. Auch von den übrigen uGalA-OS ($DP = 3, 7 - 12$) dominierte jeweils das

Oligosaccharid mit einer freien Carboxygruppe. Zur Bestimmung der Position der freien Carboxygruppe wurde das PL-Hydrolysat chromatographisch ohne Puffersalze getrennt, das Eluat während der Elution des Tetramers aufgefangen und anschließend mittels Orbitrap durch Direktinjektion nach Ionisierung mittels ESI im negativen Modus analysiert. Bei der Fragmentierung mit -10 eV entstanden die charakteristischen C-Fragmente nach Domon und Costello (1988), die darauf hinwiesen, dass sich die freie Carboxygruppe am nicht-reduzierenden ungesättigten Ende befand (vgl. Abbildung A - 7 im Anhang). Die eingesetzte PL besaß demzufolge vermutlich, anders als von van Alebeek und Mitarbeitenden (2002) für die von Ihnen untersuchte PL beschrieben (vgl. Kapitel 1.4.2.3), an der Bindungsstelle +1 eine höhere Affinität gegenüber einer freien als einer methylveresterten Carboxygruppe.

Um den Einfluss freier bzw. methylveresterter Carboxygruppen auf den Response bei 235 nm einschätzen zu können, wurde ein Teil des isolierten Tetramers zur Abspaltung der Methylester alkalisch behandelt. Anschließende photometrische Tests zeigten, dass der Response bei 235 nm zwischen dem veresterten und dem unveresterten Tetramer vergleichbar war. Weiter konnte festgestellt werden, dass der Response von einem veränderten Anteil an Acetonitril (20 - 70 %) im Lösungsmittel sowie von vorhandenen (Puffer-)Salzen nicht beeinflusst wurde. Folglich kann zur Bestimmung von veresterten uGalA-OS der RRF entsprechender unveresterter uGalA-OS herangezogen werden. Dies reduzierte die Anzahl an erforderlichen Standardsubstanzen enorm. Außerdem lag in dieser Arbeit der Fokus auf der Bestimmung des Anteils an uGalA-OS entsprechend ihres DP, weshalb deren Quantifizierung über entsprechende Standardsubstanzen der unveresterten uGalA-OS als ausreichend angesehen wurde.

In dieser Arbeit konnten nach alkalischer Hydrolyse zur Spaltung der Methylester und präparativer Isolierung (vgl. Kapitel 3.4.1) zwölf uGalA-OS als Standardsubstanzen gewonnen werden. Die Ergebnisse ihrer Strukturcharakterisierung und Reinheitsbestimmung werden im Folgenden beschrieben.

4.1.2 CHARAKTERISIERUNG ISOLIERTER STANDARDSUBSTANZEN

Anhand der gemessenen *m/z* konnten den zwölf isolierten uGalA-OS DP von zwei bis dreizehn zugeordnet werden (vgl. Tabelle 1). Die Monomerzusammensetzung (vgl. Abbildung A - 5 im Anhang) der zwölf uGalA-OS nach saurer Hydrolyse zeigte, dass die isolierten uGalA-OS mit einem DP von 3, 6 - 10, 12 und 13 erwartungsgemäß ausschließlich aus Galacturonsäure bestanden. Das Tetra- und Pentamer wiesen daneben geringere molare Anteile an Glucose (< 7 mol%) und das Undecamer an Glucose, Xylose und Arabinose (je < 3 - 6 mol%) auf. Auffällig war das isolierte Dimer, welches lediglich aus 20 mol% Galacturonsäure bestand. Diese Ergebnisse deuten auf eine Verunreinigung der vier genannten isolierten uGalA-OS mit anderen Mono- und/oder Oligosacchariden hin. Diese könnten entweder aus dem Citruspektin stammen und wurden im Zuge der Isolierung nicht vollständig abgetrennt oder könnten durch eine Kontamination eingetragen worden sein.

Tabelle 1: Identität und Reinheit der isolierten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) bestimmt mittels Massenspektrometrie bzw. Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarraydetektor (PDA) bei 235 nm und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), uGalA_{2, 3, ...} = uGalA-OS mit Polymerisierungsgrad von 2, 3, ..., m/z = Masse-zu-Ladungsverhältnis

UGALA-OS	m/z	QUASI-MOLEKÜLION	REINHEIT / %		VERUNREINIGUNG MIT ANDEREN UGALA-OS
			PDA (235 nm)	NMR	
uGalA ₂	351,0		100	44	-
uGalA ₃	527,0	[M-H] ⁻	100	86	-
uGalA ₄	703,1		100	94	-
uGalA ₅	879,1 / 439,1		98	90	uGalA ₄
uGalA ₆	1055,1 / 527,2	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	99	96	uGalA ₄ + uGalA ₅
uGalA ₇	1231,9 / 615,3		96	94	uGalA ₄ - uGalA ₆
uGalA ₈	1408,8 / 703,3		96	95	uGalA ₄ - uGalA ₇
uGalA ₉	791,3		96	97	uGalA ₅ - uGalA ₈
uGalA ₁₀	879,4	[M-2H] ²⁻	95	94	uGalA ₆ - uGalA ₉
uGalA ₁₁	967,4		94	82	uGalA ₆ - uGalA ₁₀
uGalA ₁₂	1055,5 / 703,3	[M-2H] ²⁻ / [M-3H] ³⁻	95	92	uGalA ₆ - uGalA ₁₁
uGalA ₁₃	1143,6 / 762,1		90	97	uGalA ₆ - uGalA ₁₂

Die Analyse mittels 1D- und 2D-NMR ermöglichte eine Unterscheidung des ungesättigten nicht-reduzierenden Endes ($\delta_{\text{H}1-4} = 7,2 - 7,5 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}1-4} = 122,9 - 129,8 \text{ ppm}$), der Galacturonsäureeinheit neben dem nicht-reduzierenden Ende ($\delta_{\text{H}1} = 6,1 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}1} = 112,2 \text{ ppm}$), den übrigen mittleren Galacturonsäureeinheiten ($\delta_{\text{H}1} = 5,1 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}1} = 100,5 \text{ ppm}$) sowie dem reduzierenden Ende (α : $\delta_{\text{H}1} = 5,4 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}1} = 92,9 \text{ ppm}$; β : $\delta_{\text{H}1} = 4,7 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{C}1} = 96,9 \text{ ppm}$). Eine Differenzierung der Protonen der ungesättigten Einheit war aufgrund überlagerter H1 - H4- und C1H1 - C4H4-Signale nicht möglich. Hinsichtlich der verschiedenen mittleren Galacturonsäureeinheiten kam es unter anderem zur Überlagerung der einzelnen H1- und C1H1-Signale, weshalb es mittels NMR nicht möglich war, Verunreinigungen mit uGalA-OS eines anderen DP zu erkennen. Im Falle des Dimers ist das reduzierende Ende gleichzeitig die Galacturonsäureeinheit neben dem nicht-reduzierenden Ende. Daher war im ¹H-NMR-Spektrum das H1-Signal (α) des reduzierenden Endes des Dimers im Vergleich zu denen der anderen uGalA-OS bei einer höheren chemischen Verschiebung ($\delta_{\text{H}1} = 5,8 \text{ ppm}$) zu finden (vgl. Abbildung A - 9 im Anhang). In Abbildung 15 sind exemplarisch die ¹H- und HSQC-NMR-Spektren der ungesättigten Hexagalacturonsäure mit den identifizierten H1 - H4/5- und C1H1 - C4/5H4/5-Signalen der unterschiedlichen Galacturonsäureeinheiten dargestellt. Als isoliertes charakteristisches Signal im ¹H-NMR-Spektrum wurde zur absoluten Quantifizierung der uGalA-OS (DP = 4 - 13) das isolierte Dublett des H1 der Galacturonsäureeinheit neben dem ungesättigten nicht-reduzierenden Ende ausgewählt (vgl. Abbildung A - 9 im Anhang). Im Dimer entspricht dieses Dublett dem H1-Signal (α -Anomer) des reduzierenden Endes. Die Quantifizierung des Trimers erfolgte, wie beim Dimer, über das H1-Signal (α -Anomer) des reduzierenden Endes, da dieses das einzige isoliert vorliegende Dublett im ¹H-NMR-Spektrum darstellte. Bei der Quantifizierung über das α -Anomer ist es notwendig, das Gleichgewicht der

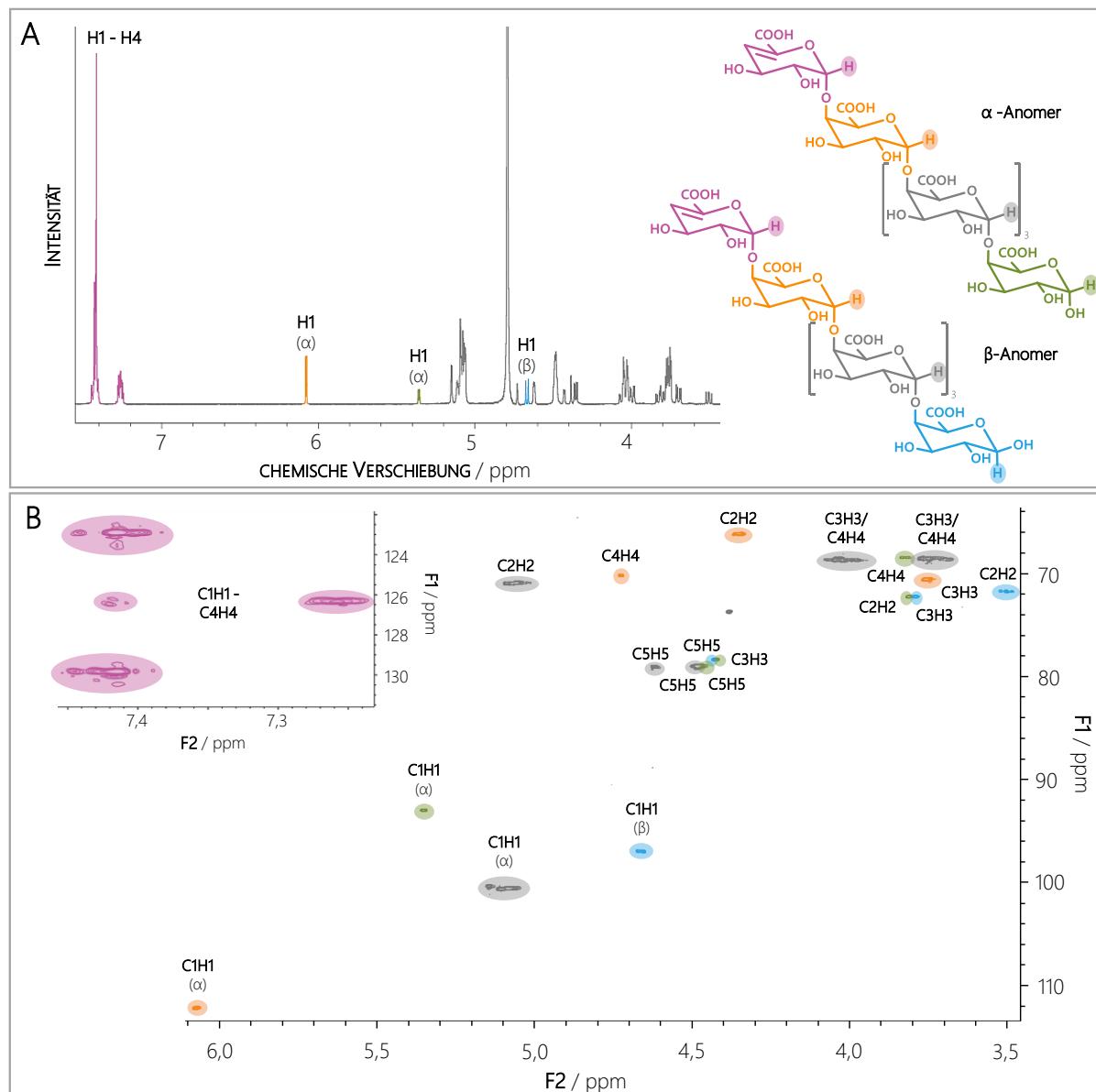


Abbildung 15: Mittels Kernspinresonanzspektroskopie aufgenommenes und mittels Aceton referenziertes ($\delta_H = 2,22 \text{ ppm}$; $\delta_C = 30,89 \text{ ppm}$) ^1H - (A) und *Heteronuclear Single Quantum Coherence*-Spekturm (B) mit identifizierten H1 - H4/5- bzw. C1H1 - C4/5H4/5-Signalen der isolierten ungesättigten Hexagalacturonsäure sowie die Struktur ihres α - und β -Anomers mit hervorgehobenen H1-Atomen (A), farblich hervorgehoben sind Signale und Strukturen der ungesättigten Galacturonsäureeinheit (rosa), der Galacturonsäureeinheit neben dem ungesättigten nicht-reduzierenden Ende (orange), der mittleren Galacturonsäureeinheiten (grau) und der reduzierenden Galacturonsäureeinheit (grün (α -Anomer) bzw. blau (β -Anomer))

Anomere (α/β) zu berücksichtigen. Da sowohl im ^1H -NMR-Spektrum des Dimers als auch in dem des Trimers das H1-Signal des korrespondierenden β -Anomers überlagert war, wurde das Verhältnis der H1-Signale des α - zum β -Anomer aus den ^1H -NMR-Spektren der anderen isolierten uGalA-OS (DP = 4 - 13) abgeleitet. So lagen die einzelnen uGalA-OS im Gleichgewicht in etwa zu 43 % als α -Anomer und 57 % als β -Anomer vor. Die mittels NMR bestimmte Reinheit war für die meisten uGalA-OS $\geq 90\%$, für das Trimer und Undecamer $\geq 82\%$ und für das Dimer lag sie lediglich bei 44 %. Die mittels NMR bestimmte Reinheit der zwölf uGalA-OS steht mit den Ergebnissen der Monosaccharidzusammensetzung im Einklang.

Bei der Reinheitsbestimmung mittels UV-Detektion bei 235 nm nach chromatographischer Trennung werden nur Verunreinigungen mit anderen im gleichen Wellenlängenbereich absorbierenden Substanzen erfasst, während beispielweise gesättigte neutrale und saure Mono- und Oligosaccharide nicht detektiert werden können. Jedoch ist der Nachweis von Verunreinigungen mit kürzer- und/oder längerkettigen uGalA-OS möglich, weshalb die UV-spektroskopische Reinheitsbestimmung als Ergänzung zur Reinheitsbestimmung mittels NMR gesehen werden sollte. Der Grad der Verunreinigung mit anderen uGalA-OS nahm mit steigendem DP zu. Dennoch war die UV-spektroskopisch bestimmte Reinheit aller zwölf isolierten uGalA-OS $\geq 90\%$ und für die meisten sogar $\geq 95\%$. Die spektroskopisch mittels UV und NMR ermittelte Reinheit der einzelnen isolierten uGalA-OS können der Tabelle 1 entnommen werden.

Die isolierten und charakterisierten uGalA-OS wurden zur Entwicklung und Validierung einer Profilingmethode zur Analyse von uGalA-OS verwendet. Die Ergebnisse hierzu werden im Weiteren vorgestellt.

4.1.3 ENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG DER PROFILINGMETHODE MITTELS UHPLC-PDA(-MS)

Die Entwicklung der Profilingmethode zur Analyse von uGalA-OS unterteilt sich in die chromatographische Methode und die vorherige alkalische Hydrolyse. Die Ergebnisse hierzu werden nachfolgend mit Augenmerk auf die wichtigsten Parameter vorgestellt. Die chromatographische Trennung der uGalA-OS wurde auf einer Amidphase entwickelt. Als Elutionsmittel kamen dabei Gemische aus Wasser und Acetonitril zum Einsatz, welchen für eine bessere Trennung der uGalA-OS Ameisensäure und Ammoniumformiat zugesetzt wurden (vgl. Kapitel 3.3.5.6). Je mehr Carboxygruppen methylverestert vorliegen, desto geringer ist die Polarität der entsprechenden uGalA-OS und desto früher eluieren diese. Aufgrund des unterschiedlichen Elutionsverhaltens der veresterten und unveresterten uGalA-OS wurden daher, unter anderem im Hinblick auf eine kürzere Analysenzeit, zwei verschiedene Gradientenprogramme entwickelt. Das eine Gradientenprogramm (vgl. Tabelle V - 15 in Arbeitsvorschrift 8.11.2.2) ermöglicht eine vollständige Trennung der zwölf unveresterten uGalA-OS (DP = 2 - 13) und der IStd Acarbose innerhalb von 43 min (vgl. Abbildung 16). Hinsichtlich der veresterten uGalA-OS gestaltete sich eine vollständige Trennung wegen der Vielzahl an Analyten, bedingt durch die Methyleneester, schwierig. Mit dem entsprechend entwickelten Gradientenprogramm (vgl. Tabelle V - 16 in Arbeitsvorschrift 8.11.2.2) konnten die dominierenden uGalA-OS des Citruspektins nach Hydrolyse mit PL (vgl. Kapitel 3.4.1) in 64 min vollständig getrennt werden, während die der längerkettigen uGalA-OS (DP ≥ 7) partiell coeluierten. Jedoch konnten diese aufgrund verschiedener *m/z* mit Hilfe der MS differenziert werden. So können mit diesem Gradientenprogramm veresterte uGalA-OS bis zu einem DP von 12 (partiell) getrennt und in Verbindung mit MS als Detektor eindeutig identifiziert werden (vgl. Abbildung 17 auf Seite 62). Da für eine quantitative Bestimmung über die RRF der entsprechenden unveresterten uGalA-OS (vgl. Kapitel 3.4.3) eine vollständige Trennung der einzelnen veresterten uGalA-OS erforderlich ist, ist dies je nach vorliegendem veresterten uGalA-OS nur begrenzt möglich. Bei der Anwendung der Profilingmethode im Rahmen dieser Arbeit war dies keine

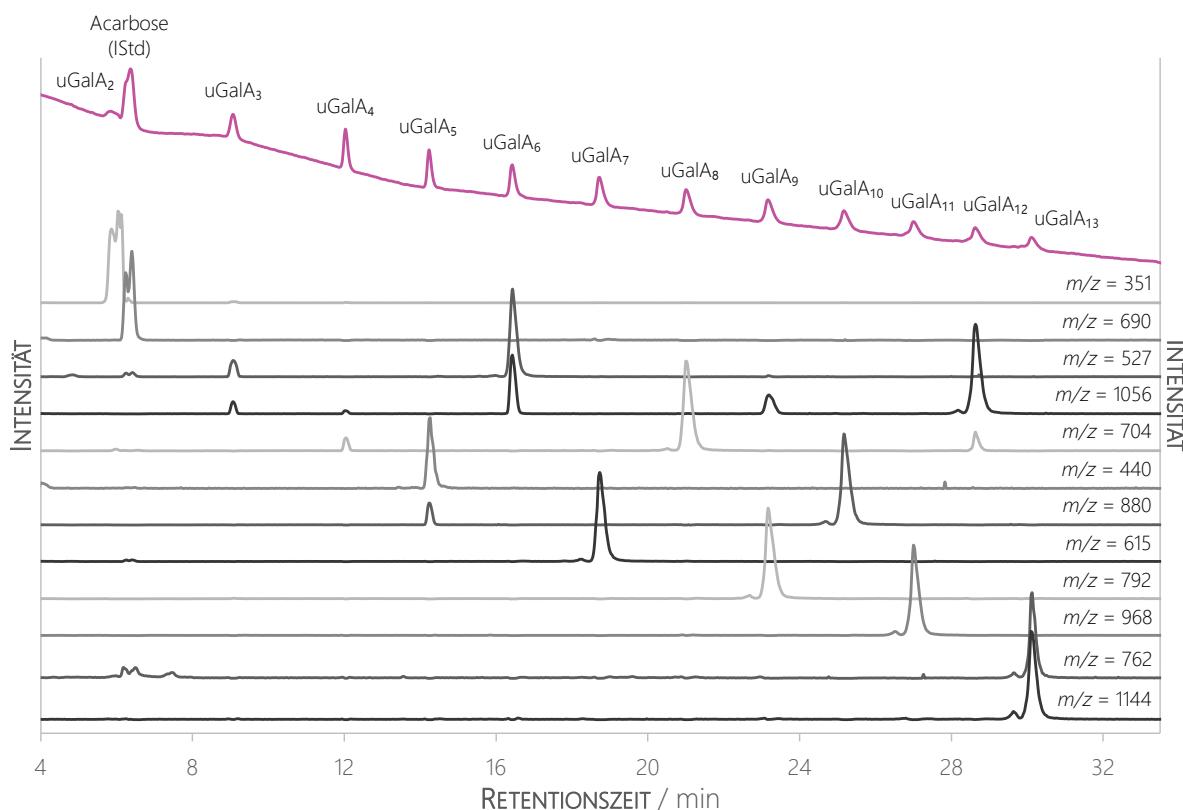


Abbildung 16: Ausschnitt der chromatographischen Trennung der isolierten unveresterten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) mit der entwickelten Profilingmethode mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Photodiodenarraydetektor (PDA) und Massenspektrometrie im **Selected Ion Monitoring (SIM)-Modus**, pink: PDA-Chromatogramm bei 235 nm, grau: SIM-Spuren der verschiedenen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z), $u\text{GalA}_{2,3\dots} = u\text{GalA-OS}$ mit Polymerisierungsgrad von 2, 3, ..., IStd = interne Standardsubstanz

grundlegende Einschränkung, da eine qualitative Analyse veresterter uGalA-OS ausreichend war (vgl. Kapitel 4.4.2.3.3).

Zu Beginn der Gradientenprogramme weist das Elutionsmittel einen Anteil von 72 - 80 % Acetonitril auf. Dieser wird im Verlauf des Gradienten sukzessive reduziert, um durch den steigenden Wasseranteil die Elution der uGalA-OS zu erreichen. Idealerweise sollte die zu analysierende Probe den gleichen Acetonitrilgehalt aufweisen wie die anfängliche Zusammensetzung des Elutionsmittels, um eine Präzipitation von Analyten und/oder Matrixbestandteilen vor und/oder auf der Säule zu vermeiden. Dies könnte wiederum zu breiteren Signalen und damit einer geringeren Auflösung führen. Es wurden daher Mischungen der uGalA-OS in 30 bis 70%igen Acetonitril hergestellt, diese mittels UHPLC-PDA analysiert und die Trennung sowie die Flächen der Signale verglichen. Dabei zeigte sich anhand abnehmender Signalläden, dass es ab einem Anteil von 60 % Acetonitril in der Probelösung zu einer (partiellen) Präzipitation der längerkettigen uGalA-OS kam. Um alle uGalA-OS (DP = 2 - 13) zu erfassen, erwies sich ein Anteil von 50 % Acetonitril in der Probelösung als geeignet. Die Trennung selbst blieb von dem Acetonitrilanteil in der Probelösung unbeeinflusst.

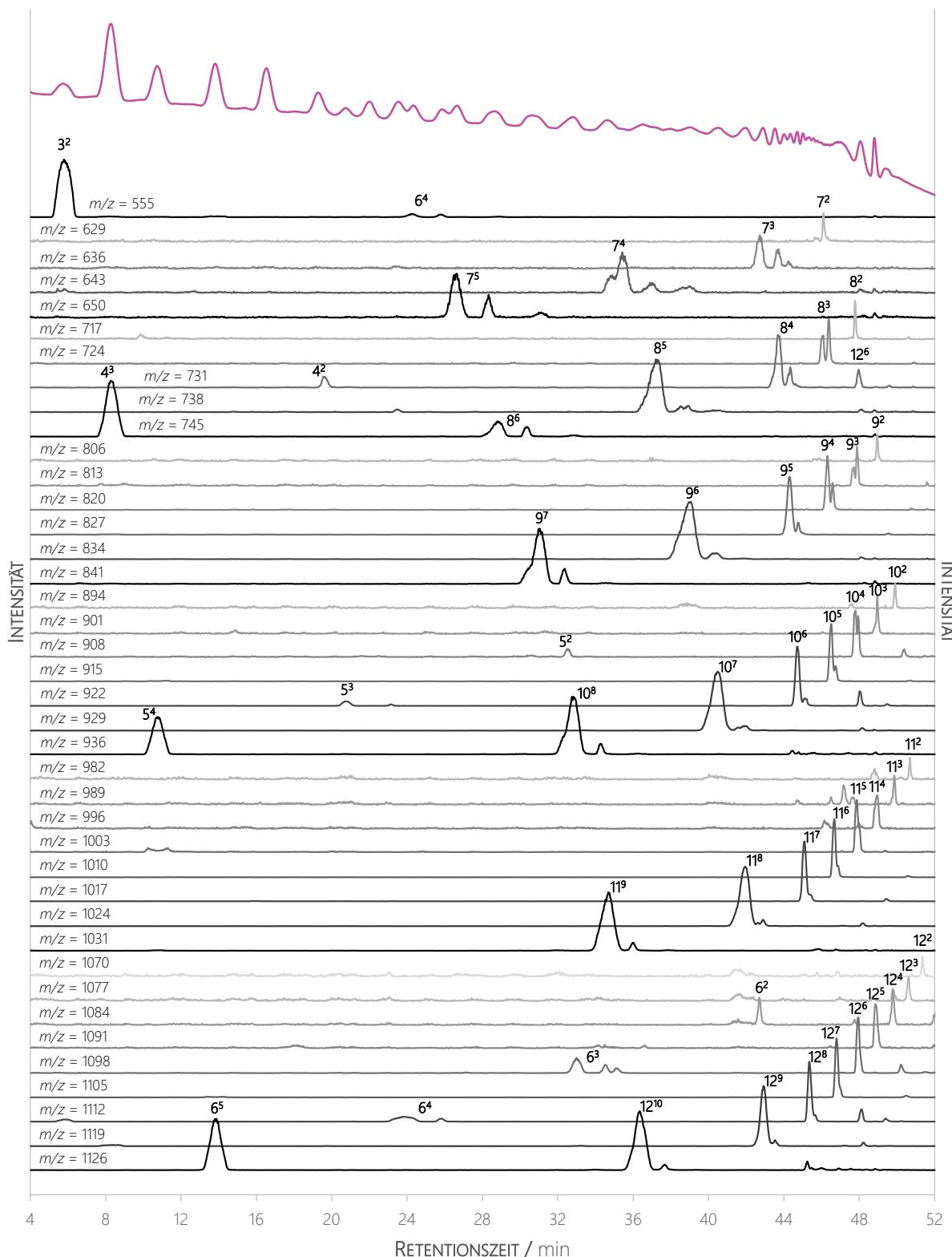


Abbildung 17: Chromatogrammausschnitt der Analyse der vereesterten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) im Citruspektin nach enzymatischer Hydrolyse mittels Pektinlyase und Präzipitation in 80%igem Ethanol mit der entwickelten Profilingmethode mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Photodiodenarraydetektor (PDA) und Massenspektrometrie im **Selected Ion Monitoring (SIM)-Modus**, pink: PDA-Chromatogramm bei 235 nm, grau: SIM-Spuren der verschiedenen Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), 3, 4, ... = uGalA-OS mit Polymerisierungsgrad von 3, 4, ..., $^{2,3} \dots$ = Anzahl der Methylester

Neben Elutionsmittel und Lösungsmittel hat auch die Temperatur der Trennsäule einen Einfluss auf die Trennung. So kann eine erhöhte Temperatur unter anderem eine Auftrennung der Anomere reduzierender Zucker wie uGalA-OS unterbinden (vgl. Kapitel 3.3.5.6). Zur Festlegung der optimalen Temperatur wurde das PL-Hydrolysat des Citruspektins (vgl. Kapitel 3.4.1) bei 35, 40, 45 bzw. 50 °C mittels UHPLC-PDA analysiert und die Trennung anhand der resultierenden Signale miteinander verglichen. Zu beobachten war, dass die Signale mit steigender Temperatur schmäler wurden und zunehmend weniger Schultern aufwiesen (vgl. Abbildung A - 8 im Anhang). Es wird angenommen, dass, anders als von Leijedekkers und Mitarbeitende (2011) beschrieben, bei 35 °C und 40 °C die Anomere der uGalA-OS partiell getrennt wurden. Um möglichst schmale Signale und damit eine hohe Auflösung zu erhalten, wurde die Temperatur zur chromatographischen Trennung auf 50 °C festgelegt.

Zur Vermeidung von Abbaureaktionen wie der β -Eliminierung sollte die alkalische Hydrolyse zur Abspaltung aller Methylester unter möglichst milden Bedingungen durchgeführt werden. Um geeignete Bedingungen zu finden, wurde das Produktspektrum nach alkalischer Hydrolyse der aus Citruspektin mittels Hydrolyse mit PL gebildeten uGalA-OS (vgl. Kapitel 3.4.1) bei verschiedenen Temperaturen (5 und 20 °C), Zeiten (30 und 120 min) und Konzentrationen an Natronlauge (20 - 60 mM) verglichen. Eine vollständige Verseifung ohne eine zu beobachtende Bildung von anderen Abbauprodukten wurde mit 50 mM Natronlauge bei 5 °C für 30 min erreicht. Zudem war eine umgehende Neutralisation mit Kontrolle des pH-Werts entscheidend. Hierbei galt es zu berücksichtigen, dass je nach Grad der Methylveresterung die zur Neutralisation erforderliche Menge an Salzsäure variierte. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass die Probelösungen nach der alkalischen Hydrolyse keinen erhöhten Temperaturen ausgesetzt werden, da dadurch unerwünschte Abbaureaktionen, wie β -Eliminierung, begünstigt werden können. Tests zeigten, dass im Zuge einer Evaporation zur Aufkonzentrierung der Probelösungen die Verteilung der uGalA-OS zu den kürzerkettigen uGalA-OS, als Resultat eines Abbaus längerkettiger uGalA-OS, hin verschoben wurde. Als Ursache wird die durch eine erhöhte Temperatur begünstigte β -Eliminierung vermutet. Folglich sollte von einer Evaporation zur Aufkonzentrierung abgesehen werden. Zusätzlich kam es nach der Evaporation aufgrund von Löslichkeitseffekten abhängig vom DP zu Verlusten an uGalA-OS, wie die Ergebnisse entsprechender Wiederfindungsversuche (vgl. Tabelle A - 6 im Anhang) nahelegen. So konnten nach Evaporation einer wässrigen Lösung bis zur Trockene nur 71 - 75 % bzw. 62 - 66 % der einzelnen uGalA-OS (DP = 3 - 10 bzw. 11 - 13) wieder in Wasser gelöst werden. Bei Versuchen mit dotierter Matrix war die Löslichkeit des Tri- bis Hexamers mit 87 - 96 % höher als bei Versuchen mit wässriger Lösung. Die Löslichkeit der längerkettigen uGalA-OS (DP > 6) hingegen war mit 10 - 21 % im Vergleich sehr stark reduziert. Wie erwartet, nahm die Löslichkeit der uGalA-OS mit steigendem DP ab und gleichzeitig nahm eine unerwünschte Interaktion mit der Matrix zu. Auffälligkeiten ergaben sich beim Dimer, welches nach Evaporation nur zu 35 % bzw. aus Matrix nur zu 28 % wieder in Wasser löslich war. Jedoch wird vermutet, dass diese Werte in Folge der geringen Reinheit der isolierten Standardsubstanz des Dimers (vgl. Kapitel 4.1.2) stark fehlerbehaftet sind.

Im Zuge der Validierung der chromatographischen Methode zur Bestimmung von unveresterten uGalA-OS wurden verschiedene Parameter untersucht, deren Ergebnisse der Tabelle 2 und Tabelle A - 6 im Anhang entnommen werden können. Zunächst wurde zur Bestimmung der RRF in Bezug auf Acarbose (IStd) für jedes uGalA-OS (DP = 2 - 13) ein linearer Konzentrationsbereich ($\sim 10 - 100 \mu\text{M}$ bzw. $65 - 190 \mu\text{M}$ (Dimer)) festgelegt. Darauf basierend wurde für jedes uGalA-OS der RRF aus der entsprechenden Konzentration und Signalläche bei 235 nm in Bezug auf die Konzentration und Signalläche von Acarbose berechnet (vgl. Kapitel 3.4.3). Die RRF der kürzerkettigen uGalA-OS (DP = 3 - 9) waren vergleichbar (0,038 - 0,042), während der RRF der längerkettigen uGalA-OS (DP = 10 - 13) mit dem DP anstiegen (0,048 - 0,063). Auffällig war der hohe RRF des Dimers von 0,077. Aus der dreifachen Messung der einzelnen Kalibrierpunkte wurde abgeleitet, dass die Messpräzision im entsprechenden Konzentrationsbereich mit $\leq 5\%$ zumeist hoch war. Jedoch nahm insbesondere am unteren Ende des Kalibrierbereichs die Präzision ($\leq 15\%$) ab. Insgesamt lag die Messpräzision für alle zwölf uGalA-OS in einem akzeptablen Bereich. Die ermittelten LOD der uGalA-OS waren mit $2 - 4 \mu\text{M}$ mit Ausnahme des Dimers ($16 \mu\text{M}$) gering. Ähnlich verhielt es sich mit den LOQ, welche für die meisten uGalA-OS (DP = 3 - 12) bei $3 - 6 \mu\text{M}$ lagen und tendenziell mit dem DP anstiegen. Dies konnte auf breitere Signale und eine damit verbundene fehlerbehaftetere Integration der Signallächen der später eluierenden längerkettigen uGalA-OS zurückgeführt werden. Dafür sprach auch die höhere LOQ ($9 \mu\text{M}$) des Tridecamers. Auffällig war erneut das Dimer mit einer LOQ von $21 \mu\text{M}$. In diesem Fall war eine größere Fehleranfälligkeit in der Bestimmung aufgrund der geringen Reinheit des Dimers denkbar (vgl. Kapitel 4.1.2). Insgesamt war die Empfindlichkeit der UHPLC-PDA-Methode geringer als bei vergleichbaren HPAEC-PAD-Methoden zum Beispiel zur Analyse von Arabino- oder Galactooligosacchariden (Wefers & Bunzel, 2016a). Jedoch ermöglicht die Analyse mittels UHPLC-PDA eine spezifischere Detektion der uGalA-OS, eine schnellere Trennung dieser und bei Bedarf eine Kopplung mit MS zur eindeutigen Identifizierung.

Die Wiederfindung der einzelnen uGalA-OS aus 50%igem Acetonitril lag für fast alle im Bereich von $90 - 110\%$ und für einige (DP = 3 - 10) sogar im Bereich von $95 - 105\%$. Eine geringere Wiederfindungsrate zeigten erneut das Tridecamer (78 %) und das Dimer (37 %). Die ab einem DP von 10 abnehmenden Wiederfindungsraten konnten auf eine abnehmende Löslichkeit im Vergleich zu den anderen uGalA-OS zurückgeführt werden. Hinsichtlich des Dimers ist wieder eine fehlerbehaftete Bestimmung als Folge der geringen Reinheit der isolierten Standardsubstanz zu nennen, auch wenn die Reinheit bei der Berechnung der Wiederfindungsrate berücksichtigt wurde. Die Präzision der Dreifachbestimmung war für die kürzerkettigen uGalA-OS (DP ≤ 10) mit $1 - 4\%$ höher als für die längerkettigen uGalA-OS (DP > 10) mit $6 - 8\%$, was ebenfalls durch deren geringere Löslichkeit bedingt war. Zudem könnten die breiteren Signale der längerkettigen uGalA-OS zu Fehlern bei der Integration geführt haben, welche wiederum die Präzision negativ beeinflusst haben. Bei den Wiederfindungsversuchen aus Matrix zeigte sich, dass mit zunehmendem DP die uGalA-OS stärker mit der Matrix interagierten und folglich analytisch nur teilweise erfasst werden konnten. Zudem waren diese Interaktionen der längerkettigen uGalA-OS

Tabelle 2: Ergebnisse der Validierung der Profilingmethode zur Bestimmung ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarraydetektor, uGalA_{2,3,...} = uGalA-OS mit Polymerisierungsgrad von 2, 3, ..., RRT = relative Retentionszeit, RRF = relativer Responsefaktor, LOD = Nachweisgrenze, LOQ = Bestimmungsgrenze, WF = Wiederfindung ± Standardabweichung (n = 3), ACN = Acetonitril

UGALA-OS	RRT	RRF	KONZENTRATIONSBEREICH / µM	LOD / µM	LOQ / µM	WF AUS 50 % ACN / %	WF AUS MATRIX / %
uGalA ₂	0,914	0,0770	65 - 190	16	21	37,4 ± 0,7	38,4 ± 0,8
uGalA ₃	1,419	0,0391	9 - 86	3	4	100,5 ± 1,7	80,5 ± 4,8
uGalA ₄	1,897	0,0382	10 - 100	2	3	102,9 ± 1,0	83,5 ± 5,5
uGalA ₅	2,251	0,0403	10 - 100	2	3	100,8 ± 4,4	82,6 ± 5,0
uGalA ₆	2,600	0,0379	10 - 100	2	3	103,9 ± 1,5	80,0 ± 3,1
uGalA ₇	2,968	0,0374	28 - 100	2	3	104,4 ± 2,9	80,9 ± 6,1
uGalA ₈	3,336	0,0401	28 - 100	2	4	104,5 ± 2,6	80,3 ± 6,0
uGalA ₉	3,686	0,0419	10 - 100	2	4	102,8 ± 3,5	76,0 ± 4,0
uGalA ₁₀	4,013	0,0478	10 - 100	2	4	100,0 ± 2,6	75,3 ± 4,2
uGalA ₁₁	4,304	0,0485	23 - 82	3	5	92,7 ± 7,4	43,5 ± 17,9
uGalA ₁₂	4,575	0,0529	28 - 100	4	6	92,6 ± 7,8	8,4 ± 4,4
uGalA ₁₃	4,806	0,0632	28 - 100	4	9	77,5 ± 4,8	56,5 ± 46,8

(DP = 11 - 13) vermutlich nicht reproduzierbar, was sich in einer geringen Präzision (41 - 83 %) abgeleitet aus der Dreifachbestimmung widerspiegelte. Das Dimer wurde zu 38 % wiedergefunden, während die Wiederfindungsraten des Tri- bis Octamers bei 80 - 83 %, die des Nonan- und Decamers bei 75 - 76 % und die der längerkettigeren uGalA-OS (DP = 11 - 13) bei 8 - 57 % lagen. Die Präzisionsdaten der kürzerkettigen uGalA-OS (DP ≤ 10) waren mit 2 - 8 % im Vergleich zu der Bestimmung ohne Matrix, aus 50 % Acetonitril, schlechter, aber dennoch akzeptabel. Weiter wurden die RRT der uGalA-OS bezogen auf Acarbose ermittelt, um zukünftig eine Identifizierung der unveresterten uGalA-OS ohne die Notwendigkeit von entsprechenden Standardsubstanzen oder MS zu ermöglichen.

So konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Profilingmethode zur Analyse von uGalA-OS entwickelt und für elf isolierte uGalA-OS (DP = 3 - 13) erfolgreich validiert werden. Diese ermöglicht eine Bestimmung der Anteile an uGalA-OS in Abhängigkeit von ihrem DP nach alkalischer Hydrolyse, sowie ergänzend eine Analyse der Anzahl an Methylestern innerhalb eines DP. Für eine sichere absolute Quantifizierung der ungesättigten Digalacturonsäure ist es zu empfehlen, die Validierung nach einer weiteren Aufreinigung der Standardsubstanz zu wiederholen. Auf Grundlage der erhobenen Validierungsdaten war es aufgrund der hohen Präzision dennoch möglich, mit dieser Profilingmethode die Anteile an ungesättigter Digalacturonsäure im Vergleich verschiedener Proben abzuschätzen. Einzig eine absolute Quantifizierung des Dimers sollte kritisch betrachtet werden.

Die entwickelte Profilingmethode wurde erfolgreich auf die NLBS-Faktionen des unbehandelten, mechanisch und/oder enzymatisch behandelten Karottentresters angewandt. Die Ergebnisse hierzu werden im Kapitel 4.4.2.3.3 vorgestellt.

4.2 ÜBERPRÜFUNG DER METHODE ZUR BESTIMMUNG NIEDERMOLEKULARER, LÖSLICHER BALLASTSTOFFE

Der Gehalt an NLBS in den einzelnen Ballaststoffpräparaten der beiden Nebenströme sollte einen zentralen Parameter beim Vergleich dieser darstellen. Daher war es Teil dieser Arbeit zu überprüfen, ob mit der angewandten AOAC-Methode (vgl. Kapitel 3.3.4) eine vollständige Erfassung aller definitionsgemäß zu den NLBS zählenden und potenziell in (un)behandelten Erbsenschalen und/oder Karottentrester vorkommenden Oligosacchariden gewährleistet ist.

Zunächst wurde das Elutionsverhalten ausgewählter Mono-, Di- und Trisaccharide mit dem von Maltose und Maltotriose bei der Analyse mittels HPSEC-RID verglichen (vgl. Abbildung 18), da der Übergang von Maltotriose auf Maltose in der angewandten AOAC-Methode als Grenze zwischen NLBS und Mono- und Disacchariden herangezogen wird. Dabei bestätigte sich die Erwartung, dass β -1,4-verknüpften Hexobiosen (Cello-, Galacto- und Mannobiose) und -triosen (Cello- und Mannotriose) zeitgleich mit Maltose bzw. Maltotriose eluieren. Auch Saccharose und Raffinose wiesen, trotz anderer Bindungstypen, ein zu Maltose bzw. Maltotriose vergleichbares Elutionsverhalten auf. Anders sah es mit den beiden Invertaseabbauprodukten der RFO (Melibiose und Manninotriose) aus, welche im Vergleich zu Maltose bzw. Maltotriose früher eluierten. Als Ursache hierfür wird ein größeres hydrodynamisches Volumen der α -1,6-verknüpften Di- und Trisaccharide gegenüber den β -1,4-verknüpften Di- und Trisacchariden vermutet. Für die Bestimmung der NLBS bedeutet die partielle Coelution von Melibiose und Maltotriose, dass Melibiose (partiell) zu den NLBS gezählt wird und somit eine Überbestimmung dieser bewirkt. Da in der Erbsenschale RFO vorkommen, war eine Freisetzung von Melibiose aus Raffinose im Zuge der mechanischen und/oder enzymatischen Behandlung möglich, welche die Bestimmung der NLBS in entsprechenden Ballaststoffpräparaten beeinträchtigen kann. Weiter wiesen Pentobiosen (Arabino- und Xylobiose) und -triosen (Arabino- und Xylotriose) eine spätere Elution auf als Maltose bzw. Maltotriose. Daher war anzunehmen, dass die Pentobiosen und -triosen ein kleineres hydrodynamisches Volumen aufweisen als Hexobiosen und -triosen. Da Arabinotriose und Xylotriose (partiell) nach Maltotriose eluieren, werden die beiden Trisaccharide nicht bzw. nur teilweise von der angewandten AOAC-Methode als NLBS erfasst. Die daraus resultierende Unterbestimmung des Anteils an NLBS war in dieser Arbeit bei der Analyse der Gehalte an NLBS in den Ballaststoffpräparaten von Erbsenschale und Karottentrester, in welchen ein hoher Anteil an Arabinotriose und/oder Xylotriose erwartet wurde, als problematisch anzusehen. Zuletzt zeigte sich, dass Mono-, Di- und Trigalacturonsäure deutlich vor Maltotriose eluierten und somit sowohl mono- als auch dimere Galacturonsäure fälschlicherweise den NLBS zugerechnet werden. Daher würden erhöhte Anteile an Mono- und Digalacturonsäure, wie sie in den Ballaststoffpräparaten der beiden Nebenströme zu erwarten waren, zu einer Überbestimmung der Gehalte an NLBS führen. Allerdings werden saure Saccharide (u. a. Mono- und Digalacturonsäure), wie nachfolgend dargelegt wird, bei der Entsalzung der NLBS-Fraktionen mittels Ionenaustauscher entfernt, weshalb sie bei der nachfolgenden Analyse mittels HPSEC-RID nicht mehr erfasst werden können.

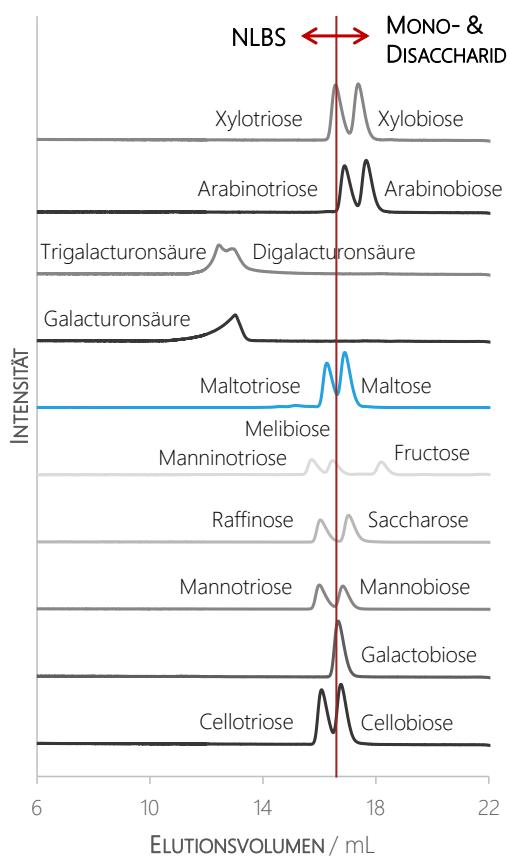


Abbildung 18: Chromatogrammausschnitte relevanter Mono-, Di- und Trisaccharide nach Größenausschlusschromatographie mit Brechungsindexdetektion sowie der Übergang von Maltotriose auf Maltose (blau) als Grenze (rot) zwischen niedermolekularen, löslichen Ballaststoffen (NLBS) und Mono- und Disacchariden

Um den Einfluss der Entsalzung auf die Erfassung der NLBS zu untersuchen, wurden exemplarisch für die verschiedenen Di- und Trisaccharide die Wiederfindungsraten von Cellobiose und -triose (Hexosen), Arabinobiose und -triose (Pentosen) und Mono-, Di- und Trigalacturonsäure (Hexuron-säuren) ermittelt (vgl. Kapitel 3.3.4). Die Ergebnisse hierzu können der Tabelle 3 entnommen werden. Während Cellobiose und -triose nahezu vollständig (94 - 96 %) wiedergefunden wurden, kam es bei Arabinobiose und -triose zu geringen Verlusten (82 - 88 %). Den entsalzten Versuchs-ansätzen wurde, wie in der AOAC-Methode vorgesehen, mittels Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entzogen. Dabei kann es zu einer Erwärmung der Probe kommen, wodurch ein thermischer Abbau der Saccharide begünstigt werden kann. Daher wird vermutet, dass die im Vergleich zu Cellobiose und -triose höheren Verluste an Arabinobiose und -triose auf eine geringere Hitzestabilität der glykosidischen Bindung mit Arabinofuranosiden im Vergleich zu denen mit Glucopyranosiden und nicht auf Interaktion mit den Ionenaustauschern zurückzuführen waren. In den zwei zusätzlich aufgefangenen Eluaten des Entsalzungsschritts wurden jeweils < 1% der beiden Di- und Trisaccharide nachgewiesen, weshalb das in der AOAC-Methode vorgeschrie-benen Elutionsvolumen für eine vollständige Elution ausreichend war. Hinsichtlich der Mono-, Di- und Trigalacturonsäure führte die Entsalzung mittels Ionenaustauscher zu den erwartet hohen Verlusten (76 - 95 %), welche mit dem Polymerisierungsgrad zunahmen. Es wird angenommen,

Tabelle 3: Wiederfindungsraten der drei Eluate (1, 2, 3) von Cellobiose, Cellotriose, Arabinobiose, Arabinotriose, Mono-, Di- und Trigalacturonsäure nach Entsalzung mittels Ionenaustauscher in Prozent (%)

ELUAT	CELLO-BIOSE	CELLO-TRIOSE	ARABINO-BIOSE	ARABINO-TRIOSE	GALACTURON-SÄURE	DIGALACTURON-SÄURE	TRIGALACTURON-SÄURE
1	94,4	96,2	88,0	81,9	24,0	8,1	4,9
2	0,4	0,3	0,9	0,8	0,2	-	-
3	0,2	0,1	0,5	0,4	0,3	-	-

dass die Galacturonsäuren weitgehend an den Anionenaustauscher banden, daher mit Wasser nicht eluierten und somit von der weiteren Analyse mittels HPSEC-RID ausgeschlossen wurden. Auch eine Verdopplung des Elutionsvolumens führte zu keiner vermehrten Elution der Galacturonsäuren. Dies zeigte der Nachweis nur geringer Mengen an Monogalacturonsäure bzw. keiner Di- und Trigalacturonsäure in den beiden zusätzlichen Eluaten (vgl. Arbeitsvorschrift 8.9). Demzufolge erwies sich die Entsalzung von NLBS-Fraktionen, die saure Oligosaccharide enthalten, wie es für die Ballaststoffpräparate der beiden untersuchten Nebenströme zu erwarten war, mittels Ionenaustauscher für eine nachfolgende Bestimmung des Gehaltes an NLBS als nicht geeignet.

Auf die Entsalzung zur Entfernung der Phosphatpuffersalze, welche für den vorherigen enzymatischen Abbau von Stärke und Proteinen benötigt werden (vgl. Kapitel 3.3.4), kann jedoch nicht verzichtet werden. Die Phosphate coeluieren bei der Analyse mittels HPSEC-RID mit Maltotriose und würden somit eine Überbestimmung des Gehalts an NLBS bewirken. Der Zusatz von Puffersalzen bei der analytischen Ballaststoffbestimmung (vgl. Kapitel 3.3.4) ist für eine optimale Aktivität der Enzyme (Amylase, Protease, Amyloglucosidase) erforderlich. Eine Alternative zum Phosphatpuffer bietet der Maleatpuffer, welcher in einer adaptierten AOAC-Methode eingesetzt wird (McCleary *et al.*, 2010). Jedoch coeluiert bei der Analyse mittels HPSEC-RID Maleat mit Glycerin (IStd). Da Maleat im Bereich der NLBS kein Signal erzeugt, wäre unter Verwendung des Maleatpuffers und einer anderen IStd, die Bestimmung der NLBS ohne vorherige Entsalzung möglich. Jedoch erfordert dies eine vorherige Validierung der modifizierten Methode mit einer neuen IStd.

Trotz der zuvor beschriebenen Einschränkungen der AOAC-Methode wurde diese zur Analyse der NLBS der (un)behandelten Nebenströme eingesetzt, da sie die offiziell anerkannte Analysemethode darstellt. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurden die Limitationen der Methode berücksichtigt.

4.3 CHARAKTERISIERUNG EINGESETZTER ENZYME

Die Ergebnisse der Charakterisierung der eingesetzten Enzyme (ARA, CEL, GAL, PG, PL und XYL) bezüglich deren Temperatuoptima, Nebenaktivitäten und (Hitze-)Inaktivierung können im Einzelnen der Abbildung 19 entnommen werden. Das Temperatuoptimum der sechs untersuchten Enzyme lag, wie vom Hersteller angegeben, zumeist bei 40 - 50 °C. Ausnahmen bildeten die ARA, die eine geringere (30 °C) und die XYL, die eine höhere Temperatur (60 °C) bevorzugten. Beim

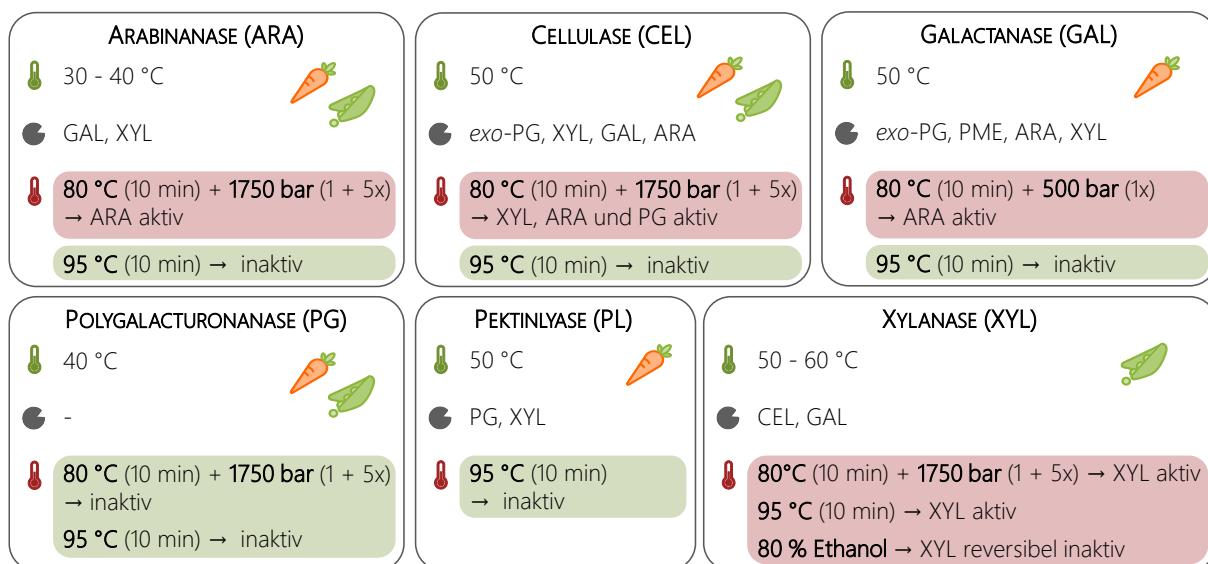


Abbildung 19: Ergebnisse der Charakterisierung der zur enzymatischen Behandlung der Erbsenschale und/oder des Karottentresters eingesetzten Enzyme hinsichtlich Temperaturoptimum (🌡️), Nebenaktivitäten (●) und (Hitze)-Inaktivierung (🔥), PME = Pektinmethyl esterase, 1 + 5x/1x = Anzahl der Durchläufe bei Mikrofluidisierung

enzymatisch-mechanischen Behandlungsansatz lag das Interesse insbesondere auf einer Lockerung der Zellwandstrukturen durch eine CEL-Aktivität. Daher wurden die enzymatischen Behandlungen entsprechend dem Aktivitätsoptimum der CEL bei 50 °C durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.1). Beim mechanisch-enzymatischen Behandlungsansatz lag bei der cellulosereichen Erbsenschale der Fokus ebenfalls auf der Spaltung von Cellulose. Daher erfolgte die enzymatische Hydrolyse der Erbsenschalen auch bei 50 °C. Der pektinreiche Karottentrester hingegen wurde bei 45 °C enzymatisch hydrolysiert, um die Aktivität der ARA zu steigern (vgl. Kapitel 3.1.2).

Bis auf die *endo*-PG besaßen alle zur enzymatischen Behandlung eingesetzten und charakterisierten Enzyme diverse, unterschiedlich stark ausgeprägte Nebenaktivitäten. Stark ausgeprägt waren unter anderem die *exo*-PG- und XYL-Aktivitäten der CEL, die CEL-Aktivitäten der XYL sowie die *exo*-PG- und ARA-Aktivitäten der GAL. Problematisch waren insbesondere die *exo*-PG-Aktivitäten, die teilweise zur Freisetzung eines hohen Anteils an unerwünschter monomerer Galacturonsäure führten (vgl. Kapitel 4.4.2). Jedoch waren für die enzymatische Behandlung der Erbsenschale bzw. des Karottentresters nur die Nebenaktivitäten von Relevanz, deren entsprechendes Substrat (Polysaccharidstruktur) in zugänglicher Form im Nebenstrom vorlag. Im Falle der Erbsenschale spielten zum Beispiel GAL-Nebenaktivitäten und beim Karottentrester XYL-Nebenaktivitäten aufgrund sehr geringer Anteile an (Arabino-)Galactanen bzw. Xylanen im entsprechenden Nebenstrom (vgl. Kapitel 4.4.1.1 und 4.4.2.1) keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings kamen bei der Erbsenschale XYL- und ARA-Nebenaktivitäten und beim Karottentrester ARA- und GAL-Nebenaktivitäten zum Tragen. Daher war es unter anderem nicht möglich, anhand der Ergebnisse der Charakterisierung der Ballaststoffpräparate eine optimale Menge der entsprechenden Enzyme zur enzymatischen Behandlung der Nebenströme für die Freisetzung hoher Gehalte an NLBS bzw. Oligosacchariden abzuleiten. Genauer wird dies in den Unterkapiteln von 4.4 erläutert.

Bei der Hitzeinaktivierung mit 80 °C für 10 min, wie sie zur Herstellung der enzymatisch-mechanisch behandelten Nebenströme angewandt wurde (vgl. Kapitel 3.1.1), zeigte sich, dass einige der Enzyme bzw. deren Nebenaktivitäten nicht (vollständig) inaktiviert wurden. Hierbei handelte es sich vorwiegend um die ARA- und XYL-Aktivitäten der eingesetzten Enzyme. Auch überstanden diese eine anschließende Mikrofluidisierung mit 1750 bar für 1 + 5 Durchläufe bzw. 500 bar für 1 Durchlauf. Auf die Bedeutung der unvollständig inaktivierten Enzyme für die enzymatisch-mechanisch hergestellten Ballaststoffpräparate aus der Erbsenschale bzw. aus dem Karottentrester wird in den Kapiteln 4.4.1.2 und 4.4.2.2 eingegangen. Eine Hitzebehandlung bei 95 °C für 10 min führte zu einer Inaktivierung der eingesetzten Enzyme mit Ausnahme der XYL. Auch der Zusatz der vierfachen Menge Ethanol inaktivierte diese nur reversibel. Aufgrund dieser Problematik wurde auf den Zusatz dieser XYL bei der enzymatischen Behandlung der Erbsenschalen in den Versuchsanträgen der mechanisch-enzymatischen Behandlung verzichtet. Zur vollständigen Inaktivierung der anderen eingesetzten Enzyme war es ausreichend, die mechanisch-enzymatisch bzw. enzymatisch behandelten Nebenströme im Anschluss an die enzymatische Hydrolyse für 10 min auf 95 °C zu erhitzen (vgl. Kapitel 3.1.2).

4.4 CHARAKTERISIERUNG VON ERBSENSCHALE UND KAROTTENTRESTER

In den folgenden Kapiteln wird die chemische Beschaffenheit der Ballaststoffe der Erbsenschale und des Karottentresters sowie deren Veränderungen im Zuge einer mechanischen, enzymatischen bzw. kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung vorgestellt. Gleichzeitig wird ein Bezug zu den Ergebnissen der funktionellen Charakterisierung der beiden Nebenströme hergestellt, welche begleitend von Dr. Rocío Morales-Medina am Department für Lebensmitteltechnologie und -materialwissenschaften, Institut für Lebensmitteltechnologie und -chemie, Fakultät III: Prozesswissenschaften an der Technische Universität Berlin durchgeführt wurden. Dabei waren die wichtigsten Kenngrößen: Sedimentation, Viskosität, Partikelgröße, unlösliche Masse und Wasserretentionskapazität. Hinsichtlich der unlöslichen Masse gilt zu beachten, dass bei deren gravimetrischen Bestimmung, anders als bei den UBS, alle wasserunlöslichen Substanzen wie Stärke und Proteine miterfasst wurden, weshalb der Anteil an unlöslicher Masse in der Regel höher ausfiel als der der UBS. Durch die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung der Erbsenschale bzw. des Karottentresters sollten nicht-sedimentierende, niedrigviskose Suspensionen hergestellt werden. Zur Vermeidung von Sedimentation können geringe Partikelgrößen, geringe Anteile an unlöslicher Masse und/oder hohe Viskositäten beitragen. Da Letztere unerwünscht waren, war die Minimierung von Partikelgröße und unlöslicher Masse im Zuge der Behandlung obligatorisch.

4.4.1 ERBSENSCHALE

4.4.1.1 UNBEHANDELTE ERBSENSCHALE

Die Erbsenschale enthielt 76 % Ballaststoffe, die vor allem aus UBS (70 %) bestanden und von geringeren Anteilen an LBS (5 %) und NLBS (< 1 %) begleitet wurden. Daneben wies die Erbsenschale einen Proteingehalt von 7 % und einen Aschegehalt von 3 % auf. Neben den RFO Stachyose (0,3 %), Verbascose (0,3 %) und Raffinose (0,2 %), konnten auch Glucose (0,1 %), Fructose (0,1 %), Saccharose, Maltose, Maltotriose und Stärke in der Erbsenschale nachgewiesen und partiell quantifiziert werden. Während insbesondere der Gesamtballaststoffgehalt, aber auch der Anteil an UBS, über den von Saldanha do Carmo und Mitarbeitenden (2022) beschriebenen Gehalten (vgl. Kapitel 1.1.1) lagen, waren die übrigen analysierten Inhaltsstoffe der untersuchten Erbsenschale im Vergleich zu den Literaturwerten in geringerem Umfang vorzufinden (Saldanha do Carmo *et al.*, 2022). Im Folgenden werden die in der Erbsenschale vorliegenden Polysaccharidstrukturen getrennt nach UBS und LBS, basierend auf den Ergebnissen der Monosaccharidanalyse, der Methylierungsanalyse, dem Arabinan-, Galactan- und Xyloglucanscreening sowie der Bestimmung der Veresterungsgrade (vgl. Abbildung 20 A - E), beschrieben.

Die Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide aus den UBS der Erbsenschale wurden nach Schwefelsäurehydrolyse und Methanolysen mit nachfolgender TFA-Hydrolyse bestimmt. Dabei fielen die Ergebnisse nach Schwefelsäurehydrolyse (vgl. Abbildung 20 A) ähnlich aus, wie die, die in der Literatur von Le Goff und Mitarbeitenden (2001) beschrieben sind. Das Hauptmonosaccharid der Polysaccharide aus den UBS nach Schwefelsäurehydrolyse war mit 64 mol% Glucose. Durch die Methanolysen und TFA-Hydrolyse konnten aus den Polysacchariden der UBS nur 5 mol% Glucose freigesetzt werden. Dies wurde dadurch begründet, dass der Hauptanteil der durch Schwefelsäurehydrolyse freigesetzten Glucose aus kristalliner Cellulose stammte, welche für eine Methanolysen und TFA-Hydrolyse kaum zugänglich ist (vgl. Kapitel 3.3.5.1). Auch die Ergebnisse der Methylierungsanalyse (vgl. Abbildung 20 B) zeigen, dass die PMAA der Glucose in den Polysacchariden aus den UBS mit 50 mol% mengenmäßig überwogen. Dabei stammten 89 % der Glucose aus einer 1,4-glykosidischen Bindung und 1 % aus einem terminalen Ende, wie sie in Cellulose (vgl. Kapitel 1.3.2.1) vorkommen. Allerdings kann die Glucose dieser Bindungstypen, zumindest zu geringeren Anteilen, auch aus Xyloglucanen stammen. Dass dies auch bei der Erbsenschale der Fall war, lässt unter anderem das nachgewiesene PMAA der 1,4,6-verknüpften Glucopyranose (3 mol%) als substituierte Einheit aus dem Glucanrückgrat von Xyloglucanen vermuten. Die in geringem Umfang gebildeten PMAA der 1,2,3,4-verknüpften Glucopyranose (< 1 mol%) und 1,2,3,4,6-verknüpften Glucopyranose (2 mol%) repräsentieren Verbindungstypen von Glucose, deren Vorkommen weder in Cellulose noch in Xyloglucanen zu erwarten ist. Daher war es wahrscheinlich, dass es trotz doppelter Durchführung der Methylierung bei der Analyse der Polysaccharidstrukturen der UBS zu einer Untermethylierung freier Hydroxygruppen kam (vgl. Kapitel 3.3.5.2).

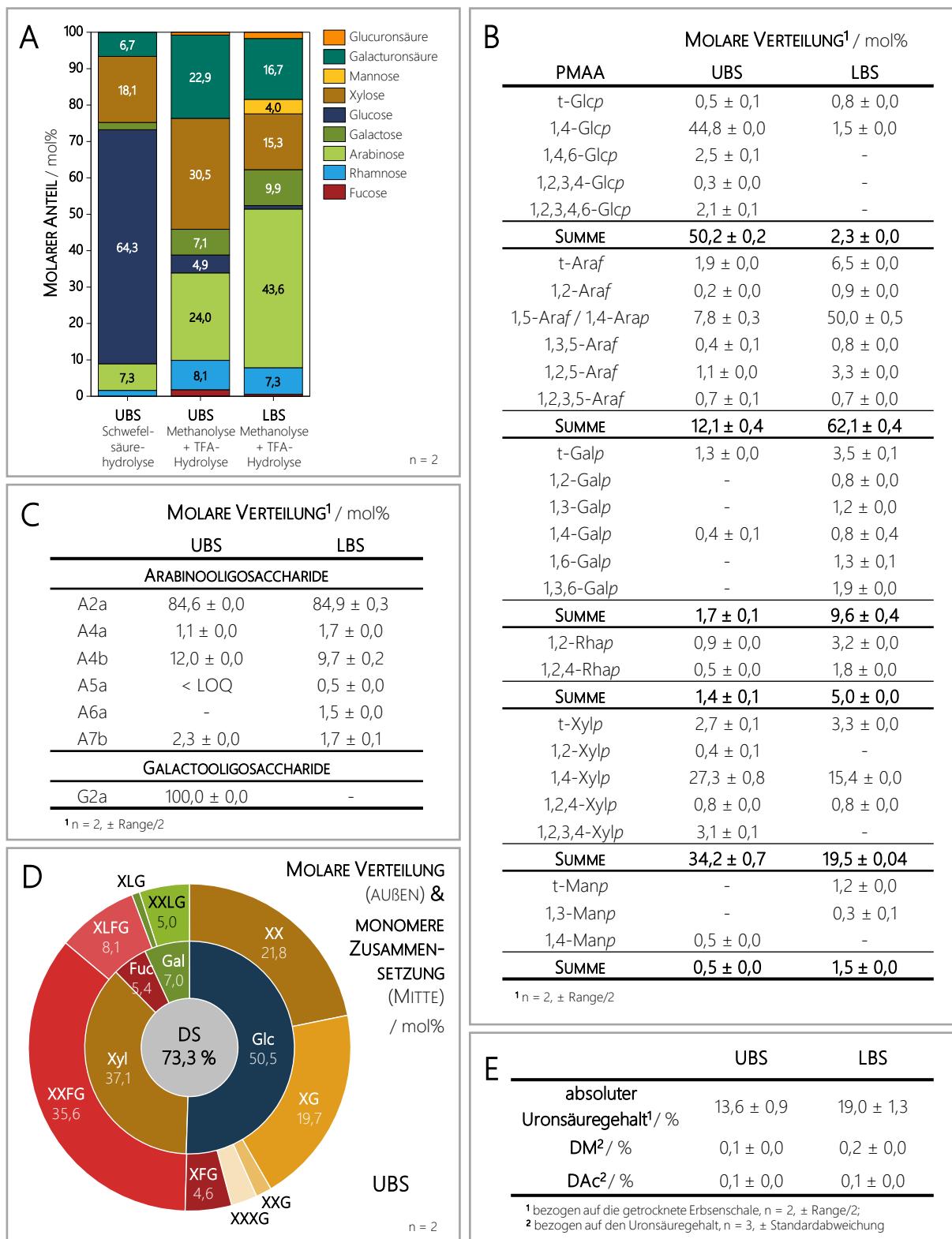


Abbildung 20: Ergebnisse der Monosaccharid- (A) und Methylierungsanalyse (B), des Arabinan-, Galactan- (C) und Xyloglucanscreenings (D) sowie der Bestimmung des Uronsäuregehalts und des Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrads (DAc) (E) der unlöslichen (UBS) und löslichen Ballaststoffe (LBS) der Erbsenschale, TFA = Trifluoressigsäure, PMAA = partiell methyierte Alditolacetate, t = terminal, p = Pyranose, f = Furanose, Ara = Arabinose, Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Glc = Glucose, Man = Mannose, Rha = Rhamnose, Xyl = Xylose, A2a - A7b = Arabino-biose bis Arabinoheptaose (vgl. Abbildung A - 1 im Anhang), G2a = Galactobiose (vgl. Abbildung A - 2 im Anhang), DS = Substitutionsgrad, XX, XG, ... = Xyloglucanoligosaccharide mit Nomenklatur nach Fry und Mitarbeitenden (1993) (vgl. Abbildung A - 3 im Anhang), n = Anzahl an Messungen, LOQ = Bestimmungsgrenze

Das häufigste Monosaccharid in den Polysacchariden der UBS nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse (31 mol%) stellte Xylose dar. Zu dieser gehörten auch die zweitmeisten PMAA nach der Methylierungsanalyse (34 mol%). Da Erbsenschalen vermehrt Zellen mit sekundärer Zellwand aufweisen, wird angenommen, dass die Xylose größtenteils aus (Glucurono-)Xylanen stammte. Dafür sprach, dass der dominierende Bindungstyp der Xylose nach Methylierungsanalyse eine 1,4-Verknüpfung war, wie sie in unsubstituierten (Glucurono-)Xylanabschnitten (vgl. Kapitel 1.3.2.2) anzutreffen ist. Der geringe molare Anteil des PMAA der 1,2,4-verknüpften Xylopyranose deutete an, dass ein kleiner Teil der Xylane substituiert vorlag. Hierbei wird eine Substitution mit Glucuronsäure, welche nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse in Spuren aus den Polysacchariden der UBS freigesetzt wurde, zu Glucuronoxylanen vermutet. Da eine doppelte Substitution des Xylanrückgrats unwahrscheinlich war und auch Xyloglucanstrukturen üblicherweise keine vierfach verknüpfte Xyloseeinheit aufweisen, lag es nahe, dass das PMAA der 1,2,3,4-verknüpften Xylopyranose wiederum Resultat einer Untermethylierung im Zuge der Methylierungsanalyse war.

Glucose und Xylose sind nicht nur die monomeren Einheiten von Cellulose bzw. (Glucurono-)Xylanen, sondern sind auch wesentliche Bestandteile der Xyloglucanstrukturen (vgl. Kapitel 1.3.2.2). Diese können daneben Galactose und Fucose, welche zu teils geringeren molaren Anteilen nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse (7 bzw. 2 mol%) nachgewiesen wurden, beinhalten. Dass die genannten vier Monosaccharide Bestandteil der Xyloglucane der UBS der Erbsenschale waren, zeigen auch die Ergebnisse des Xyloglucanscreenings (vgl. Abbildung 20 D). Nach der Methylierungsanalyse hingegen konnten aus den Polysacchariden der UBS lediglich charakteristische PMAA der Glucose, Xylose und Galactose detektiert werden. Der Anteil an in den Xyloglucanen enthaltener Fucose war für einen Nachweis vermutlich zu gering. So konnten mit Ausnahme von terminaler Fucose und 1,2-verknüpfter Galactopyranose alle in den Xyloglucanen zu erwartenden Bindungstypen der Glucose (terminal, 1,4- und 1,4,6-verknüpft), Xylose (terminal und 1,2-verknüpft) und Galactose (terminal verknüpft) in den Polysacchariden der UBS mittels Methylierungsanalyse nachgewiesen werden. Da die beiden für Xyloglucane typischen PMAA der 1,4,6-verknüpften Glucopyranose (3 mol%) und 1,2-verknüpften Xylopyranose (< 1 mol%) je nur einen geringen molaren Anteil ausmachten, war der Anteil an Xyloglucanen in den Polysacchariden der UBS der Erbsenschale deutlich geringer einzustufen als der von Cellulose und (Glucurono-)Xylanen. Einen genaueren Einblick in die Feinstruktur der Xyloglucane liefern die Ergebnisse des Xyloglucanscreenings (vgl. Abbildung 20 D). Der größte Anteil mit 48 mol% der enzymatisch freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (vgl. Abbildung A - 3 im Anhang) trug eine fucosyierte Seitenkette. Hierzu zählen XXFG (36 mol%), XLFG (8 mol%) und XFG (5 mol%). Den zweitgrößten molaren Anteil mit 46 mol% bildeten die aus einem (partiell) mit Xylose substituierten Glucanrückgrat bestehenden Xyloglucanoligosaccharide XX (22 mol%), XG (20 mol%), XXXG (3 mol%), XXG (2 mol%) und XXX (< 1 mol%). Dabei stellen die Xyloglucanoligosaccharide XXX und XXXG Intermediate der enzymatischen Hydrolyse mit *endo*-Xyloglucanase dar. So kann bei ausreichend langer Hydrolysezeit XXXG weiter in XX und XG und XXX in X und XX gespalten werden (Steck *et al.*, 2021). Den geringsten molaren Anteil stellten die Xyloglucanoligosaccharide XXLG (5 mol%)

und XLG (< 1 mol%) mit galactosehaltigen Seitenketten. Rechnerisch setzten sich die Xyloglucan-oligosaccharide aus den Xyloglucanen der UBS somit aus 51 mol% Glucose, 37 mol% Xylose, 7 mol% Galactose und 5 mol% Fucose zusammen. Daraus ließ sich für die Xyloglucane der UBS ein für Dikotyledonen üblicher Substitutionsgrad von 73 % (vgl. Kapitel 1.3.2.2) ableiten.

Des Weiteren wiesen die Polysaccharide der UBS nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse bzw. Methylierungsanalyse die Monosaccharide bzw. entsprechenden PMAA der Arabinose (24 bzw. 12 mol%), Galacturonsäure (23 mol%) und Rhamnose (8 bzw. 1 mol%) auf. Diese stammten zusammen mit Galactose (7 bzw. 2 mol%) vermutlich größtenteils aus den Pektinstrukturen der Homogalacturonane und/oder Rhamnogalacturonane Typ I (vgl. Kapitel 1.3.2.3). Aus den molaren Anteilen von Galacturonsäure und Rhamnose lässt sich das Verhältnis von Homogalacturonanen zu Rhamnogalacturonanen Typ I errechnen (Broxterman *et al.*, 2017), welches mit 0,9 relativ ausgeglichen war. Von den nach der Methylierungsanalyse detektierten PMAA der Rhamnose repräsentierten 64 % eine unsubstituierte (1,2-verknüpfte) und 36 % eine substituierte (1,2,4-verknüpfte) Rhamnopyranoseeinheit, wie sie im Rückgrat der Rhamnogalacturonane Typ I vorkommen. Da der molare Anteil der Arabinose den der Galactose überwog, wird angenommen, dass an die Rhamnoseeinheiten in den Rhamnogalacturonanen Typ I hauptsächlich Arabinane und nur wenige (Arabino-)Galactane gebunden waren. Die Arabinane in den UBS waren überwiegend linear aufgebaut, wie die Ergebnisse der Methylierungsanalyse und des Arabinanscreenings (vgl. Abbildung 20 B und C) nahelegen. So dominierte die 1,5-verknüpfte Arabinofuranose (8 mol%) die PMAA der Arabinose nach Methylierungsanalyse. In Übereinstimmung dazu wurde im Zuge des Arabinanscreenings hauptsächlich die Arabinobiose A2a (85 mol%) enzymatisch freigesetzt, welche aus zwei α -(1→5)-verknüpften Arabinofuranosen besteht. Weiter deuteten die im Zuge der Methylierungsanalyse erfassten PMAA der 1,3,5-; 1,2,5- und 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranose (je \leq 1 mol%) auf geringere Anteile an einfach bzw. zweifach substituierten Arabinoseeinheiten in den Arabinanen hin. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen des Arabinanscreenings. Demnach entfielen 12 mol% auf die Arabinotetraose A4b und 1 mol% auf A4a (vgl. Abbildung A - 1 im Anhang), die eine einfache Substitution mit Arabinose in O2 bzw. O3-Position repräsentieren. Der Nachweis geringer molarer Anteile der Arabinoheptaose A7b (2 mol%) und Spuren der Arabinopentaose A5a deuteten auf einzelne höher substituierte Bereiche in den Arabinanstrukturen hin. A7b besteht aus einem aus fünf α -(1→5)-verknüpften Arabinofuranosen aufgebauten Rückgrat, welches an der zweiten und vierten Arabinoseeinheit in O3-Position mit je einer Arabinofuranose substituiert ist. A5a zeigt das Vorkommen von in O2- und O3-Position disubstituierten Arabinoseeinheiten an. Die dargelegten Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die Arabinane der UBS der Erbsenschale überwiegend linear, mit vereinzelten Substitutionen in O2- und seltener in O3- bzw. O2- und O3-Position, aufgebaut waren. Die Struktur der (Arabino-)Galactane in den UBS war vermutlich ausschließlich linear. Dies spiegelte sich zum einen in den beiden nachgewiesenen PMAA der Galactopyranose (terminal und 1,4-verknüpft) nach Methylierungsanalyse und zum anderen in der beim Galactanscreening ausschließlich freigesetzten Galactobiose G2a (vgl. Abbildung A - 2 im Anhang) wider. Diese besteht aus zwei

β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen. Die Galacturonsäure in den Homogalacturonanen und Rhamnogalacturonanen Typ I können methyliert und/oder acetyliert vorliegen (vgl. Kapitel 1.3.2.3). In den UBS der Erbsenschale wurde ein DM und DAc von je 0,1 % ermittelt. Dies sprach für einen sehr geringen Anteil an Esterbindungen in den Pektinstrukturen sowie anderer in den UBS der Erbsenschale potenziell verestert vorliegender Polysaccharide, wie (Glucurono-)Xylane. In der Literatur hingegen finden sich für polymergebundene Galacturonsäuren in Erbsenschalen mit einem DM von 33 % und einem DAc von 40 % höhere Veresterungsgrade (Le Goff *et al.*, 2001).

Mannane spielten in den Polysacchariden der UBS der Erbsenschale aufgrund des sehr geringen molaren Anteils des in der Methylierungsanalyse nachgewiesenen PMAA der 1,4-verknüpften Mannopyranose (< 1 mol%) eine untergeordnete Rolle.

Hauptbestandteil der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der LBS der Erbsenschale nach Methanolysen und nachfolgender TFA-Hydrolyse war mit 44 mol% Arabinose (vgl. Abbildung 20 A). Passend dazu überwogen nach der Methylierungsanalyse mit 62 mol% die PMAA der Arabinose. Diese stammten wahrscheinlich zusammen mit Galacturonsäure (17 mol%), Galactose (10 mol%) und Rhamnose (7 %) hauptsächlich aus den Pektinstrukturen der Rhamnogalacturonane Typ I, genauer den Arabinanen. Wie in den UBS überwog deren Anteil aufgrund des höheren molaren Anteils an Arabinose im Vergleich zu Galactose den der (Arabino-)Galactane deutlich. Die Dominanz der Arabinane gegenüber den (Arabino-)Galactanen in Erbsenschalen stellten auch Ralet und Mitarbeitende (1993) fest. Etwa 37 % der Rhamnoseeinheiten lagen, wie in den Polysacchariden der UBS, 1,2,4-verknüpft und damit substituiert vor. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse und des Arabinanscreenings (vgl. Abbildung 20 B und C) zeigen, dass die Arabinane in den LBS ähnlich aufgebaut waren wie die in den UBS. Es dominierte das aus den linearen Arabinanabschnitten stammende PMAA der 1,5-verknüpften Arabinofuranose (50 mol%), während die PMAA der einfach (1,2,5- bzw. 1,3,5-verknüpft) bzw. zweifach (1,2,3,5-verknüpft) substituierten Arabinoseeinheiten in deutlich geringeren molaren Anteilen vorkamen. Beim Arabinanscreening kam es vor allem zur enzymatischen Freisetzung der Arabinobiose A2a (85 mol%). Daneben wurden die Arabinotetraose A4b (10 %) und geringere molare Anteile an A4b, A5a, A6a und A7a erfasst. Diese wiesen auf das Vorliegen vereinzelter (höher) substituierter Abschnitte in den überwiegend linearen Arabinanstrukturen der LBS hin. Die substituierten Arabinoseeinheiten waren bevorzugt in O2- und seltener in O3- bzw. O2- und O3-Position anzutreffen. Auch Ralet und Mitarbeitende (1993) beschrieben in den wasserlöslichen Polysacchariden der Erbsenschale die Struktur der Arabinane als überwiegend linear. Jedoch wiesen die Autoren vorrangig eine Substitution der Arabinane in O3-Position und wenige doppelt substituierte Arabinoseeinheiten nach. Obwohl sowohl nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse als auch nach Methylierungsanalyse Galactose bzw. die für (Arabino-)Galactane Typ I und II typischen PMAA der terminalen, 1,4-; 1,3- und 1,3,6-verknüpften Galactopyranose nachgewiesen wurden, konnten beim Galactanscreening auf (Arabino-)Galactane Typ I enzymatisch keine (Arabino-)Galactooligosaccharide in detektierbaren Mengen freigesetzt werden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die LBS der Erbsenschale kaum Typ I (Arabino-)Galactanstrukturen aufwiesen und die

Galactose zu großen Teilen aus anderen löslichen Oligo- und/oder Polysacchariden, wie (Arabino-) Galactane Typ II, RFO oder Xyloglucanen, stammte. So wurden bei der Methylierungsanalyse unter anderem terminale und 1,6-verknüpfte Galactopyranosen nachgewiesen, welche Verbindungs-typen der RFO repräsentieren (vgl. Kapitel 1.2.2). RFO sind aufgrund abnehmender Löslichkeit in 80%igem Ethanol mit zunehmendem Polymerisierungsgrad vermehrt in den LBS anstatt in den NLBS-Faktionen anzutreffen. Als Bestätigung diente der Nachweis von Raffinose, Stachyose und Verbascose in den LBS und der NLBS-Faktion mittels HPAEC-PAD.

Der Nachweis von Galacturonsäure deutete auf das Vorkommen von Homogalacturonanen und Rhamnogalacturonanen Typ I hin. Dabei wies das Verhältnis von Homogalacturonanen zu Rhamnogalacturonanen Typ I von 0,6, anders als in den UBS, auf Rhamnogalacturonane Typ I als dominierende Pektinstrukturen hin. Weiter war das Vorliegen von Xylogalacturonanstrukturen aufgrund des Nachweises von Xylose bzw. terminaler Xylopyranose und Galacturonsäure als monomere Bestandteile der Polysaccharide möglich. Bereits von Renard und Mitarbeitenden (1997) wurden Xylogalacturonane in Erbsenschalen vermutet und später von Goff und Mitarbeiten-den (2001) bestätigt. Die Pektinstrukturen der LBS lagen, wie die in den UBS, mit einem DM von 0,2 % und einem DAc von 0,1 % sehr gering verestert vor (vgl. Abbildung 20 E).

Außerdem wurden in den Polysacchariden der LBS nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse Xylose (15 mol%) sowie Spuren von Glucuronsäure nachgewiesen. Dies lässt zusammen mit den bei der Methylierungsanalyse erfassten PMAA der terminalen, 1,4- und 1,2,4-verknüpften Xylopyranose das Vorkommen von (Glucurono-)Xylanen in den LBS der Erbsenschale vermuten. So beschrieben auch Ralet und Mitarbeitende (1993) das Vorkommen von linearen Xylanen und von in zu geringerem Umfang mit Arabinose und/oder Glucuronsäure substituierten (Arabinoglucurono-) Xylanen. Weiter deuten ihre Ergebnisse auf einen hohen DAc der (Arabinoglucurono-)Xylane hin.

Zusammen mit Glucose (2 mol%), Galactose und der nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse in Spuren detektierten Fucose könnte die detektierte terminale Xylopyranose partiell auch aus Xyloglucanen stammen. Hierfür sprachen die mittels Methylierungsanalyse nachgewiesenen und in Xyloglucanen anzutreffenden Bindungstypen der Glucose (terminal und 1,4-verknüpft), Xylose (terminal) und Galactose (terminal und 1,2-verknüpft). Jedoch konnten die für Xyloglucane charakteristischeren PMAA der 1,4,6-verknüpften Glucopyranose sowie der 1,2-verknüpften Xylopyranose und terminalen Fucose nicht erfasst werden. Dies könnte möglicherweise an den nur sehr geringen Anteilen an entsprechend gebundener Glucose, Xylose bzw. Fucose in den Xyloglucanstrukturen liegen. Diese Annahmen wurden gestützt durch den qualitativen Nachweis der aus einem mit Xylose substituierten Glucanrückgrat bestehenden (X, XG, XX, XXG, XXX), den fucosierten (XFG, XLFG und XXFG) sowie den galactosehaltigen Xyloglucanoligosacchariden (XLG, XXLG und XLLG) im Xyloglucanscreening.

Außerdem wurden in den Polysacchariden der LBS nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse geringe molare Anteile an Mannose (4 mol%) nachgewiesen, welche aus Mannanen stammen können. Den Ergebnissen der Methylierungsanalyse zufolge handelt es sich dabei um terminale und 1,3-ver-

knüpfte Mannopyranosen. Jedoch ist letzterer Bindungstyp üblicherweise nicht in pflanzlichen Mannanen zu erwarten (Pettolino *et al.*, 2012).

Basierend auf den vorgestellten Ergebnissen dominierte in den Polysacchariden der untersuchten Erbsenschalen Cellulose gefolgt von (Glucurono-)Xylanen, sehr niedrigveresterten Pektinen und Xyloglucanen. Hinsichtlich der Pektine waren vor allem die Strukturelemente der Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I, hier insbesondere die überwiegend linearen Arabinane, in relevanten Anteilen vorhanden. Den potenziell vorliegenden Mannanen galt aufgrund ihres geringen Anteils bei der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung sowie der sich daran anschließenden Charakterisierung der Erbsenschale keine weitere Beachtung.

4.4.1.2 ENZYMATISCH-MECHANISCHE BEHANDELTE ERBSENSCHALEN

Die Ergebnisse der Charakterisierung der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-em-1/2/3/4) werden in den nachfolgenden Kapiteln im Vergleich zur unbehandelten (E-u) und mechanisch behandelten Erbsenschale (E-m-5x) in Hinblick auf Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung und der Struktur relevanter Polysaccharide sowie der in den NLBS-Faktionen vorliegenden Oligosaccharide ausgeführt.

4.4.1.2.1 VERÄNDERUNGEN IN DER BALLASTSTOFFZUSAMMENSETZUNG

Die enzymatisch-mechanische Behandlung der Erbsenschale führte zu einer Abnahme des Anteils an UBS von 70 % (E-u) bzw. 73 % (E-m-5x) auf 55 - 58 % (E-em-1/2/3/4), wie die Ergebnisse der analytischen Ballaststoffbestimmung zeigen (vgl. Abbildung 21 A), die aus der Masterarbeit von Veronika Kurz (2023) stammen. Gleichzeitig kam es zu einer geringfügigen Zunahme des Anteils an LBS von 5 % (E-u) auf 6 - 7 % (E-em-1/2/3/4). Jedoch erhöhte bereits die rein mechanische Behandlung der Erbsenschale den Anteil an LBS auf 7 %. Eine gleiche Tendenz wie bei den LBS zeigte sich bei den NLBS (Kurz, 2023). Allerdings blieb deren Anteil (1 - 2 %) in der Erbsenschale nach der mechanischen bzw. enzymatisch-mechanischen Behandlung weiterhin gering. Dabei war eine Unterbestimmung der NLBS (vgl. Kapitel 4.2) wahrscheinlich, wie die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung einzelner zu den NLBS zählender Oligosaccharide zeigen. So enthielten die enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen 3 - 4 % Oligosaccharide, bei welchen es sich überwiegend um Xylo-, Cello- und Arabinoxylansaccharide (vgl. Kapitel 4.4.1.2.3) handelte. Dabei entfiel in etwa die Hälfte allein auf Xylo- und Arabinotriose, welche mit der AOAC-Methode nicht bzw. nur partiell als NLBS erfasst werden.

Insgesamt reduzierte sich der Gesamtballaststoffgehalt im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung von 76 % (E-u) bzw. 80 % (E-m-5x) auf 63 - 67 % (E-em-1/2/3/4) (Kurz, 2023). Dabei war keine deutliche Verschiebung der UBS zu den LBS und NLBS, wie sie durch die enzymatisch-mechanische Behandlung der Erbsenschale angestrebt wurde, zu erreichen. Als Ursache wird eine bevorzugte enzymatische Hydrolyse der löslichen Poly- und Oligosaccharide gegenüber den unlöslichen aufgrund einer besseren Zugänglichkeit angenommen. Dabei wurden unter anderem

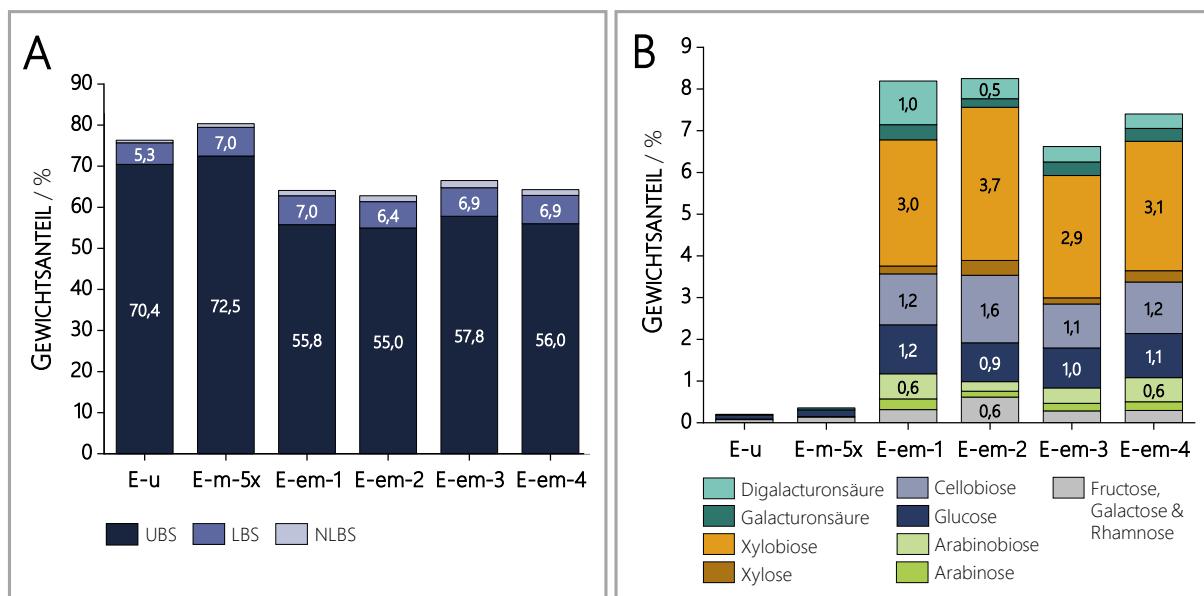


Abbildung 21: Gewichtsanteile an Ballaststoffen (A) sowie freien Mono- und Disacchariden (B) der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-5x) und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-em-1/2/3/4) jeweils bezogen auf die getrocknete Erbsenschale ($n = 2$), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, NLBS = niedermolekulare, lösliche Ballaststoffe (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023))

Mono- und Disaccharide freigesetzt, wie auch die Ergebnisse der Analyse von freien Mono- und Disacchariden (vgl. Abbildung 21 B) bestätigen. So wiesen die enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen 2 % Mono- und 5 - 6 % Disaccharide auf, während in der unbehandelten bzw. der mechanisch behandelten Erbsenschale nur wenige Mono- (< 0,5 %) und keine Disaccharide nachgewiesen wurden (Kurz, 2023). Bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale wurden vorwiegend Xylobiose und wenig Xylose aus Xylanen, Cellobiose und Glucose aus Cellulose, Di- und Monogalacturonsäure aus Homogalacturonanen sowie Arabino-biose und Arabinose aus Arabinanen freigesetzt. Morales Medina und Mitarbeitende (2024) fanden bei vergleichbaren enzymatisch-mechanischen Behandlungen von Erbsenschalen unterschiedlich starke Abnahmen (18 - 51 %) des Anteils an UBS und Zunahmen an alkoholunlöslicher (3 - 4 fache) bzw. löslicher Masse (2 - 12-fache), welche mit LBS bzw. NLBS gleichgesetzt werden können. Allerdings behandelten die Autoren die Erbsenschale mit anderen kommerziellen Enzympräparaten für eine länger Zeit (3 - 8 Stunden) sowie anschließend mechanisch intensiver (8 x 2000 bar) als es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Von den Autoren wurde weiter keine Proteinkorrektur der einzelnen Ballaststofffraktionen vorgenommen und der Gehalt an NLBS lediglich rechnerisch ohne Berücksichtigung möglicher freigesetzter Anteile an Mono- und Disacchariden ermittelt.

Der Vergleich der von Veronika Kurz (2023) analysierten Molekulargewichtsverteilungen der Polysaccharide aus den LBS der unbehandelten, mechanisch und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (vgl. Abbildung 22) zeigte, dass es durch die mechanische Behandlung zu einer Zunahme an löslichen Polysacchariden mit höherem Molekulargewicht (12 bis > 670 kDa) kam. Es war daher anzunehmen, dass die mechanische Behandlung der Erbsenschale partiell zur

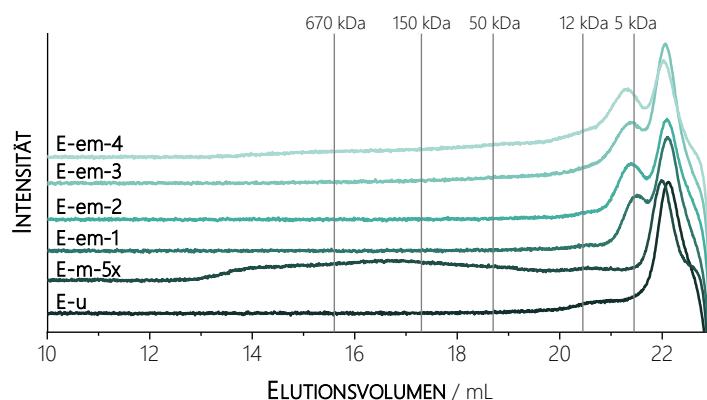


Abbildung 22: Ausschnitte der Chromatogramme zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung der löslichen Ballaststoffe der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-5x) und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-em-1/2/3/4) mit Dextranstandardsubstanzen (5, 12, 50, 150 und 670 kDa) als Molekulargewichtsmarker (n = 2) (Daten erhoben von Veronika Kurz (2023))

Löslichkeit höhermolekularer Polysaccharide führte. Dafür sprach auch der geringfügig erhöhte Anteil an LBS in der mechanisch behandelten gegenüber der unbehandelten Erbsenschale. In der unbehandelten sowie den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen hingegen waren lösliche Polysaccharide mit einem Molekulargewicht von über 12 kDa nicht vorhanden. Jedoch führte die Kombination aus enzymatischer und mechanischer Behandlung im Vergleich zu keiner bzw. einer rein mechanischen Behandlung der Erbsenschale zur Zunahme löslicher Polysaccharide mit einem geringeren Molekulargewicht (5 - 12 kDa). Somit wurden durch die vorherige enzymatische Hydrolyse vermutlich partiell unlösliche Polysaccharide zu löslichen Polysacchariden mit einem Molekulargewicht von unter 12 kDa abgebaut. Der Übergang von Polysacchariden aus den UBS zu den LBS der Erbsenschale im Zuge einer enzymatisch-mechanischen Behandlung steht in Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Ballaststoffbestimmung. Dass in den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen nicht wie in der mechanisch behandelten Erbsenschale höhermolekular, lösliche Polysaccharide vorzufinden waren, könnte an einer unvollständigen Inaktivierung der Enzymaktivitäten (vgl. Kapitel 4.3) liegen. Es besteht die Vermutung, dass mechanisch generierte, höhermolekulare Polysaccharide (12 bis > 670 kDa) enzymatisch weiter abgebaut wurden. Dabei handelte es sich überwiegend um die Spaltung von (Glucurono-)Xylanen und Arabinanen mittels entsprechenden XYL- bzw. ARA-Aktivitäten, worauf im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird.

4.4.1.2.2 VERÄNDERUNGEN IN DEN POLYSACCHARIDSTRUKTUREN

Die beschriebene Verschiebung der Anteile der UBS zu den LBS, NLBS sowie freien Mono- und Disacchariden durch die enzymatisch-mechanische Behandlung der Erbsenschale konnte vorrangig auf den enzymatischen Abbau von Cellulose, (Glucurono-)Xylanen, Arabinanen und Homogalacturonanen zurückgeführt werden. Der erwartete Abbau dieser Polysaccharidstrukturen zeigte sich einerseits an der Freisetzung entsprechender Mono-, Di- und Oligosaccharide (vgl. Abbildung 21 B und Kapitel 4.4.1.2.3) und andererseits an der Verschiebung molarer Anteile in der

Monosaccharidzusammensetzung der UBS, LBS bzw. NLBS-Faktionen, wie im Weiteren im Detail beschrieben wird. Da die vier enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen ähnliche Veränderungen in den Polysaccharidstrukturen gegenüber der unbehandelten bzw. mechanisch behandelten Erbsenschale aufwiesen, wird nachfolgend exemplarisch auf das Ballaststoffpräparat E-em-1 eingegangen. Die Daten der Monosaccharidanalyse sowie die der Bestimmung freier Mono- und Disaccharide entstanden überwiegend im Rahmen der Masterarbeit von Veronika Kurz (2023).

In den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen wurden Glucose, Cellobiose, -triose, und -tetraose nachgewiesen, während die unbehandelten und mechanisch behandelten Erbsenschalen nur wenig monomere Glucose enthielten. Daher wurde von einem Abbau der vorliegenden Cellulose durch die im Zuge der enzymatischen Behandlung zugesetzten Enzyme mit CEL-Aktivität (CEL und XYL) ausgegangen. Wie der in E-em-1 zurückbleibende hohe Anteil an UBS (56 %) vermuten lässt, konnte Cellulose jedoch bei weitem nicht vollständig enzymatisch hydrolysiert werden. Dies zeigte sich auch in der Dominanz von Glucose (82 mol%) in der Monomerzusammensetzung der unlöslichen Polysaccharide nach schwefelsaurer Hydrolyse der UBS von E-em-1 (vgl. Abbildung A - 10 im Anhang). Dabei stammte die Glucose vermutlich überwiegend aus kristalliner Cellulose, deren Hydrolyse durch CEL, insbesondere *endo*-CEL, sterisch behindert wurde. Es wird daher angenommen, dass die kristalline Cellulose in der Erbsenschale auch nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung weitgehend unverändert blieb.

Die Monomerzusammensetzung der Polysaccharide aus den UBS von E-em-1 wies nach Methanolyse und TFA-Hydrolyse (vgl. Abbildung 23 A) mit 27 mol% einen gegenüber der unbehandelten (31 mol%) und mechanisch behandelten Erbsenschale (40 mol%) reduzierten molaren Anteil an Xylose auf. Die erfasste Xylose stammte vermutlich größtenteils aus den (Glucurono-)Xylanen, den zweithäufigsten Polysacchariden in der Erbsenschale (vgl. Kapitel 4.4.1.1). Somit wies diese Veränderung in der Monosaccharidzusammensetzung auf einen enzymatischen Abbau von (Glucurono-)Xylanen durch XYL-Aktivitäten der zugesetzten Enzyme hin. Eine Bestätigung für den Abbau fand sich in der Monomerzusammensetzung der NLBS-Faktion (vgl. Abbildung 23 C), welche neben Oligo- auch freie Mono- und Disaccharide enthielt (vgl. Kapitel 3.3.4). So stieg nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale der molare Anteil an Xylose auf 40 mol% (E-em-1). Dessen Ursprung kann aus den Ergebnissen der Analyse der freien Mono- und Disaccharide (vgl. Abbildung 21 A) sowie aus denen der Analyse der Oligosaccharide in den NLBS-Faktionen (vgl. Kapitel 4.4.1.2.3) abgeleitet werden. Es zeigte sich, dass es bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale, anders als bei der mechanischen Behandlung, zur Freisetzung von Xylose, Xylobiose, und (Glucurono-)Xylooligosacchariden kam, welche alle Abbauprodukte von (Glucurono-)Xylanen darstellen. Hinsichtlich des Abbaus der (Glucurono-)Xylane wurde zudem von der weitgehenden Hydrolyse der enzymatisch zugänglichen Strukturen ausgegangen, da die XYL-Aktivitäten im Zuge der Behandlung nicht vollständig inaktiviert wurden (vgl. Kapitel 4.3).

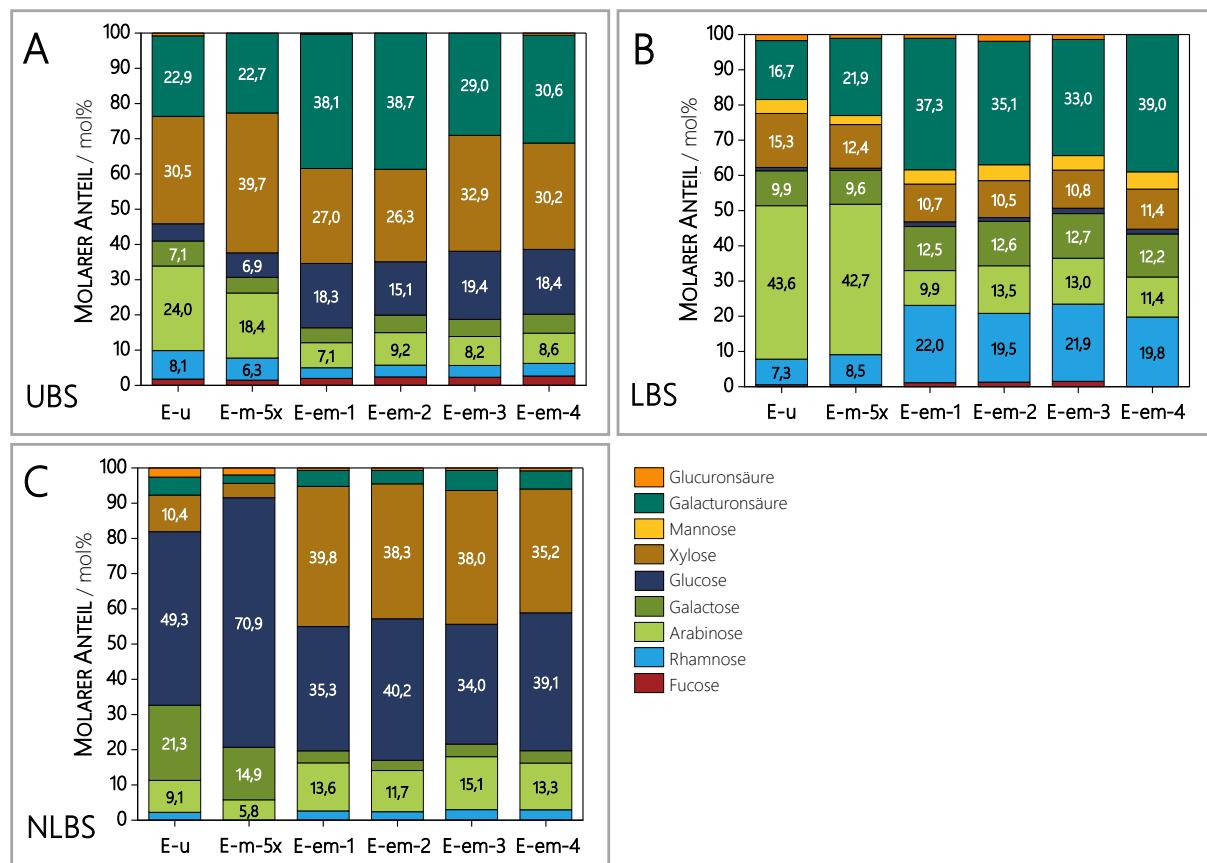


Abbildung 23: Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolysen und Trifluoressigsäurehydrolyse der unlöslichen (UBS) (A) und löslichen Ballaststoffe (LBS) (B) sowie der niedermolekularen, löslichen Ballaststoff (NLBS)-Fraktionen (C) der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-5x) und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-em-1/2/3/4) ($n = 2$) (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023))

Daneben zeigte die Betrachtung der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der UBS und LBS (vgl. Abbildung 23 A und B) von E-em-1 im Vergleich zur unbehandelten und mechanisch behandelten Erbsenschale eine Abnahme des molaren Anteils an Arabinose, welche überwiegend aus Arabinanen stammte (vgl. Kapitel 4.4.1.1). In den UBS sank der molare Anteil an Arabinose von 24 mol% (E-u) bzw. 18 mol% (E-m-5x) auf 7 mol % (E-em-1) und in den LBS von 44 mol% (E-u) bzw. 43 mol% (E-m-5x) auf 10 mol % (E-em-1). Somit war der Rückgang des molaren Anteils an Arabinose in den LBS stärker ausgeprägt als in den UBS. Dies sprach für eine bevorzugte enzymatische Hydrolyse der löslichen gegenüber den unlöslichen Arabinanen. Außerdem wurden nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale freie Arabinose, Arabinobiose und Arabinoooligosaccharide, wie sie im Zuge einer enzymatischen Hydrolyse von Arabinanen mit ARA entstehen können, nachgewiesen. Der Abbau von Arabinanen spiegelte sich auch in einem erhöhten molaren Anteil an Arabinose (14 mol%) in der Monosaccharidzusammensetzung der NLBS-Faktion von E-em-1 wider. Einen genaueren Einblick in die Veränderungen der Arabinanstrukturen im Zuge der mechanischen bzw. enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale geben die Ergebnisse des Arabinanscreenings (vgl. Tabelle 4), welche partiell aus der Masterarbeit von Veronika Kurz (2023) stammen. Es zeigten sich in den Arabinanen der UBS und LBS vergleichbare strukturelle Veränderungen, weshalb diese hier

Tabelle 4: Molare Verteilung und absoluter auf die getrocknete Erbsenschale bezogener Summengehalt von aus den unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-5x) und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-em-1/2/3/4) enzymatisch freigesetzten Arabinooligosacchariden (\pm Range/2, n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, A2a - A7b = Arabinobiose bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1 im Anhang), LOQ = Bestimmungsgrenze (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023))

	E-u	E-m-5x	E-em-1	E-em-2	E-em-3	E-em-4
UBS						
MOLARE VERTEILUNG / mol%						
A2a	84,6 \pm 0,0	90,7 \pm 0,0	95,0 \pm 0,1	94,6 \pm 0,1	96,0 \pm 0,0	95,1 \pm 0,1
A4a	1,1 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	< LOQ	0,8 \pm 0,0	< LOQ	0,8 \pm 0,0
A4b	12,0 \pm 0,0	7,2 \pm 0,0	4,0 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	3,2 \pm 0,0	3,3 \pm 0,1
A5a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A7b	2,3 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$						
	14,1 \pm 1,2	13,3 \pm 0,3	1,7 \pm 0,0	2,8 \pm 0,3	2,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
LBS						
MOLARE VERTEILUNG / mol%						
A2a	84,9 \pm 0,3	90,7 \pm 0,6	95,2 \pm 0,1	95,0 \pm 0,2	94,9 \pm 0,0	95,9 \pm 0,5
A4a	1,7 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	0,7 \pm 0,2
A4b	9,7 \pm 0,2	6,7 \pm 0,5	3,9 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3	3,7 \pm 0,0	2,9 \pm 0,4
A5a	0,5 \pm 0,0	-	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A7a	1,5 \pm 0,0	-	-	-	-	< LOQ
A7b	1,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	< LOQ	< LOQ	0,8 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$						
	311,1 \pm 14,1	108,8 \pm 7,8	24,1 \pm 4,2	47,8 \pm 3,5	39,4 \pm 4,0	44,5 \pm 0,9

beispielhaft an den unlöslichen Arabinanen erläutert werden. So wurden aus den Arabinanen der UBS von E-em-1 hauptsächlich die Arabinobiose A2a (95 mol%) begleitet von geringen molaren Anteilen der Arabinotetraose A4b (4 mol%) und -heptaose A7b (1 mol%) sowie Spuren der Arabinotetraose (A4a) und -pentaose (A5a) enzymatisch freigesetzt. Da der molare Anteil an A2a aus den linearen Arabinanabschnitten von E-em-1 verglichen mit dem molaren Anteil aus der unbehandelten Erbsenschale (85 mol%) höher war, war eine Linearisierung der Arabinanstrukturen im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale wahrscheinlich. Es lag daher nahe, dass die zur enzymatischen Hydrolyse eingesetzten kommerziellen Enzympräparate eine Arabinofuranosidaseaktivität aufwiesen. Jedoch bewirkte bereits die rein mechanische Behandlung der Erbsenschale eine Erhöhung des molaren Anteils an A2a (91 mol%). Dies konnte einerseits durch eine alleinige Verschiebung der molaren Verhältnisse freigesetzter Arabinoooligosaccharide in Folge einer mechanisch bedingten verbesserten Zugänglichkeit der Arabinanstrukturen, insbesondere der linearen Abschnitte, der Erbsenschale für die zur Analyse eingesetzten endo-ARA erklärt werden. Andererseits war denkbar, dass der Ablauf einer nicht enzymatisch katalysierten hydrolytischen Abspaltung von Arabinoseeinheiten aus den Arabinanen im leicht sauren Milieu (pH = 5,0 - 5,7) unter dem hohen Druck und den dadurch ebenfalls erhöhten Temperaturen bei der mechanischen Behandlung der Erbsenschale begünstigt war. So sind glykosidische Bindungen, die Arabinofuranosen enthalten, im Sauren und bei erhöhten Temperaturen

labiler als solche die Arabinopyranosen enthalten. Hinsichtlich der Lokalisation der Arabinoseseitenketten am Arabinanrückgrat waren die Arabinane der enzymatisch-mechanisch bzw. mechanisch behandelten Erbsenschalen mit denen der unbehandelten Erbsenschale vergleichbar. Der semiquantitativ abgeschätzte absolute Summengehalt an enzymatisch freigesetzten Arabino-oligosacchariden aus den Arabinanstrukturen der UBS bzw. LBS von E-em-1 war mit 2 µmol/g bzw. 24 µmol/g gegenüber dem entsprechenden Summengehalt der unbehandelten (14 µmol/g bzw. 311 µmol/g) bzw. mechanisch behandelten Erbsenschale (13 µmol/g bzw. 109 µmol/g) deutlich reduziert. Dies wies ebenfalls auf einen enzymatischen Abbau der Arabinane im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale durch ARA-Aktivitäten der zugesetzten Enzyme hin. Insgesamt ist davon auszugehen, dass es bei den Arabinanen, wie bei den (Glucurono-)Xylanen, aufgrund einer unvollständigen Inaktivierung der ARA-Aktivitäten (vgl. Kapitel 4.3) zu einem weitgehenden enzymatischen Abbau der zugänglichen Arabinanstrukturen kam.

Aufgrund der Freisetzung von Mono- und Digalacturonsäure konnte geschlussfolgert werden, dass die in geringerem Umfang in der Erbsenschale enthaltenen Homogalacturonane (vgl. Kapitel 4.4.1.1) durch die enzymatisch-mechanische Behandlung teilweise abgebaut wurden. Hierfür verantwortlich waren vermutlich vorrangig die *exo*-PG-Aktivitäten (vgl. Kapitel 4.3) der zur Erbsenschale zugesetzten Enzyme. Die höheren molaren Anteile an Galacturonsäure in der Monomerzusammensetzung der unlöslichen (38 mol%) und löslichen Polysaccharide (37 mol%) von E-em-1 sprachen für den Verbleib einer größeren Menge an Homogalacturonanstrukturen in den UBS und LBS der Erbsenschale nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung. Die rein mechanische Behandlung der Erbsenschale führte im Vergleich zur unbehandelten Erbsenschale zu einem leichten Anstieg des molaren Anteils an Galacturonsäure in der Monosaccharidzusammensetzung der LBS von 17 mol% auf 22 mol%. Dies deutete auf eine verbesserte Löslichkeit der Homogalacturonane in Folge der mechanischen Behandlung hin. Ebenfalls konnte damit das Vorkommen der höhernmolekularen Polysaccharide in den LBS der mechanisch behandelten Erbsenschale erklärt werden (vgl. Kapitel 4.4.1.2.1). Jedoch war es nicht möglich, anhand der in dieser Arbeit erhobenen Analysedaten zu beurteilen, in welchem Ausmaß der angestrebte Übergang von Homogalacturonanen aus den UBS in die LBS im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung stattfand.

Die Ergebnisse des Xyloglucanscreenings (vgl. Abbildung A - 11 im Anhang) zeigen, dass im Vergleich zur unbehandelten Erbsenschale (vgl. Kapitel 4.4.1.1) nach der mechanischen Behandlung insbesondere der molare Anteil an den enzymatisch freigesetzten Xyloglucanoligosacchariden XX zu und XXFG abnahm (Kurz, 2023). Als Ursache möglich wäre eine rein mechanische Lockerung des Zellwandnetzwerks (vgl. Kapitel 1.3.3) der Erbsenschale im Zuge der mechanischen Behandlung. Dabei könnte die Anzahl an Interaktionen zwischen Cellulose und Xyloglucanen minimiert und damit die Xyloglucanstrukturen, insbesondere die nur mit Xylose substituierten Abschnitte (XX), besser enzymatisch zugänglich geworden sein. Die Xyloglucanstrukturen der mechanisch und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen waren vergleichbar (vgl. Abbildung A - 11 und Tabelle A - 7 im Anhang) (Kurz, 2023). Dies war zu erwarten, da zur enzymatischen Hydrolyse

der Erbsenschale keine spezifischen Enzyme zur Spaltung von Xyloglucanen eingesetzt wurden. Die zusätzliche Verwendung einer Xyloglucanase bei künftigen enzymatischen Behandlungen könnte durch Spaltung vorliegender Xyloglucane eine weitere Lockerung der Zellwandstrukturen der Erbsenschale sowie einen Übergang von Polysacchariden der UBS in die LBS und/oder NLBS begünstigen.

4.4.1.2.3 ANALYSE DER OLIGOSACCHARIDE IN DEN NLBS-FRAKTIONEN

In den NLBS-Fraktionen der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen konnten verschiedene Oligosaccharide, resultierend aus dem Abbau entsprechender Polysaccharidstrukturen, mittels HPAEC-PAD(/MS) bzw. UHPLC-MS identifiziert und partiell quantifiziert werden (vgl. Kapitel 3.3.5.6). Die Ergebnisse hierzu können im Einzelnen der Abbildung 24 entnommen werden. Da die Unterschiede zwischen den vier enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen sehr gering waren, werden die Ergebnisse im Folgenden exemplarisch anhand von E-em-1 erläutert. Die zur Identifizierung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD aufgenommenen Chromatogramme von E-em-1 im Vergleich zur unbehandelten und mechanisch behandelten Erbsenschale können im Anhang in Abbildung A - 12 eingesehen werden.

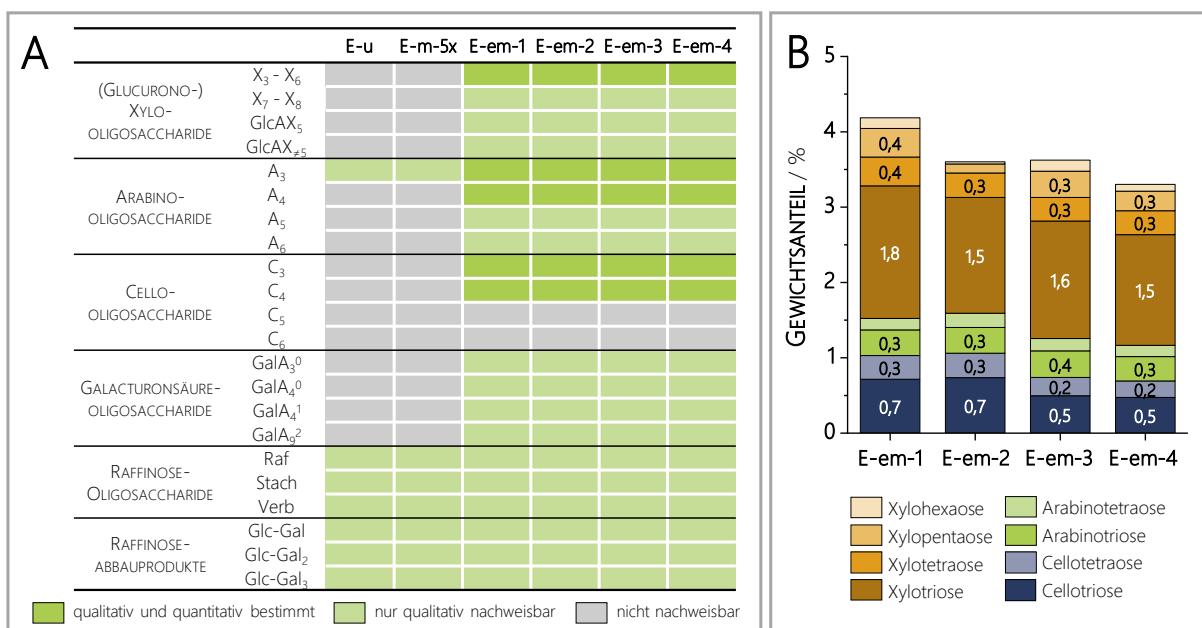


Abbildung 24: Ergebnisse der qualitativen (A) und quantitativen (B) Bestimmung von Oligosacchariden in den niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-5x) und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-em-1/2/3/4) (n = 2), Gewichtsanteile bezogen auf die getrocknete Erbsenschale, 2 - 9 = Polymerisierungsgrad, 0/1/2 = Anzahl an Methylestern, A = Arabinoseeinheit, C = Glucoseeinheit, Gal = Galactose, GalA = Galacturonsäure, Glc = Glucose, GlcA = Glucuronsäure, Raf = Raffinose, Stach = Stachyose, Verb = Verbascose, X = Xyloseeinheit

Sowohl in der unbehandelten (vgl. Kapitel 4.4.1.1) als auch in den mechanisch und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen waren RFO sowie entsprechende Abbauprodukte ohne Fructoseeinheit vorhanden. Zur Identifizierung dieser Abbauprodukte wurde neben den mittels MS bestimmten *m/z* eine RFO-Standardmischung nach vollständiger enzymatischer Hydrolyse der

Fructoseeinheiten mittels Invertase zum Abgleich der Retentionszeiten der RFO-Abbauprodukte herangezogen. Eine Quantifizierung der RFO und deren Abbauprodukte erfolgte nicht, da im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale kein Invertase zum Abbau der RFO zum Einsatz kam. Wie demnach erwartet, deutete der Vergleich entsprechender Signalintensitäten auf ähnliche Gehalte an RFO und deren Abbauprodukte in den enzymatisch-mechanisch, mechanisch und unbehandelten Erbsenschalen hin. Einzig der Anteil an Melibiose (Glc-Gal) war nach einer mechanischen bzw. enzymatisch-mechanischen Behandlung erhöht, während eine parallele Reduktion der Signalintensität an Raffinose nicht zu erkennen war. Sowohl bei der mechanischen als auch bei der enzymatischen Behandlung war die Erbsenschale erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Zudem wiesen die Suspensionen der Erbsenschalen mit 5 - 6 einen leicht sauren pH-Wert auf. Somit konnte die Bildung von Melibiose auf die Hitze- und Säure-labilität der glykosidischen Bindung in Raffinose, die Fructofuranose enthält, zurückgeführt werden. Andere Oligosaccharide waren in den NLBS-Faktionen der unbehandelten und mechanisch behandelten Erbsenschale nicht nachweisbar. Daraus konnte geschlossen werden, dass die weiteren in den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen enthaltenen Oligosaccharide (3 - 4 %) aus dem enzymatischen Abbau entsprechender in der Erbsenschale enthaltener Polysaccharide stammten.

Dem Oligosaccharidprofil der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen zufolge handelte es sich bei den (Glucurono-)Xylanen um die bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung am stärksten abgebauten Polysaccharide der Erbsenschale. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die nicht inaktivierten XYL-Aktivitäten einen weitgehenden Abbau der enzymatisch zugänglichen (Glucurono-)Xylane ermöglichten. In E-em-1 stellten mit einem Gewichtsanteil von 2,7 % bezogen auf die getrocknete Erbsenschale die Xylooligosaccharide 64 % aller quantifizierbaren Oligosaccharide. Dabei entfiel ein Gewichtsanteil von 1,8 % auf Xylotriose, je 0,4 % auf Xylotetraose und -pentaose und 0,1 % auf Xylohexaose. Qualitativ war zudem der Nachweis der beiden längerkettigeren Xylooligosaccharide, Xyoheptaose und -oktaose, möglich. Daneben konnte Glucuronoxypentaose über den Abgleich der Retentionszeit mit der von Simon Beck (2022) im Rahmen seiner Masterarbeit weitgehend isolierten und charakterisierten Standardsubstanz identifiziert werden. Die Aufreinigung einer Mischung aus Xylo- und Glucuronoxyloligosacchariden von Simon Beck (2022) ermöglichte zudem die Identifizierung weiterer, hinsichtlich des DP nicht genauer charakterisierter, Glucuronoxyloligosaccharide. Eine absolute Quantifizierung dieser war aufgrund fehlender Standardsubstanzen nicht möglich. Jedoch waren die Gehalte der einzelnen Glucuronoxyloligosaccharide aufgrund der vergleichsweise kleinen PAD-Signale vermutlich gering.

Obwohl Cellulose die Polysaccharide der Erbsenschale dominierte (vgl. Kapitel 4.4.1.1), bildeten die daraus mittels CEL freigesetzten Cellooligosaccharide nur den zweitgrößten Anteil (24 %) an den Oligosacchariden in der NLBS-Faktion. So konnten in der NLBS-Faktion von E-em-1 Cellotriose (0,7 %) und -tetraose (0,3 %) quantifiziert werden, während Cellopentaose und -hexaose nicht detektiert wurden. Letztere weisen eine geringe Löslichkeit in 80%igem Ethanol auf, weshalb

angenommen wird, dass Cellopentaose und -hexaose vorwiegend in den LBS und nicht in den NLBS-Faktionen vorlagen. Weiter war der Nachweis längerkettiger Cellooligosaccharide ($DP > 6$) durch deren Unlöslichkeit in Wasser limitiert. Als Grund für die geringen Gehalte an Cellooligosacchariden kann die eingeschränkte enzymatische Zugänglichkeit kristalliner Cellulose und die bevorzugte Spaltung von freigesetzten Cellooligosacchariden weiter zu kürzerkettigen Cellooligosacchariden, Cellobiose und/oder Glucose durch die CEL-Aktivitäten angeführt werden.

Die Arabinane stellten in der Erbsenschale eine Minorkomponente dar (vgl. Kapitel 4.4.1.1). Dennoch machten die enzymatisch freigesetzte Arabinotriose und -tetraose 12 % der quantifizierbaren Oligosaccharide aus. Daneben wies die NLBS-Faktion von E-em-1 Arabinopentaose und -hexaose in nicht quantifizierbaren Mengen auf. Allerdings führten die nicht inaktivierten ARA-Aktivitäten vermutlich nicht nur zu einer weitgehenden Hydrolyse der Arabinanstrukturen, sondern auch zu einem unerwünschten Abbau zuvor freigesetzter Arabinoooligosaccharide weiter zu Arabinobiose und/oder Arabinose.

Eine geringe Bedeutung für das Oligosaccharidprofil der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen entfiel auf die aus den Homogalacturonanen freigesetzten GalA-OS. Aufgrund der Verwendung der *endo*-PG zur enzymatischen Behandlung der Erbsenschale wurde vor allem ein hoher Anteil an längerkettigen GalA-OS erwartet. Jedoch konnten bei der Analyse der NLBS-Faktion von E-em-1 mittels HPAEC-PAD lediglich Spuren an Tri- und Tetragalacturonsäure und bei der Analyse mittels UHPLC-MS das Vorkommen von Spuren an einfach methylveresterter Tetra- bzw. doppelt methylveresterter Nonagalacturonsäure nachgewiesen werden. Daher besteht die Vermutung, dass vorliegende *exo*-PG-Aktivitäten intermediär gebildete längerkettige GalA-OS zu Mono- und Digalacturonsäure abbauten.

Zur enzymatischen Hydrolyse der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen wurden vier verschieden zusammengesetzte Enzymmischungen verwendet. Daher wurde für die vier resultierenden Ballaststoffpräparate E-em-1/2/3/4 ein unterschiedliches Oligosaccharidprofil erwartet. Tatsächlich waren E-em-1/2/3/4 in Hinblick auf die vorliegenden Oligosaccharide vergleichbar. Die Ursachen hierfür waren zum einen die Nebenaktivitäten der eingesetzten Enzyme und zum anderen die unvollständige Inaktivierung mancher Enzyme nach der enzymatischen Hydrolyse. Die verschieden stark ausgeprägten Haupt- und Nebenaktivitäten der Enzyme erlaubten keine Aussage über den genauen Anteil der einzelnen Enzymaktivitäten (ARA, CEL, PG, XYL) in den vier zugesetzten Enzymmischungen. Deshalb war es nicht möglich, aus den Ergebnissen eine ideale Zusammensetzung der Enzymmischung für eine maximale Freisetzung von Oligosacchariden aus der Erbsenschale abzuleiten.

4.4.1.2.4 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN

Die vier enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen wiesen auch hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften keine großen Unterschiede auf. Im Detail einzusehen sind die von Dr. Rocío Morales-Medina bestimmten funktionellen Eigenschaften der unbehandelten, mechanisch

behandelten und enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen in Tabelle A - 8 im Anhang. Sowohl die mechanisch als auch die enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen bildeten im Gegensatz zur unbehandelten Erbsenschale physikalisch stabile 1%ige Suspensionen. Lediglich die Suspension der mechanisch behandelten Erbsenschale wies eine geringe Sedimentation (2,7 %) auf. Während die Viskosität der Suspensionen (13 - 16 mPa·s) und die Partikelgröße ($D_{90} = 81 - 92 \mu\text{m}$) nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschalen geringer waren als vor der Behandlung, blieb der Anteil an unlöslicher Masse (71 - 74 %) hoch. Die mechanische Behandlung der Erbsenschale führte im Vergleich zur enzymatisch-mechanischen Behandlung zu einer ähnlichen Viskosität und Partikelgröße. Jedoch war die unlösliche Masse in der mechanisch behandelten Erbsenschale (80 %) höher, was deren geringfügige Sedimentation erklären könnte. Die Wasserretentionskapazität der Erbsenschale konnte sowohl durch die mechanische Behandlung als auch durch die enzymatisch-mechanische Behandlung gegenüber der unbehandelten Erbsenschale vervierfacht werden. Dies sprach für eine Verbesserung der Zugänglichkeit bzw. Freisetzung wasserbindender Strukturen der Erbsenschale vor allem im Zuge der mechanischen Behandlung.

4.4.1.3 MECHANISCH-ENZYMATISCH BEHANDELTE ERBSENSCHALEN

Im Rahmen der Optimierung der Bedingungen der mechanisch-enzymatischen Behandlung (vgl. Kapitel 3.1.2) wurde mit drei verschieden intensiv mechanisch behandelten Erbsenschalen gearbeitet, welche ebenfalls hinsichtlich ihrer Ballaststoffzusammensetzung und Polysaccharidstrukturen analysiert wurden. Wie die im Anhang in Abbildung A - 13 dargestellten Ergebnisse der Bestimmung von Ballaststoffanteilen, Monosaccharidzusammensetzung, Molekulargewichtsverteilung und Feinstruktur der Arabinane zeigen, hatte die Intensität der mechanischen Behandlung keinen bedeutenden Einfluss auf die Polysaccharide der Erbsenschale (Kurz, 2023). In Übereinstimmung dazu beschrieben Morales-Medina und Mitarbeitende (2020) für verschiedene mechanisch behandelte Erbsenschalen keine Veränderungen in deren Ballaststoffanteilen. Dennoch wird vermutet, dass eine intensivere mechanische Behandlung der Erbsenschale zu einer stärker ausgeprägten Lockerung der Zellwandstrukturen geführt haben könnte und diese damit zugänglicher für eine anschließende enzymatische Hydrolyse gewesen sein könnten. Dies galt es in dem Versuchsansatz der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale zu überprüfen. Die Ergebnisse der Analysen dazu werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert. Dabei liegt der Fokus auf dem Vergleich der beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x).

In Kapitel 4.4.1.2 wurde für die enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen im Vergleich zu den unbehandelten und mechanisch behandelten Erbsenschalen detailliert erläutert, aus welchen Analyseergebnissen ein Abbau von Polysacchariden und damit einhergehende Veränderungen abgeleitet werden können. Analog kann dies auf die mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen übertragen werden, weshalb entsprechende Bezüge im Folgenden nicht genauer diskutiert werden.

4.4.1.3.1 VERÄNDERUNGEN IN DER BALLASTSTOFFZUSAMMENSETZUNG

Die Ergebnisse der analytischen Ballaststoffbestimmung aus den Masterarbeiten von Veronika Kurz (2023) und Verena Haitz (2024) können der Abbildung 25 A entnommen werden. Diese zeigen, dass die mechanisch-enzymatische Behandlung der Erbsenschale eine Reduktion des Anteils an UBS von 70 % (E-u) bzw. 73 % (E-m-3x/5x) auf etwa 61 % (E-me-3x/5x), bei gleichzeitiger Zunahme der Anteile an LBS von 5 % auf circa 7 % und an NLBS von < 1 % auf 4 - 6 %, bewirkte. Jedoch wurde anders als bei den NLBS eine entsprechende Zunahme der LBS bereits durch eine rein mechanische Behandlung der Erbsenschale erreicht. Hinsichtlich der Gehalte an NLBS wurde von einer Unterbestimmung mittels der angewandten AOAC-Methode ausgegangen (vgl. Kapitel 4.2), da durch diese Arabino- und Xylotriose, welche über 60 % der quantifizierbaren Oligosaccharide in den NLBS-Faktionen der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen ausmachten (vgl. Kapitel 4.4.1.3.3), nicht bzw. nur partiell als NLBS mitbestimmt wurden. In Summe führte die mechanisch-enzymatische Behandlung der Erbsenschale zu einer geringfügigen Verschiebung der UBS zu LBS und NLBS. Jedoch nahm der Gesamtballaststoffanteil tendenziell ab. Dies konnte durch die gleichzeitige Freisetzung von Mono- (2 %) und Disacchariden (4 %) während der enzymatischen Hydrolyse der Polysaccharide belegt werden (vgl. Abbildung 25 B). Dabei entstanden aus Cellulose, (Glucurono-)Xylanen, Arabinanen und Homogalacturonanen primär Cellobiose, Glucose, Xylo- und Arabinobiose und in geringerem Umfang Arabinose, Mono- und Digalacturonsäure sowie Xylose.

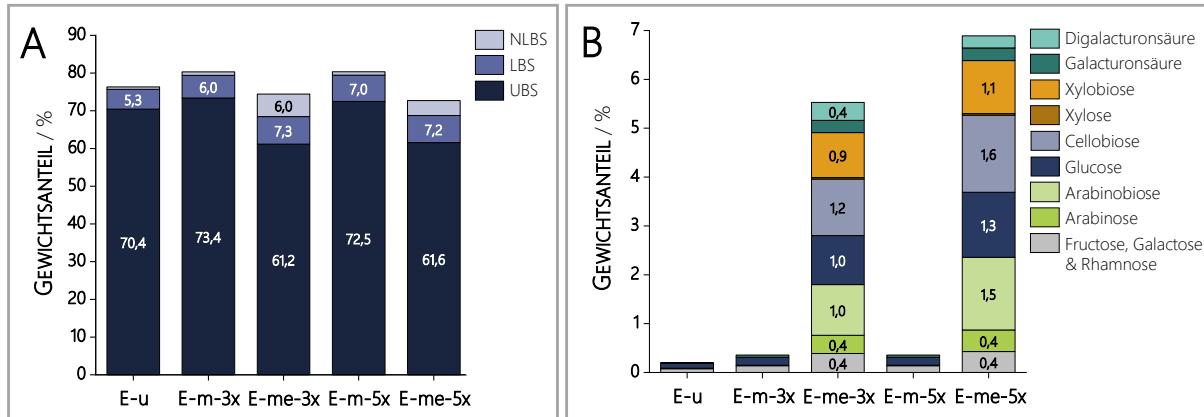


Abbildung 25: Gewichtsanteile an Ballaststoffen (A) sowie freien Mono- und Disacchariden (B) der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-3x/5x) und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) jeweils bezogen auf die getrocknete Erbsenschale (n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, NLBS = niedermolekulare, lösliche Ballaststoffe (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023) und Verena Haitz (2024))

Bei der Betrachtung der von Verena Haitz (2024) bestimmten Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide aus den LBS der unbehandelten, mechanisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (vgl. Abbildung 26) zeigten sich die gleichen Effekte, wie sie zuvor bei der Betrachtung der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (vgl. Kapitel 4.4.1.2.1) zu sehen waren. Dabei waren sowohl zwischen den beiden rein mechanisch als auch zwischen den

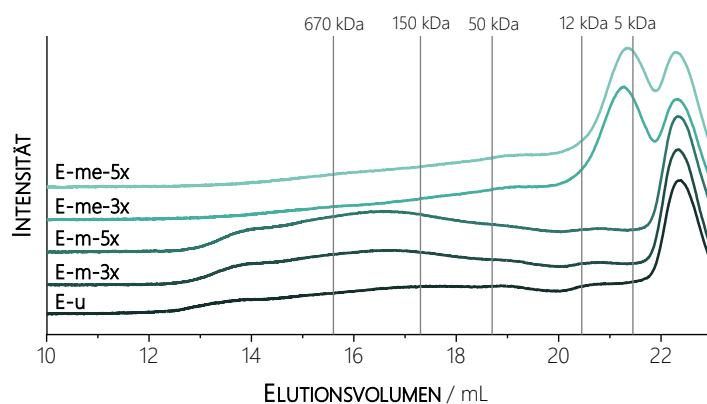


Abbildung 26: Ausschnitte der Chromatogramme zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung der löslichen Ballaststoffe der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-3x/5x) und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) mit Dextranstandardsubstanzen (5, 12, 50, 150 und 670 kDa) als Molekulargewichtsmarker ($n = 2$) (Daten erhoben von Verena Haitz (2024))

beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen keine Unterschiede zu erkennen. Die in den LBS der mechanisch behandelten Erbsenschalen enthaltenen höhermolekularen, löslichen Polysaccharide (50 - 670 kDa) waren vermutlich die Folge eines mechanisch bedingten Übergangs von Polysacchariden der UBS in die LBS. Im Zuge der mechanisch-enzymatischen Behandlung kam es zur Freisetzung von löslichen Polysacchariden mit einem geringeren Molekulargewicht (5 - 12 kDa), welche vermutlich aus dem enzymatischen Abbau unlöslicher und/oder den zuvor mechanisch generierten höhermolekularen, löslichen Polysacchariden stammten. Letztere waren den Ergebnissen der Molekulargewichtsverteilung zufolge in den LBS der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen reduziert, verglichen mit denen der mechanisch behandelten Erbsenschalen.

Die ähnlichen Ergebnisse der Ballaststoffbestimmung, der Analyse freier Mono- und Disaccharide und der Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide aus den LBS der beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen legen nahe, dass es durch eine höhere Intensität bei der vorherigen mechanischen Behandlung zu keiner ausgeprägteren Lockerung der Zellwandstrukturen kam. Nachfolgend wird betrachtet, ob sich die mechanische Behandlung in Abhängigkeit von ihrer Intensität unterschiedlich auf die Struktur und/oder den enzymatischen Abbau einzelner Polysaccharide auswirkte.

4.4.1.3.2 VERÄNDERUNGEN IN DEN POLYSACCHARIDSTRUKTUREN

Im Zuge der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale wurden, wie bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung (vgl. Kapitel 4.4.1.2.2), Arabinane, Cellulose, (Glucurono-)Xylane und Homogalacturonane in der Erbsenschale enzymatisch gespalten. Dies ließ sich aus den freigesetzten Mono-, Di- und Oligosacchariden (vgl. Abbildung 25 B und Kapitel 4.4.1.3.3) sowie den veränderten Monomerzusammensetzungen der Polysaccharide aus den UBS, LBS bzw. NLBS-Fraktionen (vgl. Abbildung 27 A - C) der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen im

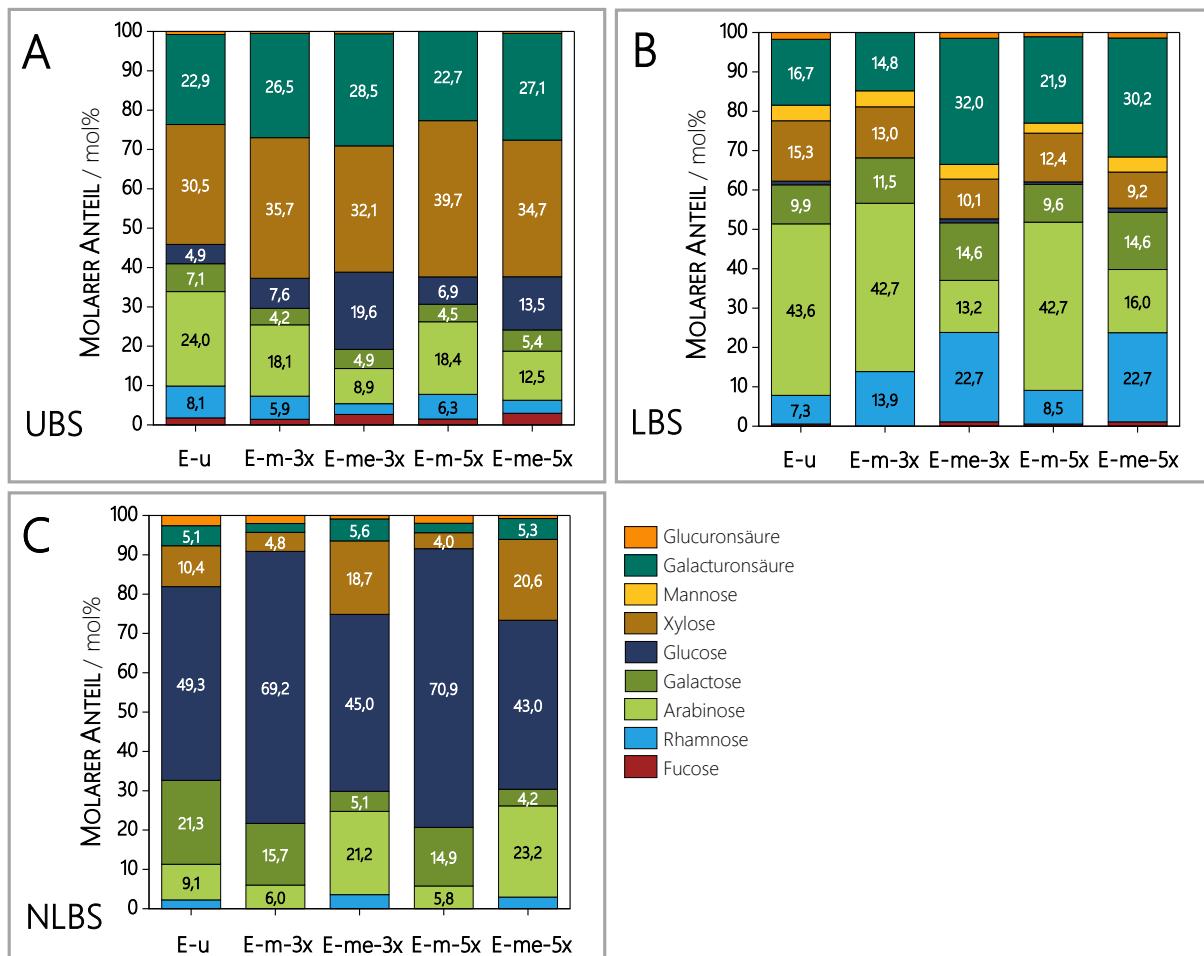


Abbildung 27: Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse und Trifluoressigsäurehydrolyse der unlöslichen (UBS) (A) und löslichen Ballaststoffe (LBS) (B) sowie der niedermolekularen, löslichen Ballaststoff (NLBS)-Fraktionen (C) der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-3x/5x) und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) ($n = 2$) (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023) und Verena Haitz (2024))

Vergleich zur unbehandelten und mechanisch behandelten Erbsenschale ableiten (Haitz, 2024; Kurz, 2023).

Aus der Cellulose der Erbsenschale wurde bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung durch die zugegebene CEL neben geringen Anteilen an Cellooligosacchariden (vgl. Kapitel 4.4.1.3.3) hauptsächlich Cellobiose und Glucose (vgl. Abbildung 25 A) freigesetzt. Hierbei wies E-me-5x einen geringfügig höheren Gehalt an Cellobiose (1,6 %) und Glucose (1,3 %) auf als E-me-3x (1,2 % bzw. 1,0 %). Allerdings blieb die Cellulose, unabhängig von der Intensität der vorherigen mechanischen Behandlung, größtenteils in einer enzymatisch nur eingeschränkt hydrolysierbaren, vermutlich kristallinen Form in den UBS zurück. Dafür sprachen die geringe Abnahme des Anteils der UBS (vgl. Kapitel 4.4.1.3.1) und der hohe molare Anteil an Glucose (85 mol%) in der Monosaccharidzusammensetzung der unlöslichen Polysaccharide der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschale nach schwefelsaurer Hydrolyse (vgl. Abbildung A - 10 im Anhang).

In den beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen lag eine Vielzahl an (Glucurono-)Xylooligosacchariden (in Summe je 1,3 %) vor (vgl. Kapitel 4.4.1.3.3), welche zusammen mit der freigesetzten Cellobiose (0,9 - 1,1 %) und den Spuren an Xylose aus dem Abbau

der (Glucurono-)Xylane stammten. In Übereinstimmung damit war der molare Anteil an Xylose in der Monomerzusammensetzung der NLBS-Fraktionen der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen gegenüber der unbehandelten und rein mechanisch behandelten Erbsenschale deutlich erhöht (vgl. Abbildung 27 C). Bei der Durchführung der enzymatischen Hydrolyse wurde keine XYL zugesetzt, jedoch besaß die verwendete CEL eine XYL-Nebenaktivität (vgl. Kapitel 4.3), welche für den beschriebenen Abbau der (Glucurono-)Xylane verantwortlich war. In der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der UBS der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten und der entsprechend mechanisch behandelten Erbsenschale, anders als erwartet, kein deutlicher Rückgang des molaren Anteils an Xylose im Zuge der mechanisch-enzymatischen Behandlung (vgl. Abbildung 27 A). Daher wird angenommen, dass ebenfalls ein bedeutender Anteil der (Glucurono-)Xylane bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung nicht abgebaut wurde. Dies konnte zusammen mit (kristalliner) Cellulose den weiterhin hohen Anteil an UBS in den mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen erklären. Für einen weitergehenden Abbau der (Glucurono-)Xylane durch eine mechanisch-enzymatische Behandlung sollte somit zukünftig die zusätzliche Verwendung einer XYL in Betracht gezogen werden. Hierbei sollte auch auf eine effektive Inaktivierung dieser geachtet werden.

Der Abbau der in geringen Mengen vorkommenden Arabinane war im Zuge der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale am stärksten ausgeprägt. Dies ließen unter anderem vergleichsweise hohe Anteile an freigesetzten Arabinoooligosacchariden (1,7 - 2,0 %), Arabinobiose (1,0 - 1,5 %) und Arabinose (0,4 %) sowie der damit einhergehende erhöhte molare Anteil an Arabinose (21 - 23 mol%) in der Monomerzusammensetzung entsprechender NLBS-Fraktionen (vgl. Abbildung 27 C) annehmen. Hierbei galt es zu beachten, dass neben der ARA auch die zugegebene CEL ARA-Aktivitäten aufwies (vgl. Kapitel 4.3). In E-me-5x waren geringfügig mehr der niedermolekularen Hydrolyseprodukte der Arabinane enthalten. Des Weiteren wiesen die Monosaccharidzusammensetzungen der UBS und LBS der Erbsenschale nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung geringere molare Anteile an Arabinose auf. Diese waren in E-me-3x (9 mol% bzw. 13 mol%) jeweils etwas geringer als in E-me-5x (13 mol% bzw. 16 mol%). Die Ergebnisse des Arabinanscreenings der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen, die aus der Masterarbeit von Verena Haitz (2024) stammen, sind mit denen der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (vgl. Kapitel 4.4.1.2.2) vergleichbar und werden daher an dieser Stelle nicht genauer erläutert. Im Einzelnen können die Ergebnisse des Arabinanscreenings der Tabelle A - 9 im Anhang entnommen werden. Die Zunahme des molaren Anteils an der enzymatisch freigesetzten Arabinobiose A2a auf 93 mol% (UBS) bzw. 95 mol% (LBS) deutete ebenfalls auf eine Linearisierung der Arabinane der Erbsenschale bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung hin. Dies zeigte sich im gleichen Zuge in der Abnahme der molaren Anteile der substituierten Arabinoooligosaccharide (A4a, A4b, A5a, A7a, A7b). Jedoch fielen die Veränderungen in den Arabinanstrukturen der UBS tendenziell weniger stark aus als in denen der LBS. Dies wies auf eine bevorzugte enzymatische Hydrolyse der löslichen Arabinanstrukturen durch

ARA-Aktivitäten der zugegebenen Enzyme hin. Unterschiede zwischen den beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen waren nicht erkennbar. Dies deutete darauf hin, dass die Arabinanstrukturen der Erbsenschale nach der intensiveren mechanischen Behandlung (1 + 5x 1750 bar) für deren enzymatischen Abbau nicht besser zugänglich waren als nach der weniger intensiveren mechanischen Behandlung (1 + 3x 1750 bar).

Bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale kam es außerdem zur Freisetzung geringer Mengen an Mono- und Digalacturonsäure sowie GalA-OS aus den Homogalacturonanen. Deren enzymatische Hydrolyse war aufgrund einer (exo-)PG-Aktivität der bei der Behandlung zugesetzten CEL (vgl. Kapitel 4.3) möglich. Beim Vergleich von E-me-3x und E-me-5x waren in dieser Hinsicht keine Unterschiede zu erkennen, weshalb die verschiedenen Intensitäten bei der mechanischen Vorbehandlung den Abbau der Homogalacturonane nicht merklich beeinflussten.

Wie die Ergebnisse des Xyloglucanscreenings zeigen (vgl. Abbildung A - 11 und Tabelle A - 7 im Anhang), blieben die Xyloglucanstrukturen in der Erbsenschale nach der mechanischen Behandlung, unabhängig von der dazu angewandten Intensität, nahezu unverändert (Kurz, 2023). Jedoch bewirkte die nachfolgende enzymatische Hydrolyse, welche ohne Zusatz einer Xyloglucanase erfolgte, eine Verschiebung der molaren Verhältnisse der im Zuge des Xyloglucanscreenings aus den UBS enzymatisch freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide. Der Substitutionsgrad der Xyloglucane blieb dabei unverändert. Die Verschiebung der molaren Anteile machte sich insbesondere in einer Zunahme von XLLG und einer Abnahme von XX bemerkbar (Haitz, 2024).

Insgesamt legte der ähnlich stark ausgeprägte Abbau der Polysaccharide der Erbsenschale während der beiden mechanisch-enzymatischen Behandlungen (E-me-3x/5x), wie auch die in Kapitel 4.4.1.3.1 beschriebenen Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung, nahe, dass im Falle der Erbsenschale eine intensivere vorherige mechanische Behandlung keine deutlich stärkere Lockerung von Zellwandstrukturen bewirkte. Weiter wird vermutet, dass die Wahl der Enzyme und Bedingungen bei der enzymatischen Hydrolyse auf den Abbau der Polysaccharide einen bedeutenderen Einfluss nahmen als die mechanische Behandlung.

4.4.1.3.3 ANALYSE DER OLIGOSACCHARIDE IN DEN NLBS-FRAKTIONEN

Die Analyse der NLBS-Fraktionen der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen zeigte, dass diese eine Vielzahl an Oligosacchariden enthielten, die teilweise quantifizierbar waren (vgl. Abbildung 28) (Haitz, 2024). Das dabei mittels HPAEC-PAD aufgenommene und zur Analyse der Oligosaccharide herangezogene Chromatogramm der NLBS-Fraktion der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschale E-me-5x ist im Anhang in Abbildung A - 12 exemplarisch dargestellt. In Hinblick auf die nachgewiesenen RFO und deren entsprechenden Abbauprodukte ohne Fructoseeinheit waren die mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen mit den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (vgl. Kapitel 4.4.1.2.3) vergleichbar. So führte die mechanische Behandlung vor der enzymatischen Hydrolyse lediglich zu einem höheren Gehalt

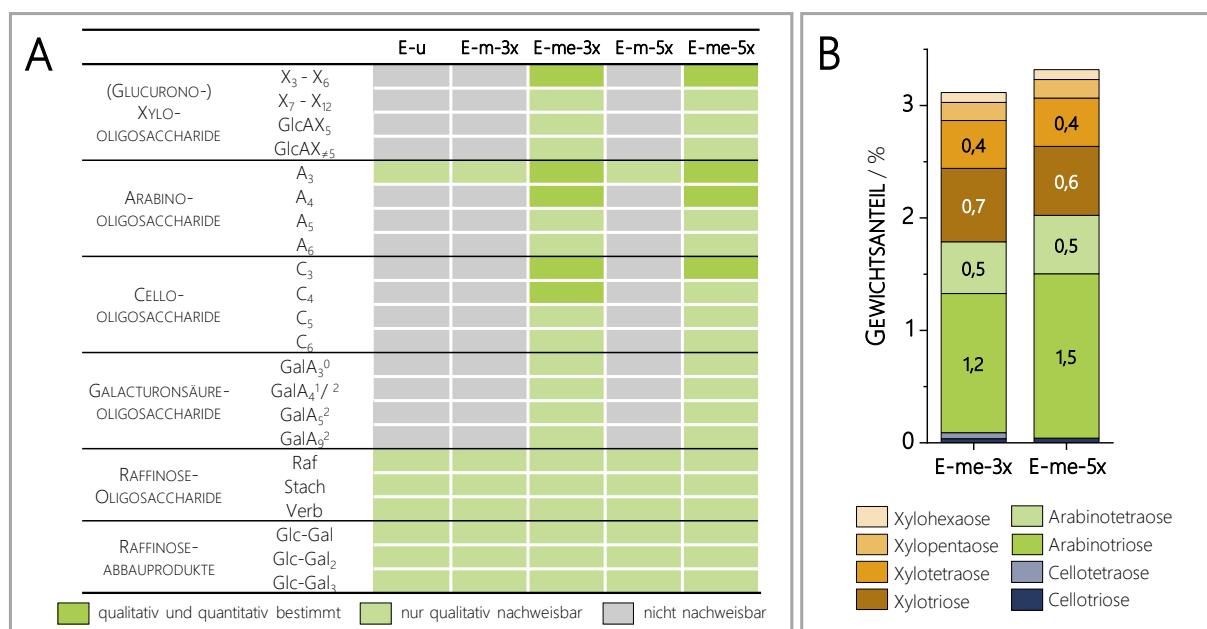


Abbildung 28: Ergebnisse der qualitativen (A) und quantitativen (B) Bestimmung von Oligosacchariden in den niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-3x/5x) und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) ($n = 2$), Gewichtsanteile bezogen auf die getrocknete Erbsenschale, $2 - 12$ = Polymerisationsgrad, $^{0/12}$ = Anzahl an Methylestern, A = Arabinoseeinheit, C = Glucoseeinheit, Gal = Galactose, GalA = Galacturonsäure, Glc = Glucose, GlcA = Glucuronsäure, Raf = Raffinose, Stach = Stachyose, Verb = Verbascose, X = Xyloseeinheit (Daten partiell erhoben von Verena Haitz (2024))

an Melibiose (Glc-Gal). Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Intensität der mechanischen Behandlung. Die Gehalte der RFO und deren anderen Abbauprodukte veränderte sich durch die mechanisch-enzymatische Behandlung nicht.

Die Oligosaccharidprofile der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen wurden von den Arabino- und (Glucurono-)Xylooligosacchariden dominiert (vgl. Abbildung 28 B). Dabei stellten Arabinotriose und -tetraose etwa 60 % und Xylotriose bis -hexaose etwa 40 % des Anteils an quantifizierbaren Oligosacchariden. Zudem wiesen die mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen Arabinopentaose und -hexaose auf. Ein verstärkter Abbau der Arabinane, wie in Kapitel 4.4.1.3.2 beschrieben, spiegelte sich somit auch im Oligosaccharidprofil von E-me-3x/5x wider. Aus den (Glucurono-)Xylanen setzte die XYL vorrangig kürzerkettige, daneben aber auch längerkettige, Xylooligosaccharide (bis DP = 12) und Glucuronoxyloligosaccharide frei, wie deren qualitativer Nachweis ergab, dessen Vorgehen in Kapitel 4.4.1.2.3 erläutert ist. Ein weiterer enzymatischer Abbau der freigesetzten längerkettigen (Glucurono-)Xylooligosaccharide mittels XYL lief gegenüber dem Abbau der unlöslichen (Glucurono-)Xylane aufgrund einer besseren Zugänglichkeit bevorzugt ab. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass es zumindest partiell zu keinem weiteren Abbau längerkettiger Xylooligosaccharide während der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale kam. Somit konnte das breite Spektrum der DP der (Glucurono-)Xylooligosaccharide als Hinweis auf einen unvollständigen Abbau der (Glucurono-)Xylane, wie in Kapitel 4.4.1.3.2 vermutet, aufgefasst werden.

Die Anteile an Cellotriose und -tetraose waren verschwindend gering (je < 0,1 %), und der Nachweis von Cellopentaose und -hexaose war aufgrund sehr geringer Gehalte nur qualitativ möglich. Darin bestätigte sich die in Kapitel 4.4.1.3.2 getroffene Annahme, dass die Cellulose der Erbsenschale bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung kaum abgebaut wurde. Anders als erwartet, spielten in den Oligosaccharidprofilen der mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen die mittels UHPLC-MS nachgewiesenen, partiell methylveresterten GalA-OS (DP = 3 - 5, 9) aus dem Abbau der Homogalacturonane, wie in denen der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen (vgl. Kapitel 4.4.1.2.3), eine untergeordnete Rolle.

Im Ganzen betrachtet waren die Oligosaccharidprofile der NLBS-Fraktionen von E-me-3x und E-me-5x vergleichbar. Daraus ließ sich, wie in den vorherigen Kapiteln aufgrund von Ballaststoffzusammensetzung und Polysaccharidstrukturen bereits vorgeschlagen, schlussfolgern, dass die intensivere mechanische Behandlung der Erbsenschale vermutlich nicht zu einer besseren enzymatischen Zugänglichkeit der Polysaccharide in Folge einer stärker ausgeprägten Lockerung der Zellwandstrukturen führte.

4.4.1.3.4 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN

Anders als die Ergebnisse der chemischen Charakterisierung der beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen vermuten lassen, ergaben sich hinsichtlich deren funktionellen Eigenschaften Unterschiede. So begann die 1%ige Suspension von E-me-3x bereits nach zwei Minuten zu sedimentieren, während die von E-me-5x über zehn Minuten physikalisch stabil blieb. Die Unterschiede in der Sedimentation waren die Folge einer tendenziell höheren Partikelgröße und eines höheren Anteils an unlöslicher Masse sowie einer halb so großen Viskosität der Suspensionen von E-me-3x gegenüber E-me-5x. Die genauen Werte der von Dr. Rocío Morales-Medina ermittelten Kenngrößen, können der Tabelle A - 8 im Anhang entnommen werden. Außerdem wies E-me-5x eine 1,7-fach höhere Wasserretentionskapazität auf als E-me-3x. Vermutlich kam es bei der intensiveren mechanischen Behandlung der Erbsenschale zu einer ausgeprägteren Verbesserung der Zugänglichkeit wasserbindender Zellwandstrukturen.

Auch wenn anhand der Ergebnisse der chemischen Charakterisierung der beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen abgeleitet werden konnte, dass die Intensität der vorherigen mechanischen Behandlung für den enzymatischen Abbau der Polysaccharide unerheblich war, legen die Unterschiede in den Ergebnissen der physikochemischen Untersuchungen nahe, dass eine intensivere mechanische Behandlung eine deutlichere Verbesserung funktioneller Eigenschaften bewirkte.

4.4.2 KAROTTENTRESTER

4.4.2.1 UNBEHANDELTER KAROTTENTRESTER

Der untersuchte, getrocknete Karottentrester enthielt 60 % Ballaststoffe, die sich aus 44 % UBS, 15 % LBS und < 1 % NLBS zusammensetzten. Weiter konnten im Karottentrester Proteine (11 %), Asche (5 %), Glucose (2 %), Fructose (2 %), Saccharose und geringe Gehalte an Rhamnose, Galactose, Mannose und Galacturonsäure analytisch erfasst und partiell quantifiziert werden. Damit war die ermittelte Zusammensetzung des Karottentresters mit der in der Literatur beschriebenen (vgl. Kapitel 1.1.2) vergleichbar (Bellur Nagarajaiah & Prakash, 2015; Chau *et al.*, 2004; Trabert *et al.*, 2022; Turksoy & Özkaya, 2011). Nachfolgend werden die im Karottentrester enthaltenen Polysaccharidstrukturen getrennt nach UBS und LBS, ausgehend von den Ergebnissen der Monosaccharid- und Methylierungsanalyse, dem Arabinan-, Galactan- und Xyloglucanscreening sowie der Bestimmung der Veresterungsgrade (vgl. Abbildung 29 A - E) im Detail beschrieben.

Die Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide aus den UBS wurde nach Schewelsäurehydrolyse sowie Methanolysen mit nachfolgender TFA-Hydrolyse bestimmt. Die Ergebnisse der Monosaccharidanalyse sind in Abbildung 29 A dargestellt und zu denen der Literatur vergleichbar (Chau *et al.*, 2004; Trabert *et al.*, 2022; Yoon *et al.*, 2005). Das dominierende Monosaccharid der Polysaccharide aus den UBS nach Schewelsäurehydrolyse war mit 45 mol% Glucose. Auch überwogen die PMAA der Glucose (63 mol%) bei der Methylierungsanalyse. Nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse der Polysaccharide der UBS hingegen betrug der molare Anteil der Glucose lediglich 5 mol%. Daher ist davon auszugehen, dass Glucose in den UBS des Karottentresters überwiegend als Bestandteil von kristalliner Cellulose vorlag, welche im Zuge der Schewelsäurehydrolyse gespalten wurde (vgl. Kapitel 3.3.5.1). Hierfür sprach auch, dass die polymere gebundenen Glucoseeinheiten zu 91 % 1,4-verknüpft und zu 3 % terminal gebunden waren.

Das Hauptmonosaccharid der UBS nach Methanolysen und nachfolgender TFA-Hydrolyse war Galactose (35 mol%), gefolgt von Arabinose (24 mol%) und Galacturonsäure (22 mol%). Diese drei Monosaccharide stammten zusammen mit Rhamnose (9 mol%) vermutlich überwiegend aus den Pektinstrukturen der Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I (vgl. Kapitel 1.3.2.3). Dabei war der Anteil an Rhamnogalacturonanen Typ I höher als der an Homogalacturonanen. Dies zeigte sich an dem nach Broxterman und Mitarbeitenden (2017) aus den molaren Anteilen an Galacturonsäure und Rhamnose berechneten Verhältnis von Homogalacturonanen zu Rhamnogalacturonanen Typ I von 0,8. Von den Rhamnoseeinheiten des Rhamnogalacturonan Typ I Rückgrats lagen der Methylierungsanalyse zufolge 60 % substituiert (1,2,4-verknüpft) mit Arabinanen und (Arabino-)Galactanen und 40 % unsubstituiert (1,2-verknüpft) vor. Die ähnlichen molaren Anteile an Arabinose und Galactose in der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der UBS deuteten dabei auf ein ausgewogenes Verhältnis von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen hin. Die Arabinane bestanden entsprechend der im Zuge der Methylierungsanalyse nachgewiesenen PMAA aus linear 1,5-verknüpften Arabinofuranosen (4 mol%). Diese lagen partiell in O3-(1,3,5-verknüpft, 2 mol%) und seltener in O2-Position (1,2,5-verknüpft, < 1 mol%) mit vermutlich

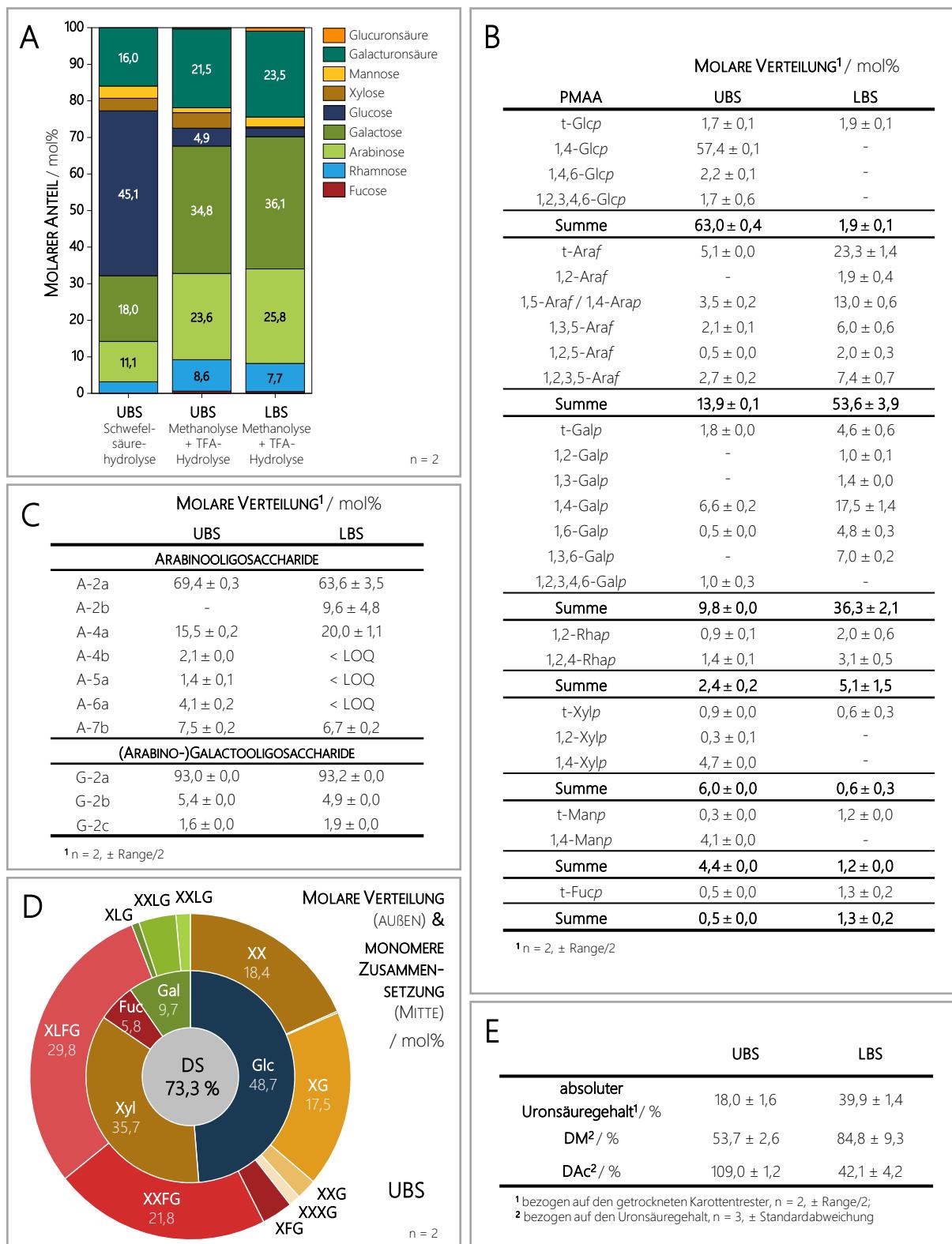


Abbildung 29: Ergebnisse der Monosaccharid- (A) und Methylierungsanalyse (B), des Arabinan-, Galactan- (C) und Xyloglucanscreenings (D) sowie der Bestimmung des Uronsäuregehalts und des Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrads (DAc) (E) der unlöslichen (UBS) und löslichen Ballaststoffe (LBS) des Karottentreters, TFA = Trifluoressigsäure, PMAA = partiell methylierte Alditolacetate, t = terminal, p = Pyranose, f = Furanose, Ara = Arabinose, Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Glc = Glucose, Man = Mannose, Rha = Rhamnose, Xyl = Xylose, A2a - A7b = Arabinobiose bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1 im Anhang), G2a - c = (Arabino-)Galactobiose (vgl. Abbildung A - 2 im Anhang), DS = Substitutionsgrad, XX, XG, ... = Xyloglucanoligosaccharide mit Nomenklatur nach Fry und Mitarbeitenden (1993) (vgl. Abbildung A - 3 im Anhang), n = Anzahl an Messungen, LOQ = Bestimmungsgrenze

terminaler Arabinofuranose (5 mol%) verknüpft vor. Das zu einem höheren molaren Anteil nachgewiesene PMAA der 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranose (3 mol%) deutete auf doppelt substituierte Arabinoseeinheiten des Arabinanrückgrats hin. Allerdings war unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Arabinanscreenings anzunehmen, dass das genannte PMAA aufgrund von Untermethylierung (vgl. Kapitel 3.3.5.2) überbestimmt wurde. Im Zuge des Arabinanscreenings wurde aus den Arabinanen der UBS hauptsächlich die aus den linearen Bereichen stammende Arabinobiose A2a (67 mol%) freigesetzt. In größerem Umfang konnte auch die Arabinotetraose A4a (16 mol%), welche eine Substitution mit Arabinose in O3-Position anzeigt (vgl. Abbildung A - 1 im Anhang), nachgewiesen werden. Eine Substitution der Arabinane der UBS des Karottentresters in O2-Position war seltener, wie ein geringerer molarer Anteil der enzymatisch freigesetzten Arabinotetraose A4b (2 mol%) bestätigte. Die Arabinoheptaose A7b, -hexaose A6a und -pentaose A5a stammten aus höher substituierten bzw. disubstituierten Arabinanabschnitten. Hierbei waren die einzelnen substituierten Arabinoseeinheiten in O3- oder O2- und O3-Position lokalisiert. Insgesamt legen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse und des Arabinanscreenings eine überwiegend lineare Arabinanstruktur mit bevorzugter Substitution in O3-Position und vereinzelten höher substituierten Arabinanabschnitten nahe. Ein vergleichbarer struktureller Aufbau von Arabinanen in den UBS von Karottentrester wurde durch Trabert und Mitarbeitende (2022) beschrieben.

Die (Arabino-)Galactane der UBS lagen größtenteils unverzweigt vor, wie die Ergebnisse der Methylierungsanalyse und des Galactanscreenings zeigen. Demnach waren 67 % der Galactoseeinheiten 1,4-verknüpft und 18 % terminal gebunden. Das detektierte PMAA der 1,6-verknüpften Galactopyranose stammte möglicherweise aus den Seitenketten der Arabinogalactane Typ II, während das PMAA der fünffach gebundenen 1,2,3,4,6-Galactopyranose wahrscheinlich die Folge einer Untermethylierung bei der Methylierungsanalyse war. Nach der enzymatischen Hydrolyse der (Arabino-)Galactane beim Galactanscreening dominierte mit 93 mol% die Galactobiose G2a (vgl. Abbildung A - 2 im Anhang) aus den linearen (Arabino-)Galactanabschnitten. Daneben wurden in geringerem Umfang die Arabinogalactobiosen G2b (5 mol%) und G2c (2 mol%) freigesetzt. Diese zeigen das Vorkommen von Arabinopyranosen im Rückgrat der Arabino-galactane Typ I an. Im Zuge der Methylierungsanalyse bilden 1,5-verknüpfte Arabinofuranosen das gleiche PMAA wie 1,4-verknüpfte Arabinopyranosen und können somit nicht differenziert werden. Daher war eine Bestätigung des Vorliegens von 1,4-verknüpften Arabinoseeinheiten in den unlöslichen Polysacchariden mittels Methylierungsanalyse nicht möglich. Jedoch wird auch in der Literatur vom Vorkommen terminaler und/oder 1,4-verknüpfter Arabinopyranosen in Galactanstrukturen aus Karottentrester berichtet (Trabert *et al.*, 2022). Die Galacturonsäuren in den Pektinstrukturen lagen häufig partiell verestert vor. Für die polymergebundenen Uronsäuren in den UBS des Karottentresters wurden mit einem DM von 54 % und einem DAc von 109 % mittlere bis sehr hohe Veresterungsgrade ermittelt. Dabei sollte beachtet werden, dass neben den Pektinen auch andere Polysaccharide wie (Glucurono-)Xylane acetyliert und/oder methyliert vorliegen können und so zu einem DAc von über 100 % führen können. Trabert und Mitarbeitende (2022)

ermittelten für die polymergebundenen Uronsäuren der UBS aus Karottentrester einen vergleichbaren DM (57 %), jedoch einen deutlich geringeren DAc (78 %).

In geringeren molaren Anteilen wurden aus den Polysacchariden der UBS nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse Xylose (4 mol%) und Fucose (< 1 mol%) freigesetzt. Diese wiesen in Verbindung mit Glucose und Galactose auf das Vorhandensein von Xyloglucanen hin. In Übereinstimmung dazu konnten bei der Methylierungsanalyse, abgesehen von 1,2-verknüpfter Galactopyranose, alle wesentlichen in Xyloglucanstrukturen anzutreffenden Bindungstypen von Glucose (terminal, 1,4- und 1,4,6-verknüpft), Xylose (terminal und 1,2-verknüpft), Galactose (terminal verknüpft) und Fucose (terminal verknüpft) nachgewiesen werden. Bei dem PMAA der 1,2,3,4,6-verknüpften Glucopyranose (1 mol%) handelte es sich vermutlich um eine nicht vollständig methylierte Glucoseeinheit, da eine fünfach verknüpfte Glucopyranose üblicherweise nicht in Polysacchariden der pflanzlichen Zellwand anzutreffen ist. Einen genaueren Einblick in die Feinstruktur der Xyloglucane liefern die Ergebnisse des Xyloglucanscreenings (vgl. Abbildung 29 D). Es zeigte sich, dass der größte molare Anteil (55 mol%) der enzymatisch freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (vgl. Abbildung A - 3 im Anhang) eine fucosyierte Seitenkette (XLFG (30 mol%), XXFG (22 mol%) und XFG (3 mol%)) trug. Den zweitgrößten molaren Anteil (39 mol%) bildeten die Xyloglucanoligosaccharide XX (18 mol%), XG (18 mol%), XXG (2 mol%), XXXG (1 mol%) und XXX (< 1 mol%), die aus einem mit Xylose substituierten Glucanrückgrat aufgebaut sind. Ein geringer molarer Anteil (6 mol%) entfiel auf die galactosehaltigen Xyloglucanoligosaccharide XXLG (4 mol%), XLLG (2 mol%) und XLG (< 1 mol%). Abgeleitet aus den gebildeten Xyloglucanoligosacchariden ergab sich rechnerisch eine Monomerzusammensetzung der Xyloglucane der UBS von 49 mol% Glucose, 36 mol% Xylose, 10 mol% Galactose und 6 mol% Fucose. Weiter ließ sich daraus ein für Dikotyledonen üblicher Substitutionsgrad der Xyloglucanstrukturen von 73 % ermitteln. Insgesamt war der Anteil an Xyloglucanen an den Polysacchariden unter den Anteilen von Cellulose und Pektinen einzuordnen, wie aus den geringen molaren Anteilen der einzelnen für Xyloglucane charakteristischen PMAA (≤ 2 mol%) geschlossen werden konnte. In der Literatur wird neben Xyloglucanen auch das Vorkommen von Mannanen und Xylanen in den UBS von Karottentrester beschrieben (Trabert *et al.*, 2022). In Übereinstimmung dazu wies die Monomerzusammensetzung der Polysaccharide geringe Spuren an Mannose auf. Dabei deuten die mittels Methylierungsanalyse bestimmten Bindungstypen der Mannose (terminal und 1,4-verknüpft) auf das Vorkommen von linearen Mannanen hin. Auch war in Verbindung mit Galactose und Glucose das Vorliegen von Galactoglucomannanen in geringen Mengen möglich, wie von Houben und Mitarbeitenden (2011) angenommen wurde. Allerdings konnte das für Galacto(gluco-)mannane typische PMAA der 1,4,6-verknüpften Mannose im Zuge der Methylierungsanalyse nicht nachgewiesen werden. Weiter wurden auch Spuren von Glucuronsäure aus den Polysacchariden der UBS durch Methanolysen und nachfolgender TFA-Hydrolyse freigesetzt, welche beispielsweise zusammen mit Xylose und ggf. Arabinose aus (Arabino-)Glucuronoxylanen stammen könnte, wie ebenfalls von Houben und Mitarbeitenden (2011) vermutet wurde. Allerdings konnten bei der Methylierungsanalyse lediglich

terminale und 1,4-verknüpfte Xylopyranosen als übliche Bestandteile von linearen Xylanen und keine substituierten (1,2,4-verknüpften) Xyloseeinheiten nachgewiesen werden.

In der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der LBS nach Methanolysen und nachfolgender TFA-Hydrolyse waren neben Galactose (36 mol%) vorrangig Arabinose (26 mol%) und Galacturonsäure (24 mol%) anzutreffen. Diese wurden wahrscheinlich zusammen mit Rhamnose (8 mol%) überwiegend aus den Pektinstrukturen der Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I freigesetzt. Dabei war das Verhältnis von Homogalacturonanen zu Rhamnogalacturonanen Typ I ausgehend von den Monomereinheiten des Rückgrats mit 1,0 ausgeglichen als in den UBS. Den Ergebnissen der Methylierungsanalyse sowie des Arabinan- und Galactanscreenings zufolge war der Aufbau der Rhamnogalacturonane Typ I und der daran gebundenen Arabinane und (Arabino-)Galactane in den LBS mit denen der UBS vergleichbar. Zum gleichen Schluss kamen auch Trabert und Mitarbeitende (2022). Jedoch zeigen sowohl die Ergebnisse genannter Autoren als auch die dieser Arbeit, dass die Anteile der Pektinstrukturen an den Polysacchariden in den LBS gegenüber denen der UBS deutlich erhöht waren, was sich in höheren molaren Anteilen der entsprechenden Monosaccharide bzw. PMAA widerspiegelte. Die Arabinane in den LBS enthielten im Gegensatz zu denen in den UBS terminal verknüpfte Xylopyranosen. Darauf weist die, im Zuge des Arabinanscreenings enzymatisch freigesetzte und nachgewiesene, Xyloarabinobiose A2b (10 mol%) hin. In Übereinstimmung dazu wurde bei der Methylierungsanalyse das PMAA der terminalen Xylopyranose (< 1 mol%) erfasst. Weiter war der Veresterungsgrad der Pektinstrukturen in den LBS mit einem ermittelten DM von 85 % und DAc von 42 % mittel bis hoch und umgekehrt wie in den UBS (vgl. Abbildung 29 E). Damit waren die Pektine der LBS des untersuchten Karottentresters zu einem ähnlichen Grad verestert wie die von Broxterman und Mitarbeitenden (2017) aus Karotten extrahierten und analysierten alkoholunlöslichen Pektine (DM = 71 %, DAc = 41 %). Für die in den LBS von Karottentrester enthaltenen polymergebundenen Uronsäuren sind mit einem DM von 67 % und DAc von 16 % hingegen auch niedrigere als die bestimmten Veresterungsgrade beschrieben (Trabert *et al.*, 2022).

Daneben waren in geringem Umfang in den Polysacchariden der LBS Glucose (2 mol%), Fucose (< 1 mol%) und Xylose (< 1 mol%) enthalten. Diese können zusammen mit Teilen der freigesetzten Galactose aus den Xyloglucanen stammen. Jedoch ist davon auszugehen, dass der Anteil an Xyloglucanen in den LBS sehr gering war, da die PMAA der 1,4- und 1,4,6-verknüpften Glucopyranose sowie der 1,2-verknüpften Xylopyranose bei der Methylierungsanalyse nicht nachgewiesen werden konnten. Allerdings war ein Nachweis der PMAA der terminalen und 1,2-verknüpften Galactopyranose, der terminalen Xylopyranose und der terminalen Fucopyranose möglich. Zudem wurden beim Xyloglucanscreening die drei Xyloglucanoligosaccharide XG, XX und XXG enzymatisch freigesetzt und detektiert. Nicht identifiziert werden konnten galactosehaltige und fucosyierte Xyloglucanabschnitte. Die Xylose könnte partiell auch zusammen mit der zu einem geringen molaren Anteil vorliegenden Glucuronsäure (1 mol%) aus (Glucurono-)Xylanen freigesetzt worden sein. Jedoch waren bei der Methylierungsanalyse die Bindungstypen der Xylopyranose (1,4- bzw. 1,2,4-verknüpft), wie sie in (Glucurono-)Xylanen vorliegen, nicht nachweisbar.

Glucuronsäure kann daneben auch aus Rhamnogalacturonan Typ II stammen. Weiter war in der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der LBS ein geringer molarer Anteil an Mannose (3 mol%) zu finden, welcher auf das Vorhandensein von Mannanen hindeutete, wenngleich bei der Methylierungsanalyse ausschließlich terminale Mannopyranose erfasst wurde.

Zusammenfassend wurden die Polysaccharide des Karottentresters von Cellulose und hochveresterten Pektinen dominiert. Letztere umfassten insbesondere Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I, welche ein ausgewogenes Verhältnis an Arabinanen und (Arabino-)Galactanen aufwiesen. Nur zu einem geringen Anteil waren Xyloglucane, (Glucurono-)Xylane und Mannane in der Zellwand des Karottentresters enthalten, weshalb diese drei Polysaccharide bei der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters nicht weiter berücksichtigt wurden.

4.4.2.2 ENZYMATISCH-MECHANISCHE BEHANDELTE KAROTTENTRESTER

Die enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester (K-em-1/2/3/4) wurde in Hinblick auf Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung und den dominierenden Polysaccharidstrukturen sowie den Anteilen an Oligosacchariden in den NLBS-Faktionen analysiert. Die Ergebnisse hierzu werden in den nachfolgenden Kapiteln im Vergleich zum unbehandelten (K-u) und mechanisch behandelten Karottentrester (K-m-500) vorgestellt.

4.4.2.2.1 VERÄNDERUNGEN IN DER BALLASTSTOFFZUSAMMENSETZUNG

Der Gesamtballaststoffanteil (vgl. Abbildung 30 A) blieb nach der mechanischen Behandlung des Karottentreters (57 %), verglichen mit dem unbehandelten Karottentrester (60 %), nahezu unverändert. Die enzymatisch-mechanischen Behandlungen hingegen führten zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Rückgang des Gesamtballaststoffanteils. So war dieser mit 49 % in K-em-1 höher als in K-em-2/3/4 (27 - 33 %). Die geringeren Gesamtballaststoffanteile in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern gegenüber dem unbehandelten Karottentrester basierten insbesondere auf einer Reduktion des Anteils an UBS im Zuge der Behandlung um etwa die Hälfte auf 16 - 23 %, bezogen auf den unbehandelten (44 %) und mechanisch behandelten Karottentrester (42 %). Zudem war der Anteil an LBS in drei enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern (K-em-2/3/4) im Vergleich zum unbehandelten (15 %) und mechanisch behandelten Karottentrester (16 %) mit 9 - 11 % geringer. Der enzymatisch-mechanisch behandelte Karottentrester K-em-1 wies mit 23 % jedoch einen höheren Anteil an LBS auf als die zuvor genannten (un)behandelten Karottentrester. Der Anteil an NLBS war in allen enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern gegenüber dem unbehandelten und dem mechanisch behandelten Karottentrester (je < 1 %) leicht erhöht und in K-em-1 (5 %) und K-em-2 (3 %) am höchsten. Die NLBS-Faktionen der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester enthielten unter anderem GalA-OS und Arabinotriose (vgl. Kapitel 4.4.2.2.3), welche von der angewandten Bestimmungsmethode nicht als NLBS miterfasst wurden (vgl. Kapitel 4.2). Folglich

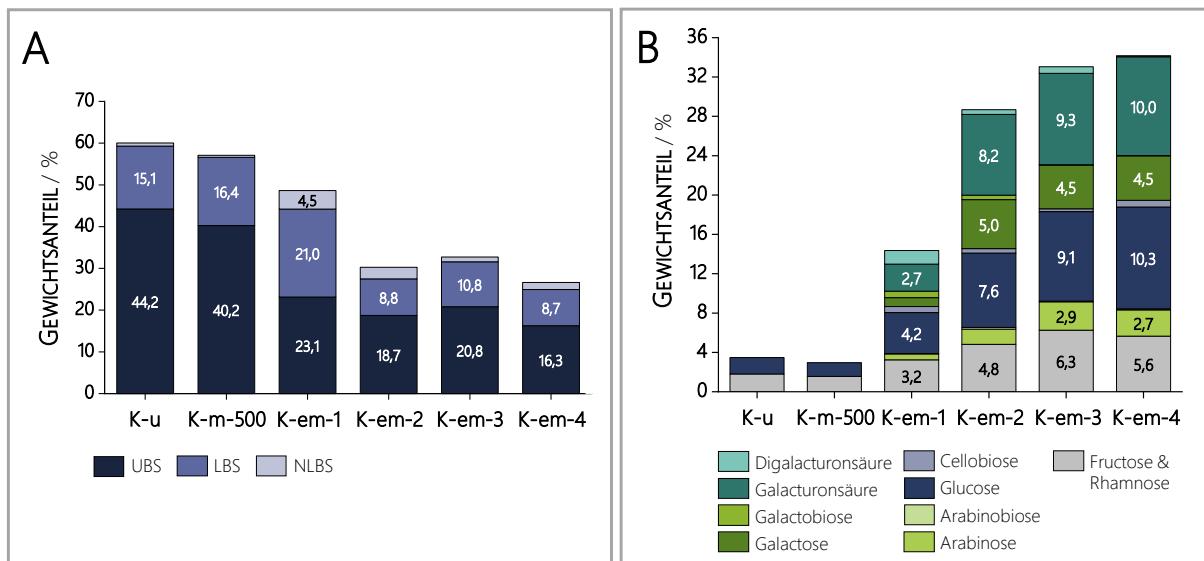


Abbildung 30: Gewichtsanteile an Ballaststoffen (A) sowie freien Mono- und Disacchariden (B) der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m-500) und enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester (K-em-1/2/3/4) jeweils bezogen auf den getrockneten Karottentrester ($n = 2$). UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, NLBS = niedermolekulare, lösliche Ballaststoffe

war an dieser Stelle von einer Unterbestimmung der NLBS-Anteile in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrestern auszugehen.

Die Abnahme der Ballaststoffanteile im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentresters ging einher mit der Zunahme an freien Mono- und Disacchariden (vgl. Abbildung 30 B). Je stärker der Ballaststoffanteil durch die enzymatisch-mechanische Behandlung reduziert wurde, desto stärker nahm der Anteil an freien Mono- und Disacchariden zu. So bestand der unbehandelte bzw. mechanisch behandelte Karottentrester in Summe lediglich aus 3 - 4 % Glucose und Fructose, während K-em-1 mit dem höchsten Ballaststoffanteil 14 % und K-em-2/3/4 mit den geringeren Ballaststoffanteilen 29 - 34 % freie Mono- und Disaccharide enthielten. Es überwogen jeweils die Monosaccharide (Arabinose, Galactose, Galacturonsäure und Glucose) gegenüber den entsprechenden Disacchariden. Dies deutete darauf hin, dass bei der enzymatischen Hydrolyse des Karottentresters auch exo-Aktivitäten der Enzyme zum Tragen kamen und somit monomere Einheiten aus Arabinanen, (Arabino-)Galactanen, Cellulose und Homogalacturonanen bzw. entsprechenden zuvor freigesetzten Oligosacchariden freigesetzt wurden. Daneben kam es bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentresters zur Freisetzung von Fructose, welche vermutlich der in größerem Umfang im Karottentrester enthaltenen Saccharose entstammte. Der Anteil an freier Rhamnose blieb unabhängig von der Behandlung des Karottentresters gering (< 0,4 %).

Die enzymatisch-mechanische Behandlung des Karottentresters führte, mit Ausnahme von K-em-1, zu keiner Anreicherung an LBS und/oder NLBS durch Abbau von Polysacchariden der UBS. Dies ist damit zu begründen, dass neben den unlöslichen auch die löslichen Polysaccharide, vermutlich sogar bevorzugt, enzymatisch weiter abgebaut wurden. Hierfür sprach auch, dass in allen vier

enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern, anders als erwünscht, kaum Oligosaccharide in den NLBS-Faktionen enthalten waren (vgl. Kapitel 4.4.2.2.3).

Der unterschiedlich stark ausgeprägte Abbau der Polysaccharide des Karottentreters im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung konnte auf die Verwendung der vier unterschiedlich zusammengesetzten Enzymmischungen (vgl. Tabelle A - 1 im Anhang) zurückgeführt werden. Die Enzymmischung zur Herstellung von K-em-1 enthielt im Gegensatz zu den anderen drei Enzymmischungen einen sehr hohen Anteil an PG (90 %) und nur wenig ARA, CEL und GAL. Die zugesetzte PG war überwiegend *endo*-aktiv und zeigte gegenüber anderen Polysacchariden keine Aktivität, wohingegen die anderen drei Enzyme diverse Nebenaktivitäten aufwiesen. Außerdem wurden die ARA-Aktivitäten der verwendeten Enzyme bei der Behandlung nicht vollständig inaktiviert (vgl. Kapitel 4.3). Wie die in diesem Kapitel ausgeführten Ergebnisse nahelegen, war die Folge eines höheren Anteils an ARA, CEL und/oder GAL ein bevorzugter Abbau von unlöslichen und löslichen Polysacchariden bis zu den Monosacchariden. Besonders hervor trat dabei die Freisetzung von Galacturonsäure, welche in etwa ein Drittel der freien Mono- und Disaccharide in K-em-2/3/4 ausmachte und auf stark ausgeprägte *exo*-PG-Nebenaktivitäten der CEL und GAL zurückgeführt werden konnte. Ein geringerer Anteil an ARA, CEL und GAL führte demnach einerseits zu einer geringeren Freisetzung von Mono- und Disacchariden und andererseits, entsprechend der Zielsetzung, zu einer Verschiebung von UBS zu LBS und NLBS.

Der aufgrund der Ballaststoffzusammensetzung vermutete stärkere Abbau der löslichen Polysaccharide im Zuge der Herstellung von K-em-2/3/4 gegenüber K-em-1 spiegelte sich auch in der Molekulargewichtsverteilung der LBS wider (vgl. Abbildung 31). Während die mechanische Behandlung des Karottentreters keinen Einfluss auf die Verteilung der Molekulargewichte der Polysaccharide in den LBS hatte, zeigten sich nach den enzymatisch-mechanischen Behandlungen des Karottentreters unterschiedlich stark ausgeprägte Verschiebungen der Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide in den LBS bzw. die Zunahme an löslichen Polysacchariden mit geringerem Molekulargewicht (< 50 kDa). Die Veränderungen können sowohl durch die enzymatische als auch die mechanische Behandlung bedingt worden sein. Es wird vermutet, dass die Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide in den LBS vorrangig durch die Enzyme bzw. die zugesetzten Enzymmischungen beeinflusst wurde. Jedoch könnte die enzymatische Hydrolyse auch die Polysaccharidstrukturen des Karottentreters für Veränderungen während der anschließenden mechanischen Behandlung zugänglicher gemacht haben. Im Vergleich zum unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentreter war die Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide aus den LBS von K-em-2 am stärksten in den Bereich geringerer Molekulargewichte (< 50 kDa) verschoben, gefolgt von denen der LBS von K-em-4 und K-em-3. Die Molekulargewichtsverteilung der löslichen Polysaccharide von K-em-1 hingegen wies im Vergleich dazu nur eine geringe Verschiebung auf. Aus der Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide aus den LBS von K-em-2/3/4 ließ sich ein weitgehender Abbau von löslichen Polysacchariden mit höherem Molekulargewicht (> 150 kDa) sowie eine Freisetzung löslicher

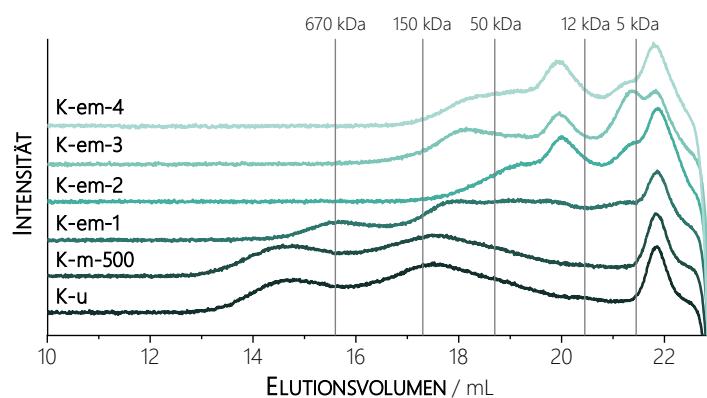


Abbildung 31: Ausschnitte der Chromatogramme zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung der löslichen Ballaststoffe der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m-500) und enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester (K-em-1/2/3/4) mit Dextransubstanzen (5, 12, 50, 150 und 670 kDa) als Molekulargewichtsmarker ($n = 2$)

Polysaccharide mit geringerem Molekulargewicht (< 50 kDa) als Folge der enzymatisch-mechanischen Behandlung ableiten. Im Falle der LBS von K-em-1 war der Anteil an löslichen Polysacchariden mit höherem Molekulargewicht (> 150 kDa) im Vergleich zum unbehandelten Karottentrester reduziert, während der Anteil an löslichen Polysacchariden mit mittlerem Molekulargewicht (5 - 150 kDa) erhöht und der der löslichen Polysaccharide mit geringem Molekulargewicht (< 5 kDa) nahezu unverändert war.

Um einschätzen zu können, welche Polysaccharide bevorzugt abgebaut wurden und somit zur Verschiebung der Ballaststoffanteile bzw. Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide aus den LBS im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung führten, wird im folgenden Kapitel auf strukturelle Veränderungen der Polysaccharide eingegangen.

4.4.2.2.2 VERÄNDERUNGEN IN DEN POLYSACCHARIDSTRUKTUREN

Die dominierenden Polysaccharide des Karottentresters waren Cellulose und Pektinpolymere (Arabinane, (Arabino-)Galactane und Homogalacturonane), zu deren Abbau im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung entsprechende Enzyme (ARA, CEL, GAL, PG) zugesetzt wurden. Eine Bestätigung für den Abbau von Cellulose ließ sich in der Freisetzung von Glucose und geringen Mengen Cellobiose (vgl. Abbildung 30 B) sowie partiell Cellotriose und -tetraose (vgl. Kapitel 4.4.2.2.3) während der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentreters finden. Der höhere Anteil an Glucose (8 - 10 %) in K-em-2/3/4 gegenüber K-em-1 (4 %), sprach vor allem bei K-em-2/3/4 für einen umfangreicheren Abbau von Cellulose durch zugegebene Enzyme mit (exo-)CEL-Aktivitäten. Die Ergebnisse der Monosaccharidanalyse nach Schwefelsäurehydrolyse (vgl. Abbildung A - 14 im Anhang) zeigen einen deutlich höheren molaren Anteil an Glucose in der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der UBS von K-em-1/2/3/4 (76 - 78 mol%) im Vergleich zu der des unbehandelten (45 mol%) und mechanisch behandelten Karottentreters (53 mol%). Dies deutete auf den Verbleib von Cellulose in den UBS hin. Dabei handelte es sich

vermutlich hauptsächlich um die kristalline Form der Cellulose, die die in den UBS zurückbleibenden Polysaccharide deutlich dominierte.

Die geringeren molaren Anteile an Arabinose und Galactose in der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der UBS und LBS der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester gegenüber denen des unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentresters deuteten auf den Abbau von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen hin (vgl. Abbildung 32 A und B). Dabei führte ein höherer Anteil an ARA, CEL und GAL in der Enzymmischung bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung zu einem stärkeren Abbau der Arabinane und (Arabino-)Galactane des Karottentresters. Dies zeigte sich an den geringeren molaren Anteilen an Arabinose und Galactose in der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der UBS und LBS von K-em-2/3/4 im Vergleich zu denen von K-em-1. Die Unterschiede waren hierbei in den UBS stärker ausgeprägt als in den LBS. Weitere Hinweise auf den Abbau von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen ergaben sich aus der Monosaccharidzusammensetzung der NLBS-Fraktionen (vgl. Abbildung 32 C). Hierbei war der molare Anteil an Arabinose und Galactose in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern höher als im unbehandelten und im mechanisch behandelten Karottentrester. Aus den Ergebnissen der Bestimmung freier Mono- und Disaccharide (vgl. Kapitel 4.4.1.2.1) sowie Oligosaccharide in den NLBS-Fraktionen (vgl. Kapitel 4.4.1.2.3) lässt sich schlussfolgern, dass die molaren Anteile an Arabinose und Galactose überwiegend auf monomere Arabinose bzw. Galactose und nur partiell auf Arabinobiose, -triose und -tetraose bzw. Galactotriose und ggf. -tetraose zurückgeführt werden können. Insbesondere die höheren Anteile an freier Arabinose (2 - 3 %) und Galactose (5 %) in K-em-2/3/4 gegenüber K-em-1 konnten als Bestätigung für einen stärkeren Abbau von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung zur Herstellung von K-em-2/3/4 im Vergleich zu K-em-1 gesehen werden.

Außerdem war der molare Anteil an Galactose in den Polysacchariden der LBS von K-em-1 (18 %) und K-em-2/3/4 (13 - 15 %) gegenüber denen des unbehandelten (36 %) und mechanisch behandelten Karottentresters (37 %) stärker reduziert als in denen der UBS. In den UBS lag der molare Anteil an Galactose für K-em-1 bei 35 mol%, für K-em-2/3/4 bei 28 - 30 mol%, für den unbehandelten bei 35 mol% und für den mechanisch behandelten Karottentrester bei 42 mol%. Aufgrund der beschriebenen Veränderungen in der Monosaccharidzusammensetzung wird angenommen, dass die enzymatische Hydrolyse der löslichen (Arabino-)Galactane bevorzugt ablief. Dabei lässt der im Rahmen des Galactanscreenings bestimmte geringe absolute Summengehalt aller dabei enzymatisch freigesetzten (Arabino-)Galactooligosaccharide vermuten, dass die enzymatisch zugänglichen unlöslichen (Arabino-)Galactane im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentreters weitgehend abgebaut wurden (vgl. Tabelle 5). Dabei begünstigte, entsprechend den Erwartungen, der Zusatz eines höheren Anteils an Enzymen mit GAL-Aktivität bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung (vgl. Kapitel 4.3) den Abbau der (Arabino-)Galactane stärker. So konnten aus den UBS von K-em-2/3/4 beim Galactanscreening kaum ($\leq 1 \mu\text{mol/g}$) (Arabino-)Galactooligosaccharide enzymatisch freigesetzt werden. Aus K-em-1,

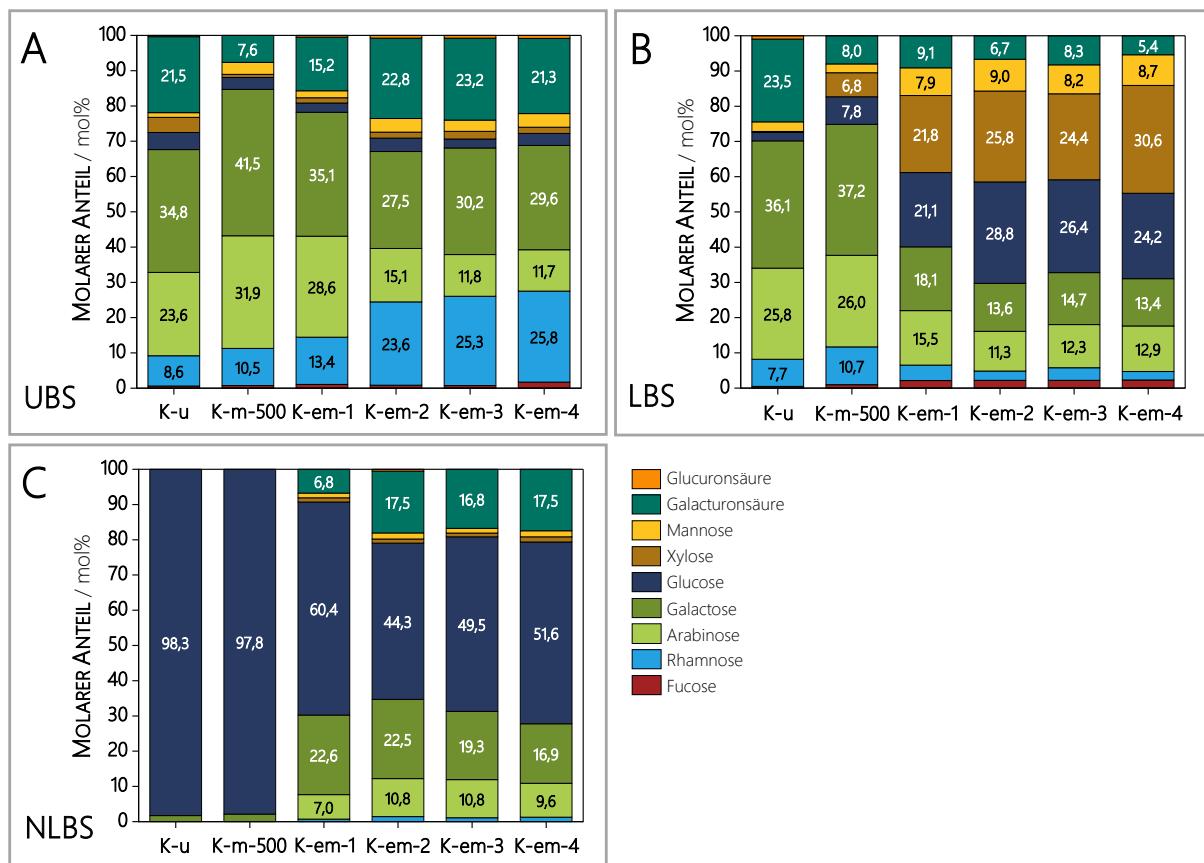


Tabelle 5: Molare Verteilung und absoluter auf den getrockneten Karottentrester bezogener Summengehalt von aus den un behandelten (K-u), mechanisch (K-m-500) und enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrestern (K-em-1/2/3/4) enzymatisch freigesetzten (Arabino-)Galactooligosacchariden (\pm Range/2, $n = 2$), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, G2a - G2c = (Arabino-)Galactobiose (vgl. Abbildung A - 2 im Anhang), LOQ = Bestimmungsgrenze

	K-u	K-m-500	K-em-1	K-em-2	K-em-3	K-em-4
UBS						
MOLARE VERTEILUNG / mol%						
G2a	93,0 \pm 0,0	92,8 \pm 0,2	92,8 \pm 0,1	82,4 \pm 0,1	53,3 \pm 0,5	52,2 \pm 2,5
G2b	5,4 \pm 0,0	5,5 \pm 0,0	5,6 \pm 0,1	13,5 \pm 0,2	46,7 \pm 0,5	47,8 \pm 2,5
G2c	1,6 \pm 0,0	1,6 \pm 0,2	1,7 \pm 0,0	4,1 \pm 0,1	-	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$						
	60,0 \pm 1,1	74,5 \pm 3,7	10,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
LBS						
MOLARE VERTEILUNG / mol%						
G2a	93,2 \pm 0,0	92,4 \pm 0,0	93,6 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
G2b	4,9 \pm 0,0	6,3 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0	< LOQ	< LOQ	< LOQ
G2c	1,9 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0	1,5 \pm 0,0	< LOQ	-	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$						
	95,7 \pm 4,6	186,3 \pm 7,3	183,4 \pm 4,7	15,0 \pm 1,0	16,5 \pm 2,0	7,7 \pm 2,2

bei dessen Herstellung nur ein geringer Anteil (10 %) der zugesetzten Enzyme GAL-Aktivitäten aufwiesen, wurde hingegen die zehnfache Menge an (Arabino-)Galactooligosacchariden im Rahmen des Galactanscreenings freigesetzt. Mit einem ausgeprägteren Abbau der (Arabino-)Galactane während der enzymatisch-mechanischen Behandlung nahm der molare Anteil an Arabinogalactooligosacchariden gegenüber den Galactooligosacchariden im Galactanscreening zu. So wurde aus den (Arabino-)Galactanen der UBS von K-em-2 im Vergleich zu denen der UBS des unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentrester der 2,5-fache molaren Anteile der Arabino-galactobiosen G2b und G2c im Zuge des Galactanscreenings enzymatisch freigesetzt. Im Falle von K-em-3/4 waren die molaren Anteile von G2b und der Galactobiose G2a im Galactanscreening fast gleich. Folglich wiesen die (Arabino-)Galactane in den UBS von K-em-3/4 deutlich mehr arabinosehaltige Abschnitte auf als die der UBS des unbehandelten Karottentrester. Dies legte nahe, dass im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung insbesondere bei K-em-3/4 bevorzugt lineare, aus β -1,4-verknüpften Galactoseeinheiten bestehende, Abschnitte der (Arabino-)Galactane abgebaut wurden. Aus den (Arabino-)Galactanen der LBS von K-em-2/3/4 wurde beim Galactanscreening lediglich die Galactobiose G2a in quantifizierbaren Mengen enzymatisch freigesetzt. Daher kann angenommen werden, dass die enzymatisch-mechanische Behandlung von K-em-2/3/4 im Vergleich zum unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentrester zu einer Reduktion des Anteils an Arabinose in den (Arabino-)Galactanen in den LBS führte. Hinsichtlich K-em-1 waren in den (Arabino-)Galactanstrukturen der UBS und LBS gegenüber dem unbehandelten (vgl. Kapitel 4.4.2.1) und dem mechanisch behandelten Karottentrester auf Basis der Ergebnisse des Galactanscreenings keine Veränderungen zu erkennen.

Bei Betrachtung der Veränderungen der molaren Anteile an Arabinose in der Monomerzusammensetzung der unlöslichen und löslichen Polysaccharide des Karottentresters nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung ergab sich eine gleiche Tendenz wie zuvor für Galactose beschrieben. Allerdings war bei K-em-2/3/4 der molare Anteil an Arabinose in den UBS und LBS nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung in ähnlichem Umfang reduziert. Eine mögliche Ursache dafür war ein weitgehender Abbau der enzymatisch zugänglichen Arabinane in Folge der unvollständigen Inaktivierung der ARA-Aktivitäten nach der enzymatischen Hydrolyse (vgl. Kapitel 4.3). In Übereinstimmung dazu konnten beim Arabinanscreening sowohl aus den UBS als auch aus den LBS von K-em-2/3/4 kaum Arabino-oligosaccharide enzymatisch freigesetzt werden (vgl. Tabelle A - 10 im Anhang). Die UBS und LBS von K-em-1 hingegen enthielten durch das Arabinanscreening enzymatisch hydrolysierbare Arabinanstrukturen. Der Aufbau der unlöslichen und löslichen Arabinane in K-em-1 war mit denen aus den UBS und LBS des unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentrester vergleichbar (vgl. Kapitel 4.4.2.1). Die Unterschiede im Ausmaß des Abbaus der Arabinane zwischen K-em-1 und K-em-2/3/4 waren somit das Resultat verschieden hoher Anteile an Enzymen mit ARA-Aktivitäten in der zur enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentreters zugesetzten Enzymmischung sowie vermutlich der nur partiellen Inaktivierung der ARA-Aktivitäten.

Bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentresters kam es auch zum Abbau der Homogalacturonane. Dieser zeigte sich unter anderem an der bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung in größerem Umfang freigesetzten Galacturonsäure (vgl. Kapitel 4.4.2.2.1) und den in geringeren Mengen freigesetzten Di-, Tri-, Tetra- und partiell Pentagalacturonsäuren (vgl. Kapitel 4.4.1.2.3). Entsprechend dazu waren in der Monosaccharidzusammensetzung der NLBS-Fraktionen der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester, anders als in denen des unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentreters, 7 mol% (K-em-1) bzw. 17 - 18 mol% (K-em-2/3/4) Galacturonsäure enthalten. Bei der Betrachtung der Monomerzusammensetzung der löslichen und unlöslichen Polysaccharide fiel auf, dass bereits die mechanische Behandlung des Karottentreters zu einer Reduktion des molaren Anteils an Galacturonsäure auf je 8 mol% gegenüber der des unbehandelten Karottentreters (22 mol% (UBS) bzw. 24 mol% (LBS)) führte. Möglicherweise kam es durch die mechanische Behandlung zu einer Verbesserung der Löslichkeit der Homogalacturonane und somit zu einem Übergang dieser aus den UBS in die LBS und/oder NLBS. Allerdings erschien dies eher unwahrscheinlich, wie die vergleichbaren absoluten Gehalte an polymergebundener Uronsäure, bestimmt nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973), in den UBS und LBS des unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentreters nahelegten (vgl. Tabelle 6). Auch wäre im Falle eines Übergangs von Homogalacturonanen aus den UBS in die LBS des Karottentreters bei der mechanischen Behandlung Veränderungen in der Molekulargewichtsverteilung der LBS zu erwarten. Dies wurde jedoch nicht beobachtet (vgl. Kapitel 4.4.1.2.1). Eine andere Erklärung ist, dass bei der Monosaccharidanalyse der UBS und LBS des mechanisch behandelten Karottentreters uronsäurehaltige Polysaccharide (Homogalacturonane) im Zuge der Methanolysen und TFA-Hydrolyse (vgl. Kapitel 3.3.5.1) in geringerem Umfang hydrolysiert wurden als andere Polysaccharide. Als Folge sind die Uronsäuren, insbesondere Galacturonsäure, in der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide von UBS und LBS im mechanisch behandelten Karottentreter unter- und die anderen Monosaccharide überrepräsentiert. Im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung sank der absolute Gehalt an gebundener Uronsäure sowohl in den UBS als auch in den LBS im Vergleich zum unbehandelten Karottentreter. Dabei lagen in den LBS von K-em-1 (36 %) und K-em-3 (34 %) absolut betrachtet mehr polymergebundene Uronsäuren vor als in K-em-2 (28 %) und K-em-4 (25 %). Auch der molare Anteile an Galacturonsäure in der Monomerzusammensetzung der Polysaccharide der LBS von K-em-1 und K-em-3 nach saurer Hydrolyse (vgl. Abbildung 32 B) war höher als in denen der LBS von K-em-2 und K-em-4. Dies sprach für einen stärkeren Abbau der löslichen Homogalacturonane bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung zur Herstellung von K-em-2 und K-em-4 gegenüber K-em-1 und K-em-3 aufgrund von vermehrt vorliegenden PG-Aktivitäten. Möglicherweise hatte der Anteil an polymergebundenen Uronsäuren auch einen direkten Einfluss auf die Viskosität. Nach den Ergebnissen der Viskositätsbestimmung von Dr. Rocío Morales- Medina besaßen 1%ige Suspensionen von K-em-2 und K-em-4 mit dem geringeren Uronsäuregehalt in den LBS eine nur halb so große Viskosität wie K-em-1 und K-em-3 (vgl. Kapitel 4.4.2.2.4). In den UBS der vier enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester war in Hinblick auf den Gehalt polymergebundener Uronsäuren, anders als in den LBS, kein deutlicher Trend zu erkennen.

Tabelle 6: Absoluter auf den getrockneten Karottentrester bezogener Uronsäuregehalt (\pm Standardabweichung, n = 3) sowie darauf bezogener Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrad (DAC) der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m-500) und enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester (K-em-1/2/3/4) (\pm Range/2, n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe

	ABSOLUTER URONSÄUREGEHALT / %	DM / %	DAC / %	ABSOLUTER URONSÄUREGEHALT / %	DM / %	DAC / %
	UBS				LBS	
K-u	18,0 \pm 1,6	53,7 \pm 2,6	109,0 \pm 1,2	39,9 \pm 1,4	84,8 \pm 9,3	42,1 \pm 4,2
K-m-500	19,3 \pm 0,4	38,6 \pm 0,5	55,6 \pm 0,1	40,8 \pm 6,7	57,3 \pm 1,3	18,1 \pm 0,5
K-em-1	11,7 \pm 0,1	10,8 \pm 0,0	76,2 \pm 1,2	36,4 \pm 4,1	27,8 \pm 0,3	31,4 \pm 0,4
K-em-2	8,4 \pm 0,4	6,3 \pm 0,5	105,0 \pm 3,7	28,3 \pm 2,0	10,9 \pm 0,2	34,7 \pm 0,8
K-em-3	9,4 \pm 0,6	7,1 \pm 0,2	95,3 \pm 0,0	34,1 \pm 7,5	13,2 \pm 0,2	44,0 \pm 0,4
K-em-4	7,8 \pm 0,2	8,3 \pm 2,0	113,4 \pm 4,5	25,0 \pm 2,4	10,9 \pm 0,6	55,1 \pm 0,0

Die Behandlung des Karottentresters nahm nicht nur Einfluss auf den DP der Homogalacturonane, sondern auch auf deren Veresterungsgrad. Hier zeigen die Ergebnisse zur Bestimmung von DM und DAC der Polysaccharide der UBS und LBS der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester im Vergleich zum unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentrester (vgl. Tabelle 6) die gleichen Veränderungen, weshalb im Folgenden vorrangig auf die unlöslichen Polysaccharide eingegangen wird. Bereits die mechanische Behandlung reduzierte ausgehend vom unbehandelten Karottentrester den DM polymergebundener Uronsäuren um 30 % und den DAC um über 50 %. Es wird angenommen, dass es in Folge der Erwärmung bei der mechanischen Behandlung vermehrt zu einer nicht enzymatisch katalysierten Hydrolyse der Esterbindungen kam, welche durch den leicht sauren pH-Wert (pH = 4 - 5) der Suspension des jeweiligen Karottentreters begünstigt war. Durch die enzymatisch-mechanische Behandlung des Karottentreters kam es zu einer Reduktion des DM um bis zu 88 %. Daher sollte neben der beschriebenen Hydrolyse der Methylgruppen im Zuge der mechanischen Behandlung zusätzlich der Ablauf einer enzymatischen Hydrolyse der Methylester von den Homogalacturonanen durch die PME-Nebenaktivität der GAL in Betracht gezogen werden. Ein höherer Anteil an GAL in der Enzymmischung führte bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung zu einer ausgeprägteren Methylesterspaltung. So fiel bei K-em-1 der Rückgang des DM der polymergebundenen Uronsäuren in den UBS mit 80 % tendenziell und in den LBS mit 67 % deutlich geringer aus als in den anderen enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern (K-em-2/3/4), zu deren Behandlung größere Mengen an GAL verwendet wurden.

Die DAC der polymergebundenen Uronsäuren der UBS und LBS des mechanisch behandelten Karottentreters betrugen in etwa die Hälfte der des unbehandelten Karottentreters. Die polymergebundenen Uronsäuren in den UBS und LBS der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester wiesen einen DAC zwischen den entsprechenden DAC des mechanisch behandelten und unbehandelten Karottentreters auf. Im Falle von K-em-4 lag der DAC in den UBS und LBS über denen des unbehandelten Karottentreters. Die hydrolytische Abspaltung der Acetylgruppen ohne enzymatische Katalyse war im Zuge der mechanischen Behandlung durch eine erhöhte Temperatur und einen leicht sauren pH-Wert (pH = 4 - 5) begünstigt. Für eine zusätzliche

enzymatische Hydrolyse der Acetylester bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung wäre das Vorliegen einer Pektinacetylesterase erforderlich. Eine entsprechende Aktivität wurde für die eingesetzten Enzyme aber nicht nachgewiesen. Im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentresters wurden bevorzugt unveresterte Abschnitte der Homogalacturonane mittels PG abgebaut. Dies zeigte sich in einem höheren Anteil an acetylierten Abschnitten in den Homogalacturonanen (höherer DAc) der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester gegenüber dem mechanisch behandelten Karottentrester.

Die Ergebnisse des Xyloglucanscreenings (vgl. Abbildung A - 15 und Tabelle A - 11 im Anhang) zeigen, dass die Xyloglucanstrukturen nach der mechanischen bzw. enzymatisch-mechanischen Behandlung im Vergleich zu denen des unbehandelten Karottentresters weitgehend unverändert blieben. Dies war zu erwarten, da zur enzymatischen Hydrolyse des Karottentresters keine Xyloglucanase zugesetzt wurde.

Die Unterschiede im enzymatischen Abbau der Arabinane, (Arabino-)Galactane, Cellulose und Homogalacturonane bei den vier enzymatisch-mechanischen Behandlungen des Karottentresters konnten vorrangig durch partiell sehr dominant ausgeprägte Nebenaktivitäten der Enzyme, welche in unterschiedlichen Anteilen in den jeweiligen Enzymmischungen enthalten waren, sowie die unvollständige Inaktivierung der ARA-Aktivitäten erklärt werden.

4.4.2.2.3 ANALYSE DER OLIGOSACCHARIDE IN DEN NLBS-FRAKTIONEN

In der NLBS-Faktion des unbehandelten Karottentresters konnten keine Oligosaccharide nachgewiesen werden. Während auch die mechanische Behandlung des Karottentresters zu keiner Freisetzung von Oligosacchariden führte, wurden im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung durch die enzymatische Hydrolyse der Arabinane, (Arabino-)Galactane, Cellulose und Homogalacturonane des Karottentresters entsprechende Oligosaccharide freigesetzt. So konnten in der NLBS-Faktion von K-em-1 mittels HPAEC-PAD/MS Arabinotriose und -tetraose, Cellotriose und -tetraose, Galactotriose und -tetraose (vgl. Abbildung A - 16 im Anhang) und mittels UHPLC-MS Tri-, Tetra- und Pentagalacturonsäure mit bis zu zwei Methylestern identifiziert werden. Hierbei war eine eindeutige Identifizierung von Cello- und Galactotriose nicht möglich, da diese bei der Analyse mittels HPAEC-PAD/MS coeluieren und aufgrund eines gleichen *m/z* auch anhand ihres Massenspektrums nicht differenziert werden können. Jedoch enthielt der Karottentrester Cellulose und (Arabino-)Galactane und wurde enzymatisch unter anderem mit CEL und GAL behandelt. Daher wird angenommen, dass sowohl Cello- als auch Galactotriose enzymatisch freigesetzt wurden. Diese Annahme wurde durch den qualitativen Nachweis der beiden entsprechenden Tetraosen gestützt. Anders als die NLBS-Faktion von K-em-1 enthielten die von K-em-2/3/4 keine Galactotetraose sowie nur partiell Cellotetraose und Pentagalacturonsäure. Im Detail können die Ergebnisse der in den NLBS-Faktionen des (un)behandelten Karottentresters identifizierten Oligosaccharide der Tabelle A - 12 im Anhang entnommen werden. Das schmälere Oligosaccharidprofil der NLBS-Faktionen von K-em-2/3/4, verglichen mit dem von K-em-1, bestätigte, dass es bei der Herstellung von K-em-2/3/4 im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung

tendenziell zu einem weiter fortgeschrittenen Abbau der Polysaccharide kam, wie es auch die in den beiden vorherigen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse zeigen.

Für eine quantitative Bestimmung der Oligosaccharide waren die Gehalte in allen enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester zu gering (< 0,1 %) bzw. im Falle von Cello- und Galactotriose aufgrund derer Coelution nicht möglich. Die geringen Gehalte der Oligosaccharide sprachen für einen bevorzugten Abbau intermediär freigesetzter Oligosaccharide weiter zu den Mono- und/oder Disacchariden durch die zugesetzten Enzyme. Dies zeigte sich auch daran, dass längerkettige Oligosaccharide ($DP \geq 5$) nicht bzw. nur partiell nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentrester nachweisbar waren.

4.4.2.4 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN

Sowohl die mechanische als auch die enzymatisch-mechanische Behandlung des Karottentrester ermöglichte die Herstellung nicht-sedimentierender, niedrigviskoser 1%iger Suspensionen. Die Viskosität der Suspensionen von K-em-1/3 (14 - 15 mPa·s) lag dabei etwas über und die Viskosität der Suspensionen von K-em-2/4 (je 7 mPa·s) etwas unter der der Suspension des mechanisch behandelten Karottentrester (11 mPa·s). Während der Anteil an unlöslicher Masse der vier enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester (33 - 40 %) vergleichbar war und unter dem des mechanisch behandelten Karottentrester (64 %) lag, ergaben sich in Hinblick auf die Partikelgröße Unterschiede. So wiesen K-em-1/2/4 kleinere Partikel ($D_{90} = 78 - 89 \mu\text{m}$) auf als K-em-3, dessen Partikelgröße ($D_{90} = 101 \mu\text{m}$) der des mechanisch behandelten Karottentrester entsprach. Im Vergleich zum unbehandelten Karottentrester reduzierte die mechanische bzw. enzymatisch-mechanische Behandlung die Größe der Partikel um über 70 %. Weiter bewirkte die enzymatisch-mechanische Behandlung des Karottentreters in etwa eine Verdopplung der Wasserretentionskapazität, während im Vergleich dazu der Effekt der mechanischen Behandlung verschwindend gering war. Im Einzelnen sind die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von Dr. Rocío Morales-Medina in Tabelle A - 13 im Anhang zusammengestellt.

Der Blick auf die funktionellen Eigenschaften der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester zeigte, dass sich die beschriebenen Veränderungen und Unterschiede in der chemischen Beschaffenheit der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester nicht zwangsläufig in deren funktionellen Eigenschaften widerspiegeln. So waren sich beispielsweise K-em-1 und K-em-3 in ihren funktionellen Eigenschaften ähnlicher als es unter anderem deren verschiedene Anteile an LBS und unterschiedlichen Molekulargewichtsverteilungen der Polysaccharide der LBS (vgl. Kapitel 4.4.2.1) vermuten lassen.

4.4.2.3 MECHANISCH-ENZYMATISCHE BEHANDELTE KAROTTENTRESTER

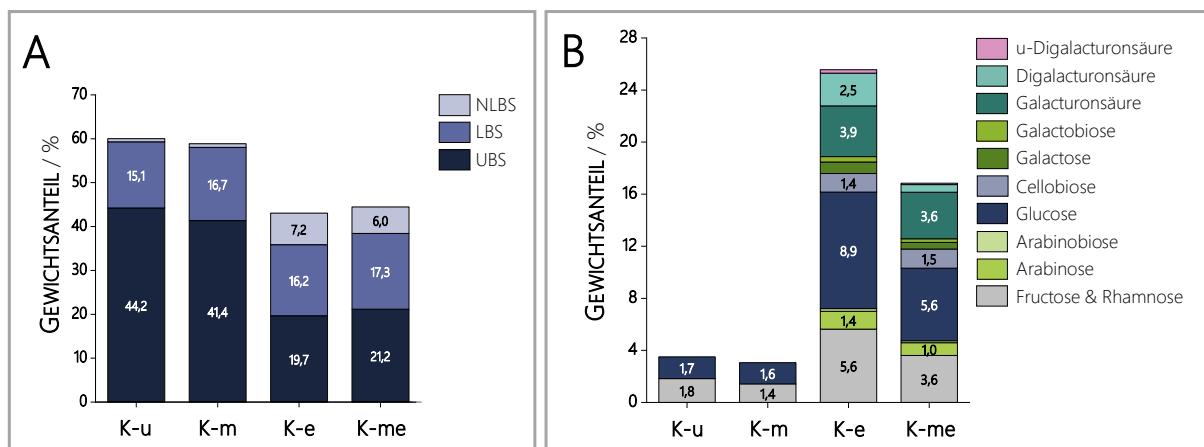
Zur Optimierung der Parameter bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung wurden drei mit verschiedener Intensität mechanisch behandelte Karottentrester herangezogen (vgl. Kapitel 3.1.2). In diesem Rahmen wurde auch der Einfluss der Intensität der mechanischen Behandlung auf die Ballaststoffzusammensetzung und die Polysaccharidstrukturen betrachtet. Die im Einzelnen im

Anhang in Abbildung A - 17 dargestellten Ergebnisse der Bestimmung von Ballaststoffanteilen, Monosaccharidzusammensetzung, Molekulargewichtsverteilung, Feinstrukturen der Arabinane und (Arabino-)Galactane und Veresterungsgrad polymergebundener Uronsäuren waren für alle drei mechanisch behandelten Karottentrester vergleichbar. Demzufolge waren Veränderungen auf struktureller Ebene innerhalb des getesteten Bereichs unabhängig von der Intensität der mechanischen Behandlung des Karottentresters.

Zur Klärung der Frage, ob eine mechanische Lockerung der Zellwandstrukturen zu einer besseren enzymatischen Zugänglichkeit der Zellwandpolysaccharide führte, wird im Folgenden speziell auf den Vergleich des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester mit dem enzymatisch behandelten Karottentrester (vgl. Kapitel 3.1.2) eingegangen. Der Abbau von Polysacchariden sowie Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung im Zuge einer enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentresters im Vergleich zum unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentrester wurde in Kapitel 4.4.2.2 ausführlich dargelegt. Da der geschilderte Abbau bzw. die beschriebenen Veränderungen auf den mechanisch-enzymatisch behandelten bzw. enzymatisch behandelten Karottentrester übertragen werden können, wird auf entsprechende Vergleiche in den nachfolgenden Kapiteln nicht erneut im Detail eingegangen.

4.4.2.3.1 VERÄNDERUNGEN IN DER BALLASTSTOFFZUSAMMENSETZUNG

Sowohl durch die enzymatische als auch die mechanisch-enzymatische Behandlung reduzierte sich der Gesamtballaststoffanteil des Karottentreters im Vergleich zum unbehandelten Karottentrester um etwa ein Viertel auf 43 - 45 %. Dabei halbierte sich der Anteil an UBS auf 20 - 21 %, während der Anteil an LBS unverändert bei 16 - 17 % lag und der Anteil an NLBS auf 6 - 7 % anstieg (vgl. Abbildung 33 A). Bei Letzterem war aufgrund des Vorliegens von (u)Gala-OS und Arabinotriose in den NLBS-Fraktionen des mechanisch-enzymatisch und enzymatisch behandelten Karottentreters (vgl. Kapitel 4.4.2.3.3) eine Unterbestimmung wahrscheinlich, da die zuvor genannten Oligosaccharide methodisch bedingt nicht als NLBS miterfasst wurden (vgl. Kapitel 4.2). Yoon und Mitarbeitende (2005) beschrieben eine stärkere Zunahme des wasserlöslichen Anteils der Ballaststoffe in Karottentrester (von 18 % auf 62 %) nach einer enzymatischen Behandlung mit einem cellulasereichen Enzymextrakt und einer 48-fach längeren Hydrolysezeit von über 24 Stunden. Der Rückgang des Gesamtballaststoffanteils ging in den hier vorgestellten Arbeiten mit einer Zunahme des Anteils an freien Mono- und Disacchariden einher, welcher im enzymatisch behandelten Karottentrester mit 26 % höher war als im mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (17 %) (vgl. Abbildung 33 B). Dabei entfielen sowohl im enzymatisch behandelten als auch im mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester über 80 % auf die Monosaccharide. Die von Yoon und Mitarbeitenden (2005) durchgeführte enzymatische Behandlung von Karottentrester für 24 Stunden hingegen resultierte in einer deutlich geringeren Freisetzung von Monosacchariden (< 2 %). Der höhere Anteil an Monosacchariden im enzymatisch behandelten Karottentrester im Vergleich zum mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester ließ



sich auf eine stärkere Freisetzung von Glucose (9 %), Fructose (5 %) und Digalacturonsäure (3 %) zurückführen. Die Anteile an Galacturonsäure (4 %), Arabinose, Galactose und entsprechenden Disacchariden (je < 2 %) waren im enzymatisch behandelten und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester vergleichbar. Die analytisch erfassten Monosaccharide in den behandelten Karottentrestern resultierten, wie es aufgrund der zugesetzten Enzyme zu erwarten war, aus dem Abbau der Arabinan, (Arabino-)Galactane, Cellulose und Homogalacturonane des Karottentresters. Die Zunahme des Anteils an Fructose nach der enzymatischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters konnte über die Spaltung von Saccharose erklärt werden. Die nicht enzymatisch katalysierte hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindung mit Fructofuranose in Saccharose war unter den erhöhten Temperaturen bei der mechanischen bzw. enzymatischen Behandlung und den leicht sauren pH-Werten der Suspensionen der Karottentrester ($\text{pH} = 4 - 5$) begünstigt. Wie insbesondere der 1,5-fach höhere Gehalt an freier Fructose im enzymatisch behandelten Karottentrester im Vergleich zum mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester nahelegte, wurde Saccharose im Zuge der enzymatischen Behandlung des Karottentresters bevorzugter gespalten als bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung. In Einklang dazu war auch der Anteil an freier Glucose im enzymatisch behandelten Karottentrester höher als im mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester. Jedoch war im Zuge der (mechanisch-)enzymatischen Behandlung des Karottentresters eine Freisetzung von Glucose nicht nur aus Saccharose, sondern auch aus Polysacchariden möglich.

Obwohl sich der Anteil an LBS nach der enzymatischen bzw. mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters kaum veränderte, weisen die Ergebnisse der Analyse der Molekulargewichtsverteilung der Polysaccharide der LBS (vgl. Abbildung 34) auf einen enzymatischen Abbau höhermolekular (> 50 kDa), löslicher Polysaccharide hin. So enthielt der enzymatisch bzw. mechanisch-enzymatisch behandelte Karottentrester überwiegend lösliche Polysaccharide mit einem geringen Molekulargewicht (< 50 kDa). Auch Xu und Mitarbeitende (2015) beschrieben eine Abnahme des mittleren Molekulargewichts sowie eine Verschmälerung der Molekulargewichts-

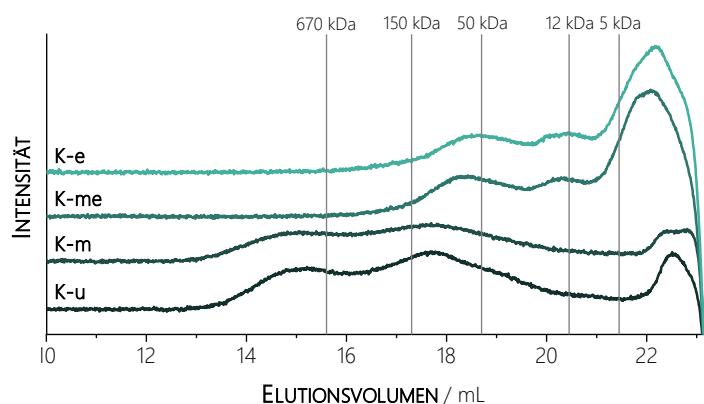


Abbildung 34: Ausschnitte der Chromatogramme zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung der löslichen Ballaststoffe der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) mit Dextransubstanzen (5, 12, 50, 150 und 670 kDa) als Molekulargewichtsmarker ($n = 2$)

Verteilung der Polysaccharide aus den LBS von Pfirsichtrester nach einer mechanisch-enzymatischen Behandlung. Yoon und Mitarbeitende (2005) zeigten, dass die enzymatische Hydrolyse von Karottentrester mit zunehmender Hydrolysezeit zu einer vermehrten Freisetzung von Polysacchariden mit geringen Molekulargewichten führte. Der Einfluss der mechanischen Behandlung auf die Molekulargewichte der löslichen Polysaccharide des Karottentresters war den Ergebnissen zufolge gering. Dies spiegelte sich in den nahezu identischen Molekulargewichtsverteilungen der Polysaccharide aus den LBS des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters wider.

Aufgrund der vergleichbaren Ballaststoffzusammensetzungen und Molekulargewichtsverteilungen der LBS des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters ließen sich keine Vorteile durch eine vorherige mechanische Behandlung des Karottentresters zur Lockerung der Zellwandstrukturen für eine verbesserte enzymatische Zugänglichkeit ableiten. Lediglich im Anteil der freigesetzten Mono- und Disaccharide ergaben sich Unterschiede zwischen dem enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester, welche jedoch teilweise durch eine unterschiedlich starke Spaltung von Saccharose und nicht nur durch den Abbau von Polysacchariden verursacht wurden. Zur Bestätigung dieser Beobachtungen werden im Weiteren mögliche Veränderungen in den einzelnen Polysaccharidstrukturen betrachtet.

4.4.2.3.2 VERÄNDERUNGEN IN DEN POLYSACCHARIDSTRUKTUREN

Die enzymatische bzw. mechanisch-enzymatische Behandlung des Karottentresters bewirkte, wie in Kapitel 4.4.2.2 für die enzymatisch-mechanische Behandlung des Karottentresters beschrieben, einen Abbau von Arabinanen, (Arabino-)Galactanen, Cellulose und Homogalacturonanen. Abzuleiten war dies aus den Ergebnissen der Analyse freigesetzter Mono-, Di- und Oligosaccharide (vgl. Abbildung 33 B und Kapitel 4.4.1.3.3) sowie der Monosaccharidanalyse der UBS, LBS und NLBS-Fraktionen des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karotten-

tresters (vgl. Abbildung 35 A - C) im Vergleich zum unbehandelten und mechanisch behandelten Karottentrester.

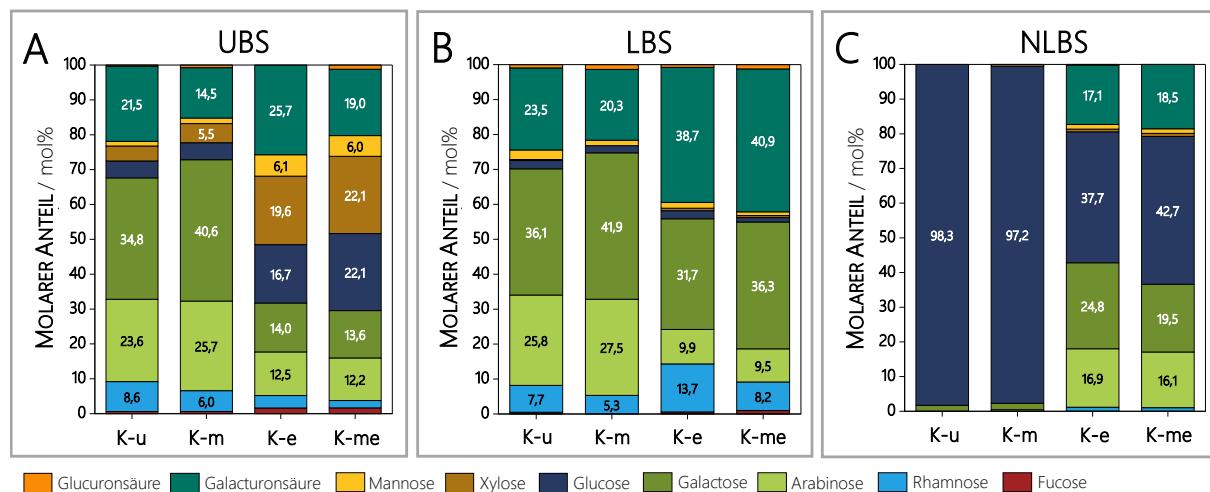


Abbildung 35: Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolysen und Trifluoressigsäurehydrolyse der unlöslichen (UBS) (A) und löslichen Ballaststoffe (LBS) (B) sowie der niedermolekularen, löslichen Ballaststoff (NLBS)-Fraktionen (C) der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) ($n = 2$)

In Abbildung 33 B ist zu erkennen, dass beim enzymatischen Abbau der Cellulose des Karottentreters primär Glucose und nur wenig Cellobiose (1,4 %) freigesetzt wurde. Daneben kam es zur Freisetzung eines geringen Anteils an Cellooligosacchariden (< 0,5 %, vgl. Kapitel 4.4.1.3.3). Dabei unterschieden sich der enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelte Karottentrester lediglich im Gehalt der freien Glucose, welcher bei 8,9 % (K-e) bzw. 5,6 % (K-me) lag. Als Ursache für den Unterschied denkbar wäre ein stärkerer Abbau von Cellulose bei der enzymatischen Behandlung des Karottentreters. Jedoch wären in diesem Fall auch höhere Gehalte der anderen Spaltprodukte von Cellulose zu erwarten. Daher war eine stärkere Spaltung von Saccharose, wie in Kapitel 4.4.2.1 beschrieben, als Ursache des höheren Gehalts an freier Glucose im enzymatisch behandelten Karottentrester wahrscheinlicher. Der hohe molare Anteil an Glucose (78 - 80 mol%) in der Monosaccharidzusammensetzung der UBS des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreters nach schwefelsaurer Hydrolyse (vgl. Abbildung A - 14 im Anhang) legte nahe, dass nach der enzymatischen bzw. mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters ein großer Teil der Cellulose in den UBS zurückblieb, wie es auch für die enzymatisch-mechanische Behandlung beobachtet wurde (vgl. Kapitel 4.4.2.2.2).

Der molare Anteil an Galactose sank in der Monomerzusammensetzung nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse der UBS nach der enzymatischen bzw. mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters deutlich von 35 mol% (unbehandelt) auf je 14 mol%. Dem Karottentrester wurde zur enzymatischen Hydrolyse keine GAL zugesetzt. Jedoch führten die GAL-Nebenaktivitäten der ARA und CEL (vgl. Kapitel 4.3) zu einem starken Abbau insbesondere der unlöslichen (Arabino-)Galactane des Karottentreters. Auch der beim Galactanscreening ermittelte absolute Summengehalt enzymatisch freigesetzter (Arabino-)Galactooligosaccharide reduzierte sich in den UBS des

enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreters gegenüber dem des unbehandelten Karottentreters um über 80 % (vgl. Tabelle 7). Dabei wiesen die im enzymatisch behandelten Karottentrester verbliebenen unlöslichen (Arabino-)Galactanstrukturen, wie die des unbehandelten Karottentreters (vgl. Kapitel 4.4.2.1), vereinzelt Arabinoseeinheiten auf. Diese wurden durch die im Galactanscreening enzymatisch freigesetzten Arabinogalactobiosen G2b (5 %) und G2c (4 %) repräsentiert. Dabei war der molare Anteil an G2c im enzymatisch behandelten Karottentrester gegenüber dem unbehandelten Karottentrester leicht erhöht. Dies sprach für eine leichte Zunahme des Anteils an Arabinoseeinheiten in den (Arabino-)Galactanen nach der enzymatischen Behandlung des Karottentreters. Es ist zu vermuten, dass der Abbau der arabinosefreien (Arabino-)Galactanabschnitte im Zuge der enzymatischen Behandlung des Karottentreters begünstigt war. Aus den unlöslichen (Arabino-)Galactanen des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreters hingegen konnte beim Galactanscreening nur Galactobiose (G2a) enzymatisch freigesetzt und analytisch erfasst werden. In den LBS des Karottentreters reduzierte sich der molare Anteil an Galactose in der Monosaccharidzusammensetzung nach der enzymatischen Behandlung geringfügig auf 32 mol% im Vergleich zum unbehandelten Karottentreter (36 %). Nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters blieb der molare Anteil an Galactose in der Monomerzusammensetzung der löslichen Polysaccharide unverändert bei 36 mol%. Die Ergebnisse des Galactanscreenings (vgl. Tabelle 7) zeigen, dass die Strukturen der (Arabino-)Galactane in den LBS der einzelnen (un)behandelten Karottentreter mit denen aus den entsprechenden UBS vergleichbar waren. In der Monosaccharidzusammensetzung der NLBS-Fraktionen stellte Galactose mit 25 mol% für den enzymatisch und mit 20 mol% für den mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreter den zweitgrößten molaren Anteil. In den enzymatisch bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentretern konnten jedoch nur geringe Gehalte an Galactose (< 1,0 %), Galactobiose (< 0,5 %), -triose und -tetraose analytisch erfasst werden. Der Nachweis der beiden Letzteren war dabei nur qualitativ möglich. Daher war es wahrscheinlich, dass die enzymatische und mechanisch-enzymatische Behandlung des Karottentreters daneben zur Freisetzung von Arabinogalacto- und/oder längerkettigen Galactooligosacchariden ($DP > 4$) führte. Jedoch konnte deren Vorkommen im enzymatisch bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreter aufgrund fehlender Standardsubstanzen im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich außerdem, dass bei der enzymatischen Behandlung des Karottentreters tendenziell mehr lösliche (Arabino-)Galactane zu Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden abgebaut wurden als bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung. Künftig könnte der zusätzliche Einsatz einer (*endo*)-GAL zur enzymatischen Hydrolyse von Karottentreter den Abbau der (Arabino-)Galactane zu entsprechenden Oligosacchariden weiter begünstigen.

Hinsichtlich der Arabinane wurden vermutlich bevorzugt die löslichen Arabinane enzymatisch abgebaut, da der molare Anteil an Arabinose in der Monosaccharidzusammensetzung der LBS nach der enzymatischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters im Vergleich zum unbehandelten Karottentreter tendenziell stärker abnahm als der der UBS. Wie aus

Tabelle 7: Molare Verteilung und absoluter auf den getrockneten Karottentrester bezogener Summengehalt von aus den unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrestern (K-me) enzymatisch freigesetzten (Arabino-)Galactooligosacchariden (\pm Range/2, n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, G2a - G2c = (Arabino-)Galactobiose (vgl. Abbildung A - 2 im Anhang), LOQ = Bestimmungsgrenze

	K-u	K-m	K-e	K-me
UBS				
MOLARE VERTEILUNG / mol%				
G2a	93,0 \pm 0,0	97,3 \pm 0,1	90,7 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0
G2b	5,4 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1	5,1 \pm 0,1	-
G2c	1,6 \pm 0,0	< LOQ	4,2 \pm 0,0	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$				
	60,0 \pm 1,1	63,9 \pm 3,8	12,2 \pm 0,2	10,2 \pm 0,6
LBS				
MOLARE VERTEILUNG / mol%				
G2a	93,2 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	90,0 \pm 0,3	100,0 \pm 0,0
G2b	4,9 \pm 0,0	< LOQ	6,3 \pm 0,3	< LOQ
G2c	1,9 \pm 0,0	< LOQ	3,7 \pm 0,0	< LOQ
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$				
	95,7 \pm 4,6	147,9 \pm 3,4	202,3 \pm 1,0	195,7 \pm 13,1

den Ergebnissen des Arabinanscreenings (vgl. Tabelle A - 14 im Anhang) hervorgeht, konnten bei diesem aus den LBS enzymatisch keine analytisch bestimmbaren Arabinoooligosaccharide freigesetzt werden. Daher war ein weitgehender Abbau der enzymatisch zugänglichen Arabinanstrukturen im Zuge der enzymatischen bzw. mechanisch-enzymatischen Behandlung wahrscheinlich. Der Übergang von Arabinanen aus den LBS in die NLBS-Fraktion im Zuge der (mechanisch-) enzymatischen Behandlung zeigte sich auch in der Zunahme des molaren Anteils an Arabinose (16 - 17 mol%) in der Monosaccharidzusammensetzung der NLBS-Fraktion des enzymatisch bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters im Vergleich zu der des unbehandelten Karottentresters. Dabei ist positiv hervorzuheben, dass die Gehalte an freigesetzter Arabinose (1,0 - 1,4 %) und Galactobiose (0,2 %), welche eine Abnahme des Gesamtballaststoffanteils anzeigen, im enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester gering waren. Folglich wurden im Zuge der enzymatischen bzw. mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters aus den Arabinanen vermutlich höhere Gehalte an Arabinoooligosacchariden freigesetzt (vgl. Kapitel 4.4.2.3.3). Den Ergebnissen zufolge begünstigte eine vorherige mechanische Behandlung die enzymatische Hydrolyse der Arabinane nicht merklich.

Die enzymatische Hydrolyse mit PL und (exo-)PG führte erwartungsgemäß zum Abbau der Homogalacturonane im Karottentrester. Dies zeigte sich unter anderem in der Freisetzung von Galacturonsäure, (un)gesättigter Digalacturonsäure (vgl. Abbildung 33 B) sowie (u)GalA-OS (vgl. Kapitel 4.4.2.3.3) bei der enzymatischen bzw. mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters. Dabei war insbesondere der Gehalt an Digalacturonsäure (2,5 %) im enzymatisch behandelten Karottentrester etwas höher als im mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (0,6 %). Dies wies auf einen stärkeren Abbau der Homogalacturonane im Zuge der enzy-

matischen Behandlung im Vergleich zur mechanisch-enzymatischen Behandlung hin. Hinsichtlich des absoluten Gehalts an polymergebundenen Uronsäuren kam es bei der enzymatischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters im Vergleich zum unbehandelten Karottentrester zu einer Abnahme in den UBS. In den LBS hingegen führte insbesondere die enzymatische Behandlung des Karottentreters zu keiner Veränderung im Gehalt polymergebundener Uronsäuren gegenüber dem unbehandelten Karottentrester (vgl. Tabelle 8). Sowohl die enzymatische als auch die mechanisch-enzymatische Behandlung des Karottentreters bewirkte eine vergleichbare Abnahme des DM in UBS und LBS (vgl. Tabelle 8) wie die enzymatisch-mechanische Behandlung (vgl. Kapitel 4.4.2.2.2). Daher wird vermutet, dass die Hydrolyse der Methylester durch eine PME-Nebenaktivität zugesetzter Enzyme bzw. eine nicht enzymatisch katalysierte Esterspaltung während der enzymatischen Behandlung gegenüber der mechanisch bedingten, nicht enzymatisch katalysiert ablaufenden Hydrolyse der Methylester überwogen. Die Veränderungen im DAc waren nach der enzymatischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters für deren LBS und UBS vergleichbar (vgl. Tabelle 8) und fielen ähnlich aus wie nach den enzymatisch-mechanischen Behandlungen (vgl. Kapitel 4.4.2.2.2). Möglicherweise führten die PL- und (exo-)PG-Aktivitäten der zur Behandlung eingesetzten Enzyme bevorzugt zum Abbau von nicht acetylierten Homogalacturonanabschnitten. Dies bestätigte sich in den beobachteten höheren DAc und absolut freigesetzten Gehalten an Essigsäure im enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester gegenüber dem mechanisch behandelten Karottentrester. Die Ergebnisse zur Bestimmung der DAc zeigen, dass es sowohl während der mechanischen als auch der enzymatischen Behandlung des Karottentreters zur Hydrolyse von Acylestern kam. Da für die eingesetzten Enzyme keine Nebenaktivität einer Pektinacetylase bekannt waren, lief die Spaltung begünstigt durch eine erhöhte Temperatur und einen sauren pH-Wert ($\text{pH} = 4 - 5$) bei der enzymatischen, mechanisch-enzymatischen und mechanischen Behandlung des Karottentreters vermutlich hydrolytisch ohne Enzymkatalyse ab. Aufgrund der vergleichbaren DAc und absoluten Gehalte an freigesetzter Essigsäure des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreters kann angenommen werden, dass der Einfluss der mechanischen Behandlung auf die Hydrolyse der Acylester geringer war als der der enzymatischen Behandlung.

Tabelle 8: Absoluter auf den getrockneten Karottentrester bezogener Uronsäuregehalt (\pm Standardabweichung, $n = 3$) sowie darauf bezogener Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrad (DAc) der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) (\pm Range/2, $n = 2$), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe

	ABSOLUTER URONSÄUREGEHALT / %	DM / %	DAc / %	ABSOLUTER URONSÄUREGEHALT / %	DM / %	DAc / %
	UBS			LBS		
K-u	18,0 \pm 1,6	53,7 \pm 2,6	109,0 \pm 1,2	39,9 \pm 1,4	84,8 \pm 9,3	42,1 \pm 4,2
K-m	16,8 \pm 0,4	35,3 \pm 0,1	58,4 \pm 0,2	42,3 \pm 3,0	44,8 \pm 0,1	13,7 \pm 0,1
K-e	12,9 \pm 0,4	8,0 \pm 0,1	66,5 \pm 1,2	39,7 \pm 4,1	13,8 \pm 0,1	30,5 \pm 0,1
K-me	11,6 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2	60,9 \pm 0,0	35,7 \pm 2,2	12,2 \pm 0,2	30,0 \pm 0,0

Die Struktur der Xyloglucane blieb, wie nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung, auch nach der enzymatischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters entsprechend den Erwartungen im Vergleich zu den Xyloglucanen des unbehandelten Karottentresters unverändert (vgl. Abbildung A - 15 und Tabelle A - 11 im Anhang).

In Summe zeigen die Ergebnisse, dass der enzymatische Abbau von Arabinanen, (Arabino-) Galactanen, Cellulose und Homogalacturonanen des Karottentresters durch eine vorherige mechanische Behandlung nicht merklich begünstigt wurde. Im Folgenden wird darauf eingegangen, ob die mechanische Behandlung vor der enzymatischen Hydrolyse des Karottentresters einen Einfluss auf das Profil der freigesetzten Oligosaccharide hatte.

4.4.2.3.3 ANALYSE DER OLIGOSACCHARIDE IN DEN NLBS-FRAKTIONEN

Die Oligosaccharidprofile der NLBS-Faktionen des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters sind in Abbildung 36 dargestellt. Weiter ist im Anhang in Abbildung A - 16 beispielhaft das Chromatogramm zur Analyse der NLBS-Faktion des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters mittels HPAEC-PAD abgebildet. Dieses wurde unter anderem zur Identifizierung vorliegender Oligosaccharide herangezogen. Zur Bestimmung und Charakterisierung der (u)GalA-OS auch hinsichtlich des Vorkommens von Methylestern wurden die NLBS-Faktionen zusätzlich mittels UHPLC-PDA-MS nach Trennung auf einer Amidphase analysiert (vgl. Kapitel 3.3.5.6). Die Analyse der Oligosaccharide in den NLBS-Faktionen des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters ergab vergleichbare Oligosaccharidprofile. Es dominierten die (u)GalA-OS, während der Anteil der gesättigten GalA-OS gering war. Dies war zu erwarten, da zur enzymatischen Hydrolyse des Karottentresters keine PG zugegeben wurde und somit vorrangig die PG-Nebenaktivitäten der CEL und PL gesättigte GalA-OS aus Homogalacturonanen freisetzen konnten. Quantitativ bestimmt wurden geringe Gehalte an Tri- und Tetragalacturonsäure (je 0,1 %), die bis zu zwei Methylester aufwiesen. Daneben war der qualitative Nachweis von doppelt methylveresterter Pentagalacturonsäure möglich. Es wird vermutet, dass die hochmethylveresterten Homogalacturonane im Karottentrester (vgl. Kapitel 4.4.2.1) die Aktivität der PL gegenüber ihrer PG-Nebenaktivität begünstigten. Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Profilingmethode (vgl. Kapitel 4.1.3) konnten in der NLBS-Faktion des enzymatisch behandelten Karottentreters nach alkalischer Hydrolyse uGalA-OS bis zu einem DP von sieben und in der des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreters uGalA-OS bis zu einem DP von acht identifiziert werden. Dabei nahm der Gehalt der einzelnen uGalA-OS mit zunehmenden DP ab. In Summe enthielt die NLBS-Faktion des enzymatisch behandelten Karottentreters tendenziell mehr uGalA-OS (1,1 %) als die des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreters (0,8 %). Der Unterschied basierte vor allem auf einer nahezu doppelt so hohen Freisetzung an ungesättigter Trigalacturonsäure im Zuge der enzymatischen Behandlung des Karottentreters im Vergleich zur mechanisch-enzymatischen Behandlung. Möglicherweise wurde durch die vorherige mechanische Behandlung, aufgrund einer nicht

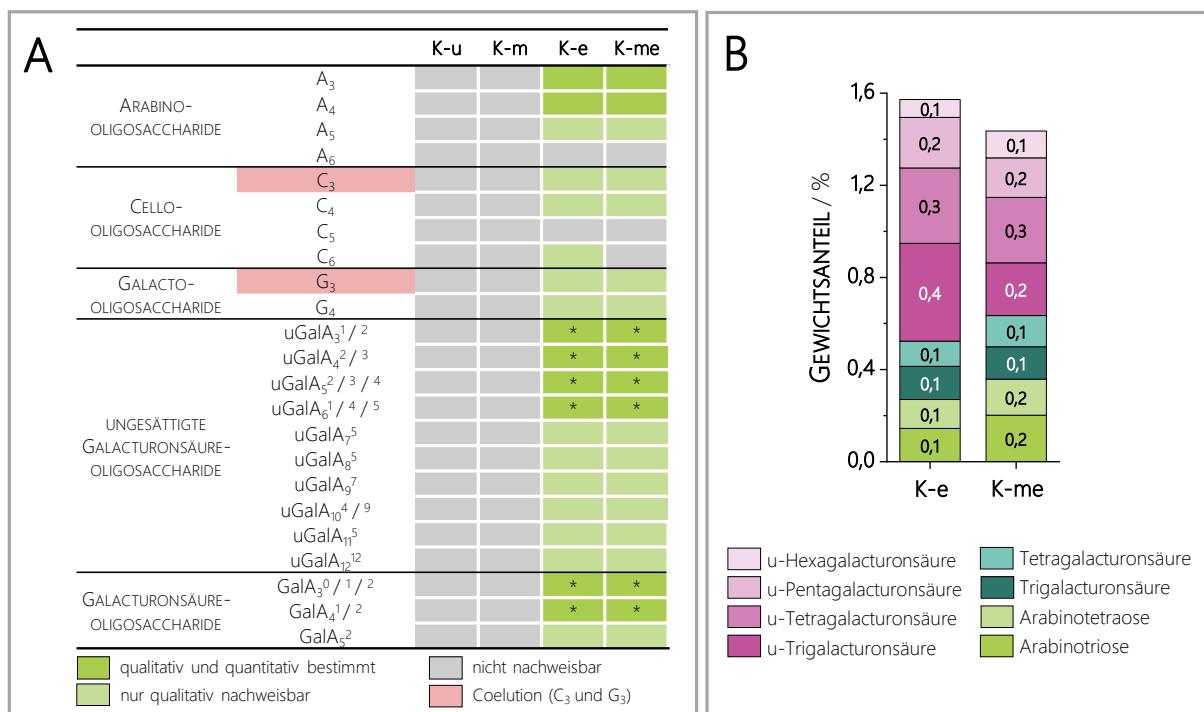


Abbildung 36: Ergebnisse der qualitativen (A) und quantitativen (B) Bestimmung von Oligosacchariden in den niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) ($n = 2$), Gewichtsanteile bezogen auf den getrockneten Karottentrester, $2 - 12$ = Polymerisationsgrad, $0/1/2$ = Anzahl an Methylestern, A = Arabinoseeinheit, C = Glucoseeinheit, Gal = Galactose, GalA = Galacturonsäure, * = Quantifizierung als Summe ohne Methylester

enzymatisch katalysierten Hydrolyse der Methylester während dieser (vgl. Kapitel 4.4.2.3.2), die Aktivität der PL bei der nachfolgenden enzymatischen Behandlung gegenüber den nun niedriger methylveresterten Homogalacturonanen reduziert. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Analyse der methylveresterten uGalA-OS aus den NLBS-Fraktionen des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters mit der dafür entwickelten Profilingmethode (vgl. Kapitel 4.1.3) wider. Hierbei konnten in beiden behandelten Karottentrestern uGalA-OS bis zu einem DP von 12 mit verschiedener Anzahl an Methylestern nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 36 A), wenngleich die Identifizierung über ermittelte Retentionszeiten und m/z im Falle der Hepta- (7^5) und Octagalacturonsäure (8^5) mit je fünf Methylestern nicht ganz eindeutig war. Aus der Intensität der einzelnen Signale (vgl. Abbildung A - 18 im Anhang) konnte abgeleitet werden, dass die NLBS-Fraktion des enzymatisch behandelten Karottentresters von einigen methylveresterten uGalA-OS höhere Gehalte aufwies als die des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters. Eine quantitative Abschätzung der Gehalte entsprechender methylveresterter uGalA-OS war für diese Arbeit aufgrund des insgesamt geringen Anteils an uGalA-OS nicht relevant. Mit zunehmenden DP der uGalA-OS nimmt deren Löslichkeit in 80%igem Ethanol stetig ab. Daher war es wahrscheinlich, dass die längerkettigen uGalA-OS (DP > 10) vermehrt in den LBS des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters vorlagen.

Neben den (u)GalA-OS konnten in den NLBS-Fraktionen der enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester Arabinotriose und -tetraose quantitativ bestimmt werden. Die

Unterschiede in der Freisetzung dieser waren zwischen den beiden Behandlungen sehr gering. Zudem wurde sowohl nach der enzymatischen als auch nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentrester Arabinopentaose in den entsprechenden NLBS-Faktionen identifiziert. Bei der Analyse der aus Arabinanen resultierenden Oligosaccharide lag der Fokus auf den linearen Arabinoooligosacchariden ($DP = 3 - 6$). Wahrscheinlich war jedoch, dass die enzymatische Hydrolyse auch zur Freisetzung von verzweigten Arabinoooligosacchariden führte. Diese konnten jedoch aufgrund unzureichender Mengen an entsprechenden Standardsubstanzen nicht in die angewandte HPAEC-PAD/MS-Methode (vgl. Kapitel 3.3.5.6) integriert und damit an dieser Stelle nicht berücksichtigt werden.

Der Nachweis von Galactotriose und -tetraose in den NLBS-Faktionen des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester aus dem Abbau der (Arabino-)Galactane war nur qualitativ möglich. Zudem konnte das Vorkommen von Galactotriose aufgrund der Coelution mit Cellotriose nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Möglicherweise freigesetzte Arabino-galactooligosaccharide und längerkettige Galactooligosaccharide ($DP > 4$) konnten aufgrund fehlender Standardsubstanzen ebenfalls nicht in die HPAEC-PAD/MS-Methode integriert werden und somit bei der Analyse der NLBS-Faktionen nicht miterfasst werden. Resultierend aus dem enzymatischen Abbau von Cellulose wurden in der NLBS-Faktion des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester Cellotriose und -tetraose und in der des enzymatisch behandelten Karottentrester zusätzlich Spuren an Cellohexaose nachgewiesen. Wie bei Galactotriose konnte das Vorliegen von Cellotriose nicht eindeutig nachgewiesen werden. Jedoch beschrieben Yoon und Mitarbeitende (2005) das Vorkommen von Galacto- ($DP = 3$ und 4) und Celooligosaccharide ($DP = 3 - 5$) in der alkohollöslichen Fraktion von enzymatisch behandeltem Karottentrester.

Hinsichtlich des Oligosaccharidprofils der NLBS-Faktion waren der enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelte Karottentrester, mit Ausnahme der uGalA-OS, vergleichbar. So zeigte sich, dass eine mechanische Behandlung des Karottentrester den anschließenden enzymatischen Abbau von Homogalacturonanen mittels PL beeinträchtigte. Daher ist von einer mechanischen Behandlung des Karottentrester vor der enzymatischen Behandlung abzuraten, wenn im Zuge der Behandlung vermehrt uGalA-OS freigesetzt werden sollen.

4.4.2.3.4 FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN

Obwohl sich bei der chemischen Charakterisierung kaum Unterschiede zwischen dem enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester ergaben, unterschieden sich diese in ihren von Dr. Rocío Morales-Medina bestimmten funktionellen Eigenschaften (vgl. Tabelle A - 13 im Anhang), mit Ausnahme der unlöslichen Masse, deutlich. Auch wenn die physikalische Stabilität der 1%igen Suspensionen beider behandelten Karottentrester sehr gering war, begann die Sedimentation des enzymatisch behandelten Karottentrester bereits nach zwei Minuten und betrug nach einer Stunde das Dreifache (32 %) des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester. Dessen Sedimentation setzte nach acht Minuten ein. Die schnellere und stärker ausgeprägte Sedimentation des enzymatisch behandelten Karottentrester konnte auf fast dreifach

größere Partikel ($D_{90} = 288 \mu\text{m}$) gegenüber dem mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester zurückgeführt werden. Der Vergleich mit dem unbehandelten Karottentrester ($D_{90} = 324 \mu\text{m}$) zeigte zudem, dass die enzymatische Behandlung die Größe der Partikel nur geringfügig reduzierte. Auch die geringere Wasserretentionskapazität des enzymatisch behandelten Karottentresters (31 g Wasser/g unlösliche Masse), verglichen mit dem mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (37 g Wasser/g unlösliche Masse), könnte unter anderem mit den unterschiedlichen Partikelgrößen zusammenhängen. Eine Bestimmung der Viskosität war aufgrund der geringen physikalischen Stabilität der 1%igen Suspensionen des enzymatisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters nicht möglich.

Den Ergebnissen der chemischen Charakterisierung zufolge bewirkte die mechanische Behandlung keine Verbesserung der nachfolgenden enzymatischen Hydrolyse der Zellwandpolysaccharide des Karottentresters. Jedoch deuten die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung darauf hin, dass die mechanische Behandlung zur Reduktion der Partikelgrößen und damit zur Bildung stabiler Suspensionen des Karottentresters, wie sie für die Einbringung in Lebensmittel vorteilhaft sein können, notwendig war.

4.5 ZUSAMMENFASENDE DISKUSSION

Die Nebenströme der Lebensmittelindustrie Erbsenschale und Karottentrester erwiesen sich als unterschiedlich gut geeignet zur Funktionalisierung mittels kombiniert mechanisch-enzymatischer Behandlung für die Ballaststoffanreicherung von Lebensmitteln. Dies ergab die umfassende chemische Charakterisierung und die parallele Betrachtung einiger funktionell relevanter Parameter verschiedener enzymatisch-mechanisch und mechanisch-enzymatisch behandelter Erbsenschalen und Karottentrester.

Die detaillierte Charakterisierung der unbehandelten Nebenströme Erbsenschale und Karottentrester zeigte, dass ein ballaststoffreicher Nebenstrom der gemüseverarbeitenden Industrie nicht dem anderen gleichen muss und daher eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung individuell angepasst werden sollte. So wies der Karottentrester 20 % weniger Ballaststoffe auf als die Erbsenschale, enthielt jedoch etwas mehr Proteine, Mineralstoffe, Glucose und Fructose. Hingegen nur in der Erbsenschale wurden die üblicherweise in Leguminosen vorkommenden RFO nachgewiesen. Jedoch lagen die Gehalte der einzelnen RFO in der Erbsenschale unter den in der Literatur beschriebenen Werten (Saldanha do Carmo *et al.*, 2022). Auch die anderen untersuchten Inhaltsstoffe der Erbsenschale unterschieden sich partiell in ihren Anteilen von den von Saldanha und Mitarbeitenden (2022) ermittelten Gehalten. Diese Abweichungen in der Zusammensetzung lassen sich unter anderem durch die Anpassung der Erbsenpflanze an die jeweils vorherrschenden Wachstumsbedingungen wie Temperatur, Trockenheit und Boden erklären. Die hier ermittelte Zusammensetzung des Karottentresters hingegen war mit der in der Literatur beschriebenen vergleichbar (Bellur Nagarajaiah & Prakash, 2015; Chau *et al.*, 2004; Trabert *et al.*, 2022; Turksoy & Özkaya, 2011). Hinsichtlich der Ballaststoffe war die Dominanz der UBS in der Erbsenschale deutlich

stärker ausgeprägt als im Karottentrester, wie sich aus den Verhältnissen von UBS zu LBS (Erbsenschale: 13:1, Karottentrester: 3:1) ableiten ließ. Während die Polysaccharide der LBS der Erbsenschale fast ausschließlich ein geringes Molekulargewicht (< 5 kDa) aufwiesen, lagen im Karottentrester vermehrt höhermolekularere LBS (> 50 kDa) vor. Der Anteil an NLBS war in beiden Nebenströmen sehr gering. In Bezug auf die vorliegenden Zellwandpolysaccharide entsprachen die Ergebnisse für beide Nebenströme den Erwartungen, welche auf den für Erbsenschale und Karottentrester in der Literatur beschriebenen Monosaccharidzusammensetzungen basierten (Chau *et al.*, 2004; Le Goff *et al.*, 2001; Trabert *et al.*, 2022). So wurden die Zellwandpolysaccharide der Erbsenschale und des Karottentresters von Cellulose dominiert, wenngleich deren Anteil in der Erbsenschale deutlich höher war als im Karottentrester. Weiter enthielt die Erbsenschale, anders als der Karottentrester, einen höheren Anteil (Glucurono-)Xylane, woraus das vermehrte Vorliegen von sekundären Zellwänden abgeleitet werden konnte. Auch der Anteil an Xyloglucanen, welche vorrangig in den UBS vorlagen, war in der Erbsenschale höher als im Karottentrester. Der Substitutionsgrad der Xyloglucane in den beiden Nebenströmen betrug jeweils 73 %, wie es für Dikotyledonen üblich ist (Fry, 1989). Auch hinsichtlich der Anteile an mit Xylose (X), Xylose und Galactose (L) bzw. Xylose, Galactose und Fucose (F) substituierten Glucanabschnitten in den Xyloglucanen waren die Erbsenschale und der Karottentrester vergleichbar. Einzig bei der enzymatischen Freisetzung der Xyloglucanoligosaccharide XXFG und XLFG im Zuge des Xyloglucan-screenings ergaben sich Unterschiede in den molaren Anteilen zwischen beiden Nebenströmen. So waren die molaren Anteile an XXFG und XLFG im Falle des Karottentresters nahezu ausgeglichen, während im Falle der Erbsenschale XXFG überwog. Im Karottentrester waren neben der Cellulose Pektine ein wesentlicher Bestandteil der Zellwand, wohingegen in der Erbsenschale nur wenige Pektine enthalten waren. Dabei wiesen beide Nebenströme Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I als zentrale Pektinstrukturen auf. In der Erbsenschale waren zusätzlich geringere Anteile an Xylogalacturonanen enthalten, deren Vorkommen erstmals von Renard und Mitarbeitenden (1997) beschrieben wurde. Hinsichtlich der Rhamnogalacturonane Typ I wiesen die Ergebnisse auf eine Dominanz von Arabinanen in der Erbsenschale und auf ein ausgewogenes Verhältnis von Arabinanen und (Arabino-)Galactanen im Karottentrester hin, wie bereits von Trabert und Mitarbeitenden (2022) beschrieben. In Übereinstimmung mit der Literatur enthielten die Arabinane der Erbsenschale tendenziell mehr lineare Abschnitte als die Arabinane des Karottentresters (Ralet *et al.*, 1993; Trabert *et al.*, 2022). Bei Betrachtung der substituierten Arabinanabschnitte fiel auf, dass an das Arabinanrückgrat gebundene Arabinoferanosen in der Erbsenschale im Gegensatz zur Literatur überwiegend in O2- und im Karottentrester in Übereinstimmung mit der Literatur vorrangig in O3-Position lokalisiert waren (Ralet *et al.*, 1993; Trabert *et al.*, 2022). Der Anteil an Arabinoseeinheiten in den (Arabino-)Galactanen des Karottentresters war gering und in der Erbsenschale nicht nachweisbar. Homogalacturonane enthalten polymergebundene Uronsäuren, welche in der Erbsenschale sehr niedrige und im Karottentrester partiell sehr hohe DM und DAC aufwiesen. Die in der Literatur für die Erbsenschale beschriebenen Veresterungsgrade sind deutlich höher, während für den Karottentrester in der Literatur vergleichbare, aber teilweise auch geringere Veresterungsgrade zu finden sind (Broxterman *et al.*, 2017; Le Goff *et al.*, 2001).

al., 2001; Trabert *et al.*, 2022). Die analysierten Unterschiede in den Anteilen an Pektinen und deren Veresterungsgraden in den beiden Nebenströmen spiegelten sich vermutlich auf funktioneller Ebene wider. Als Beispiel hierfür ist die Wasserretentionskapazität zu nennen, welche für den pektinreicherer, hochveresterten Karottentrester doppelt so hoch war wie für die pektinärmere, niedrigveresterte Erbsenschale. Mannane waren weder in der Erbsenschale noch im Karottentrester in bedeutenden Mengen nachweisbar.

Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der beiden Nebenströme war es notwendig, die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung für die Erbsenschale und den Karottentrester separat zu optimieren. Für die Herstellung physikalisch stabiler, nicht-sedimentierender Suspensionen war bei der mechanischen Behandlung der Erbsenschale eine deutlich höhere Intensität erforderlich als beim Karottentrester, obwohl die anfängliche Partikelgröße beider Nebenströme nahezu identisch war. Die Ursache für die Notwendigkeit einer intensiveren mechanischen Behandlung der Erbsenschale kann in dem hohen Anteil an Cellulose begründet sein. Diese lag vermutlich überwiegend in kristalliner Form vor. Unter den final ausgewählten Bedingungen wurde die Erbsenschale mechanisch mittels Mikrofluidizer mit zwei bis vier Durchläufen mehr und einem 3,5-fach höherem Druck als der Karottentrester behandelt. Bei der enzymatischen Behandlung kamen im enzymatisch-mechanischen Versuchsansatz entsprechend den dominierenden Zellwandpolysacchariden bei beiden Nebenströmen ARA, CEL und PG zum Einsatz. Daneben wurde der Erbsenschale XYL und dem Karottentrester GAL zugesetzt. Beim mechanisch-enzymatischen Versuchsansatz hingegen wurden bei der Erbsenschale nur ARA und CEL und im Falle des Karottentresters zusätzlich PL verwendet.

Aus den Analysedaten der enzymatisch-mechanisch behandelten Nebenströme ließ sich ableiten, dass für eine gezielte Auswahl an Enzymen und einen kontrollierbaren Ablauf der enzymatischen Hydrolyse nicht nur die dominierenden Zellwandpolysaccharide der Nebenströme, sondern insbesondere auch die Nebenaktivitäten eingesetzter Enzyme bekannt sein sollten. Weiter sollte die Möglichkeit einer vollständigen Hitzeinaktivierung der Enzyme gewährleistet sein. Daher wurde beim mechanisch-enzymatischen Versuchsansatz die Temperatur zur Enzymaktivierung von 80 °C auf 95 °C erhöht und auf den Einsatz der, nicht durch Hitze zu inaktivierenden, XYL verzichtet. Wenn im Zuge der Ballaststoffanreicherung mit einem kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenstrom unvollständig inaktivierte Enzyme ins Lebensmittel gelangen, können diese durch einen unerwünschten enzymatischen Abbau entsprechender Polysaccharide möglicherweise die Konsistenz des Lebensmittels negativ beeinflussen.

Beim nachfolgenden Vergleich der enzymatisch-mechanischen und mechanisch-enzymatischen Behandlungen getrennt nach den beiden Nebenströmen ist zu beachten, dass aufgetretene Unterschiede nicht zwingend auf die Reihenfolge der Behandlungen zurückzuführen sind. So sollte einerseits beachtet werden, dass der Karottentrester im enzymatisch-mechanischen Versuchsansatz mit einem Mikrofluidizer und im mechanisch-enzymatischen Versuchsansatz mit einem Hochdruckhomogenisator mechanisch behandelt wurde. Beide Verfahren zählen zwar zu den Hochdruckbehandlungen, beruhen jedoch auf einem unterschiedlichen Prinzip (Martínez-

Monteagudo *et al.*, 2017; Ozturk & Turasan, 2022). Folglich könnten bereits die beiden verschiedenen Hochdruckbehandlungen eine unterschiedliche Lockerung der Zellwandstrukturen des Karottentresters bewirkt haben. Andererseits sollte beim enzymatisch-mechanischen Versuchsansatz der Einfluss der in unterschiedlichem Enzym:Substrat-Verhältnis zugesetzten verschiedenen Enzymmischungen sowie die unvollständige Inaktivierung der ARA- und XYL-Aktivitäten berücksichtigt werden. Mögliche Auswirkungen zeigten sich in einem tendenziell stärkeren Rückgang an UBS und unlöslicher Masse in der Erbsenschale bei deren enzymatisch-mechanischen Behandlung im Vergleich zu deren mechanisch-enzymatischen Behandlung. Der gleiche Trend spiegelte sich auch in den Gesamtblallaststoffgehalten wider. Verantwortlich für die ausgeprägtere Abnahme der Gehalte an UBS kann sein, dass es bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale, anders als bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung, den Ergebnissen zufolge zu einem weitgehenden enzymatischen Abbau der überwiegend unlöslichen (Glucurono-)Xylane kam. Der in dieser Arbeit durch die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung erzielte Abbau der UBS der Erbsenschale war mit den Ergebnissen von Morales-Medina und Mitarbeitenden (2024) weitgehend vergleichbar. Beim alleinigen Einsatz eines kommerziellen CEL-Präparates zur enzymatischen Hydrolyse der Erbsenschale konnten die Autoren jedoch eine deutlich stärkere Reduktion des Anteils an UBS erreichen. Allerdings sollte beim Vergleich beachtet werden, dass Morales-Medina und Mitarbeitenden (2024) andere kommerzielle Enzympräparate verwendeten und die Erbsenschale für eine 3 bis 16-fach längere Zeit mit den Enzymen behandelten. Die Bedingungen bei der anschließend durchgeföhrten mechanischen Behandlung waren mit den Bedingungen der mechanischen Behandlung der Erbsenschale in dieser Arbeit vergleichbar (Morales-Medina *et al.*, 2024). Insbesondere der Anteil an löslicher Masse, welcher neben NLBS auch Mono- und Disaccharide sowie andere lösliche Bestandteile umfasst, nahm im Zuge der von Morales-Medina und Mitarbeitenden (2024) durchgeföhrten enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale partiell stark zu. Aufgrund unterschiedlicher Analysemethoden war ein Vergleich mit den in dieser Arbeit bestimmten Gehalten an NLBS sowie freien Mono- und Disacchariden nur begrenzt möglich. In dieser Arbeit unterschieden sich die Gehalte an LBS und NLBS sowie die Molekulargewichtsverteilungen der Polysaccharide aus den LBS der behandelten Erbsenschalen der beiden Versuchsansätze nicht. Auch der Gehalt an enzymatisch freigesetzten Monosacchariden war vergleichbar. Jedoch wurden bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale gegenüber der mechanisch-enzymatischen Behandlung in Summe höhere Gehalte an Disacchariden und tendenziell größere Mengen an Oligosacchariden freigesetzt. Bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung kam es im Vergleich zur mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale vor allem zu einer drei- bis vierfach höheren Freisetzung an Xylobiose und einer bis zu zweifach höheren Freisetzung an Xylooligosacchariden (DP = 3 - 4). Jedoch war nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale der Anteil längerkettiger Xylooligosaccharide (DP > 6) höher. Bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale wurde keine XYL zugesetzt, jedoch wies das verwendete CEL-Präparat XYL-Aktivitäten auf. Diese waren jedoch vermutlich geringer als die der im enzymatisch-mechanischen Versuchsansatz eingesetzten XYL und konnten zudem vollständig durch Hitze inaktiviert werden.

Folglich sollte beim Einsatz einer XYL zur enzymatischen Behandlung von Erbsenschalen auf eine vollständige Inaktivierung dieser für einen kontrollierbaren Abbau der (Glucurono-)Xylane und auf einen geringen weiteren Abbau freigesetzter (Glucurono-)Xylooligosaccharide geachtet werden.

Die Anteile an Arabinose, Arabinobiose und -tetraose bzw. Arabinotriose hingegen waren in den mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen zwei bzw. drei- bis fünffach höher als die in den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen. Somit war der Abbau der Arabinane bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung vermutlich stärker ausgeprägt, obwohl im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung der Erbsenschale wegen der unvollständigen Inaktivierung der ARA-Aktivitäten von einem weitgehenden Abbau enzymatisch zugänglicher Arabinanstrukturen ausgegangen wurde. Möglicherweise verbesserte die vorherige mechanische Behandlung der Erbsenschale die enzymatische Zugänglichkeit der Arabinane und begünstigte somit deren Abbau bei der nachfolgenden enzymatischen Behandlung. Diese Annahme stützt, dass der Abbau der Arabinane in der zuvor intensiver mechanisch behandelten Erbsenschale (E-me-5x) tendenziell weiter fortgeschritten war als in E-me-3x. Hinsichtlich der Feinstruktur der Arabinane der Erbsenschale führten beide Versuchsansätze zu einer Linearisierung der Arabinane durch Abspaltung von Arabinofuranosiden als Seitenketten.

Die Anteile an freigesetzter Glucose und Cellobiose in den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen waren mit denen in den mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen vergleichbar, während die Anteile an Cellotriose- und -tetraose in den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen deutlich höher waren. Daher wird angenommen, dass im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung mehr Cellulose abgebaut wurde als bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale. Hierfür sprach auch der höhere Anteil an UBS in den mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen gegenüber den enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen. Zudem lief insbesondere bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschalen vermutlich die enzymatische Hydrolyse der zuvor freigesetzten Cellooligosaccharide gegenüber der Hydrolyse von Cellulose bevorzugt ab. Diesen Ergebnissen zufolge führte die vorherige mechanische Behandlung der Erbsenschale, anders als angenommen, wahrscheinlich zu keiner ausgeprägten Modifikation kristalliner Bereiche der Cellulose und damit zu keiner besseren enzymatischen Zugänglichkeit der Cellulose bei anschließender enzymatischer Behandlung.

Der Abbau von Homogalacturonanen der Erbsenschale spielte in beiden Versuchsansätzen eine untergeordnete Rolle. Jedoch ergaben sich in den Strukturen der analytisch zugänglichen Xyloglucane Unterschiede, welche vermutlich auf eine verschiedene enzymatische Abbaubarkeit dieser beim Xyloglucanscreening nach der enzymatisch-mechanischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung beruhten. Bei den kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlungen der Erbsenschale wurde keine Xyloglucanase eingesetzt. Jedoch könnte ihr Einsatz im Zuge einer kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung zum Abbau unlöslicher Xyloglucane führen und somit den Anteil an UBS in der Erbsenschale weiter reduzieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die vorherige mechanische Behandlung der Erbsenschale den enzymatischen Abbau der Zellwandpolysaccharide, mit Ausnahme der Arabinane, nicht wesentlich begünstigte. Daher wird angenommen, dass die Reihenfolge von enzymatischer und mechanischer Behandlung den Abbau der Polysaccharide der Erbsenschale nur geringfügig beeinflusste. Um dies abzusichern, sollte künftig die Erbsenschale einer enzymatisch-mechanischen und einer mechanisch-enzymatischen Behandlung mit jeweils gleichen Bedingungen unterzogen und charakterisiert werden.

Im Karottentrester wurde der Anteil an UBS durch die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung in Bezug auf den unbehandelten Karottentrester in beiden Versuchsansätzen in etwa halbiert. Der Anteil an LBS blieb bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters gegenüber dem unbehandelten Karottentrester unverändert. Nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung hingegen nahm der Anteil an LBS je nach zugesetzter Enzymmischung entweder zu (K-em-1) oder ab (K-em-2/3/4). Weiter wiesen die Polysaccharide der LBS sowohl nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung, mit Ausnahme von K-em-1, als auch nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung fast ausschließlich ein Molekulargewicht von unter 150 kDa auf. In den LBS des mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentresters überwogen dabei, anders als in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern, die LBS mit geringem Molekulargewicht (< 5 kDa). In der Literatur wurden keine vergleichbaren Untersuchungen mit Karottentrester gefunden. Jedoch wurde für Pfirsichtrester gezeigt, dass die Molekulargewichte der Polysaccharide der LBS nach einer mechanisch-enzymatischen Behandlung mittels Mikrofluidizer und kommerziellem CEL-Präparat abnahmen und deren Molekulargewichtsverteilung schmäler wurde (Xu *et al.*, 2015). Ein geringeres Molekulargewicht der Polysaccharide aus den LBS kann sich möglicherweise günstig auf die funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften der kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester auswirken. Außerdem kam es bei beiden Versuchsansätzen im Vergleich zum unbehandelten Karottentrester zu einer Erhöhung der Anteile an NLBS, wenngleich der Anteil an NLBS nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung tendenziell höher war als nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung. In Übereinstimmung dazu waren im mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester anders als in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern Oligosaccharide in quantifizierbaren Mengen enthalten. Insgesamt reduzierte sich der Gesamtballaststoffgehalt des Karottentreters durch die enzymatisch-mechanische Behandlung je nach zugesetzter Enzymmischung entweder stärker (um ca. 50 %) oder tendenziell weniger (um 20 %) als nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung. Entsprechend dazu stieg in ähnlichem Ausmaß der Anteil an freien Mono- und Disacchariden nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentreters in Abhängigkeit von der zugesetzten Enzymmischung unterschiedlich stark an. Dabei enthielten die kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester, anders als die Erbsenschalen, vorrangig Monosaccharide.

Die einzelnen Ballaststoffanteile (UBS, LBS, NLBS) des enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentreters K-em-1 waren ähnlich zu denen des mechanisch-enzymatisch behandelten und

des enzymatisch behandelten Karottentresters. Zudem führte die rein enzymatische Behandlung des Karottentreters zu einer mit dem mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester vergleichbaren chemischen Beschaffenheit. Daher wird angenommen, dass die enzymatische Behandlung des Karottentreters der entscheidende Faktor für den Abbau der Polysaccharide und damit die Veränderungen in der Ballaststoffzusammensetzung sowie die Freisetzung von Mono-, Di- und Oligosacchariden war. So nahmen insbesondere die Wahl der Enzyme sowie deren Nebenaktivitäten und deren anschließende vollständige Inaktivierung maßgeblichen Einfluss auf die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung des Karottentreters. Dies zeigte sich beispielsweise beim Vergleich des Abbaus der Arabinane, (Arabino-)Galactane, Cellulose und Homogalacturonane nach der enzymatisch-mechanischen und mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentreters, welcher je nach eingesetzten Enzymen und Enzymmengen partiell unterschiedlich ausfiel. Die enzymatisch zugänglichen Arabinane des Karottentreters wurden sowohl bei der enzymatisch-mechanischen als auch bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung weitgehend abgebaut. Dabei war der Abbau nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung aufgrund der unvollständig inaktivierten ARA-Aktivitäten tendenziell weiter fortgeschritten. Dafür sprachen die höheren Gehalte an Arabinose bzw. niedrigeren Gehalte an Arabinoxyligosacchariden in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern gegenüber dem mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreter. Nur bei K-em-1 war der Abbau der Arabinane wegen eines geringeren Zusatzes an ARA zur enzymatischen Behandlung weniger stark ausgeprägt.

Die im Karottentreter enthaltenen (Arabino-)Galactane wurden im Zuge der enzymatisch-mechanischen Behandlung aufgrund des Zusatzes einer GAL zu einem größeren Umfang abgebaut als bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung ohne Zusatz einer GAL. Dies legte unter anderem der bis zu fünffach höhere Gehalt an freier Galactose in den enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentretern nahe. Der Abbau der (Arabino-)Galactane des Karottentreters im Zuge der mechanisch-enzymatischen Behandlung beruhte auf den GAL-Aktivitäten der zugesetzten CEL. Nur K-em-1 war aufgrund des geringen Anteils an zugesetzter GAL, mit Blick auf den Abbau von (Arabino-)Galactanen, mit dem mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentreter vergleichbar. Der Großteil an Cellulose hingegen blieb, wie in der Erbsenschale, im Karottentreter sowohl nach der enzymatisch-mechanischen als auch nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung vermutlich unverändert in kristalliner Form in den UBS zurück.

Der Abbau der Homogalacturonane erfolgte bei der enzymatisch-mechanischen Behandlung des Karottentreters ausschließlich mittels PG, während bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung eine PL mit PG-Nebenaktivität zum Einsatz kam. Dabei führte die PL zu einer stärkeren Freisetzung von Oligosacchariden aus den hochmethylveresterten Homogalacturonanen des Karottentreters als die PG. Hierbei war für die Freisetzung von uGalA-OS ein hoher DM der Homogalacturonane entscheidend. So kann sich das parallele Vorliegen einer PME, ähnlich wie eine vorherige mechanische Behandlung des Karottentreters, durch die hydrolytische (nicht-)enzymatisch katalysierte Abspaltung von Methylgruppen negativ auf die PL-Aktivität auswirken. Der Abbau der Homogalacturonane des Karottentreters kann möglicherweise durch eine gleich-

zeitige Verwendung von PL und PG im Zuge einer kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung zum parallelen Abbau methylveresterter und nicht methylveresterter Abschnitte weiter gefördert werden.

In Summe betrachtet, kam es weder bei der enzymatisch-mechanischen noch bei der mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters zu einer vermehrten Freisetzung von Oligosacchariden. Ähnlich verhielt es sich bei der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung der Erbsenschale, obgleich aus dieser im Vergleich zum Karottentrester bis zu dreifach höhere Gehalte an Oligosacchariden freigesetzt wurden. Es wird angenommen, dass aus den Polysacchariden beider Nebenströme Oligosaccharide vor allem intermediär freigesetzt wurden. Diese wurden dann jedoch gegenüber den Polysacchariden bevorzugt enzymatisch weiter zu Mono- und/oder Disacchariden hydrolysiert. Disaccharide zählen nach Definition der Lebensmittel-informationsverordnung nicht zu den Ballaststoffen. Dennoch sollte die Freisetzung von Disacchariden, wie es vor allem in der Erbsenschale im Zuge der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung beobachtet wurde, nicht nur kritisch gesehen werden. Ähnlich wie für Oligosaccharide wurden unter anderem für Arabino-, Cello- und Xylobiose diverse ernährungsphysiologisch positive Eigenschaften postuliert (Liu *et al.*, 2024; Nieto-Dominguez *et al.*, 2017; Prandi *et al.*, 2018). Auch ein erhöhter Anteil an Monosacchariden in den kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströmen, insbesondere dem Karottentrester, kann bei deren Einbringung in Lebensmittel vorteilhaft sein. So könnte parallel zur Ballaststoffanreicherung ein geringerer externer Zuckerzusatz zu den entsprechenden Lebensmitteln nötig sein. Wenn jedoch ein gesteigertes Interesse an einem hohen Gehalt an Oligosacchariden besteht, sollte der Prozess der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung überdacht werden. Beispielsweise könnte die enzymatische Behandlung der Nebenströme unter Tangentialflussfiltration (engl. *cross-flow-filtration*) zur kontinuierlichen Abführung von enzymatisch freigesetzten Oligosacchariden durchgeführt werden und so idealerweise der Abbau von Polysacchariden gefördert werden. Das Potential zur enzymatischen Freisetzung von Oligosacchariden wurde für den Karottentrester höher eingeschätzt als für die Erbsenschale, unter anderem aufgrund des geringeren Anteils an Cellulose. Hierfür sprach außerdem, dass der Anteil an UBS im Karottentrester durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung deutlich stärker reduziert werden konnte als in der Erbsenschale.

Aus allen kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen und Karottentrestern konnten niedrigviskose Suspensionen mit partiell unterschiedlicher physikalischer Stabilität hergestellt werden. Hinsichtlich der Viskositäten dieser Suspensionen unterschieden sich insbesondere die Suspensionen der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester. Die Viskosität ist vorrangig von der Beschaffenheit der löslichen Bestandteile abhängig. Den Analyseergebnissen zufolge konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Molekulargewichtsverteilung der löslichen Bestandteile und der Viskosität erkannt werden. So wiesen die Suspensionen der enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester trotz deutlicher Unterschiede in den Molekulargewichtsverteilungen derer Polysaccharide aus den LBS partiell gleiche Viskositäten auf. Einen

größeren Einfluss auf die Viskosität nahm das Vorliegen von Homogalacturonanen. So konnten enzymatisch-mechanisch behandelte Karottentrester mit einem höheren Anteil an polymergebundenen Uronsäuren mit einer höheren Viskosität in Verbindung gebracht werden. Inwiefern andere lösliche Oligo- und/oder Polysaccharide die Viskosität der Suspensionen der kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströme beeinflussten, konnte aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht explizit abgeleitet werden. Die Viskosität der Suspensionen der kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen waren geringer als in der Literatur beschriebene Viskositäten vergleichbarer enzymatisch-mechanisch behandelter Erbsenschalen (Morales-Medina *et al.*, 2024). In Bezug auf die physikalische Stabilität der Suspensionen der enzymatisch-mechanisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströme waren die Erbsenschale und der Karottentrester vergleichbar. Aus den enzymatisch-mechanisch behandelten Nebenströmen konnten physikalisch stabile 1%ige Suspensionen hergestellt werden, wohingegen die der mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströme bereits nach kurzer Zeit zu sedimentieren begannen. Dabei war die physikalische Stabilität der Suspensionen der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen vermutlich aufgrund einer zwei- bis dreifach höheren Viskosität, einer 15 - 30 % geringeren Partikelgröße und einer tendenziell geringeren unlöslichen Masse gegenüber den mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen begünstigt. Die enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester wiesen gegenüber dem mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester tendenziell kleinere Partikel bei vergleichbarer unlöslicher Masse auf. Somit blieben bei beiden Nebenströmen die Partikel nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung größer als nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung. Da die Partikelgröße der Nebenströme nach der mechanischen Behandlung geringer war als nach deren mechanisch-enzymatischen Behandlung, war eine Bildung von Agglomeraten bei der anschließenden enzymatischen Behandlung wahrscheinlich. Die alleinige enzymatische Behandlung des Karottentresters führte nur zu einer geringfügigen Reduktion der Partikelgrößen verglichen mit dem unbehandelten Karottentrester. Möglicherweise kam es bei einer vorherigen enzymatischen Behandlung der Nebenströme durch den Abbau von Polysacchariden zu einer Lockerung der Zellwandstrukturen und somit zu einer erleichterten Bildung kleiner Partikel bei der anschließenden mechanischen Behandlung. Dafür spricht, dass die Partikelgrößen der Nebenströme nach der enzymatisch-mechanischen Behandlung zumeist geringer waren als nach deren mechanischen Behandlung. Im Vergleich zur Literatur wiesen die in dieser Arbeit hergestellten enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen etwas größere Partikel auf (Morales-Medina *et al.*, 2024). Weiter waren die Wasserretentionskapazitäten der enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen und Karottentrester vergleichbar. Die Werte der Wasserretentionskapazitäten lagen dabei unter den von Morales-Medina und Mitarbeitenden (2024) für enzymatisch-mechanisch behandelte Erbsenschalen bestimmten Werten. Der mechanisch-enzymatisch behandelte Karottentrester hingegen wies eine höhere Wasserretentionskapazität auf als die mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen. Daraus ließ sich folgern, dass im Karottentrester nach der mechanisch-enzymatischen Behandlung mehr zugängliche wasserbindende Zellwandstrukturen vorlagen als in den mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen. In beiden unbehandelten Nebenströmen war die Wasser-

retentionskapazität geringer als in den entsprechend behandelten Nebenströmen, wenngleich die des Karottentresters verglichen mit der Erbsenschale doppelt so hoch war. Veränderungen in den funktionellen Eigenschaften der Nebenströme nach deren kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung konnten nicht zwangsläufig aus der strukturellen Beschaffenheit einzelner Polysaccharide sowie der Ballaststoffzusammensetzung abgeleitet werden. So wiesen die beiden mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen eine nahezu identische chemische Beschaffenheit auf, während sie sich in ihren funktionellen Eigenschaften partiell unterschieden. Gleich verhielt es sich mit dem mechanisch-enzymatisch behandelten und dem enzymatisch behandelten Karottentrester. Die enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester K-em-1 und K-em-3 hingegen waren in ihren funktionellen Eigenschaften ähnlicher, als es beispielsweise die Unterschiede im Anteil der LBS und im Abbau einzelner Polysaccharide vermuten ließen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung zur Funktionalisierung von gemüsebasierten Nebenströmen vor deren Einbringung in Lebensmittel ein prinzipiell geeignetes Verfahren darstellt. Dieses ermöglicht es künftig im Sinne der Nachhaltigkeit funktionalisierte, gemüsebasierte Nebenströme als wertgebende Bestandteile zurück in die Lebensmittelwertschöpfungskette zu führen. Bei der Wahl der Bedingungen und der Reihenfolge der Behandlungen sollten nicht nur die zu erzielenden funktionellen Eigenschaften, sondern auch die dominierenden Zellwandpolysaccharide der Nebenströme sowie die Beschaffenheit der damit anzureichernden Lebensmittel berücksichtigt werden. Beispielsweise zeigte sich bei der Charakterisierung der Erbsenschale, dass zur Funktionalisierung von Nebenströmen mit einem hohen Anteil an Cellulose sehr hohe Intensitäten bei der mechanischen Behandlung erforderlich sind. Bei pektinreichen Nebenströmen wie dem Karottentrester hingegen kann zur Funktionalisierung eine rein enzymatische Behandlung ausreichend sein, sofern das entsprechend damit anzureichende Lebensmittel keine hohe physikalische Stabilität erfordert. Auch Yoon und Mitarbeitende (2005) schlagen zur Funktionalisierung von Karottentrester eine rein enzymatische Behandlung vor. Ein Verzicht auf die mechanische Behandlung bzw. die Minimierung der mechanischen Intensität ist aus wirtschaftlicher Sicht aufgrund des Einsparens von Energie und damit Kosten erstrebenswert.

In Summe erwies sich funktionalisierter Karottentrester als besser geeignet für den Zusatz zu Lebensmitteln als funktionalisierte Erbsenschale. Dies kann unter anderem auf einen geringeren Anteil an UBS und einen stärkeren Abbau der UBS im Zuge der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung des Karottentresters im Vergleich zur Erbsenschale zurückgeführt werden. Dennoch waren erste Einbringungsversuche beider enzymatisch-mechanisch behandelten Nebenströme in Joghurts bzw. Getränke sensorisch vielversprechend. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit ist es künftig möglich, andere geeignete Lebensmittel zur Ballaststoffanreicherung mit den charakterisierten kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströmen auszuwählen. Außerdem tragen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu bei, auf Grundlage der dominierenden Zellwandpolysaccharide die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung effektiv auf andere gemüse- oder auch obstbasierte Nebenströme zu übertragen und geeignete Einsatzgebiete zu identifizieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der industriellen Verarbeitung von Gemüse fallen große Mengen an Nebenströmen an, welche häufig einen hohen Ballaststoffgehalt aufweisen. Diese Ballaststoffe bestehen überwiegend aus Polysacchariden der pflanzlichen Zellwand. Das Einbringen der Nebenströme in andere Lebensmittel ist nicht nur nachhaltig, sondern auch aus ernährungsphysiologischer Sicht erstrebenswert, da sich Ballaststoffe beispielsweise aufgrund ihrer präbiotischen Eigenschaften positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken können. Jedoch ist die Ballaststoffanreicherung von Lebensmitteln ohne eine Veränderung derer sensorischen Eigenschaften oft nur begrenzt möglich. Grund dafür ist unter anderem die Eigenschaft von Ballaststoffen, Gele bzw. viskose Lösungen zu bilden. Durch eine kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung ballaststoffreicher Nebenströme ist es möglich, diese gezielt für den Einsatz im Lebensmittel zu funktionalisieren. Dabei ist es erforderlich, die Bedingungen der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung auf die Beschaffenheit sowie die dominierenden Zellwandpolysaccharide eines jeden Nebenstroms abzustimmen. Es wird angenommen, dass Veränderungen in den funktionellen Eigenschaften der Nebenströme mit Veränderungen in den Ballaststoffgehalten und -strukturen einhergehen. Jedoch ist die Datenlage hierzu sehr lückenhaft, insbesondere in Bezug auf den Abbau von Polysacchariden im Zuge der Behandlung. Daher wurden in dieser Arbeit für die ballaststoffreichen, chemisch charakterisierten Nebenströme Erbsenschale und Karottentrester kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlungen zur gezielten Funktionalisierung optimiert und die resultierenden Ballaststoffpräparate detailliert charakterisiert.

Die vollumfängliche Charakterisierung der Nebenströme war zum einen für eine gezielte Auswahl von Enzymen für die kombiniert mechanisch-enzymatische Behandlung erforderlich. Zum anderen war es somit möglich, Veränderungen in der Beschaffenheit der Nebenströme im Zuge einer kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung zu erkennen. Die Erbsenschale bestand zu 76 % und der Karottentrester zu 60 % aus Ballaststoffen, wovon 90 % bzw. 75 % unlösliche Ballaststoffe (UBS) waren. Die Polysaccharide der Erbsenschale setzten sich vor allem aus Cellulose, gefolgt von (Glucurono-)Xylanen, Xyloglucanen, vorrangig linear aufgebauten Arabinanen, niedrigveresterten Homogalacturonanen und geringen Mengen an Mannanen zusammen. Auch im Karottentrester überwog Cellulose neben partiell substituierten Arabinanen, (Arabino-)Galactanen und hochveresterten Homogalacturonanen. Die Anteile an Xyloglucanen, (Glucurono-)Xylanen und Mannanen waren im Karottentrester gering. Entsprechend der dominierenden Zellwandpolysaccharide wurden zur enzymatischen Behandlung der Erbsenschale Arabinanase, Cellulase, Polygalacturonanase und/oder Xylanase und zur Behandlung des Karottentresters Arabinanase, Cellulase, Galactanase, Pektinlyase und/oder Polygalacturonanase zugesetzt.

Um den enzymatischen Abbau der Zellwandpolysaccharide der Nebenströme im Zuge der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung besser zu verstehen, war neben der Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide die Analyse der Aktivitäten der eingesetzten Enzyme sowie die Überprüfung der Effektivität der durchgeföhrten Hitzeinaktivierung notwendig. Die Versuchs-

ansätze zur enzymatisch-mechanischen Behandlung der Nebenströme zeigten, dass eine unzureichende Inaktivierung der Arabinanase- und Xylanaseaktivitäten zu einem nicht kontrollierbaren weitgehenden Abbau der enzymatisch zugänglichen Arabinane und (Glucurono-)Xylane führte. Zudem war es wegen der Enzymnebenaktivitäten nicht ohne weiteres möglich, Rückschlüsse zwischen veränderten Ballaststoffzusammensetzungen, Polysaccharidstrukturen und funktionellen Eigenschaften der Nebenströme nach deren kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung und den einzelnen zugesetzten Enzymen zu ziehen.

Zur detaillierten Charakterisierung der kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströme kamen verschiedene analytische Methoden zum Einsatz, welche zuvor entwickelt, optimiert und/oder auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft wurden. Die Bestimmung der Ballaststoffanteile getrennt nach UBS, löslichen Ballaststoffen (LBS) und niedermolekularen, löslichen Ballaststoffen (NLBS) erfolgte nach der offizielle Methode der *Association of Analytical Chemists* (AOAC). Hierbei basiert die Bestimmung der NLBS auf der Analyse mittels Größenausschlusschromatographie in Referenz zur Elution von Maltose und Maltotriose. Im Rahmen der Überprüfung dieser AOAC-Methode konnte gezeigt werden, dass methodisch bedingt manche Oligosaccharide wie Galacturonsäureoligosaccharide (Verlust bei Entsalzung) oder Xylo- und Arabinotriose (Coelution mit Maltose) (partiell) nicht als NLBS erfasst werden. Folglich erwies sich die AOAC-Methode aufgrund der Unterbestimmung des Anteils an NLBS als fehlerbehaftet für oligosaccharidhaltige Präparate wie die kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströme.

Die kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlungen der Nebenströme können beim Einsatz einer Pektinlyase zur Bildung von ungesättigten Galacturonsäureoligosacchariden (uGalA-OS) führen. Zu deren Analyse wurde eine Profilingmethode mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarraydetektor entwickelt und validiert. Hierzu wurden zunächst zwölf uGalA-OS als Standardsubstanzen isoliert und charakterisiert. Die entwickelte Profilingmethode ermöglicht die Quantifizierung von uGalA-OS mit einem Polymerisierungsgrad von zwei bis dreizehn über in dieser Arbeit ermittelte relative Responsefaktoren. Zusätzlich ist mittels Massenspektrometrie die Analyse der uGalA-OS hinsichtlich ihrer Anzahl an Methylestern möglich. Mit der entwickelten Profilingmethode konnten in dieser Arbeit im (mechanisch-)enzymatisch behandelten Karottentrester uGalA-OS bis zu einem Polymerisierungsgrad von zwölf nachgewiesen, partiell quantifiziert und deren Methylester identifiziert werden.

Ausgehend von den Ergebnissen der Charakterisierung der kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströme konnten beobachtete Veränderungen in der Beschaffenheit der Nebenströme mit den verschiedenen Behandlungen in Bezug gebracht werden. So war unabhängig von der Reihenfolge der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlung der Nebenströme die enzymatische Behandlung zur Reduktion des Anteils an UBS durch den Abbau von Arabinanen, (Arabino-)Galactanen, Cellulose, Homogalacturonanen und/oder (Glucurono-)Xylanen vorrangig zu Mono-, Di- und Oligosacchariden maßgeblich. Für eine verbesserte Funktionalität der Nebenströme durch Bildung physikalisch stabiler Suspensionen in Folge kleinerer Partikel war die mechanische Behandlung unverzichtbar. Ein weitgehender enzymatischer Abbau

der UBS war insbesondere in der Erbsenschale aufgrund des hohen Anteils an Cellulose limitiert. Auch eine vorherige mechanische Lockerung der Zellwandstrukturen war nicht zielführend. Die kombiniert mechanisch-enzymatische sowie die enzymatische Behandlung des Karottentresters waren prinzipiell für eine Erhöhung der Anteile an LBS und/oder NLBS in diesem Nebenstrom geeignet. Für eine Verschiebung von UBS zu LBS und NLBS war eine enzymatische Behandlung des Karottentresters ausreichend. Der Anteil freigesetzter Oligosaccharide war unabhängig von der Reihenfolge der kombiniert mechanisch-enzymatischen Behandlungen des Karottentresters gering und niedriger als in den behandelten Erbsenschalen. Hinsichtlich der freigesetzten Oligosaccharide dominierten in beiden kombiniert mechanisch-enzymatisch behandelten Nebenströmen Tri- und Tetraosen. Weiter waren die enzymatisch-mechanisch und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen hinsichtlich der Ballaststoffanteile und -strukturen vergleichbar. In Summe erwies sich funktionalisierter Karottentrester, unter anderem aufgrund eines deutlich geringeren Anteils an UBS und einem stärkeren Abbau dieser, im Vergleich zu funktionalisierter Erbsenschale für die Einbringung in Lebensmittel als geeigneter.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, das Potential anderer gemüsebasierter Nebenströme auf Grundlage der dominierenden Zellwandpolysaccharide für die Einbringung in Lebensmittel nach Funktionalisierung mittels kombiniert mechanisch-enzymatischer Behandlung einzuschätzen und eine entsprechende Behandlung effektiv anzupassen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad, M.; Wani, T. A.; Wani, S. M.; Masoodi, F. A. & Gani, A. (2016): Incorporation of carrot pomace powder in wheat flour: Effect on flour, dough and cookie characteristics. *Journal of Food Science and Technology*, 53 (10): 3715 - 3724.

Albersheim, P.; Devins, D. J.; English, P. D. & Karr, A. (1967): A method for the analysis of sugar in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 5: 340 - 345.

Babbar, N.; Dejonghe, W.; Gatti, M.; Sforza, S. & Elst, K. (2016): Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: Production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (4): 594 - 606.

Bastawde, K. B. (1992): Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 (4): 353 - 368.

Beck, S. (2022): Isolierung und Charakterisierung von (Glucurono-)Xylooligosacchariden. Masterarbeit: Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie, Schmidt, R. E. & Bunzel, M.

Bédouet, L.; Courtois, B. & Courtois, J. (2003): Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts. *Carbohydrate Research*, 338 (4): 379 - 383.

Bellur Nagarajaiah, S. & Prakash, J. (2015): Nutritional composition, acceptability, and shelf stability of carrot pomace-incorporated cookies with special reference to total and β -carotene retention. *Cogent Food and Agriculture*, 1 (1): 1039886.

Bharti, S. K. & Roy, R. (2012): Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, 35: 5 - 26.

Biely, P.; Singh, S. & Puchart, V. (2016): Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34 (7): 1260 - 1274.

Bitter, T. & Muir, H. M. (1962): A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4 (4): 330 - 334.

Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R. J. & Stone, B. A. (1983): A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113: 291 - 299.

BLE (2022): Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Möhren - Produktinformation (3. Auflage). Bonn, Deutschland.

Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54 (2): 484 - 489.

BMEL (2023): Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft - Lebensmittelabfälle in Deutschland: Aktuelle Zahlen zur Höhe der Lebensmittelabfälle nach Sektoren (Zugriff am 24.05.2024).

BMEL (2024): Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft - Statistik. Bodennutzung und pflanzliche Erzeugung - Hülsenfrüchte (Zugriff am 24.05.2024).

Broxterman, S. E.; Picouet, P. & Schols, H. A. (2017): Acetylated pectins in raw and heat processed carrots. *Carbohydrate Polymers*, 177: 58 - 66.

Broxterman, S. E. & Schols, H. A. (2018): Interactions between pectin and cellulose in primary plant cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 192: 263 - 272.

Bunzel, M.; Ralph, J. & Steinhart, H. (2005): Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus L.*) dietary fiber. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49 (6): 551 - 559.

Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009): The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344 (14): 1879 - 1900.

Carle, R. & Schieber, A. (2006): Gewinnung funktioneller Lebensmittelinhaltstoffe aus Reststoffen der Karottensaft-und Apfelsaftproduktion. *Ernährungsumschau*, 53: 348 - 352.

Carlsson, N. G.; Karlsson, H. & Sandberg, A. S. (1992): Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (12): 2404 - 2412.

Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993): Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3 (1): 1 - 30.

CCRC (2007): Complex Carbohydrate Research Center, the CCRC spectral database for PMAA's. *University of Georgia; Athens, GA, USA*.

Chau, C.-F.; Chen, C.-H. & Lee, M.-H. (2004): Comparison of the characteristics, functional properties, and *in vitro* hypoglycemic effects of various carrot insoluble fiber-rich fractions. *LWT - Food Science and Technology*, 37 (2): 155 - 160.

Chen, J.; Gao, D.; Yang, L. & Gao, Y. (2013): Effect of microfluidization process on the functional properties of insoluble dietary fiber. *Food Research International*, 54 (2): 1821 - 1827.

Chen, J.; Liang, R.-H.; Liu, W.; Liu, C.-M.; Li, T.; Tu, Z.-C. & Wan, J. (2012): Degradation of high-methoxyl pectin by dynamic high pressure microfluidization and its mechanism. *Food Hydrocolloids*, 28 (1): 121 - 129.

Churms, S. C. (1996): Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromatography A*, 720 (1): 151 - 166.

Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984): A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131 (2): 209 - 217.

Codex Alimentarius (2015): Guidelines on nutrition labelling CAC/GL 2-1985. Joint FAO/WHO Food Standards Programm. *Secretariat of the Codex Alimentarius Commission, FAO: Rom, Italien*.

Food Chemical Codex (1972): National Academy of Science (2. Auflage). 579 - 580. Washington, D.C., USA.

Cole, R. B. (2000): Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35 (7): 763 - 772.

Collins, T.; Gerdau, C. & Feller, G. (2005): Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 29 (1): 3 - 23.

Corradini, C.; Cavazza, A. & Bignardi, C. (2012): High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012 (1): 1 - 13.

Cosgrove, D. & Jarvis, M. (2012): Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science*, 3: 1 - 6.

Dalbøge, H. (1997): Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 21 (1): 29 - 42.

Davison, P. K. & Young, R. (1969): Gas chromatography of carbohydrates - the quantitative determination of the free sugars of plants as their trimethylsilyl ethers. *Journal of Chromatography A*, 41: 12 - 21.

De Ruiter, G. A.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. & Rombouts, F. M. (1992): Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry*, 207 (1): 176 - 185.

De Vries, J. A.; Rombouts, F. M.; Voragen, A. G. J. & Pilnik, W. (1982): Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, 2 (1): 25 - 33.

DeVries, J. W. C., M. E.; Cho, S.; Craig, S.; Gordon, D.; Jones, J. M.; Li, B.; Lineback, D.; Proskey, L. & Tungland B. (2001): The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46 (3): 112 - 126.

DGE, ÖGE, SGE (2021): Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE). D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Bonn, Deutschland.

Dische, Z. (1947): A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 167 (1): 189 - 198.

Domon, B. & Costello, C. E. (1988): A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5 (4): 397 - 409.

EFSA. (2010): European Food Safety Authority. EFSA panel on dietetic products, nutrition, allergies. Scientific opinion on dietary reference values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal*, 8 (3): 1 - 77.

El-Aneef, A.; Cohen, A. & Banoub, J. (2009): Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44 (3): 210 - 230.

Elango, D.; Rajendran, K.; Van der Laan, L.; Sebastian, S.; Raigne, J.; Thaiparambil, N. A.; El Haddad, N.; Raja, B.; Wang, W.; Ferela, A.; Chiteri, K. O.; Thudi, M.; Varshney, R. K.; Chopra, S.; Singh, A. & Singh, A. K. (2022): Raffinose family oligosaccharides: Friend or foe for human and plant health? *Frontiers in Plant Science*, 13: 1 - 16.

Englyst, H. N.; Quigley, M. E. & Geoffrey, J. H. (1994): Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst*, 119: 1497 - 1509.

Fry, S. C. (1989): The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*, 40 (1): 1 - 11.

Fry, S. C.; York, W. S.; Albersheim, P.; Darvill, A.; Hayashi, T.; Joseleau, J.-P.; Kato, Y.; Lorences, E. P.; MacLachlan, G. A.; McNeil, M.; Mort, A. J.; Grant Reid, J. S.; Seitz, H. U.; Selvendran, R. R.; Voragen, A. G. J. & White, A. R. (1993): An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum*, 89 (1): 1 - 3.

Garna, H.; Mabon, N.; Nott, K.; Wathelet, B. & Paquot, M. (2006): Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*, 96 (3): 477 - 484.

Gilbert, H. J. & Hazlewood, G. P. (1993): Bacterial cellulases and xylanases. *Microbiology*, 139 (2): 187 - 194.

Gómez-Ordóñez, E.; Jiménez-Escríg, A. & Rupérez, P. (2012): Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Talanta*, 93: 153 - 159.

Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V. & Nudelman, A. (1997): NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal Organic Chemistry*, 62: 7512 - 7515.

Guo, X.; Chen, M.; Li, Y.; Dai, T.; Shuai, X.; Chen, J. & Liu, C. (2020): Modification of food macromolecules using dynamic high pressure microfluidization: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 100: 223 - 234.

Ha, M. A.; Apperley, D. C. & Jarvis, M. C. (1997): Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiology*, 115 (2): 593 - 598.

Haitz, V. (2024): Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide mechanisch-enzymatisch behandelter Erbsenschale. Masterarbeit: Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie, Schmidt, R. E. & Bunzel, M.

Harris, P. J. & Smith, B. G. (2006): Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (s2): 129 - 143.

- Hayashi, T. (1989): Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Biology*, 40 (1): 139 - 168.
- He, K.; Mergens, B.; Yatcilla, M.; Zheng, Q.; Bao, Z.; Zhang, Y.; Li, X. & Xie, Z. (2018): Molecular weight determination of aloe polysaccharides using size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detectors. *Journal of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*, 101 (6): 1729 - 1740.
- He, X.; Dai, T.; Sun, J.; Liang, R.; Liu, W.; Chen, M.; Chen, J. & Liu, C. (2022): Disintegrating the structure and improving the functionalities of pea fiber by industry-scale microfluidizer system. *Foods*, 11 (3): 1 - 14.
- Hemström, P. & Irgum, K. (2006): Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 29 (12): 1784 - 1821.
- Heyraud, A.; Gey, C.; Leonard, C.; Rochas, C.; Girond, S. & Kloareg, B. (1996): NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Halimeda tuberculata* alginate lyase. *Carbohydrate Research*, 289: 11 - 23.
- Holck, J.; Hjernø, K.; Lorentzen, A.; Vigsnæs, L. K.; Hemmingsen, L.; Licht, T. R.; Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. (2011): Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation. *Process Biochemistry*, 46 (5): 1039 - 1049.
- Holscher, H. D. (2017): Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8 (2): 172 - 184.
- Houben, K.; Jolie, R. P.; Fraeye, I.; Van Loey, A. M. & Hendrickx, M. E. (2011): Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346 (9): 1105 - 1111.
- Huisman, M. M. H.; Oosterveld, A. & Schols, H. A. (2004): Fast determination of the degree of methyl esterification of pectins by head-space GC. *Food Hydrocolloids*, 18 (4): 665 - 668.
- IUPAC. (1995): Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*, 67: 1307 - 1375.
- Jahn, M. (2008): Unternehmenspräsentation EMSLANDGROUP - UFOP-Perspektivforum in Magdeburg (Zugriff am 27.05.2024)
- Jansson, P.-E.; Kenne, L.; Liedgren, H.; Lindberg, B. & Lönnqvist, J. (1976): A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical communications*, 8: 1 - 74.
- Jayani, R. S.; Saxena, S. & Gupta, R. (2005): Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40 (9): 2931 - 2944.
- Ji, W.; Sheng, G.; Nan, X.; Wang, H.; Li, J. & Zhou, Q. (2023): Dynamic high-pressure microfluidization of pea dietary fiber: Modified structural and adsorption properties and interaction with chlorogenic acid. *Food and Bioprocess Technology*, 16 (11): 2611 - 2621.

Juturu, V. & Wu, J. C. (2014): Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33: 188 - 203.

Karplus, M. (1963): Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society (ACS)*, 85: 2870 - 2871.

Keegstra, K.; Talmadge, K. W.; Bauer, W. D. & Albersheim, P. (1973): The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, 51 (1): 188 - 197.

Kim, J. B. & Carpita, N. C. (1992): Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology*, 98 (2): 646 - 653.

Kintner Iii, P. K. & Van Buren, J. P. (1982): Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. *Journal of Food Science*, 47 (3): 756 - 759.

Kontogiorgos, V. (2020): Pectin: technological and physiological properties. *Springer; Cham, Schweiz*.

Kravtchenko, T. P.; Arnould, I.; Voragen, A. G. J. & Pilnik, W. (1992): Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 19 (4): 237 - 242.

Kumar, K. & Kumar, N. (2012): Development of vitamin and dietary fibre enriched carrot pomace and wheat flour based buns. *Journal of Pure and Applied Science and Technology*, 2 (1): 107 - 115.

Kurz, V. (2023): Charakterisierung struktureller Veränderungen der Zellwandpolysaccharide der Erbsenschale nach enzymatischer und mechanischer Behandlung. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Schmidt, R. E. & Bunzel, M.

Laine, C.; Tamminen, T.; Viikkula, A. & Vuorinen, T. (2002): Methylation analysis as a tool for structural analysis of wood polysaccharides. *Holzforschung*, 56 (6): 607 - 614.

Larrauri, J. A. (1999): New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Trends in Food Science and Technology*, 10 (1): 3 - 8.

Le Goff, A.; Renard, C. M. G. C.; Bonnin, E. & Thibault, J. F. (2001): Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*, 45 (4): 325 - 334.

Lee, Y. C. (1990): High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Analytical Biochemistry*, 189 (2): 151 - 162.

Leijdekkers, A. G. M.; Huang, J.-H.; Bakx, E. J.; Gruppen, H. & Schols, H. A. (2015): Identification of novel isomeric pectic oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography coupled to traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 404: 1 - 8.

Leijdekkers, A. G. M.; Sanders, M. G.; Schols, H. A. & Gruppen, H. (2011): Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1218 (51): 9227 - 9235.

Leroux, J.; Langendorff, V.; Schick, G.; Vaishnav, V. & Mazoyer, J. (2003): Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17 (4): 455 - 462.

Levigne, S.; Thomas, M.; Ralet, M. C.; Quemener, B. & Thibault, J. F. (2002): Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids*, 16 (6): 547 - 550.

Li, K.; Azadi, P.; Collins, R.; Tolan, J.; Kim, J. S. & Eriksson, K. E. L. (2000): Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (1): 89 - 94.

Li, Y.; Deng, L.; Dai, T.; Li, Y.; Chen, J.; Liu, W. & Liu, C. (2022): Microfluidization: A promising food processing technology and its challenges in industrial application. *Food Control*, 137: 1 - 13.

Liu, X.; Hu, K. K. Y. & Haritos, V. S. (2024): Enzymatic production of cello-oligosaccharides with potential human prebiotic activity and release of polyphenols from grape marc. *Food Chemistry*, 435: 1 - 10.

Luzio, G. A. & Cameron, R. G. (2013): Determination of degree of methylation of food pectins by chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (10): 2463 - 2469.

Mariotti, F.; Tomé, D. & Mirand, P. P. (2008): Converting nitrogen into protein - beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48 (2): 177 - 184.

Marshall, W. L. & Franck, E. U. (1981): Ion product of water substance, 0 – 1000 °C, 1 – 10,000 bars: New international formulation and its background. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 10 (2): 295 - 304.

Martínez-Monteagudo, S. I.; Yan, B. & Balasubramaniam, V. M. (2017): Engineering Process Characterization of High-Pressure Homogenization - from Laboratory to Industrial Scale. *Food Engineering Reviews*, 9 (3): 143-169.

Matissek, R. & Fischer, M. (2021): Lebensmittelanalytik (7. Auflage). Springer Spektrum; Berlin.

Max-Rubner-Institut (2008): Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel. Nationale Verzehrs Studie II, Ergebnisbericht. Karlsruhe, Deutschland.

McCleary, B. V.; Collaborators; Ames, N.; Cox, J.; lilians, S.; Jin, Y.; Johnson, M.; McCarthy, S.; McKie, V.; Nishibata, T.; Pastell, H.; Plank, D.; Salman, H.; Sanders, P.; Santi, A.; Steegmans, M. & Yoshida, M. (2019): Total dietary fiber (CODEX definition) in foods and food ingredients by a rapid enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study, first action 2017.16. *Journal of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*, 102 (1): 196 - 207.

McCleary, B. V.; De Vries, J. W.; Rader, J. I.; Cohen, G.; Prosky, L.; Mugford, D. C.; Champ, M.; Okuma, K. & Collaborators. (2010): Determination of total dietary fiber (CODEX Definition) by

enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 93 (1): 221-233.

McCleary, B. V.; Sloane, N. & Draga, A. (2015): Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates *in vivo* digestion. *Starch - Stärke*, 67 (9 - 10): 860 - 883.

McCleary, B. V.; Sloane, N.; Draga, A. & Lazewska, I. (2013): Measurement of total dietary fiber using AOAC method 2009.01 (AACC International Approved Method 32-45.01): Evaluation and updates. *Cereal Chemistry*, 90 (4): 396 - 414.

McDougall, G. J.; Morrison, I. M.; Stewart, D. & Hillman, J. R. (1996): Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70: 133 - 150.

Morales-Medina, R.; Dong, D.; Schalow, S. & Drusch, S. (2020): Impact of microfluidization on the microstructure and functional properties of pea hull fibre. *Food Hydrocolloids*, 103: 1 - 10.

Morales-Medina, R.; Manthei, A. & Drusch, S. (2024): Enzymatic pre-treatment defines the water-binding and rheological properties of dynamic ultra-high-pressure homogenised pea hull suspensions. *Food Hydrocolloids*, 157: 110454.

Müller-Maatsch, J.; Caligiani, A.; Tedeschi, T.; Elst, K. & Sforza, S. (2014): Simple and validated quantitative ¹H NMR method for the determination of methylation, acetylation, and feruloylation degree of pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (37): 9081 - 9087.

Mussatto, S. I. M., Ismael M. (2007): Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68 (3): 587 - 597.

Nangia-Makker, P.; Hogan, V.; Honjo, Y.; Baccarini, S.; Tait, L.; Bresalier, R. & Raz, A. (2002): Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 94 (24): 1854 - 1862.

Nieto-Dominguez, M.; de Eugenio, L. I.; York-Duran, M. J.; Rodriguez-Colinas, B.; Plou, F. J.; Chenoll, E.; Pardo, E.; Codoner, F. & Jesus Martinez, M. (2017): Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chemistry*, 232: 105 - 113.

O'Sullivan, A. C. (1997): Cellulose: The structure slowly unravels. *Cellulose*, 4 (3): 173 - 207.

Olano-Martin, E.; Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (2002): Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93 (3): 505 - 511.

Ozturk, O. K. & Turasan, H. (2022): Latest developments in the applications of microfluidization to modify the structure of macromolecules leading to improved physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (16): 4481 - 4503.

Paskach, T. J.; Lieker, H.-P.; Reilly, P. J. & Thielecke, K. (1991): High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydrate Research*, 215 (1): 1 - 14.

Payne, C. M.; Knott, B. C.; Mayes, H. B.; Hansson, H.; Himmel, M. E.; Sandgren, M.; Ståhlberg, J. & Beckham, G. T. (2015): Fungal cellulases. *Chemical Reviews*, 115 (3): 1308 - 1448.

Pérez García, M.; Zhang, Y.; Hayes, J.; Salazar, A.; Zabotina, O. A. & Hong, M. (2011): Structure and interactions of plant cell wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry*, 50 (6): 989 - 1000.

Pettolino, F. A.; Walsh, C.; Fincher, G. B. & Bacic, A. (2012): Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, 7 (9): 1590 - 1607.

Prandi, B.; Baldassarre, S.; Babbar, N.; Bancalari, E.; Vandezande, P.; Hermans, D.; Bruggeman, G.; Gatti, M.; Elst, K. & Sforza, S. (2018): Pectin oligosaccharides from sugar beet pulp: Molecular characterization and potential prebiotic activity. *Food and Function*, 9 (3): 1557 - 1569.

Prosky, L.; Asp, N. G.; Furda, I.; deVries, J. W.; Schweizer, T. F. & Harland, B. F. (1985): Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*, 68 (4): 677 - 679.

Prosky, L.; Asp, N. G.; Schweizer, T. F.; deVries, J. W.; Furda, I. & Lee, S. C. (1994): Determination of soluble dietary fiber in foods and food products - collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*, 77 (3): 690-694.

Puls, J. (1997): Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia*, 120: 183 - 196.

Raees-ul, H. & Prasad, K. (2015): Nutritional and processing aspects of carrot (*Daucus carota*) - A review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment*, 1 (1): 1 - 14.

Ralet, M.-C.; André-Leroux, G.; Quéméner, B. & Thibault, J.-F. (2005): Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry*, 66 (24): 2800 - 2814.

Ralet, M.-C.; Saulnier, L. & Thibault, J. F. (1993): Raw and extruded fibre from pea hulls. Part II: Structural study of the water-soluble polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 20 (1): 25 - 34.

Ralet, M.-C.; Williams, M. A. K.; Tanhatan-Nasser, A.; Ropartz, D.; Quéméner, B. & Bonnin, E. (2012): Innovative enzymatic approach to resolve homogalacturonans based on their methylesterification pattern. *Biomacromolecules*, 13 (5): 1615 - 1624.

Rashmi, R. & Siddalingamurthy, K. R. (2018): Microbial xyloglucanases: A comprehensive review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36 (4): 280 - 295.

Renard, C. M. G. C.; Weightman, R. M. & Thibault, J. F. (1997): The xylose-rich pectins from pea hulls. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21 (1): 155 - 162.

Rovai, D.; Ortgies, M.; Amin, S.; Kuwahara, S.; Schwartz, G.; Lesnaukas, R.; Garza, J. & Lammert, A. (2021): Utilization of carrot pomace to grow mealworm Larvae (*Tenebrio molitor*). *Sustainability*, 13 (16): 1 - 15.

Rumpunen, K.; Thomas, M.; Badilas, N. & Thibault, J. F. (2002): Validation of a combined enzymatic and HPLC method for screening of pectins in fruits of Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*). *LWT - Food Science and Technology*, 35 (6): 490 - 496.

Saeman, J. F.; Bubl, J. L. & Harris, E. E. (1945): Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 17 (1): 35 - 37.

Saldanha do Carmo, C.; Silventoinen-Vejjalainen, P.; Zobel, H.; Holopainen-Mantila, U.; Sahlstrøm, S. & Knutsen, S. H. (2022): The effect of dehulling of yellow peas and faba beans on the distribution of carbohydrates upon dry fractionation. *LWT - Food Science and Technology*, 163: 1 - 9.

Sankaran, A. K.; Nijssse, J.; Bialek, L.; Bouwens, L.; Hendrickx, M. E. & Van Loey, A. M. (2015): Effect of enzyme homogenization on the physical properties of carrot cell wall suspensions. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (6): 1377 - 1385.

Sassaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Souza, L. M.; Czelusniak, P. A. & Iacomini, M. (2005): Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340 (4): 731 - 739.

Savary, B. J. & Nuñez, A. (2003): Gas chromatography–mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 1017 (1): 151 - 159.

Schäfer, D. S. (2024): Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Analyse von Oligosacchariden in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel. Dissertation: Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie, Bunzel, M.

Scheller, H. V. & Ulvskov, P. (2010): Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61 (1): 263 - 289.

Schweizer, T. F. & Würsch, P. (1991): The physiological and nutritional importance of dietary fibre. *Experientia*, 47 (2): 181 - 186.

Simmons, T. J.; Mortimer, J. C.; Bernardinelli, O. D.; Pöppler, A.-C.; Brown, S. P.; deAzevedo, E. R.; Dupree, R. & Dupree, P. (2016): Folding of xylan onto cellulose fibrils in plant cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature Communications*, 7 (1): 1 - 9.

Sims, I. M.; Carnachan, S. M.; Bell, T. J. & Hinkley, S. F. R. (2018): Methylation analysis of polysaccharides: Technical advice. *Carbohydrate Polymers*, 188: 1 - 7.

Singh, R. S.; Singh, T. & Pandey, A. (2019): Chapter 1 - microbial enzymes - an overview. In Singh, R. S.; Singhania, R. R.; Pandey, A. & Larroche, C. (Eds.): *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, Amsterdam, Niederlande, 1 - 40.

Sinitsya, A.; Copiková, J. & Pavliková, H. (1998): ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy in the analysis of pectins. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 17 (2): 279 - 292.

- Slavin, J. (2013): Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5 (4): 1417 - 1435.
- Statistisches Bundesamt (2015): Produktionsmenge von anderen Frucht- und Gemüsesäften in Deutschland nach Produktgruppen in den Jahren 2008 bis 2014. (in 1.000 Liter, Zugriff am 27.05.2024), Statista.
- Steck, J.; Kaufhold, L. & Bunzel, M. (2021): Structural profiling of xyloglucans from food plants by high-performance anion-exchange chromatography with parallel pulsed amperometric and mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (31): 8838 - 8849.
- Svanberg, S. M.; Gustafsson, K. B.; Suortti, T. & Nyman, E. M. G.-L. (1995): Molecular weight distribution, measured by HPSEC, and viscosity of water-soluble dietary fiber in carrots following different types of processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (10): 2692 - 2697.
- Sweet, D. P.; Shapiro, R. H. & Albersheim, P. (1975): Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research*, 40 (2): 217 - 225.
- Talbott, L. D. & Ray, P. M. (1992): Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides - implications for models of primary wall structure. *Plant Physiology*, 98 (1): 357 - 368.
- Teeri, T. T. (1997): Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15 (5): 160 - 167.
- Theander, O.; Aman, P.; Westerlund, E.; Andersson, R. & Pettersson, D. (1995): Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (the Uppsala method): Collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International*, 78 (4): 1030 - 1044.
- Trabert, A.; Schmid, V.; Keller, J.; Emin, M. A. & Bunzel, M. (2022): Chemical composition and technofunctional properties of carrot (*Daucus carota L.*) pomace and potato (*Solanum tuberosum L.*) pulp as affected by thermomechanical treatment. *European Food Research and Technology*, 248 (10): 2451 - 2470.
- Turksoy, S. & Özkaya, B. (2011): Pumpkin and carrot pomace powders as a source of dietary fiber and their effects on the mixing properties of wheat flour dough and cookie quality. *Food Science and Technology Research*, 17 (6): 545 - 553.
- Urbat, F.; Müller, P.; Hildebrand, A.; Wefers, D. & Bunzel, M. (2019): Comparison and optimization of different protein nitrogen quantitation and residual protein characterization methods in dietary fiber preparations. *Frontiers in Nutrition*, 6: 1 - 8.
- van Alebeek, G.-J. W. M.; Christensen, T. M. I. E.; Schols, H. A.; Mikkelsen, J. D. & Voragen, A. G. J. (2002): Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (29): 25929 - 25936.
- VdF (2013): Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie. Tomate und Möhre sind der Deutschen liebste Gemüsesäfte (Zugriff am 27.05.2024).

Vincken, J.-P.; Schols, H. A.; Oomen, R. J. F. J.; McCann, M. C.; Ulvskov, P.; Voragen, A. G. J. & Visser, R. G. F. (2003): If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132 (4): 1781 - 1789.

Vincken, J.-P.; York, W. S.; Beldman, G. & Voragen, A. G. J. (1997): Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiology*, 114 (1): 9 - 13.

VO (EG) 1924/2006: Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel, zuletzt geändert am 13.12.2014 (ABl. Nr. L 404, S. 9).

VO (EU) 432/2012: Verordnung (EU) Nr. 432/2012 der Kommission vom 16. Mai 2012 zur Festlegung einer Liste zulässiger anderer gesundheitsbezogener Angaben über Lebensmittel als Angaben über die Reduzierung eines Krankheitsrisikos sowie die Entwicklung und die Gesundheit von Kindern, zuletzt geändert am 17.05.2021 (ABl. Nr. L 136 S. 1-40).

VO (EU) 1169/2011: Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission Text von Bedeutung für den EWR, zuletzt geändert am 01.01.2018 (ABl. Nr. L 304, S. 18-63).

Vogel, J. (2008): Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 301 - 307.

Voragen, A. G. J.; Coenen, G.-J.; Verhoef, R. P. & Schols, H. A. (2009): Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20 (2): 263 - 275.

Voragen, A. G. J.; Schols, H. A. & Pilnik, W. (1986): Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Food Hydrocolloids*, 1 (1): 65 - 70.

Wefers, D. & Bunzel, M. (2016a): Arabinan and galactan oligosaccharide profiling by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (22): 4656 - 4664.

Wefers, D. & Bunzel, M. (2016b): NMR spectroscopic profiling of arabinan and galactan structural elements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (50): 9559 - 9568.

Wefers, D.; Tyl, C. E. & Bunzel, M. (2014): Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Frontiers in Chemistry*, 2 (100): 1 - 9.

Westphal, Y.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. & Gruppen, H. (2010): Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. *Journal of Chromatography A*, 1217 (5): 689 - 695.

Willför, S.; Pranovich, A.; Tamminen, T.; Puls, J.; Laine, C.; Suurnäkki, A.; Saake, B.; Uotila, K.; Simolin, H.; Hemming, J. & Holmbom, B. (2009): Carbohydrate analysis of plant materials with

uronic acid-containing polysaccharides - a comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products*, 29 (2): 571 - 580.

Wührer, M.; de Boer, A. R. & Deelder, A. M. (2009): Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 28 (2): 192 - 206.

Xu, H.; Jiao, Q.; Yuan, F. & Gao, Y. (2015): *In vitro* binding capacities and physicochemical properties of soluble fiber prepared by microfluidization pretreatment and cellulase hydrolysis of peach pomace. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (1): 677 - 684.

Yoon, K. Y.; Cha, M.; Shin, S. R. & Kim, K. S. (2005): Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition. *Food Chemistry*, 92 (1): 151 - 157.

Zamil, M. S. & Geitmann, A. (2017): The middle lamella - more than a glue. *Physical Biology*, 14 (1): 1 - 11.

Zhang, B.; Gao, Y.; Zhang, L. & Zhou, Y. (2021): The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63 (1): 251 - 272.

Zykwinska, A. W.; Ralet, M.-C. J.; Garnier, C. D. & Thibault, J.-F. o. J. (2005): Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology*, 139 (1): 397 - 407.

7 CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE

7.1 CHEMIKALIEN

CHEMIKALIE	HERSTELLER	REINHEIT	GHS-PIKTOGRAMM	H-SÄTZE	P-SÄTZE
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich	≥ 99 %	05, 06	302, 311, 314	280, 301 + 312 + 330, 301 + 330 + 331, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338
3-Phenylphenol	Sigma-Aldrich	1	07	315, 319, 335	261, 305 + 351 + 338
Aceton	VWR	≥ 99,8 %	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305 + 351 + 338
Acetonitril	VWR	LC-MS grade	02, 07	225, 302 + 312 + 332, 319	210, 240, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 403 + 233
Amberlite FFA53 (OH-)	Megazyme	-	-	-	-
Ambersep 200 (H+)	Megazyme	-	-	-	-
Ameisensäure	Merck	98 - 100 %	02, 05, 06	226, 302, 314, 331	210, 280, 301 + 330 + 31, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310
Ammoniak	Sigma-Aldrich	25 %	05, 07, 09	314, 335, 410	261, 271, 273, 280, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich	99,9 %	07	302, 319	264, 270, 280, 301 + 312, 305 + 351 + 338, 337 + 313
Ammoniumformiat	VWR	≥ 99 %	07	315, 319, 335	280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 311
Celite 545	Carl Roth	-	-	-	-
Deuteriumoxid	Deutero	99,9 %	-	-	-
Dichlormethan	VWR	≥ 99,5 %	07, 08	315, 319, 351, 336	201, 280, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 311
Dimethylsulfoxid	Carl Roth	≥ 99,5 %	-	-	-
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck	≥ 99 %	-	-	-
Dinatriumtetraborat	Carl Roth	≥ 99 %	07, 08	319, 360FD	201, 308 + 313
Essigsäure	Sigma-Aldrich	≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 233, 240, 280, 303 + 361 + 353, 305 + 351 + 338
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	≥ 99 %	02, 06, 05	226, 302, 314, 330	310, 280, 301 + 330 + 331, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310
Ethanol, vergällt	VWR	99 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305 + 351 + 338, 403 + 233
Kjeldahl-Tabletten (Wieninger-Katalysator)	Fluka	-	-	412	273, 501

Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich	$\geq 99,9\%$	07	302, 315, 319	264, 270, 280, 301 + 312, 302 + 352, 305 + 351 + 338	
Methanolische Salzsäure	Sigma-Aldrich	1,25 M	02, 06, 08, 05	225, 290, 301 + 311 + 331, 370	210, 233, 280, 301 + 310, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 311	
Methyliodid	VWR	$\geq 99\%$		312, 315, 335, 351, 301 + 331	201, 280, 301 + 310, 302 + 352, 304 + 340, 311	
Natrium-3-trimethylsilyl-propionat-2,2,3,3-d ₄	Sigma-Aldrich	$\geq 98\%$ D	-	-	-	
Natriumacetat	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$	-	-	-	
Natriumbordeuterid	Carl Roth	$\geq 98\%$ D	02, 05, 06, 08	260, 301, 314, 360FD	280, 301 + 330 + 331, 302 + 352, 305 + 351 + 338, 310, 402 + 404	
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	VWR	p. a.	-	-	-	
Natriumhydroxid	Carl Roth	$\geq 99\%$	05	290, 314	280, 301 + 330 + 331, 305 + 351 + 338, 308 + 310	
Natriumnitrat	Merck	$\geq 99,5\%$	03, 07	272, 319	220, 305 + 351 + 338	
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$	07, 08	319, 360FD	201, 308 + 313	
Natriumthiosulfat	Carl Roth	$\geq 99\%$	-	-	-	
Natronlauge	Merck	49 - 51 %	05	290, 314	280, 301 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338, 363	
Salzsäure	Merck	37 %	05, 07	290, 314, 335	260, 280, 301 + 330 + 331, 302 + 352, 304 + 340, 305 + 351 + 338, 308 + 310	
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich	95 - 98 %	05	290, 314	234, 280, 301 + 330 + 331, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	$\geq 99\%$	05, 07	314, 332, 412	261, 280, 303 + 361 + 353, 304 + 340 + 310, 305 + 351 + 338	
GHS02	GHS03	GHS05	GHS06	GHS07	GHS08	GHS09
Entzündlich	Brandfördernd	Ätzend	Giftig	Gesundheits-schädlich	Systemische Gesundheits-gefährdung	Umwelt-gefährlich

7.2 STANDARDSUBSTANZEN

GRUPPE	SUBSTANZ	KURZ-BEZEICHNUNG	HERSTELLER	REINHEIT
Interne Standardsubstanzen	2-desoxy-D-Glucose	2-d-Glc	Sigma	> 99 %
	Acarbose	Aca	Sigma-Aldrich	≥ 95 %
	Glycerin (wasserfrei)	Gly	Carl Roth	≥ 99,5%
	Isomaltotriose	IMT	Sigma-Aldrich	Analytical Standard
	Lactulose	Lac	Sigma	≥ 98 %
	Melezitose	Mel	Supelco	Analytical Standard
Monosaccharide	D-Fructose	Frc	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	D-Galacturonsäure Monohydrat	GalA	Fluka	≥ 97 %
	D-Galactose	Gal	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	D-Glucose	Glc	Sigma-Aldrich	≥ 99,5 %
	D-Glucuronsäure	GlcA	Sigma-Aldrich	≥ 98 %
	D-Mannose	Man	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	D-Xylose	Xyl	Sigma-Aldrich	≥ 99,9 %
	L-Arabinose	Ara	Sigma-Aldrich	> 99 %
	L-Fucose	Fuc	Alfa Aesar	99 %
	L-Rhamnose	Rha	Sigma-Aldrich	> 99 %
Arabino-oligosaccharide	A ₂	Megazyme	> 95 %	
	Arabinobiosen	A-2a	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		A-2b		-
	A ₃	Megazyme	> 95 %	
	Arabinotriosen	A-3a	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		A-3b		-
		A-3c		-
	A ₄	Megazyme	> 95 %	
	Arabinotetraosen	A-4a	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		A-4b		-
	A ₅	Megazyme	> 90 %	
	Arabinopentaosen	A-5a		-
		A-5b	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		A-5c		-
		A-5d		-
Cello-oligosaccharide	A ₆	Megazyme	> 88 %	
	Arabinohexaosen	A-6a	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		A-6b		-
	A ₇ a	Megazyme		-
	Arabinoheptaosen	A-7a	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		A-7b		-
Galacto-oligosaccharide	Cellobiose	C ₂	Carl Roth	≥ 98 %
	Cellotriose	C ₃	Megazyme	> 95 %
	Cellotetraose	C ₄	Megazyme	> 90 %
	Cellopentaose	C ₅	Megazyme	> 95 %
	Cellobhexaose	C ₆	Megazyme	> 95 %
	G ₂	Sigma-Aldrich	≥ 90 %	
	Galactobiosen	G-2a	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		G-2b		-
		G-2c		-
	G-3a		-	
	Galactotriosen	G-3b	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-
		G-3c		-
	G-4a		-	
	Galactotetraosen	R-40	isoliert von Wefers & Bunzel (2016)	-

Galacturonsäure-oligosaccharide	Digalacturonsäure	GalA ₂	Megazyme	> 95 %
	Trigalacturonsäure	GalA ₃	Megazyme	> 90 %
	Tetragalacturonsäure	GalA ₄	Megazyme	> 90 %
Malto-oligosaccharide	Maltose-Monohydrat	Mal ₂	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Maltotriose	Mal ₃	Sigma-Aldrich	≥ 90 %
	Maltotetraose	Mal ₄	Sigma-Aldrich	≥ 94 %
	Maltopentaose	Mal ₅	Sigma-Aldrich	≥ 95 %
Manno-oligosaccharide	Mannobiose	Man ₂	Megazyme	> 95 %
	Mannotriose	Man ₃	Megazyme	> 95 %
	Mannotetraose	Man ₄	Megazyme	> 95 %
	Mannopentaose	Man ₅	Megazyme	> 98 %
	Mannohexaose	Man ₆	Megazyme	> 95 %
Oligosaccharide der Raffinosefamilie	Saccharose	Sac	Carl Roth	≥ 99,5 %
	Raffinose Pentahydrat	Raf	Alfa Aesar	99 %
	Stachyose Hydrat	Sta	Biosynth Carbosynth	98 %
	Verbascose	Ver	Megazyme	> 95 %
Xylo-oligosaccharide	Xylobiose	X ₂	Megazyme	> 95 %
	Xylotriose	X ₃	Megazyme	> 90 %
	Xylotetraose	X ₄	Megazyme	> 95 %
	Xylopentaose	X ₅	Megazyme	> 95 %
	Xylohexaose	X ₆	Megazyme	> 95 %
	Arabinan (<i>Sugar Beet</i>)	-	Megazyme	~ 95 %
	Pectic Galactan (<i>Potato</i>)	-	Megazyme	≥ 90 %
Polysaccharide	Pektin Classic CU 201	-	Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG	-
	Pektin Classic CU 901	-	Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG	-
	Polygalacturonsäure (<i>Citrus Pectin</i>)	-	Megazyme	> 95 %
	Xylan (<i>Beechwood</i>)	-	Sigma	> 90 %
Standardsubstanzen für Molekulargewicht	Dextran (5 kDa)	-	Fluka Biochemica	Analytical Standard
	Dextran (12 kDa)	-	Fluka Biochemica	Analytical Standard
	Dextran (50 kDa)	-	Fluka Biochemica	Analytical Standard
	Dextran (150 kDa)	-	Sigma-Aldrich	Analytical Standard
	Dextran (670 kDa)	-	Fluka Biochemica	Analytical Standard

7.3 PUFFER, REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

AMMONIAKLÖSUNG (2 M)

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

AMYLOGLUCOSIDASE-LÖSUNG (9,5 mg/mL)

- › Lösen von 1,9 mg Amyloglucosidase (36.000 U/g, Fa. Megazyme) in 0,2 mL Reinstwasser
- › Rühren für 5 min
- › Ansetzen direkt vor Verwendung

GLYCERIN-LÖSUNG (100 mg/mL)

- › 2 g in 20 mL Wasser

Natriumnitratlösung (50 mM)

- › 4,249 g Natriumnitrat
- › 1 L Reinstwasser

Natriumthiosulfatlösung (0,1 M)

- › 3,95 g Natriumthiosulfat
- › 250 mL Reinstwasser

3-Phenylphenollösung (0,15 % in 0,5 % Natriumhydroxidlösung)

- › Lösen von 1 g Natriumhydroxid in 20 mL Reinstwasser für die 0,5 % Natriumhydroxidlösung
- › Lösen von 0,03 g 3-Phenylphenol in 20 mL 0,5 % Natriumhydroxidlösung

Phosphatpuffer (0,08 M)

- › 12,41 g Natriumhydrogenphosphat Dihydrat in 1 L Reinstwasser
- › 13,31 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1 L Reinstwasser
- › Vorlegen von Natriumhydrogenphosphat Dihydrat und Einstellen mit Dinatriumhydrogenphosphat auf pH = 6,0

Protease-Lösung (50 mg/mL)

- › Lösen von 3,9 mg Protease (9 U/mg, Fa. Megazyme) in 0,1 mL Reinstwasser
- › Ansetzen direkt vor Verwendung

Schwefelsäure-Natriumtetraboratlösung (12,5 mM)

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

TFA-Lösung (2 M)

- › Überführen von 15,4 mL in 100-mL-Messkolben
- › Auffüllen mit Reinstwasser

TMSP-Lösung

- › 25 mg Natrium-TMSP
- › 50 mL Deuteriumdioxid

7.4 ENZYME

ENZYM	HERKUNFT	EC-NUMMER	AKTIVITÄT	HERSTELLER
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	≥ 260 U/mL	Sigma-Aldrich
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	36.000 U/g	Megazyme
Arabinanase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
Cellulase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
<i>endo</i> -Arabinanase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.99	9 U/mg	Megazyme
<i>endo</i> -Galactanase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.89	408 U/mg	Megazyme
<i>endo</i> -Xyloglucanase	<i>Paenibacillus sp.</i>	3.2.1.151	69 U/mg	Megazyme
Galactanase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.2.1.26	≥ 300 U/mg	Sigma-Aldrich
Pektinlyase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
Polygalacturonanase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.4.21.14	9 U/mg	Megazyme
Protease (Alcalase 2.4 L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.4.21.62	2,4 U/g	Sigma
Xylanase			~ 100 - 200 ppm	kommerzielles Enzympräparat
α-Amylase (Termamyl 120 L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	≥ 500 U/mg Protein (Biuret)	Sigma-Aldrich
α-Amylase (thermostabil)	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	3.000 U/mL	Megazyme

7.5 INSTRUMENTE

7.5.1 VERWENDETE SÄULEN

GRUPPE	SÄULE	PARTIKEL- GRÖÙE	MÄBE (Länge x Innen- durchmesser)	HERSTELLER
GC	DB-225/DB-225 (MS)	0,25 µm	30 x 0,25 mm	Agilent Technologies
HPAEC	AminoTrap	6,5 µm	50 x 3 mm	Dionex™, ThermoFisher Scientific™
	CarboPac™ PA20	6 µm	150 x 3 mm	
	CarboPac™ PA200	6 µm	250 x 3 mm	
HPSEC	TSKgel G2500 PW _{XL} (2x)	17 µm	300 x 7,8 mm	Tosoh Bioscience
	TSKgel G4000 PW _{XL}	17 µm	300 x 7,8 mm	
	TSKgel G6000 PW _{XL}	17 µm	300 x 7,8 mm	
HPLC (präparativ)	XBridge BEH Amide	5 µm	250 x 10 mm	Waters Corporation
UHPLC (HILIC)	Acuity UPLC BEH Amide	1,7 µm	150 x 2,1 mm	Waters Corporation

7.5.2 ANALYSEGERÄTE

› GC-FID

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

› GC-MS

Hersteller: Shimadzu
 Bezeichnung: GC-2010 Plus
 Autosampler: AOC-20i Auto Injector
 Detektoren: GC-MS QP 2010 SE bzw. Ultra

› Hochdruckhomogenisator

Hersteller: GEA Niro Soavi
 Bezeichnung: Panda 2K

› HPAEC-PAD

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

› **HPAEC-PAD/MS**

Hersteller: Thermo Scientific™
Bezeichnung: Dionex™ ICS-6000 System
Pumpen: Dionex™ ICS-6000 SP (Eluent)
Dionex™ AXP (Regenerant)
Dionex™ AXP-MS (LiCl)
Autosampler: Dionex™ AS-AP
Detektoren (PAD/CD): Dionex™ ICS-6000 DC, Electrochemical Detector, Conductivity
Detector
Detektor (MS): ISQ IC Mass Spectrometer
Suppressor: Dionex™ AERS 500 (4 mm)

› **HPLC-UV (Fraktionierung uGalA-OS)**

Hersteller: Knauer
Pumpe (doppelt): AZURA P2.1L
Autosampler: Smartline Autosampler Optimas
UV-Detektor: AZURA UVD2.1L
Fraktionsventil: AZURA V2.1S

› **HPSEC-RI (NLBS-Bestimmung)**

Hersteller: Hitachi, Merck
Bezeichnung: LaChrom
Interface: D-7000
Pumpe: L-7100
Autosampler: L-7200
Detektor (RI): 2300 von Knauer

› **HPSEC-RI (Molekulargewichtsverteilung)**

Hersteller: Hitachi, Merck
Bezeichnung: LaChrom
Interface: D-7000
Pumpe: L-7100
Autosampler: L-7200
Detektor (RI): L-7490

› **Mikrofluidizer®**

Hersteller: Microfluidics Co.
Bezeichnung: LM20
Interaktionskammern: H30z aus Keramik (200 µm) und H10z aus Diamant (100 µm)

› **Mühlen**

Pulverisette 14 von Fritsch
Tube Mill control von IKA

› **NMR-Spektrometer**

Hersteller: Bruker
Bezeichnung: Ascend 500
Feldstärke: 500 MHz
Probenkopf: Prodigy, Kryoprobenkopf

› **Photometer**

Hersteller: Jasco
Bezeichnung: V-550 UV/Vis Spectrophotometer

› **UHPLC-PDA-MS (uGalA-OS)**

Hersteller: Shimadzu
Bezeichnung: Nexera X2
Kommunikationsmodul: CBM-20A
Pumpe: LC-30AD
Autosampler: SIL-30AC
Säulenofen: CTO-20AC
Detektor (PDA): SPD-M30A
Detektor (MS): LCMS 2020 mit ESI-Ionenquelle

› **UHPLC-MS (GalA-OS)**

Hersteller: Shimadzu
Bezeichnung: Nexera X2
Kommunikationsmodul: CBM-20A
Pumpe: LC-30AD
Autosampler: SIL-30AC
Säulenofen: CTO-20AC
Detektor (MS): LCMS 2020 mit ESI-Ionenquelle

8 ARBEITSVORSCHRIFTEN

8.1 AUSWAHL MECHANISCH-ENZYMATISCH HERGESTELLTER BALLASTSTOFFPRÄPARATE

8.1.1 SCREENING AUF MONO-, DI- UND OLIGOSACCHARIDE

- › Suspendieren von 5 mg gefriergetrocknetem und gemahlenem ($\leq 200 \mu\text{m}$) Ballaststoffpräparat in 1 mL Reinstwasser
- › Vortexen
- › Zentrifugieren für 5 min bei 13.200 rpm
- › Messung einer 1:5-Verdünnung mit Isomaltotriose (Endkonzentration: 10 μM) mittels HPAEC-PAD/MS
- › Kontrolle auf Eignung von Isomaltotriose als IStd durch Messung einer Verdünnung ohne Zusatz von Isomaltotriose

Bedingungen HPAEC-PAD/MS

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 μm ; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 μL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

Gradient

Tabelle V - 1: Gradientenprogramm zum Screening auf gebildete Mono-, Di- und Oligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
0,1	90,0	10,0	0,0
10,0	40,0	60,0	0,0
19,0	34,9	65,0	0,1
25,0	37,5	62,0	0,5
53,0	30,0	55,0	15,0
53,1	0,0	0,0	100,0
70,0	0,0	0,0	100,0

PAD-Detektion	mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (bei 20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)
MS-Detektion	elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser und anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor (bei 20 °C) Zuführung einer 0,5 mM Lithiumchlorid-Lösung (0,05 mL/min) zur Adduktbildung ESI im Positiv-Modus: <i>Full-Scan</i> (<i>m/z</i> : 150 - 850) und SIM (<i>m/z</i> : 511,4; 12 - 22 min)
Identifizierung	Standardlösungen (je 10 µM): 10 Monosaccharide (vgl. Versuchsvorschrift >), Malto- (DP = 2 - 5), Xylo- (DP = 1 - 6), Cello- (DP = 1 - 6) und Mannooligosaccharide (DP = 1 - 6), Saccharose und RFO (DP = 3 - 5), Haupt- und Nebenarabinane und -galactane (vgl. Wefers & Bunzel, 2016a)

8.1.2 MOLEKULARGEWEICHTSVERTEILUNG

- › Zentrifugieren der wässrigen Ballaststoffpräparate für 10 min bei 13.200 rpm
- › Messung des Überstands mittels HPSEC-RID
- › Herstellung einer eingewichtsprozentigen wässrigen Suspension und Messen des pH-Werts

Bedingungen HPSEC-RID

Säule	TSKgel G6000PW _{XL} und TSKgel G4000PW _{XL} in Reihe und mit Vorsäule: TSKgel PW _{XL} (12 µm, 40 x 6,0 mm)
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	50 µL
Fluss	0,5 mL/min
Gradient	isokratisch Eluent: 50 mM Natriumnitrat
Detektion	RID

8.2 ENZYMATISCH-MECHANISCHE BEHANDLUNG

Enzymatische Hydrolyse (Durchführung durch Dr. Rocío Medina-Morales, an der TU Berlin)

- › Herstellung einer eingewichtsprozentigen wässrigen Suspension und Messen des pH-Werts
- › Erhitzung der Suspension für 15 min im Wasserbad auf 50 °C
- › Zugabe der Enzymmischung (vgl. Tabelle A - 1) mit einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 5 % (1 g Enzym auf 20 g Substrat)
- › Hydrolyse für 30 min bei 50 °C
- › Inaktivierung der Enzyme für 10 min im Wasserbad bei 80 °C
- › Abkühlen im Eisbad auf 25 °C und Messen des pH-Werts

Mechanische Behandlung (Durchführung durch Dr. Rocío Medina-Morales, an der TU Berlin)

- › Mikrofluidisierung des abgekühlten enzymatischen Hydrolysats der Erbsenschale zuerst mit einer und dann mit zwei Interaktionskammern (Innendurchmesser 100 µm bzw. 200 µm) bei 1750 bar für 1 (200 µm) + 5 Durchläufe (200 µm+ 100 µm) bzw. des Karottentresters bei 500 bar für 1 Durchlauf (200 µm+ 100 µm)
- › Abkühlen der Proben im Eisbad nach jedem Durchlauf
- › Gefriertrocknen und Sendung nach Karlsruhe
- › Mahlen der Proben mit Pulverisette mit 0,5 mm Siebring

8.3 MECHANISCH-ENZYMATISCHE BEHANDLUNG

Mechanische Behandlung (Durchführung durch Dr. Medina-Rocío Morales, M. an der TU Berlin)

- › Herstellung einer eingewichtsprozentigen wässrigen Suspension und Messen des pH-Werts
- › Mikrofluidisierung der Erbsenschalensuspension zuerst mit einer und dann mit zwei Interaktionskammern für (Innendurchmesser 100 µm bzw. 200 µm) bei 1750 bar für 1 (200 µm) + 3 (200 + 100 µm) bzw. 1 (200 µm) + 5 Durchläufe (200 + 100 µm) bzw. Hochdruckhomogenisierung des Karottentrestersuspension bei einem konstanten Druck von 500 bar
- › Abkühlen der Proben im Eisbad nach jedem Durchlauf

Enzymatische Hydrolyse (Durchführung durch Dr. Medina-Rocío Morales, an der TU Berlin)

- › Erhitzung der Suspension für 15 min im Wasserbad auf 50 °C (Erbsenschale) bzw. 45 °C (Karottentrester)
- › Zugabe von je 10 µL ARA und CEL pro g Erbsenschale (= Enzym-Substrat-Verhältnis von 2 %) bzw. von je 20 µL ARA, CEL und PL pro g Karottentrester (= Enzym-Substrat-Verhältnis von 6 %) und Schwenken
- › Hydrolyse für 30 min bei 50 °C (Erbsenschale) bzw. 45 °C (Karottentrester) unter Rühren (300 rpm)
- › Inaktivierung der Enzyme für 10 min im Wasserbad bei 95 °C
- › Abkühlen im Eisbad und Messen des pH-Werts

- › Gefriertrocknen und Sendung nach Karlsruhe
- › Mahlen der Proben mit Pulverisette mit 0,5 mm Siebring

Enzymatische Hydrolyse des Karottentresters

- › Einwaage von 20 g Karottentrester und Suspendieren in 400 mL Wasser (fünfgewichtsprozentige Lösung) für 10 min auf Rührer
- › Erhitzung der Suspension für 1 h im Schüttelinkubator (120 rpm) auf 45 °C
- › Zugabe von je 400 µL CEL, ARA und PL (= Enzym-Substrat-Verhältnis von 6 %) und Schwenken
- › Hydrolyse für 30 min bei 45 °C (Karottentrester) im Schüttelinkubator (120 rpm)
- › Inaktivierung der Enzyme für 10 min im Wasserbad bei 95 °C
- › Abkühlen im Eisbad
- › Zentrifugieren (3 min, 5.000 rpm)
- › Einengen des Überstands am Rotationsverdampfer (45 °C)
- › Gefriertrocknen des Rückstands und eingeengten Überstands zusammen
- › Mahlen der Proben mit Pulverisette mit 0,5 mm Siebring

8.4 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYME

- › Versuchsansätze zur Enzymcharakterisierung hinsichtlich Temperaturoptimum, Inaktivierung und Nebenaktivitäten: vgl. Tabelle A - 5
- › Herstellung von wässrigen Lösungen bzw. Suspensionen von Arabinan, Galactan, Xylan, Pektin Classic CU 901/202 bzw. unbehandelter Erbsenschale mit 10 mg/mL
- › Vortexen
- › Zugabe von CEL, ARA, GAL, XYL, PL, PG bzw. Reinstwasser (Blindwert)
- › Hydrolyse für 60 min bei 30, 40, 50 bzw. 60 °C
- › Inaktivierung für 5 bzw. 10 min bei 95 °C im Wasserbad
- › Zentrifugieren für 10 min bei 13.200 rpm
- › Verdünnung des Überstands, Zugabe von Isomaltotriose bzw. Raffinose (Endkonzentration: 10 µM) als IStd
- › Analyse mittels HPAEC-PAD/MS

Bedingungen HPAEC-PAD

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min

- Fließmittel A Reinstwasser
 B 100 mM Natronlauge
 C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

- Gradient Ansätze mit Arabinan: vgl. Tabelle V - 8
 Ansätze mit Galactan: vgl. Tabelle V - 9
 Ansätze mit Erbsenschale: vgl. Tabelle V - 1
 Ansätze mit Pektin Classic CU 201/901: vgl. Tabelle V - 19
 Ansätze mit Xylan: vgl. Tabelle V - 2

Tabelle V - 2: Gradientenprogramm zur Charakterisierung von Xylanaseaktivitäten mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion, Eluent

A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0,0	0 ,0	100,0
-20,0	0,0	0 ,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	35,0	65,0	0,0
18,0	35,0	63,5	1,5
22,0	35,0	63,5	1,5
50,0	35,0	53,0	12,0
52,0	35,0	53,0	12,0
52,1	0,0	0,0	100,0
62,0	0,0	0,0	100,0

PAD-Detektion mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (bei 20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)

MS-Detektion elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser und anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor (bei 20 °C)

Zuführung einer 0,5 mM Lithiumchlorid-Lösung (0,05 mL/min) zur Adduktbildung

ESI im Positiv-Modus: *Full-Scan* (*m/z*: 150 - 850) und SIM (entsprechende *m/z* relevanter Oligosaccharide, vgl. Tabelle V - 12, Start- und Endzeit für den jeweiligen Gradienten angepasst)

8.5 BESTIMMUNG FREIER MONO- UND DISACCHARIDE

- › Einwaage von 10 mg gemahlener Probe in 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß und Zugabe von 2 mL Reinstwasser (5 mg/mL-Lösung)
- › Mehrmals Vortexen und Stehenlassen zum Übergang der Mono- und Disaccharide in Lösung
- › Zentrifugieren (10 min, 13.200 rpm)
- › Verdünnung der Probe (entsprechend angepasst) und Zugabe von 2-Desoxy-D-Glucose mit Endkonzentration von 25 µM (freie Monosaccharide), Melezitose (Erbensenschale) / Lactulose (Karottentrester) jeweils mit Endkonzentration von 10 µM (freie Disaccharide) bzw. Isomaltotriose mit Endkonzentration von 2 µM (freie Digalacturonsäure)

Anmerkung: Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung.

Bedingungen HPAEC-PAD

Säule	Monosaccharide: Dionex CarboPac PA20 mit Vorsäule (6 µm; 30 x 3 mm, Thermo Scientific)
	Disaccharide: Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injectivolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat
Gradient	

Tabelle V - 3: Gradientenprogramm zur Analyse von Monosacchariden mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	90	10	0
0,0	90	10	0
1,5	97	3	0
22,0	97	3	0
27,0	0	100	0
27,1	0	60	40
37,0	0	60	40

Tabelle V - 4: Gradientenprogramm zur Analyse von freier Arabinobiose, Cellobiose und Xylobiose aus Erbsenschalenproben mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
1,5	97	3	0
12,0	97	3	0
15,0	90	10	0
30,0	80	20	0
35,0	40	60	0
36,0	33	60	7
46,0	33	60	7
46,1	0	0	100
56,0	0	0	100

Tabelle V - 5: Gradientenprogramm zur Analyse von Arabinobiose, Cellobiose, Galactobiose und Xylobiose aus Karottentresterproben mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
5,0	90	10	0
15,0	40	60	0
16,0	33	60	7
26,0	33	60	7
26,1	0	0	100
36,0	0	0	100

Tabelle V - 6: Gradientenprogramm zur Analyse von Digalacturonsäure aus Erbsenschalen- und Karottentresterproben mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
20,0	0	80	20
29,0	0	56	44
29,1	0	0	100
40,0	0	0	100

PAD-Detektion	mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode bei (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)
Kalibrierung	10 Monosaccharide (Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose, Galacturonsäure, Glucuronsäure), je zwei 5-Punkt-Kalibrierungen (1, 6, 12, 18 und 25 µM sowie 25, 50, 75, 100 und 125 µM) mit quadratischer Anpassung
	6-Punkt-Kalibrierung (1, 6, 12, 18, 24 und 30 µM) der Disaccharide (Arabinobiose, Digalacturonsäure, Cellobiose, Galactobiose, Xylobiose) mit linearer Anpassung bzw. quadratischer Anpassung für Cellobiose und Xylobiose (Gradient Erbsenschale)

8.6 BESTIMMUNG VON OLIGOSACCHARIDEN DER RAFFINOSE-FAMILIE

- › Einwaage von 10 mg gemahlener Erbsenschale bzw. 4 mg LBS (Erbsenschale) in je ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß und Lösen in 2 mL bzw. 1 mL Reinstwasser (5 bzw. 4 mg/mL)
- › Zentrifugieren (10 min, 13.200 rpm)
- › Verdünnung der Überstände sowie der extrahierten NLBS-Faktion (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8) und Zugabe von 2-Desoxy-D-Glucose (IStd, Endkonzentration: 25 µM)
- › Messung mittels HPAEC-PAD

Bedingungen HPAEC-PAD

Säule	Dionex CarboPac PA20 mit Vorsäule (6 µm; 30 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

Gradient

Tabelle V - 7: Gradientenprogramm zur Analyse der Oligosaccharide der Raffinosefamilie mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	80	20	0
0,0	80	20	0
1,5	97	3	0
22,0	97	3	0
32,0	0	100	0
37,0	0	100	0
37,1	0	60	40
47,0	0	60	40

PAD-Detektion

mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode bei (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)

Kalibrierung:

zwei 5-Punkt-Kalibrierungen (1, 6, 12, 18 und 25 µM sowie 25, 50, 75, 100 und 125 µM) für Raffinose und Stachyose und eine 5-Punkt-Kalibrierung (1, 6, 12, 18 und 25 µM) für Verbascose jeweils mit quadratischer Anpassung

8.7 PRÄPARATIVE BALLASTSTOFFISOLIERUNG

- › Einwaage von 5 g gemahlenem Probenmaterial und Zugabe von 50 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0) in einen 250-mL-Erlenmeyerkolben
- › Zugabe von 375 µL thermostabiler α-Amylase (Termamyl 120 L, Sigma-Aldrich)
- › Inkubation für 20 min bei 92 °C und Schwenken des Kolbens alle 5 min
- › Abkühlen der Probe in Eis auf Raumtemperatur und Einstellung des pH-Werts auf 7,5 mit Natronlauge (0,275 M)
- › Zugabe von 175 µL Protease (Alcalase 2.4 L, Sigma)
- › Inkubation für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln
- › Abkühlen der Probe in Eis auf Raumtemperatur und Einstellung des pH-Werts auf 4,5 mit Salzsäure (0,325 M)
- › Zugabe von 175 µL Amyloglucosidase (\geq 260 U/mL, Sigma-Aldrich)
- › Inkubation für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln
- › Zentrifugieren der warmen Lösung für 15 min bei 5.000 rpm
- › Abtrennung des Überstands (enthält LBS)
- › Waschen des Rückstands (UBS) mit 2 x 25 mL und 1 x 12,5 mL warmen Wasser (60 °C), nach jedem Waschschritt zentrifugieren, Überstand abtrennen und mit aufgehobenem Überstand vereinigen

- › Waschen des Rückstands mit 1 x 25 mL und 1 x 12,5 mL Ethanol (99 %), nach jedem Waschschritt zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- › Waschen des Rückstands mit 1 x 25 mL und 1 x 12,5 mL Aceton, nach jedem Waschschritt zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- › Trocknen der **UBS** bei 60 °C über Nacht
- › Präzipitation der LBS aus vereinigtem Überstand der Waschschritte durch Zugabe der vierfachen Menge Ethanol (99 %) über Nacht
- › Zentrifugieren für 12 min bei 500 rpm
- › Abtrennung des Überstands und Verwerfen
- › Waschen des Rückstands (**LBS**) mit 1 x 25 mL und 1 x 12,5 mL Ethanol (78 %), nach jedem Waschschritt zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- › Waschen des Rückstands mit 1 x 25 mL und 1 x 12,5 mL Ethanol (99 %), nach jedem Waschschritt zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- › Waschen des Rückstands mit 1 x 25 mL und 1 x 12,5 mL Aceton, nach jedem Waschschritt zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- › Trocknen der **LBS** bei 60 °C über Nacht

Anmerkung: Ballaststoffe aus mechanisch-enzymatisch / enzymatisch-mechanisch behandelten Erbsenschalen- / Karottentresterproben wurden wegen geringerer Probenmenge partiell in kleineren Ansätzen (3 bzw. 4 g Einwaage) mit entsprechend reduzierter Menge an Puffer und Enzymen isoliert. Die Isolierung sowie der Stärkenachweis wurden jeweils in Einfachbestimmung durchgeführt.

Stärkenachweis

- › Aufkochen einer Spatelspitze UBS bzw. LBS in etwas vollentsalztem. Wasser
- › Versetzen mit Jod-Kaliumiodid-Lösung
- › Mitführen eines Blindwerts (Wasser)

8.8 ISOLIERUNG NIEDERMOLEKULARER, LÖSLICHER BALLASTSTOFFE

- › Einwaage von 140 mg Probe in ein 15 mL-Pyrexglas
- › Zugabe von 9,8 mL (Erbse) bzw. 7 mL (Karotte) Reinstwasser (gleiches Verhältnis wie bei der analytischen Ballaststoffbestimmung (vgl. Kapitel 8.9)
- › 360°-drehende Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
- › Zugabe von 28 µL Amyloglucosidase-Lösung (vgl. Kapitel 7.3)
- › Inkubation bei 60 °C für 30 min im Wasserbad unter ständigem Schütteln
- › Überführung der gesamten warmen Lösung in 15 mL-Tube und Abzentrifugieren der UBS (10 min, 5.000 rpm)
- › Überführung von 8,5 mL (Erbse) bzw. 6 mL (Karotte) des Überstands mit Vollpipette in 50 mL-Tube
- › Zugabe der vierfachen Menge Ethanol (80 %) und Vortexen

- › Präzipitation abwarten (30 min) bei gelegentlichem Vortexen der Lösung
- › Abzentrifugieren des Rückstands (10 min, 5.000 rpm)
- › Überführung von 40 mL (Erbse) bzw. 28 mL (Karotte) des Überstands in 50 mL-Rundkolben
- › Eindampfen bei 50 °C am Rotationsverdampfer bis zur Trockene
- › Aufnahme in 2,4 mL (Erbse) bzw. 2,3 mL (Karotte) Reinstwasser

Anmerkung: Die Isolierung erfolgte in Doppelbestimmung.

8.9 ANALYTISCHE BALLASTSTOFFBESTIMMUNG

Durchführung Isolierung

- › Befüllen der Filtertiegel (Pore Size 2, 40 - 100 µm, Fa. Robu) mit Celite (Boden bedeckt)
- › Ausglühen im Muffelofen bei 500 °C für 4 h und konstant wiegen
- › Einwaage von 1 g Probe und Zugabe von 50 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M) in 250 mL-Schottflasche
- › Zugabe von 100 µL thermostabiler α-Amylase (3.000 U/mL)
- › Inkubation für 30 min bei 92 °C unter Schwenken des Kolbens alle 5 min
- › Abkühlen der Probe in Eis auf Raumtemperatur und Einstellung des pH-Werts auf 7,5 mit Natronlauge (0,171 M)
- › Zugabe von 100 µL Protease-Lösung (vgl. Kapitel 7.3)
- › Inkubation für 30 min bei 60 °C
- › Abkühlen der Probe in Eis auf Raumtemperatur und Einstellung des pH-Werts auf 4,5 mit Salzsäure (0,325 M)
- › Zugabe von 200 µL Amyloglucosidase-Lösung (vgl. Kapitel 7.3)
- › Inkubation für 30 min bei 60 °C
- › Zugabe von 1 mL Glycerin-Lösung (100 mg/mL, IStd)
- › Filtrieren der warmen Lösung über zuvor gewogenem Filtertiegel mit Celite
- › Waschen des Rückstands (**UBS**) mit 2 x 25 mL und 1 x 10 mL warmen Wasser (60 °C)
- › Vereinigung und Aufbewahrung der Filtrate (enthalten **LBS**) für spätere Weiterverarbeitung
- › Waschen des Rückstands mit 2 x 25 mL Ethanol (99,5 %) und 2 x 25 mL Aceton
- › Trocknen der UBS im Filtertiegel über Nacht bei 105 °C und auswiegen
- › Versetzen der vereinigten wässrigen Filtrate (mit **LBS**) mit vierfacher Menge Ethanol (99,5 %)
- › Präzipitation über Nacht
- › Abfiltrieren der Lösung über zuvor gewogenem Filtertiegel mit Celite
- › Waschen des Rückstands (**LBS**) mit 2 x 25 mL und 1 x 10 mL Ethanol (78 %)
- › Vereinigung und Aufbewahrung der Filtrate (enthalten **NLBS**) für spätere Weiterverarbeitung
- › Waschen des Rückstands mit 2 x 25 mL Ethanol (99,5 %) und 2 x 25 mL Aceton
- › Trocknen der LBS im Filtertiegel über Nacht bei 105 °C und auswiegen

- › Eindampfen des bei der analytischen Isolierung der LBS erhaltenen Filtrats (mit NLBS) fast bis zur Trockene am Rotationsverdampfer bei 50 °C
- › Aufnahme des Rückstands in etwas Wasser und quantitative Überführung in 20 mL-Messkolben
- › Aufgabe von 4 mL der Lösung zum Entsalzen auf eine Säule mit Amberlite FPA53 (OH-) / Ambersep 200 (H+) (je 4 g, vor Benutzung mit Reinstwasser waschen)
- › Stehenlassen für 15 min
- › Elution mit 40 mL Wasser
- › Eindampfen des Eluats bei 50 °C am Rotationsverdampfer bis zur Trockene
- › Aufnahme des Rückstands in 2 mL Wasser
- › Filtrieren der Lösung durch einen Spritzenfilter (0,45 µm; PTFE)
- › Injektion von 50 µL in HPSEC-RID

Anmerkung: Abhängig vom Wasserbindungsvermögen der Probe war ein größeres Volumen an Natriumphosphatpuffer (bis 100 mL) erforderlich. Die Durchführung erfolgte in Dreifachbestimmung.

Bedingungen HPSEC-RID

Säule	2 x TSKgel G2500PW _{XL} in Reihe mit Vorsäule TSKgel PW _{XL} (12 µm, 40 x 6,0 mm)
Säulentemperatur	80 °C
Injektionsvolumen	50 µL
Fluss	0,4 mL/min
Gradient	isokratisch Eluent: Reinstwasser
Detektion	RID
Kalibrierung	Glucose, 5-Punkt-Kalibrierung (0,1; 1; 5; 10 und 20 mg/mL) mit linearer Anpassung und Glycerin als IStd (10 mg/mL)
Übergang DP 2 zu DP 3	Maltose-Maltotriose-Lösung (10 mg/mL)
Vergleich von DP 2 zu 3	Arabinobiose-Arabinotriose-, Cellobiose-Cellobiotriose-, Galactobiase-, Galacturonsäure-, Di- und Trigalacturonsäure-, Maltose-Maltotriose-, Mannobiose-Mannotriose, Saccharose-Raffinose-, Fructose-Melibiose-Manninotriose-, Xylobiose-Xylotriose-Lösung (je 0,5 mg/mL)

Aschekorrektur

- › Veraschen der getrockneten und gewogenen Filtertiegel mit UBS und LBS für 5 h bei 500 °C
- › Auswiegen der Filtertiegel

Restproteinkorrektur nach Kjeldahl

- › Überführung der UBS und LBS aus getrockneten und gewogenen Filtertiegeln in Kjeldahl-Aufschlusskolben
- › Zugabe von 4 - 5 Glasperlen, 500 mg Selenreaktionsgemisch und 5 mL Schwefelsäure (konzentriert)
- › Aufschluss der Probe für ca. 1 h auf einem Heizblock, Erhitzung bis zur Entfärbung
- › Abkühlen der Lösung
- › Zugabe von 10 mL Reinstwasser
- › Quantitative Überführung der Lösung ohne Glasperlen in 50 mL-Messkolben und Auffüllen auf 50 mL mit Reinstwasser
- › Auffüllen von 1 mL der Lösung auf 50 mL mit Reinstwasser
- › Überführung von 50 mL Aliquot in Becherglas und Zugabe von 3 mL Natronlauge (2 M)
- › Schwenken und 2 min warten
- › Eintauchen der Ammoniak-sensitiven Elektrode unter Röhren und Messen

Kalibrierung:

- › Ammoniumchlorid-Lösung (1.000 mg N/L = 382 mg Ammoniumchlorid/100 mL Wasser)
- › Herstellung von drei Kalibrierlösungen (0,1; 1 und 10 mg/L) in je einem 200 mL-Messkolben mit je 4 mL verdünnter Schwefelsäure (4 mL konzentrierte Schwefelsäure in 50 mL Wasser)
- › Versetzen von je 50 mL Kalibierlösung mit 3 mL Natronlauge (2 M) zur Messung (s. oben)

Stärkenachweis

- › Aufkochen des Tiegelinhals (UBS bzw. LBS) in vollentsalztem Wasser
- › Versetzen mit Jod-Kaliumiodid-Lösung
- › Mitführen eines Blindwerts (Wasser)

Anmerkung: Einfachbestimmung von Aschekorrektur, Restproteinkorrektur und Stärkenachweis.

Durchführung Wiederfindungsversuch

- › Herstellung von je drei Standardlösungen in Phosphatpuffer (0,2 M)
 - Arabinobiose, Arabinotriose + Isomaltotriose (IStd) (je 200 µM)
 - Cellobiose, Cellotriose + Raffinose (IStd) (je 200 µM)
 - Mono-, Di- und Trigalacturonsäure (je 200 µM) + Isomaltotriose (IStd, 100 µM)
- › Entsalzung mit je 1 g gewaschenem Anionen- und Kationentauscher (s. oben)
- › Aufgabe von 1 mL Standardlösung
- › Stehenlassen für 15 min
- › Elution mit 1 x 40 mL (Eluat 1) und 2 x 20 mL (Eluate 2 und 3) Reinstwasser
- › Eindampfen des Eluats bei 50 °C am Rotationsverdampfer bis zur Trockene
- › Aufnahme in 1,5 mL Reinstwasser und Gefriertrocknen

- › Aufnahme des Rückstands in 600/500 µL (Eluat 1) bzw. 100/200 µL (Eluate 2 und 3) Reinstwasser
- › Verdünnung und Zugabe von Raffinose bzw. Isomaltotriose als IStd (Endkonzentration: 10 µM)
- › Messung mittels HPAEC-PAD

Bedingungen HPAEC-PAD

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat
Gradient	Wiederfindung Arabinobiose/-triose: vgl. Tabelle V - 8 Wiederfindung Cellobiose/-triose: vgl. Tabelle V - 1 Wiederfindung Galacturonsäuren: vgl. Tabelle V - 19
PAD-Detektion	mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode bei (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)
Kalibrierung	1-Punkt Kalibrierung mit entsprechender Standardlösung (10 µM)

8.10 CHARAKTERISIERUNG VON OLIGO- UND POLYSACCHARIDEN

8.10.1 ANALYSE DER MONOSACCHARIDZUSAMMENSETZUNG

Methanolyse und Trifluoressigsäure-Hydrolyse der UBS und LBS

- › Einwaage von 6 mg Probe in 1,5 mL-Glasvial
- › Zugabe von 500 µL methanolischer Salzsäure (1,25 M)
- › Verschließen mit geschlossenem Deckel mit Dichtscheibe und Behandlung bei 80 °C für 16 h im Trockenschränk
- › Abkühlen, grobe Teilchen absetzen lassen und 40 µL in ein neues 1,5 mL-Glasvial pipettieren
- › Eindampfen im Evaporator zur Trockene (ca. 15 min)
- › Zugabe von 500 µL TFA-Lösung (2 M)
- › Verschließen mit Lochdeckel mit Dichtscheibe und Behandlung bei 121 °C für 1 h im Trockenschränk
- › Eindampfen im Evaporator bis zur Trockene (ca. 2 - 2,5 h)

- › Zugabe von zweimal je 200 µL Ethanol und Eindampfen zur Trockene (ca. 20 min)
- › Aufnahme in 200 µL Reinstwasser
- › Verdünnung mit 2-Desoxy-D-Glucose (IStd, Endkonzentration: 25 µM)
- › Analyse mittels HPAEC-PAD

Methanolyse und Trifluoressigsäure-Hydrolyse löslicher Oligosaccharide

- › Pipettieren von 20 µL extrahierter NLBS-Fraktion (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8) in ein 1,5 mL-Glasvial und Eindampfen im Evaporator zur Trockene
- › Zugabe von 500 µL methanolischer Salzsäure (1,25 M)
- › Verschließen mit geschlossenem Deckel mit Dichtscheibe und Behandlung bei 80 °C für 16 h im Trockenschrank
- › Eindampfen im Evaporator zur Trockene (ca. 1 h)
- › Zugabe von 500 µL TFA-Lösung (2 M)
- › Verschließen mit Lochdeckel mit Dichtscheibe und Behandlung bei 121 °C für 1 h im Trockenschrank
- › Eindampfen im Evaporator bis zur Trockene (ca. 2 - 2,5 h)
- › Zugabe von zweimal je 200 µL Ethanol und Eindampfen zur Trockene (ca. 20 min)
- › Aufnahme in 200 µL Reinstwasser
- › Verdünnung mit 2-Desoxy-D-Glucose (IStd, Endkonzentration: 25 µM)
- › Analyse mittels HPAEC-PAD

Schwefelsäurehydrolyse der UBS

- › Einwaage von 10 mg Probe in 3,5 mL-Glasvial und Zugabe von ca. 3 Glasperlen
- › Zugabe von 150 µL Schwefelsäure (12 M), Vortexen und Verschließen des Glasvials mit geschlossenem Deckel mit Dichtscheibe
- › Stehen lassen für 30 min im Eisbad unter Vortexen alle 10 min (Probenmaterial gut benetzen)
- › Stehen lassen für 2 h bei Raumtemperatur unter Vortexen alle 30 min
- › Verdünnung mit 975 µL Wasser
- › Hydrolyse für 3 h bei 100 °C im Trockenschrank
- › Abkühlen, Aufnahme der gesamten Lösung mit Spritze und Filtrieren durch PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm)
- › Versetzen von 100 µL Filtrat mit 75 µL Natronlauge (4 M) und 825 µL Reinstwasser
- › Verdünnung und Zugabe von 2-Desoxy-D-Glucose (IStd, Endkonzentration: 25 µM)
- › Analyse mittels HPAEC-PAD

Anmerkung: Durchführung der sauren Hydrolysen zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung in Doppelbestimmung außer NLBS-Fraktionen (Einfachbestimmung).

Bedingungen HPAEC-PAD

Säule	Dionex CarboPac PA20 mit Vorsäule (6 µm; 30 x3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat
Gradient	vgl. Tabelle V - 3
PAD-Detektion	mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode bei (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)
Kalibrierung	10 Monosaccharide (Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose, Galacturonsäure, Glucuronsäure), je zwei 5-Punkt-Kalibrierungen (1, 6, 12, 18 und 25 µM sowie 25, 50, 75, 100 und 125 µM) mit quadratischer Anpassung

8.10.2 ANALYSE DER BINDUNGSVERHÄLTNISSE**Methylierung** (zweifache Durchführung)

- › Einwaage von 5 mg UBS bzw. LBS (trocken und homogen) in je ein 15 mL-Pyrexglas
- › Zugabe von 2 mL Dimethylsulfoxid und Behandeln für 15 min im Ultraschallbad
- › Quellen über Nacht und erneutes Behandeln für 15 min im Ultraschallbad
- › Zugabe von 100 mg frisch unter Stickstoff gemörsertem Natriumhydroxid
- › Reaktion für 90 min im Ultraschallbad unter Zugabe von Eis zur Kühlung und anschließend für 90 min bei Raumtemperatur
- › Zugabe von 1 mL Methyliodid
- › Inkubation für 30 min im Ultraschallbad und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur
- › Zugabe von 3 mL Dichlormethan und 5 mL Natriumthiosulfatlösung (0,1 M) und Vortexen für gute Durchmischung
- › Abnahme der wässrigen Phase und zweifaches Waschen der organischen Phase mit je 5 mL Wasser
- › Eindampfen der organischen Phase am Rotationsverdampfer bis zur Trockene und ggf. Abdampfen von möglichen Lösungsmittelresten unter Stickstoff
- › Trocknen der Proben über Nacht bei 40 °C im Vakuumtrockenschränk (100 mbar)

Hydrolyse, Reduktion und Derivatisierung

- › Zugabe von 2 mL TFA (2 M) und Hydrolyse für 90 min bei 121 °C im Trockenschrank
- › Eindampfen am Rotationsverdampfer bis zur Trockene und ggf. Abdampfen von möglichen Lösungsmittelresten unter Stickstoff
- › Zugabe von 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 mL Ammoniak (2 M) und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
- › Abbruch der Reaktion durch die Zugabe von 100 µL Eisessig
- › Zugabe von 450 µL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid unter Eiskühlung
- › Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur
- › Zugabe von 3 mL Wasser unter Eiskühlung
- › Extraktion mit 5 mL Dichlormethan
- › Dreimaliges Waschen der organischen Phase mit je 3 mL Wasser
- › Ausfrieren des Restwassers über Nacht bei -18 °C
- › Überführen der organischen Phase in 4 mL-Glasvial
- › Analyse der Proben in geeigneter Verdünnung mittels GC-MS und GC-FID

Anmerkung: Durchführung nur für UBS und LBS der unbehandelten Erbsenschale bzw. des unbehandelten Karottentresters jeweils in Doppelbestimmung.

Bedingungen GC-MS und GC-FID

Säule	DB-225MS
Injektionsvolumen	5 µL
Injektionstemperatur	220 °C
Injektionsart	Split im Verhältnis 30:1 (MS) bzw. 10:1 (FID)
Trägergas	Helium
Trägergasgeschwindigkeit	40 cm/s
Temperaturprogramm	Anfangstemperatur 140 °C für 1 min Aufheizphase (4 min) mit 20 °C/min bis 220 °C Haltephase (25 min) bei 220 °C
MS-Detektion	Elektronenstoßionisation mit Energie von 70 eV und Transferline-Temperatur von 220 °C
FID-Detektion	Temperatur 240 °C mit Stickstoff als Makeup-Gas

8.10.3 ARABINAN- UND GALACTANSCREENING

- › Einwaage von 5 mg **UBS** in ein 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß
- › Zugabe von 500 µL Reinstwasser und Vortexen
- › Zugabe von 5 µL einer *endo*-ARA- (20 U/mL) bzw. 5 µL einer *endo*-GAL-Lösung (100 U/mL)
- › Herstellen einer **LBS**-Lösung (1 mg/mL)
- › Pipettieren von 200 µL LBS-Lösung (Arabinanscreening Erbse und Karotte, Galactanscreening Erbse) bzw. 50 µL LBS-Lösung + 150 µL Reinstwasser (Galactanscreening Karotte) in je ein 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß
- › Zugabe von 2 µL (Karotte) bzw. 20 µL (Erbse) einer *endo*-ARA- (20 U/mL) bzw. 2 µL (Erbse) bzw. 20 µL (Karotte) einer *endo*-GAL-Lösung (100 U/mL)
- › Gut mischen, aber nicht vortexen
- › Inkubation für 24 h bei 40 °C im Schüttelinkubator
- › Inaktivierung der Enzyme für 5 min im 95 °C warmen Wasserbad
- › Zentrifugieren (10 min bei 13.200 rpm)
- › Verdünnung des Überstands (angepasst für jeweilige Probe) und Zugabe von Raffinose (Endkonzentration: 10 µM)
- › Messung mittels HPAEC-PAD

Anmerkung: Durchführung der Screenings erfolgte in Doppelbestimmung. Zudem wurde jeweils ein Blindwert ohne Zugabe von Enzym mitgeführt.

Bedingungen HPAEC-PAD

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (full loop)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

Gradient

Tabelle V - 8: Gradientenprogramm zur Analyse der Arabinoooligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
60,0	50	30	20
75,0	0	40	60
75,1	0	0	100
90,0	0	0	100

Tabelle V - 9: Gradientenprogramm zur Analyse der Galactooligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
10,0	90	10	0
20,0	50	50	0
60,0	50	40	10
75,0	0	50	50
80,0	0	0	100
90,0	0	0	100

PAD-Detektion

mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode (bei 20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)

Identifizierung

Lösungen der Haupt- und Nebenarabinane und -galactane von Wefers & Bunzel, 2016a

8.10.4 XYLOGLUCANSCREENING

- › Einwaage von 10 mg ZM in ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß
- › Zugabe von 400 µL Reinstwasser und Vortexen
- › Zugabe von 2,5 µL Xyloglucanase (3.000 U)
- › Inkubation für 24 h bei 40 °C im Schüttelinkubator
- › Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 1,6 mL Ethanol
- › Präzipitation für 1 h und Zentrifugieren (10 min bei 13.200 rpm)

- › Abnahme des Überstands und Filtration durch PTFE-Spritzenfilter (Porengröße: 0,45 µm, Filterdurchmesser: 13 mm, Hersteller: Chromafil)
- › Eindampfen von 500 µL Filtrat bis zur Trockene
- › Aufnahme des Rückstands in 100 µL Isomaltotriose-Lösung (10 µM)
- › Analyse mittels HPAEC-PAD/MS (ggf. Verdünnung anpassen)

Anmerkung: Durchführung des Screenings erfolgte in Doppelbestimmung. Zudem wurde jeweils ein Blindwert ohne Zugabe von Enzym mitgeführt.

Bedingungen HPAEC-PAD/MS

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

Gradient

Tabelle V - 10: Gradientenprogramm zur Analyse der Xyloglucanoligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	40	60	0
0,0	40	60	0
0,1	40	60	0
10,0	5	95	0
20,0	5	92	3
60,0	5	88	7
75,0	0	50	50
80,0	0	0	100
90,0	0	0	100

PAD-Detektion mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (bei 18 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)

MS-Detektion elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser und anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor (bei 18 °C)

Zuführung einer 0,5 mM Lithiumchlorid-Lösung (0,05 mL/min) zur Adduktbildung

ESI im Positiv-Modus: *Full-Scan* (*m/z*: 300 - 1000) und SIM (entsprechende *m/z* der einzelnen Xyloglucanoligosaccharide, vgl. Steck *et al.*, 2021)

8.10.5 BESTIMMUNG DES VERESTERUNGSGRADS POLYMERGBUNDENER URONSÄUREN

8.10.5.1 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG POLYMERGBUNDENER URONSÄUREN

- › Herstellen einer 1 mg/mL Lösung der LBS und Verdünnen (1:7)

Vorhydrolyse der UBS

- › Einwaage von 10 mg UBS in ein 3,5 mL-Glasvial und Zugabe von Glasperlen
- › Zugabe von 300 µL Schwefelsäure (12 M) auf Eis und Vortexen
- › 15 min auf Eis stehen lassen und gelegentlich vortexen
- › Hydrolyse für 2 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln und gelegentlichem Vortexen (vollständige Benetzung des Probenmaterials)
- › Zugabe von 2,6 mL Reinstwasser
- › Filtrieren durch einen PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm) und Verdünnen des Filtrats (1:10)

Photometrische Bestimmung

- › Pipettieren von je 600 µL der verdünnten UBS-/LBS-Lösungen in je zwei 15 mL-Pyrexgläser
- › Zugabe von 3,6 mL schwefelsaurer Natriumtetraboratlösung (12,5 mM in konzentrierter Schwefelsäure (18 M)) und umgehendes Vortexen
- › Inkubation für 5 min bei 95 °C im Wasserbad
- › Direktes Abkühlen im Eisbad für 5 min
- › Stehenlassen bei Raumtemperatur für 5 min
- › Je Probe einen Ansatz mit 60 µL 3-Phenylphenollösung (0,15 % in 0,5 % Natronlauge) und einen Ansatz mit 60 µL Natronlauge (0,5 %; Blindwert) versetzen und umgehend vortexen
- › Messen der Extinktion nach 20 min Inkubation bei 520 nm am Photometer

Kalibrierung

- › Herstellung von sechs Kalibrierlösungen (10, 25, 40, 55, 70 und 85 mg/L) aus einer Galacturonsäure-Stammlösung (200 mg/L)
- › Photometrische Bestimmung analog zu den Probelösungen wie oben beschrieben mit je einem Blindwert für jede Kalibrierlösung

Anmerkung: Durchführung der Vorhydrolyse sowie die Herstellung der LBS-Lösungen erfolgte in Dreifach- und die photometrische Bestimmung in Einfachbestimmung.

8.10.5.2 BESTIMMUNG VON GEBUNDENEM METHANOL UND ESSIGSÄURE

- › Einwaage von 20 mg UBS bzw. LBS in 3,5 mL-Glasvial
- › Zugabe von 1,5 mL Natronlauge (2 M) in Deuteriumdioxid und 150 µL TMSP-Lösung (0,5 mg/mL in Deuteriumoxid)
- › Hydrolyserien für 2 h im Ultraschallbad unter Zugabe von Eis zur Vermeidung einer Erwärmung
- › Absetzen lassen und Filtrieren des Überstands mittels PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm)
- › Überführen von 550 µL in NMR-Tube
- › Messung mittels NMR

Anmerkung: Durchführung der Analyse in Doppelbestimmung.

Bedingungen NMR

Pulssequenz	Zg30 (90° Puls, Standardparametersatz der Firma Brucker)
Lösungsmittel	Deuteriumdioxid
Scananzahl	32
Relaxation-Delay (D1 Zeit)	35 Sekunden
Referenzierung	δ_H (TMSP) = 0,00 ppm δ_H (Essigsäure) = 1,92 ppm δ_H (Methanol) = 3,36 ppm

8.10.6 ANALYSE DER MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNG

- › Einwaage von 20 mg LBS und Zugabe von 10 mL Natriumnitrat-Lösung (50 mM)
- › 360°-drehende Inkubation für 24 h bei 40 °C
- › Zentrifugieren (10 min, 5.000 rpm)
- › Messung des unverdünnten Überstands mittels HPSEC-RID

Anmerkung: Durchführung der Analyse erfolgte in Doppelbestimmung.

HPSEC-RI Bedingungen

Säulen	TSKgel G6000PWXL und TSKgel G4000PWXL in Reihe mit Vorsäule TSKgel PWXL (12 µm, 40 x 6,0 mm)
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	50 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,5 mL/min
Fließmittel	50 mM Natriumnitrat
Gradient	isokratisch
Detektion	RID

Molekulargewichtsmarker Dextranstandardsubstanzen (5, 12, 50, 150 und 670 kDa)

8.11 ANALYSE VON OLIGOSACCHARIDEN IN DEN NLBS-FRAKTIONEN

8.11.1 ANALYSE MITTELS HPAEC-PAD(/MS)

- › Verdünnung der extrahierten NLBS-Fraktionen (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8) und Zugabe von Isomaltotriose (IStd, Endkonzentration: 10 µM)
- › Analyse mittels HPAEC-PAD(-MS)

Anmerkung: Die Analyse erfolgte jeweils in Einfachbestimmung aus den doppelt extrahierten NLBS-Fraktionen.

Bedingungen HPAEC-PAD/MS

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

Gradient

Tabelle V - 11: Gradientenprogramm zur Analyse der Oligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer (und massenspektrometrischer) Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat.

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
20,0	35,0	65,0	0,0
28,0	35,0	63,5	1,5
32,0	35,0	63,5	1,5
55,0	35,0	55,0	10,0
57,0	16,0	60,0	24,0
67,0	0,0	70,0	30,0
72,0	0,0	45,0	55,0
82,0	0,0	40,0	60,0
82,1	0,0	0,0	100,0
97,0	0,0	0,0	100,0

PAD-Detektion mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (bei 20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)

MS-Detektion elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser und anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor (bei 20 °C)

Zuführung einer 0,5 mM Lithiumchlorid-Lösung (0,05 mL/min) zur Adduktbildung

ESI im Positiv-Modus: *Full-Scan* (*m/z*: 150 - 850) und SIM (entsprechende *m/z* relevanter Oligosaccharide, vgl. Tabelle V - 12)

Tabelle V - 12: Parameter zur massenspektrometrischen Detektion mittels Selected Ion Monitoring (SIM) zur Analyse der Oligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie, *m/z* = Masse-zu-Ladungsverhältnis

OLIGOSACCHARID	STARTZEIT / min	ENDZEIT / min	<i>m/z</i>	ADDUKTION
Pentose	2	15	157,1	[M+Li] ⁺
Pentobiose	5	53	289,2	[M+Li] ⁺
Pentotriose / Hexopentaose	7	53	421,1	[M+Li] ⁺ / [M+2Li] ²⁺
Pentotetraose / Uronsäuretrimer	10	53	553,3	[M+Li] ⁺
Pentopentaose	10	53	685,3	[M+Li] ⁺
Pentohexaose	10	53	412,2	[M+2Li] ²⁺
Hexose	2	15	187,1	[M+Li] ⁺
Hexobiose	5	53	349,2	[M+Li] ⁺
Hexotriose	10	53	511,4	[M+Li] ⁺
Hexotetraose	10	53	673,5	[M+Li] ⁺
Hexopentaose	10	53	835,7	[M+Li] ⁺
Hexohexaose	10	53	502,4	[M+2Li] ²⁺
Uronsäure	10	53	201,1	[M+Li] ⁺
Uronsäuredimer	10	53	377,2	[M+Li] ⁺
ungesättigte Uronsäure	10	53	183,1	[M+Li] ⁺
ungesättigte Uronsäuredimer	10	53	359,2	[M+Li] ⁺
ungesättigte Uronsäuretrimer	10	53	535,3	[M+Li] ⁺

Identifizierung Oligosaccharid-Standardsubstanzen: 10 Monosaccharide (vgl. Arbeitsvorschrift 8.10.1), Maltooligosaccharide (DP = 2 - 5), Mannoseoligosaccharide (DP = 1 - 6), Saccharose und RFO (DP = 3 - 5), Haupt- und Nebenarabinane und -galactane (vgl. Wefers & Bunzel, 2016a) Invertase-Abbauprodukte von Raffinose, Stachyose und Verbascose, Lösung mit (Glucurono-)Xylooligosacchariden (teilweise Isolierung von Beck (2022))

Kalibrierung 6-Punkt-Kalibrierung (1, 6, 12, 18, 24 und 30 µM) für Arabino-, Cello- und Xylooligosaccharide (DP = 1 - 6) sowie GalA-OS (DP = 1 - 4) und Stachyose und eine 5-Punkt-Kalibrierung (1, 6, 12, 18 und 25 µM) für Verbascose jeweils mit quadratischer Anpassung

8.11.2 ANALYSE MITTELS UHPLC(-PDA)-MS

8.11.2.1 IDENTIFIZIERUNG VON GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE

- › 1:2 Verdünnung der wässrig extrahierten NLBS-Faktionen in Einfachbestimmung (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8) mit Acetonitril (Endkonzentration: 50 %)
- › Analyse (methylveresterter) GalA-OS mittels UHPLC-MS (nur SIM)

Bedingungen UHPLC-MS

Säule	Acquity UPLC BEH Amid mit Vorsäule (1,7 µM; 5 x 2,1 mm, Waters)
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure B Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure

Gradient

Tabelle V - 13: Gradientenprogramm zur Analyse der (methylveresterten) Galacturonsäureoligosaccharide mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion, Eluent A: Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure

ZEIT / min	A / %	B / %
0,1	0	100
1,0	0	100
31,0	80	20
35,0	80	20
36,0	0	100
41,0	0	100

MS-Detektion	Ventilstellung 2 (MS): 2 - 40 min ESI-Modus: negativ Interface Temperatur: 350 °C DL Temperatur: 250 °C Nebulizing Gasfluss: 1,5 L/min Heizblock: 200 °C
--------------	---

Drying Gasfluss: 15 L/min
 SIM: m/z entsprechender relevanter Galacturonsäureoligosaccharide (vgl. Tabelle V - 14)

Tabelle V - 14: Parameter zur massenspektrometrischen Detektion mittels Selected Ion Monitoring (SIM) zur Analyse der (methylveresterten) Galacturonsäureoligosaccharide mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie, m/z = Masse-zu-Ladungsverhältnis, GalA = Galacturonsäure, $_{2,3,4,\dots}$ = Polymerisierungsgrad, $^0, 1, 2, \dots$ = Anzahl Methylester

OLIGO-SACCHARID	m/z	QUASI-MOLEKÜLION	OLIGO-SACCHARID	m/z	QUASI-MOLEKÜLION
GalA $_0^0$	193	[M-H] $^-$	GalA $_6^0$	536	[M-2H] $^{2-}$
GalA $_2^0$	369		GalA $_7^0$	624	
GalA $_3^0$	545		GalA $_8^0$	712	
GalA $_4^0$	721		GalA $_9^0$	800	
GalA $_5^0$	897		GalA $_{10}^0$	888	
GalA $_1^1$	207		GalA $_6^1$	543	
GalA $_2^1$	383	[M-H] $^-$	GalA $_7^1$	631	[M-2H] $^{2-}$
GalA $_3^1$	559		GalA $_8^1$	719	
GalA $_4^1$	735		GalA $_9^1$	807	
GalA $_5^1$	911		GalA $_{10}^1$	895	
-	-		GalA $_6^2$	550	
GalA $_2^2$	397	[M-H] $^-$	GalA $_7^2$	638	[M-2H] $^{2-}$
GalA $_3^2$	573		GalA $_8^2$	726	
GalA $_4^2$	749		GalA $_9^2$	814	
GalA $_5^2$	925		GalA $_{10}^2$	902	

8.11.2.2 ANALYSE VON UNGESÄTTIGTEN GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDEN

Alkalische Hydrolyse

- › Vorkühlen von 190 µL (95 µL) der wässrig extrahierten NLBS-Faktionen (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8) im Kühlschrank (5 °C)
- › Zugabe von 10 µL (5 µL) 1 M Natronlauge (= 50 mM Natronlauge)
- › Vortexen und Hydrolyse für 30 min bei 5 °C im Kühlschrank
- › Zugabe von 15 µL (7,5 µL) bei höherem Anteil an methylveresterten (u)GalA-OS bzw. 20 µL (10 µL) bei geringem Anteil an methylveresterten (u)GalA-OS 0,5 M Salzsäure (vgl. Anmerkung)
- › Vortexen und Verdünnung mit Acetonitril und Wasser (Endkonzentration an Acetonitril: 50 %) sowie Zugabe von Acarbose (IStd, Endkonzentration: 1 mM)
- › Analyse unveresterter uGalA-OS mittels UHPLC-DAD und bei ausgewählten Proben mit UHPLC-DAD/MS (TIC und SIM)

Anmerkung: Zur Kontrolle des pH-Werts vor und nach Zugabe der Natronlauge (pH = 12) sowie nach Zugabe der Salzsäure (pH = 5 - 6) wurde ein zusätzlicher Probenansatz mitgezogen, um Verdünnungseffekte zu vermeiden. Falls erforderlich, wurde die Menge an Salzsäure zur Neutralisation angepasst. Die Analyse wurde in Einfachbestimmung der doppelt extrahierten NLBS-Faktionen durchgeführt.

Ohne alkalische Hydrolyse

- › 1:2 Verdünnung je einer wässrigen NLBS-Faktion (vgl. Arbeitsvorschrift 8.8) pro Probe mit Acetonitril (Endkonzentration: 50 %)
- › Analyse methylveresterter uGalA-OS mittels UHPLC-DAD-MS (nur SIM)

Bedingungen UHPLC-PDA(-MS)

Säule	Acquity UPLC BEH Amid mit Vorsäule (1,7 µM; 5 x 2,1 mm, Waters)
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure B Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure
Gradient	

Tabelle V - 15: Gradientenprogramm zur Analyse der ungesättigten unveresterten Galacturonsäureoligosaccharide nach alkalischer Hydrolyse mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarray- und massenspektrometrischer Detektion, Eluent A: Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure

ZEIT / min	A / %	B / %
0,1	10	90
1,0	10	90
5,0	24	76
7,0	25	75
12,0	40	60
32,0	65	35
34,0	80	20
35,0	80	20
36,0	10	90
43,0	10	90

Tabelle V - 16: Gradientenprogramm zur Analyse der ungesättigten methyleveresterten Galacturonsäureoligosaccharide nach alkalischer Hydrolyse mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarray- und massenspektrometrischer Detektion, Eluent A: Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure

ZEIT / min	A / %	B / %
0,1	0	100
1,0	0	100
40,0	25	75
55,0	80	20
56,0	0	100
64,0	0	100

PDA-Detektion

190 - 350 nm

MS-Detektion

Ventilstellung 2 (MS): 2 - 40 min bzw. 2 - 64 min

ESI-Modus: negativ

Interface Temperatur: 350 °C

DL Temperatur: 250 °C

Nebulizing Gasfluss: 1,5 L/min

Heizblock: 200 °C

Drying Gasfluss: 15 L/min

TIC: 500 - 1520 (m/z), nur zur Analyse unveresterter ungesättigter GalacturonsäureoligosaccharideSIM: m/z entsprechender relevanter uGalA-OS
(vgl. Tabelle V - 17 und Tabelle V - 18)

Tabelle V - 17: Parameter zur massenspektrometrischen Detektion mittels Selected Ion Monitoring (SIM) zur Analyse der ungesättigten unveresterten Galacturonsäureoligosaccharide nach alkalischer Hydrolyse mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie, m/z = Masse-zu-Ladungsverhältnis, uGalA = ungesättigte Galacturonsäure, 2, 3, 4 ... = Polymerisierungsgrad

OLIGOSACCHARID	m/z	QUASIMOLEKÜLION
uGalA	175	[M-H] ⁻
uGalA ₂	351	[M-H] ⁻
uGalA ₅	440	[M-2H] ²⁻
uGalA ₃ / uGalA ₆	527	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₇	615	[M-2H] ²⁻
uGalA ₄ / uGalA ₈ / uGalA ₁₂	704	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻ / [M-3H] ³⁻
uGalA ₁₃	762	[M-3H] ³⁻
uGalA ₉	792	[M-2H] ²⁻
uGalA ₅ / uGalA ₁₀	880	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₁₁	968	[M-3H] ³⁻
uGalA ₃ / uGalA ₆ / uGalA ₉ / uGalA ₁₂	1056	[2M-H] ⁻ / [M-H] ⁻ / [2M-3H] ³⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₁₁	1144	[M-2H] ²⁻
Acarbose	645	[M-H] ⁻
	691	[M+Formiat] ⁻

Tabelle V - 18: Parameter zur massenspektrometrischen Detektion mittels Selected Ion Monitoring (SIM) zur Analyse der ungesättigten methylveresterten Galacturonsäureoligosaccharide mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie, m/z = Masse-zu-Ladungsverhältnis, uGalA = ungesättigte Galacturonsäure, $_{2,3,4,\dots}$ = Polymerisierungsgrad, $^{1,2,3,\dots}$ = Anzahl Methylester

OLIGO-SACCHARID	m/z	QUASI-MOLEKÜLION	OLIGO-SACCHARID	m/z	QUASI-MOLEKÜLION
uGalA ₂ ¹	365	[M-H] ⁻	uGalA ₂ ²	379	[M-H] ⁻
uGalA ₃ ¹ / uGalA ₆ ²	541	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₃ ³ / uGalA ₆ ⁶	569	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₃ ² / uGalA ₆ ⁴	555		-	-	-
uGalA ₇ ¹	1246 / 622	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₇ ⁵	650	
uGalA ₇ ²	1260 / 629		uGalA ₇ ⁶	657	[M-2H] ²⁻
uGalA ₇ ³	636	[M-2H] ²⁻	uGalA ₇ ⁷	664	
uGalA ₇ ⁴	643		-	-	-
uGalA ₈ ¹	710	[M-2H] ²⁻	uGalA ₈ ⁵	738	[M-2H] ²⁻
uGalA ₄ ¹ / uGalA ₈ ²	717	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₄ ³ / uGalA ₈ ⁶	745	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₈ ³	724	[M-2H] ²⁻	uGalA ₈ ⁷	752	[M-2H] ²⁻
uGalA ₄ ² / uGalA ₈ ⁴	731	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₄ ⁴ / uGalA ₈ ⁸	759	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₉ ¹	799	[M-2H] ²⁻	uGalA ₉ ⁶	834	
uGalA ₉ ²	806		uGalA ₉ ⁷	841	[M-2H] ²⁻
uGalA ₉ ³	813		uGalA ₉ ⁸	848	
uGalA ₉ ⁴	820		uGalA ₉ ⁹	855	
uGalA ₉ ⁵	827		-	-	-
uGalA ₁₀ ¹	887	[M-2H] ²⁻	uGalA ₅ ³ / uGalA ₁₀ ⁶	922	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₅ ¹ / uGalA ₁₀ ²	894	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₁₀ ⁷	929	[M-2H] ²⁻
uGalA ₁₀ ³	901	[M-2H] ²⁻	uGalA ₅ ⁴ / uGalA ₁₀ ⁸	936	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₅ ² / uGalA ₁₀ ⁴	908	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₁₀ ⁹	943	[M-2H] ²⁻
uGalA ₁₀ ⁵	915	[M-2H] ²⁻	uGalA ₅ ⁵ / uGalA ₁₀ ¹⁰	950	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₁₁ ¹	975	[M-2H] ²⁻	uGalA ₁₁ ⁷	1017	
uGalA ₁₁ ²	982		uGalA ₁₁ ⁸	1024	[M-2H] ²⁻
uGalA ₁₁ ³	989		uGalA ₁₁ ⁹	1031	
uGalA ₁₁ ⁴	996		uGalA ₁₁ ¹⁰	1038	
uGalA ₁₁ ⁵	1003		uGalA ₁₁ ¹¹	1045	
uGalA ₁₁ ⁶	1010		-	-	-
uGalA ₁₂ ¹	1063	[M-2H] ²⁻	uGalA ₁₂ ⁷	1105	[M-2H] ²⁻
uGalA ₆ ¹ / uGalA ₁₂ ²	1070	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₆ ⁴ / uGalA ₁₂ ⁸	1112	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₁₂ ³	1077	[M-2H] ²⁻	uGalA ₁₂ ⁹	1119	[M-2H] ²⁻
uGalA ₆ ² / uGalA ₁₂ ⁴	1084	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₆ ⁵ / uGalA ₁₂ ¹⁰	1126	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
uGalA ₁₂ ⁵	1091	[M-2H] ²⁻	uGalA ₁₂ ¹¹	1133	[M-2H] ²⁻
uGalA ₆ ³ / uGalA ₁₂ ⁶	1098	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻	uGalA ₆ ⁶ / uGalA ₁₂ ¹²	1140	[M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻

8.12 GEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄURE-OLIGOSACCHARIDE AUS CITRUSPEKTIN ALS STANDARDSUBSTANZEN

8.12.1 BILDUNG UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE

Enzymatische Hydrolyse

- › Lösen von 15 g Pektin (Pectin Classic CU 201 von Herbstreith & Fox) in 600 mL Wasser (= 25 mg/mL) in 1 L-Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator (30 °C, 120 rpm) über Nacht
- › Abfüllen von 500 µL der Pektinlösung in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß für Blindwert
- › Zugabe von 600 µL PL (= 40 µL Enzym/g Pektin, kommerzielles Enzympräparat)
- › Enzymatische Hydrolyse für 4 h bei 45 °C im Schüttelinkubator (120 rpm)
- › Inaktivierung auf Heizrührer für 10 min nach Erreichen von 90 °C bzw. 5 min im Wasserbad bei 95 °C (Blindwert)
- › Abkühlen im Eisbad
- › Abzentrifugieren (15 min, 5.000 rpm bzw. Blindwert: 5 min, 13.200 rpm) des Rückstands
- › Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse durch Messung einer 1:10-Verdünnung des Überstands und Zugabe von Raffinose (Endkonzentration: 10 µM) mittels HPAEC-PAD
- › Einengung des Überstands am Rotationsverdampfer (45 °C)
- › Überführung in 50 mL-Tube und Zugabe der vierfachen Menge Ethanol (80 %)
- › Präzipitation für 1 - 2 h
- › Zentrifugieren (10 min, 5.000 rpm) und Abtrennung des Rückstands
- › Einengen des Überstands am Rotationsverdampfer (45 °C) und Gefriertrocknen

Anmerkung: Durchführung der enzymatischen Hydrolyse erfolgte insgesamt neunmal. Die jeweils erhaltenen Überstände wurden vor dem Gefriertrocknen vereint.

Kontrolle mittels HPAEC-PAD

Säule	Dionex CarboPac PA200 mit Vorsäule (5,5 µm; 50 x 3 mm, Thermo Scientific)
Säulentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Fluss	0,4 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser B 100 mM Natronlauge C 100 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat

Gradient

Tabelle V - 19: Gradientenprogramm zur Kontrolle der enzymatischen Hydrolyse zur Bildung ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M Natronlauge, Eluent C: 0,1 M Natronlauge + 0,5 M Natriumacetat

ZEIT / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
20,0	0	80	20
50,0	0	0	100
75,0	0	0	100

PAD-Detektion

mit Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode bei (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)

Alkalische Hydrolyse

- › Versetzen von 4 mL gefriergetrocknetem Überstand mit 196 mL Reinstwasser in 250 mL-Rundkolben (= 1:50-Verdünnung)
- › Kühlen der Lösung im Kühlschrank (5 °C) für 1 - 2 h
- › Zugabe von 10 mL Natronlauge (1M, entspricht 50 mM Natronlauge) und Überprüfung des pH-Wertes mit pH-Papier (pH ≈ 12)
- › Hydrolyse für 30 min im Kühlschrank (5 °C) unter Schwenken des Kolbens alle 5 min
- › Neutralisieren durch Zugabe von 10 mL Salzsäure (0,5 M) und Überprüfung des pH-Wertes mit pH-Papier (pH ≈ 4 - 6)
- › Kontrolle der alkalischen Hydrolyse durch Messung einer 1:20-Verdünnung des Überstands in Acetonitril (30 %) mittels UHPLC-PDA
- › Einengen des Hydrolysats am Rotationsverdampfer (45 °C) und Überführung in 50 mL-Tube
- › Abzentrifugieren des Rückstands (10 min, 5.000 rpm) und Gefriertrocknung des Überstands

Anmerkung: Durchführung der alkalischen Hydrolyse erfolgte insgesamt zehnmal. Die jeweils erhaltenen Überstände wurden vor dem Gefriertrocknen vereint.

Kontrolle mittels UHPLC-PDA

Säule	Acquity UPLC BEH Amid mit Vorsäule (1,7 µM; 5 x 2,1 mm, Waters)
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	10 µL
Fluss	0,4 mL/min

Fließmittel	A	Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure
	B	Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure

Gradient

Tabelle V - 20: Gradientenprogramm zur Kontrolle der alkalischen Hydrolyse zur Bildung ungesättigten unveresterter Galacturonsäureoligosaccharide mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarray-Detektion, Eluent A: Acetonitril:Reinstwasser (20:80) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril:Reinstwasser (80:20) + 10 mM Ammoniumformiat + 0,2 % Ameisensäure

ZEIT / min	A / %	B / %
0,1	0	100
1,0	0	100
15,0	9	91
35,0	80	20
36,0	80	20
37,0	0	100
45,0	0	100

PDA-Detektion 190 - 400 nm

8.12.2 PRÄPARATIVE ISOLIERUNG DER UNGESÄTTIGTEN GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE

- › Verdünnung des gefriergetrockneten Überstands 1:2 mit Reinstwasser
- › Fraktionierung mittels HPLC-UV an präparativer BEH-Amid-Säule
- › Auffangen von zwölf Fraktionen
- › Einengen der Fraktionen an Rotationsverdampfer (45 °C)
- › Gefrieretrocknen
- › Aufnehmen in Wasser und erneute Gefrieretrocknung

Bedingungen HPLC-UV

Säule	XBridge BEH Amide mit Vorsäule (130 Å; 5 µm; 10 x 10 mm, Waters), präparativ
Säulentemperatur	50 °C
Injektionsvolumen	100 µL (µL pick-up)
Lösung Autosampler	30 % Acetonitril
Fluss	5 mL/min
Fließmittel	A Reinstwasser + 0,2 % Ameisensäure B Acetonitril + 0,2 % Ameisensäure

Gradient

Tabelle V - 21: Gradientenprogramm zur Fraktionierung der ungesättigten unveresterten Galacturonsäureoligosaccharide mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion, Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: Acetonitril jeweils mit 0,2 % Ameisensäure

ZEIT / min	A / %	B / %
0	30	70
30	65	35
35	70	30
37	70	30
38	30	70
50	30	70

UV-Detektion

235 nm

Fraktionierung

Tabelle V - 22: Stellung des Fraktionierventils zur Fraktionierung der ungesättigten unveresterten Galacturonsäureoligosaccharide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion

FRAKTION	STARTZEIT / min	VENTIL- STELLUNG	ENDZEIT / min	VENTIL- STELLUNG
1	7,3	1	8,3	16 (= Abfall)
2	9,8	2	10,9	
3	12,3	3	14,2	
4	15,8	4	17,7	
5	18,6	5	20,7	
6	21,3	6	23,3	
7	24,1	7	25,8	
8	26,3	8	27,9	
9	28,5	9	29,7	
10	30,4	10	31,4	
11	32,1	11	32,8	
12	33,3	12	34,1	

8.12.3 CHARAKTERISIERUNG ISOLIERTER UNGESÄTTIGTER GALACTURONSÄUREOLIGOSACCHARIDE

Reinheitsbestimmung und Strukturcharakterisierung mittels NMR

- › Einwaage von je einmal 1 mg präparativ isolierter unveresterter uGalA-OS (vgl. Arbeitsvorschrift 8.12.2)
- › Zweimaliges Lösen in je 200 µL Deuteriumoxid und Gefriertrocknen
- › Aufnahme in Deuteriumoxid mit Acetanilid (0,5 mg/mL) zu Endkonzentration von 1 bzw. 2 mg/mL und Zugabe von 0,5 bzw. 1 µL Aceton
- › Messung mittels NMR

Bedingungen NMR

- Referenzierung δ_H (Aceton) = 2,22 ppm; δ_C (Aceton) = 30,89 ppm
 δ_H (Acetanilid) = 2,17 ppm
- Pulssequenzen alle Experimente wurden mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt

Tabelle V - 23: Parameter zur Reinheitsbestimmung und Strukturanalyse isolierter ungesättigter Homogalacturonanoligosaccharide mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

EXPERIMENT	PULSPROGRAMM	TIME-DOMAIN (TD, F2 x F1)	SCANANZAHL (NS)	NON-UNIFORM SAMPLING (NUS)
1H	zg30	-	64	ohne 50 %
HSQC	hsqcedetgp	1024 x 1024	16	
HSQC-TOCSY	hsqcetgpml	2048 x 2048	32	
HMBC	hmbcgplndqf	2048 x 2048	16	
H2BC	h2bcetgpl3	2048 x 256	64	

Reinheitsbestimmung und Identifizierung mittels UHPLC-PDA-MS

- › Lösen der präparativ isolierten unveresterten uGalA-OS (vgl. Arbeitsvorschrift 8.12.2) je einmal in Wasser (1 mg/mL)
- › Verdünnung mit Acetonitril (Endkonzentration: 50 %) zu 100 μ M-Lösung
- › Messung mittels UHPLC-DAD-MS (Bedingungen vgl. Arbeitsvorschrift 8.11.2.2, Tabelle V - 15 und Tabelle V - 17)

Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolysen und TFA-Hydrolyse

- › Lösen der präparativ isolierten unveresterten uGalA-OS (vgl. Arbeitsvorschrift 8.12.2) je einmal in Wasser (1 mg/mL)
- › Pipettieren von zweimal 5 μ L in je ein 1,5 mL-Glasvial und Evaporieren
- › Durchführung von Methanolysen und TFA-Hydrolyse sowie anschließender Analyse der Monosaccharide mittels HPAEC nach Arbeitsvorschrift 8.10.1 für löslicher Oligosaccharide in kleinerem Ansatz mit je 250 μ L methanolischer Salzsäure und TFA-Lösung

9 ANHANG

9.1 ABBILDUNGEN

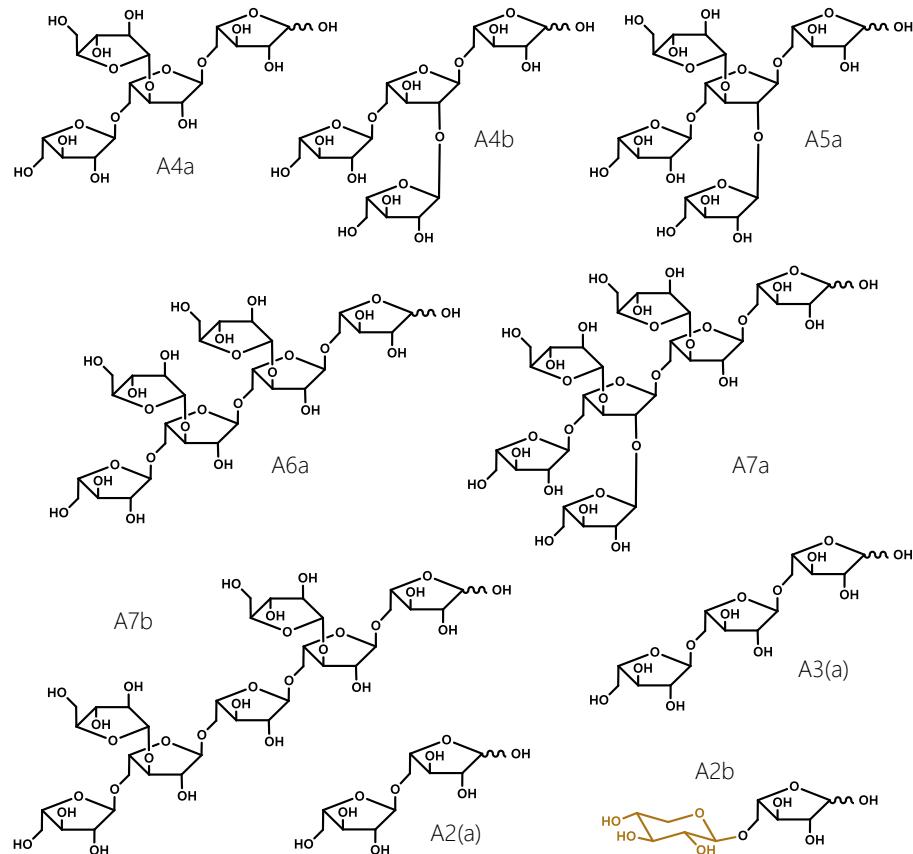


Abbildung A - 1: Strukturen und Nomenklatur der für Erbsenschalen und Karottentrester relevanten Arabino-oligosaccharide, schwarz: Arabinofuranose, braun: Xylopyranose (nach Wefers & Bunzel, 2016a)

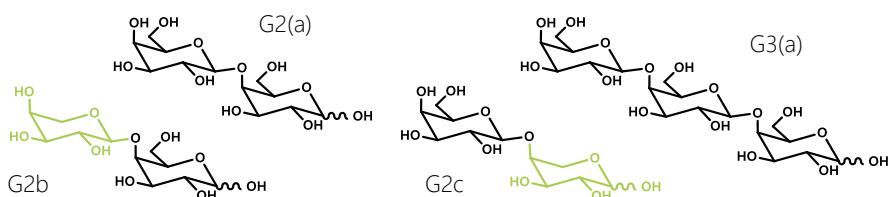


Abbildung A - 2: Strukturen und Nomenklatur der für Erbsenschalen und Karottentrester relevanten (Arabino-)Galactooligosaccharide, schwarz: Galactopyranose, grün: Arabinopyranose (nach Wefers & Bunzel, 2016a)

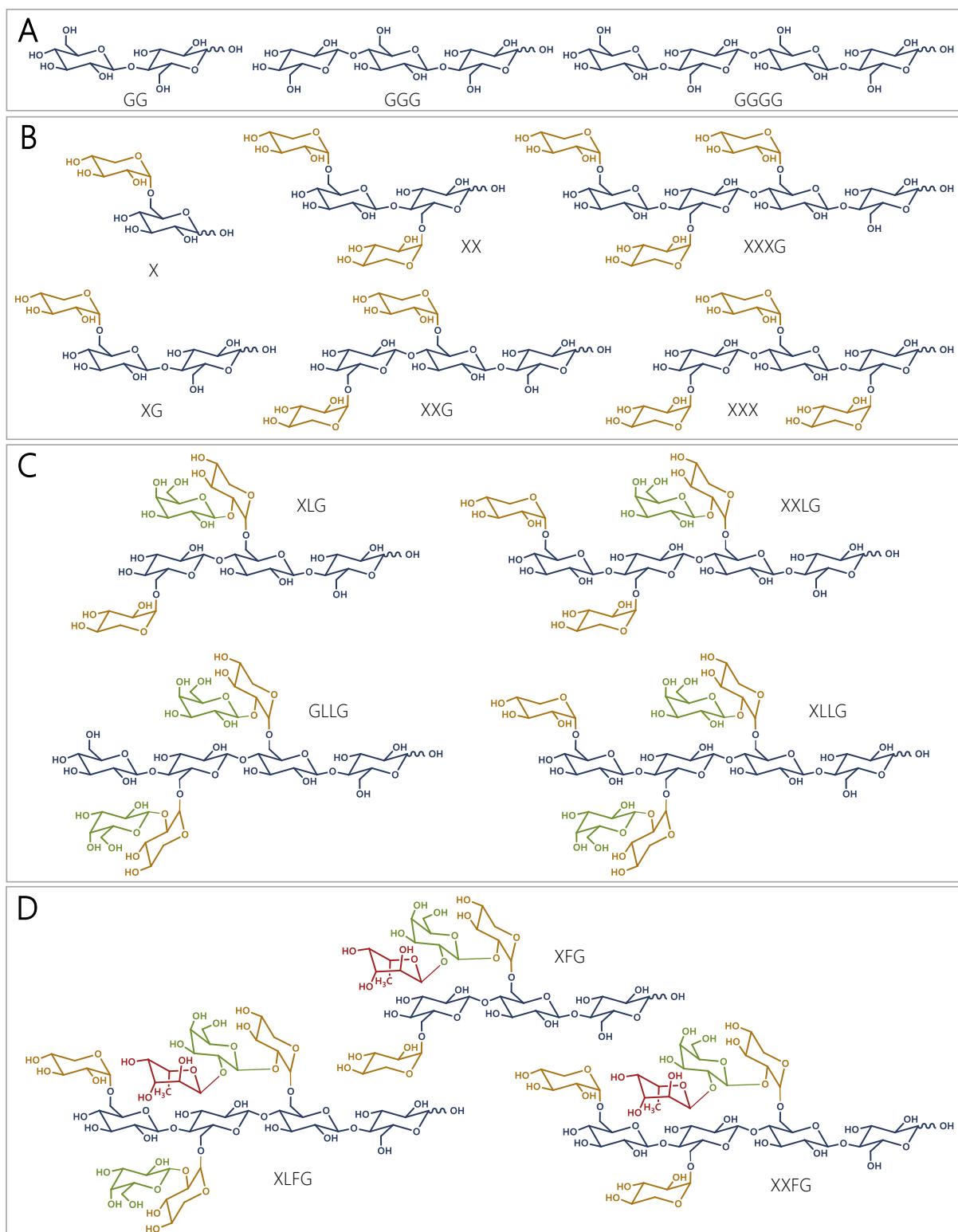


Abbildung A - 3: Strukturen und Nomenklatur der für Erbsenschalen und Karottentrester relevanten Xyloglucanoligosaccharide: Glucanoligosaccharide (A), Xyloglucanoligosaccharide (B), galactosyierte (C) und fucosyierte Xyloglucanoligosaccharide (D), blau: Glucopyranose, braun: Xylopyranose, grün: Galactopyranose, rot: Fucopyranose (nach Steck und Mitarbeitenden (2021) und Fry und Mitarbeitenden (1993))

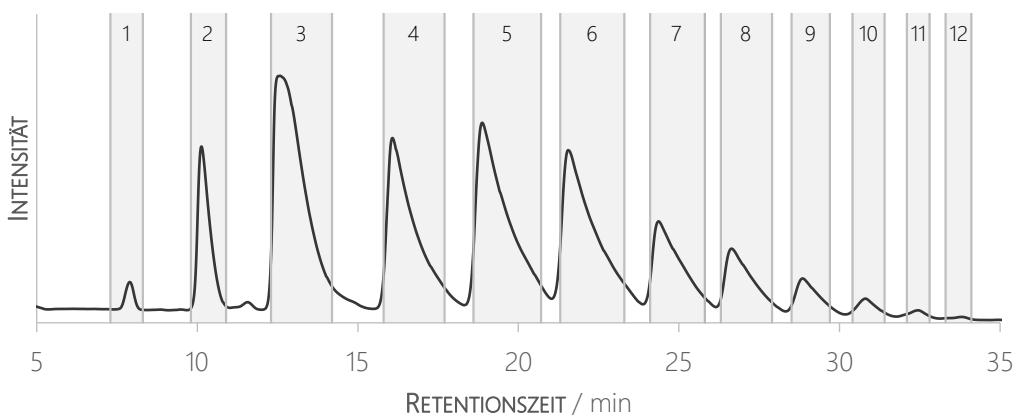


Abbildung A - 4: Einteilung der Fraktionen (1 - 12) zur präparativen Isolierung der unveresterten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide entsprechend der Signale im Chromatogramm nach Trennung auf Amidphase und Detektion bei 235 nm

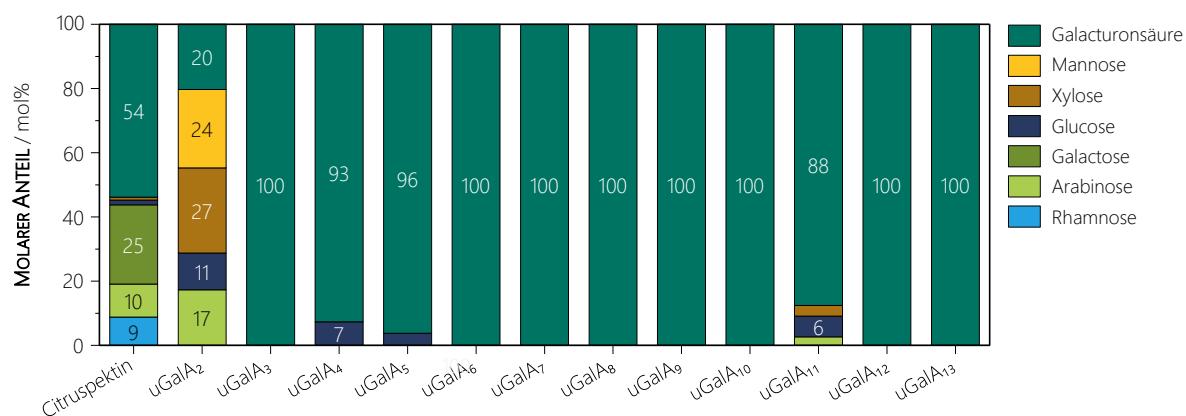


Abbildung A - 5: Monosaccharidzusammensetzung des Citruspektins sowie der daraus isolierten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) nach Methanolysen und Trifluoressigsäure-Hydrolyse ($n = 2$), $uGalA_{2,3}, \dots = uGalA$ -OS mit Polymerisierungsgrad von 2, 3, ...

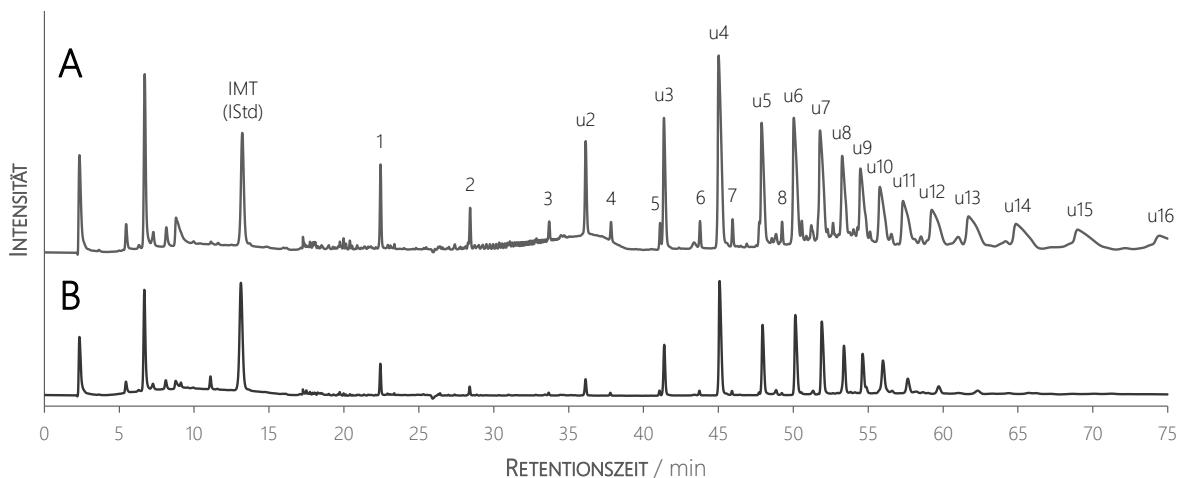


Abbildung A - 6: Chromatogramme des mittels Pektinlyase hydrolysierten Citruspektins nach Analyse mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion vor (A) und nach (B) Präzipitation in 80%igem Ethanol, IMT = Isomaltotriose, IStd = interne Standardsubstanz, 1, 2, ... = Mono-, Di-, ... galacturonsäure, u2, u3, ... = ungesättigte Di-, Tri-, ... galacturonsäure

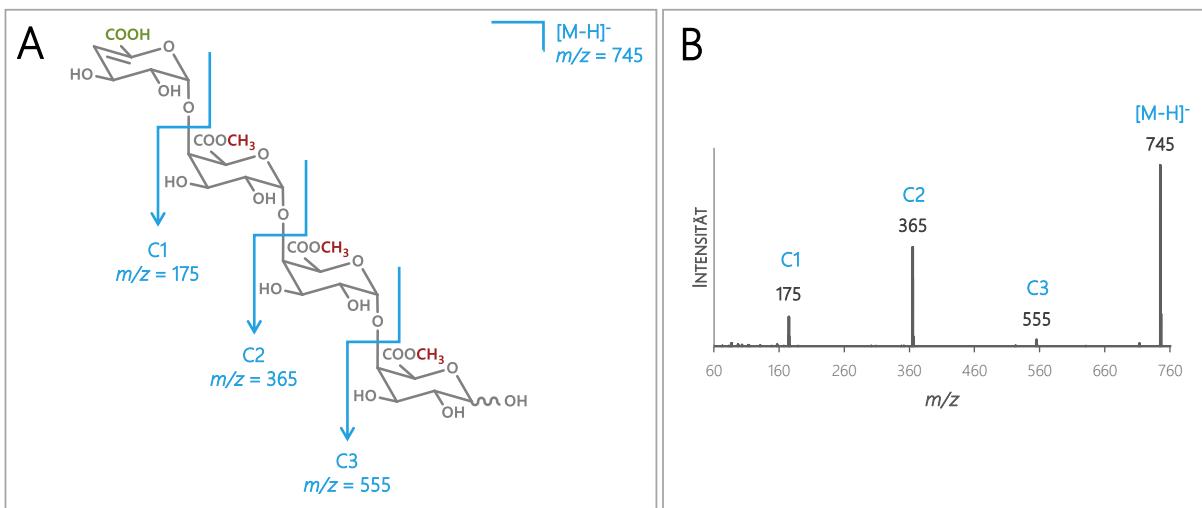


Abbildung A - 7: Fragmentierung der partiell veresterten ungesättigten Tetragalacturonsäure mittels Tandem-Massenspektrometrie, dargestellt anhand der Struktur (A) und des Massenspektrums (B), rot: Methylgruppen, grün: freie Carboxygruppe, m/z = Masse-zu-Ladungsverhältnis, $[M-H]^-$ = Quasimolekülion, C1, 2, 3 = Fragmente nach Domon und Costello (1988)

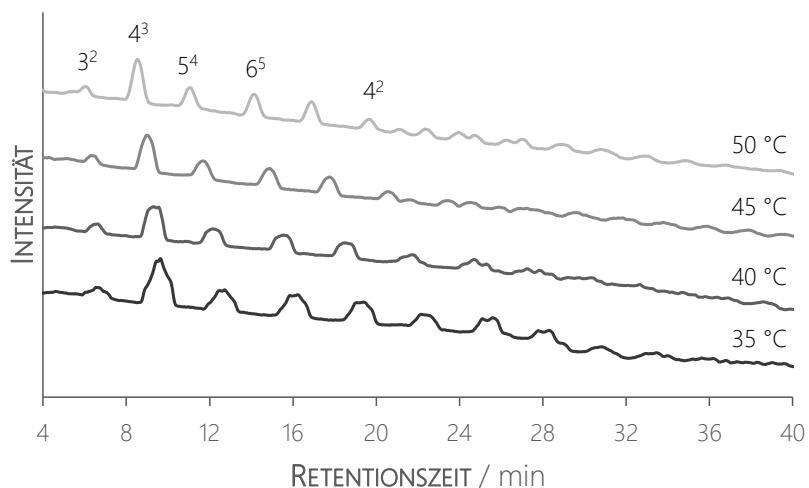


Abbildung A - 8: Vergleich der chromatographischen Trennung der veresterten ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) resultierend aus der enzymatischen Hydrolyse mit Pektinlyase des Citruspektins mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarraydetektor (235 nm) bei verschiedenen Temperaturen (35, 40, 45 und 50 °C), 3, 4, ... = Polymerisierungsgrad der uGalA OS, 2, 3, ... = Anzahl der Methylester

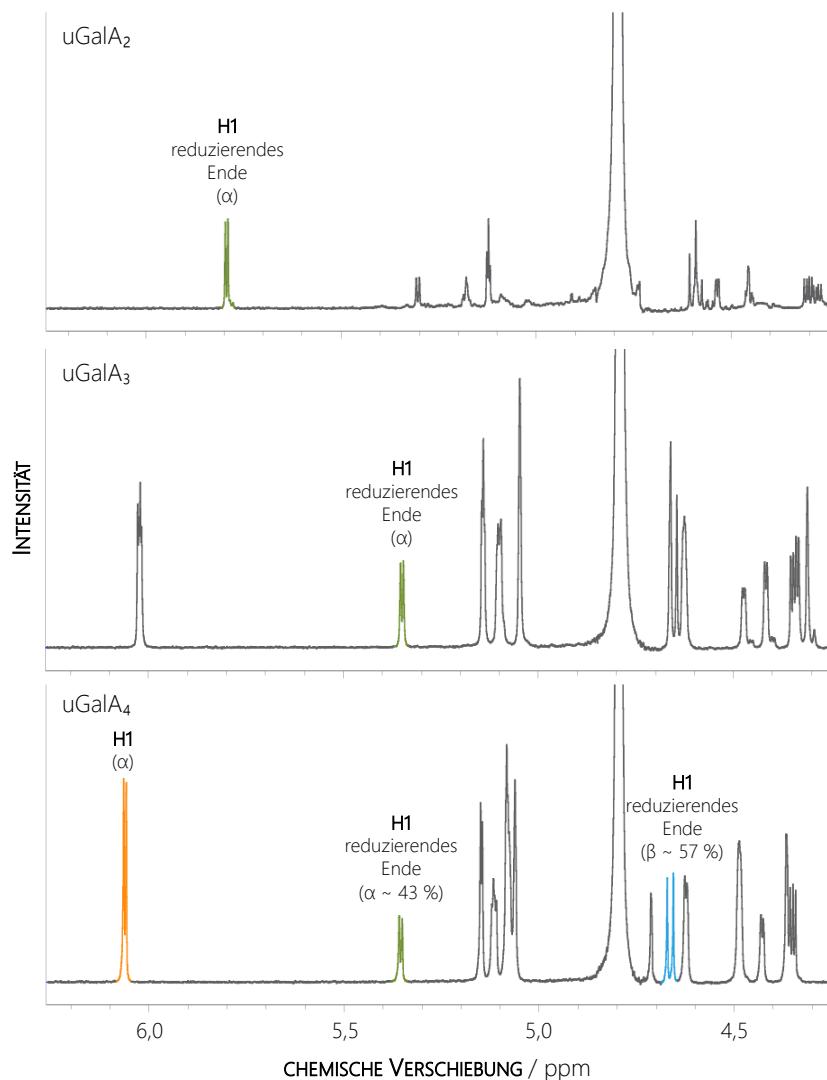


Abbildung A - 9: Ausschnitte der mittels Kernspinresonanzspektroskopie aufgenommenen ¹H-Spektren der ungesättigten Di- (uGalA₂), Tri- (uGalA₃) und Tetragalacturonsäure (uGalA₄) mit farblich hervorgehobenen zur Quantifizierung ausgewählten H1-Signalen und dem Gleichgewicht der α - und β -Anomere, orange: H1-Signal der Galacturonsäureeinheit neben dem nicht-reduzierenden Ende, grün/blau: H1-Signal des α -/ β -Anomers der Galacturonsäureeinheit am reduzierenden Ende

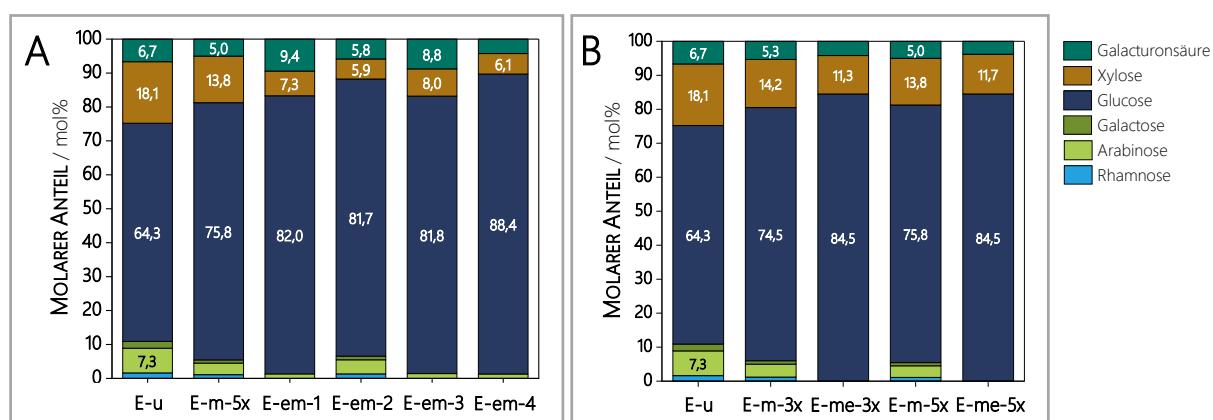


Abbildung A - 10: Monosaccharidzusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe nach Schwefelsäurehydrolyse der enzymatisch-mechanisch (E-em-1/2/3/4) (A) bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) (B) im Vergleich zur unbehandelten (E-u) und den mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-m-3x/5x) ($n = 2$) (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023))

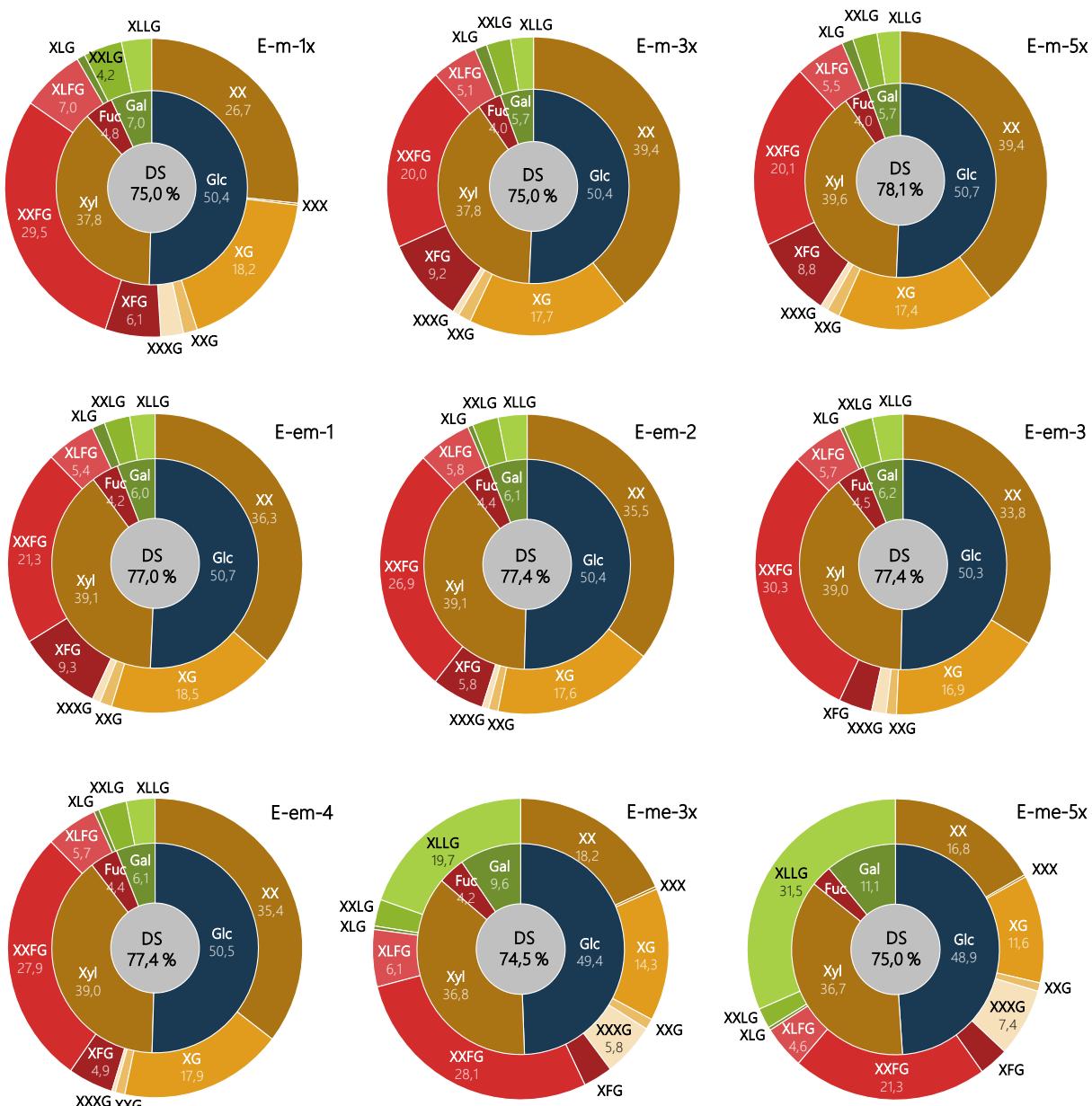


Abbildung A - 11: Molare Verteilung (mol%) der aus den unlöslichen Ballaststoffen der mechanisch (E-m-1x/3x/5x), enzymatisch-mechanisch (E-em-1/2/3/4) bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (außen) mit den daraus errechneten Monomerrzammensetzungen in mol% (Mitte) und Substitutionsgraden (DS, innen) ($n = 2$). XX, XG, ... = Bezeichnung der Xyloglucanoligosaccharide nach Nomenklatur von Fry und Mitarbeitenden (1993). Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Glc = Glucose, Xyl = Xylose (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023) und Verena Haitz (2024))

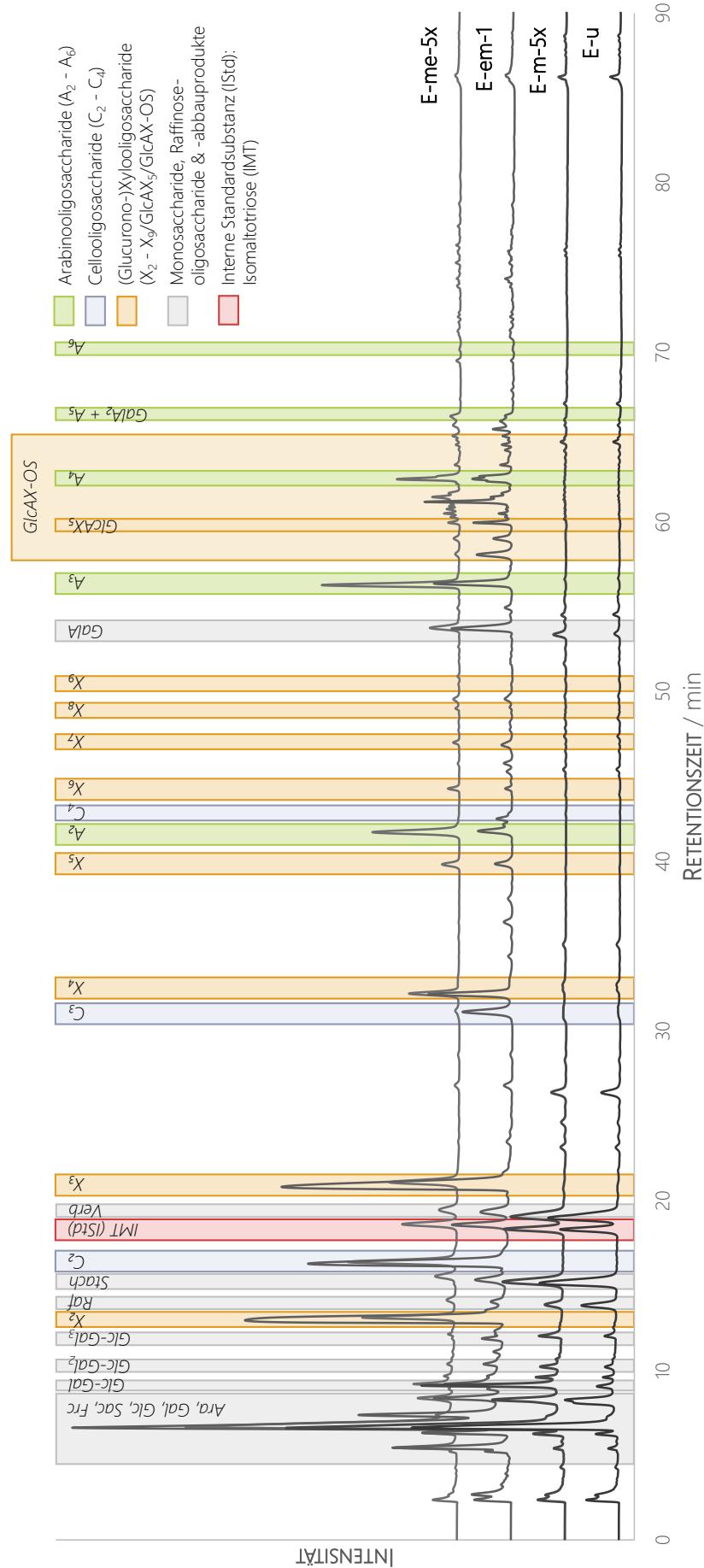


Abbildung A - 12: Mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion aufgenommene Chromatogramme der wässrig extrahierten niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-5x), enzymatisch-mechanisch (E-em-1) bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-5x), Ara = Arabinose, Frc = Fructose, Gal = Galactose, GalA = Galacturonsäure, Glc = Glucose, GlcA = Glucuronsäure, Sac = Saccharose, Raf = Raffinose, Stach = Stachyose, Verb = Verbascose, 2 - 9 = Polymerisierungsgrad

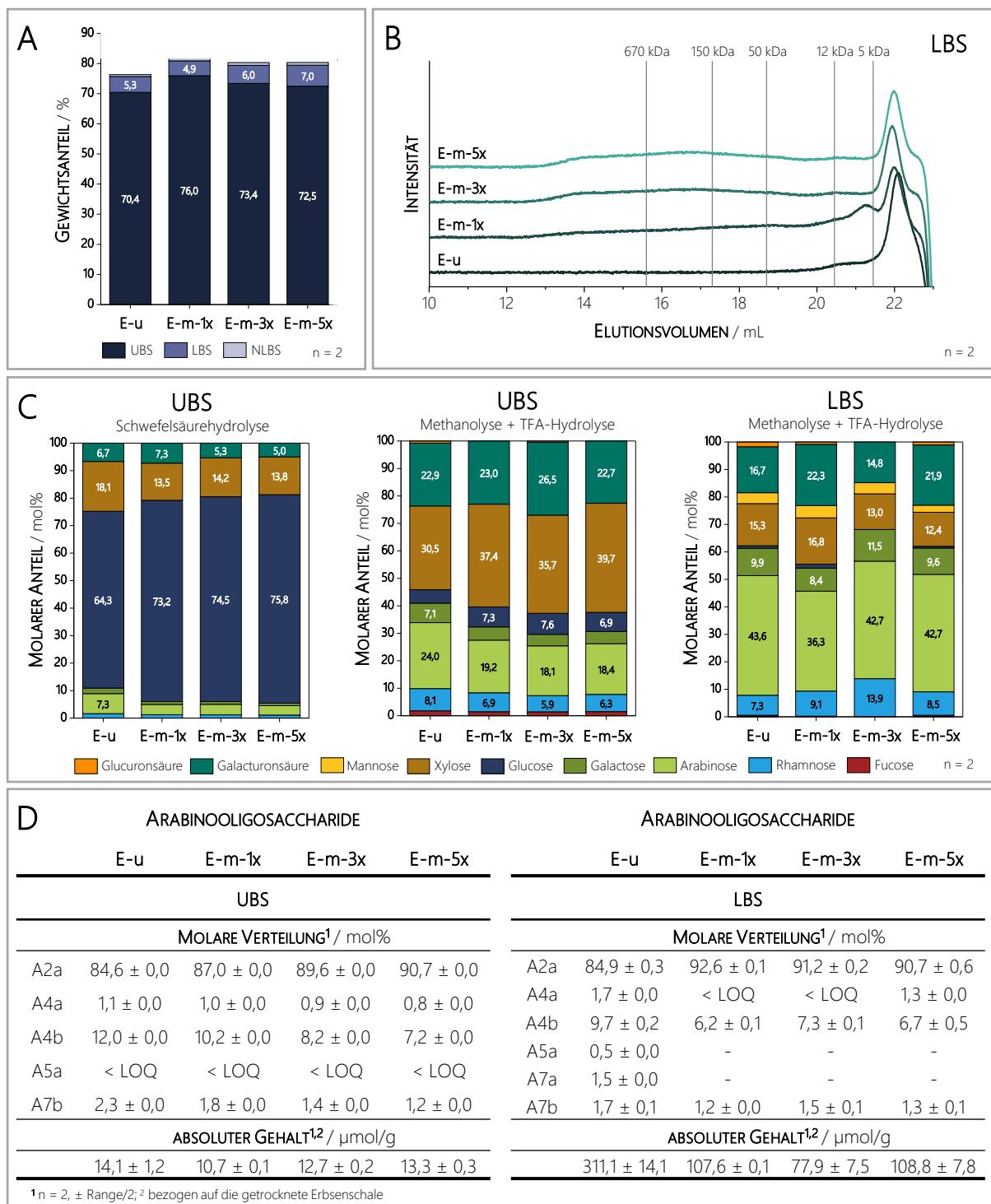


Abbildung A - 13: Ballaststoffanteile bezogen auf die getrocknete Erbsenschale (A), gemittelte Molekulargewichtsverteilung der löslichen Ballaststoffe (LBS) mit Dextransubstanzen (5, 12, 50, 150 und 670 kDa) als Molekulargewichtsmarker (B), Monosaccharidzusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe (UBS), der LBS und der niedermolekularen, löslichen Ballaststoff (NLBS)-Fraktionen (C), molare Verteilung und absoluter Summengehalt enzymatisch freigesetzter Arabinoooligosaccharide (D) der unbehandelten (E-u) und mechanisch behandelten Erbsenschalen (E-m-1x/3x/5x), A2a - A7b = Arabinobiase bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1), LOQ = Bestimmungsgrenze, n = Anzahl an Messungen (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023))

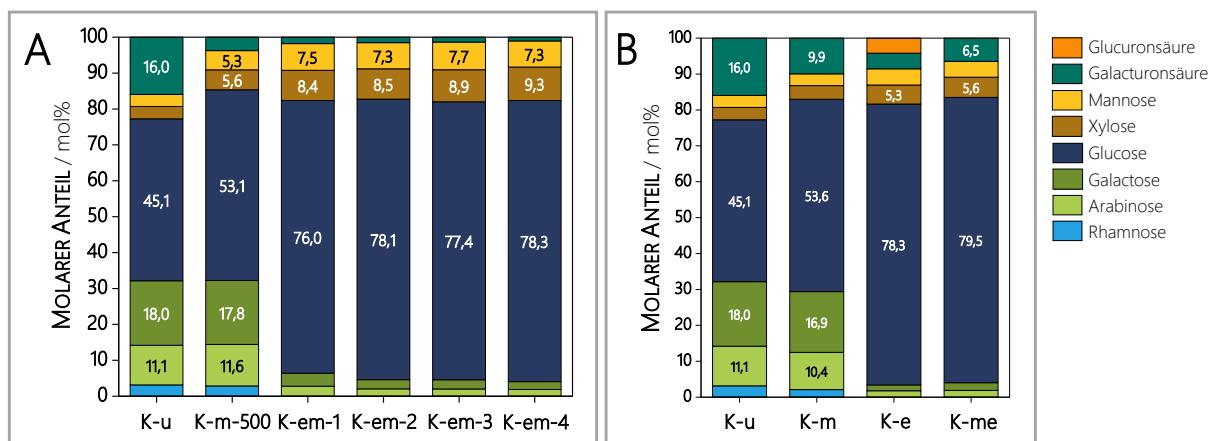


Abbildung A - 14: Monosaccharidzusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe nach Schwefelsäurehydrolyse der enzymatisch-mechanisch (K-em-1/2/3/4) (A) bzw. enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) (B) im Vergleich zum unbehandelten (K-u) und mechanisch behandelten Karottentrester (K-m-500 bzw. K-m) ($n = 2$)

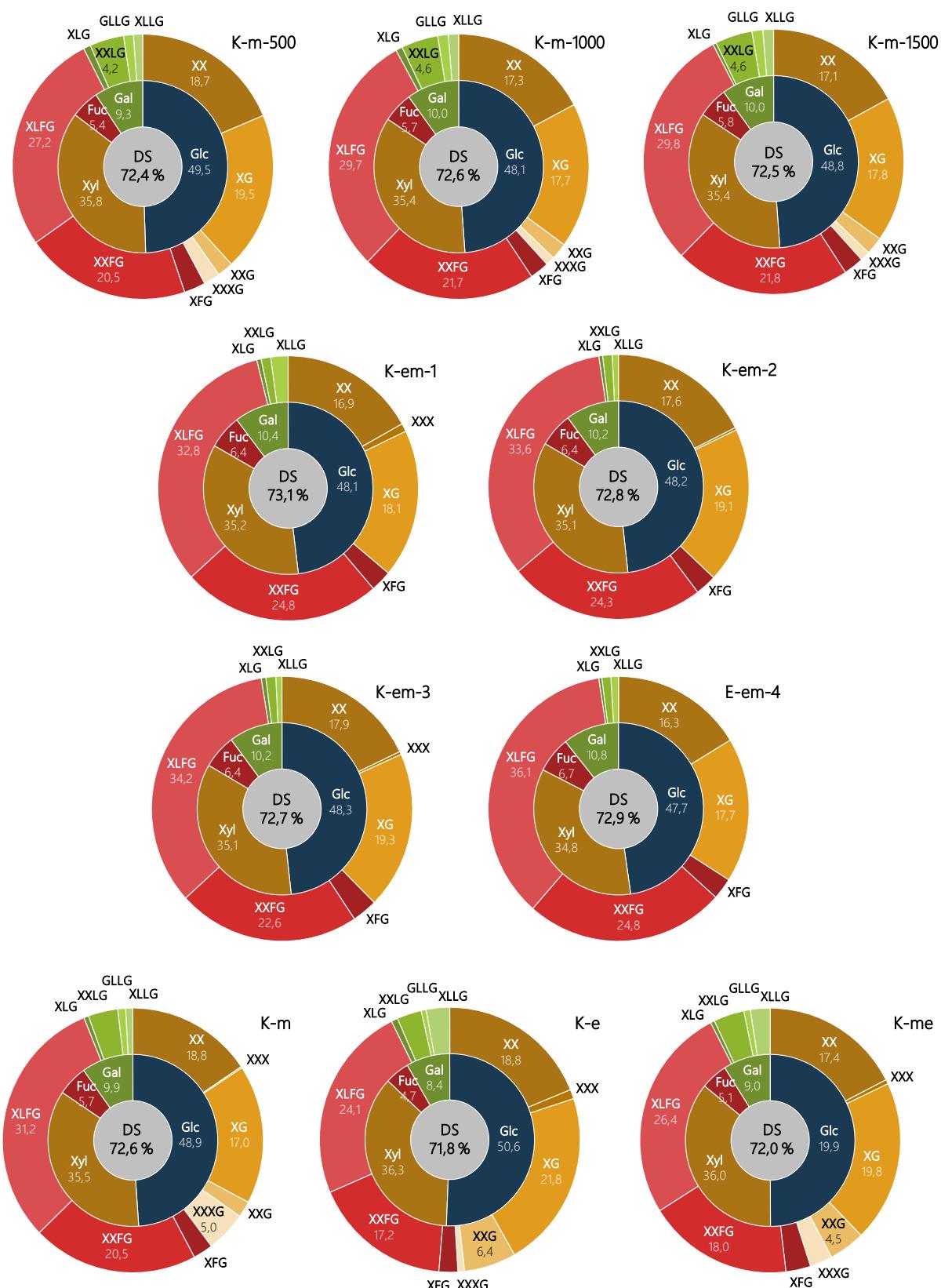


Abbildung A - 15: Molare Verteilung (mol%) der aus den unlöslichen Ballaststoffen der mechanisch (K-m/K-m-500/1000/1500), enzymatisch-mechanisch (K-em-1/2/3/4), enzymatisch (K-e) bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (außen) mit den daraus errechneten Monomerzusammensetzungen in mol% (Mitte) und Substitutionsgraden (DS, innen) ($n = 2$), XX, XG, ... = Bezeichnung der Xyloglucanoligosaccharide nach Nomenklatur von Fry und Mitarbeitenden (1993), Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Glc = Glucose, Xyl = Xylose

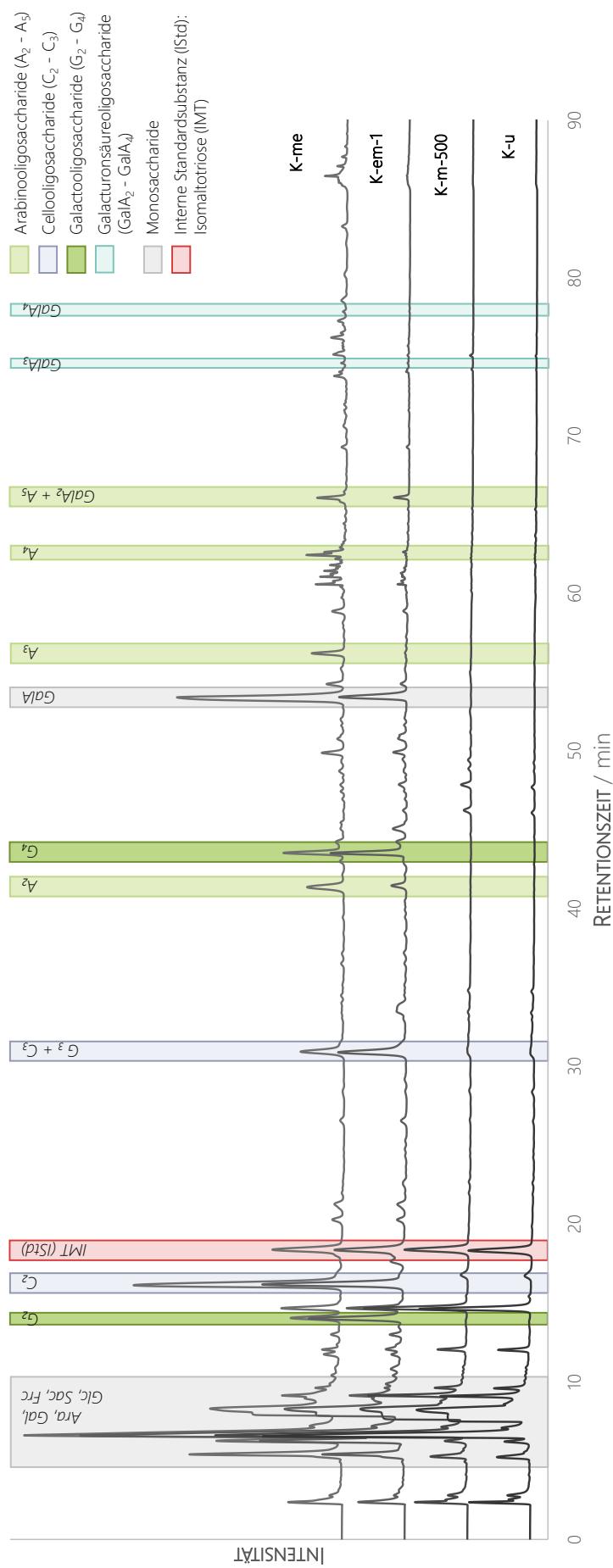


Abbildung A - 16: Mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion aufgenommene Chromatogramme der wässrig extrahierten niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (K-u), enzymatisch (K-em-1) bzw. mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me). Ara = Arabinose, Frc = Fructose, Gal = Galactose, GalA = Galacturonsäure, Glc = Glucose, Sac = Saccharose, 2 - 5 = Polymerisationsgrad

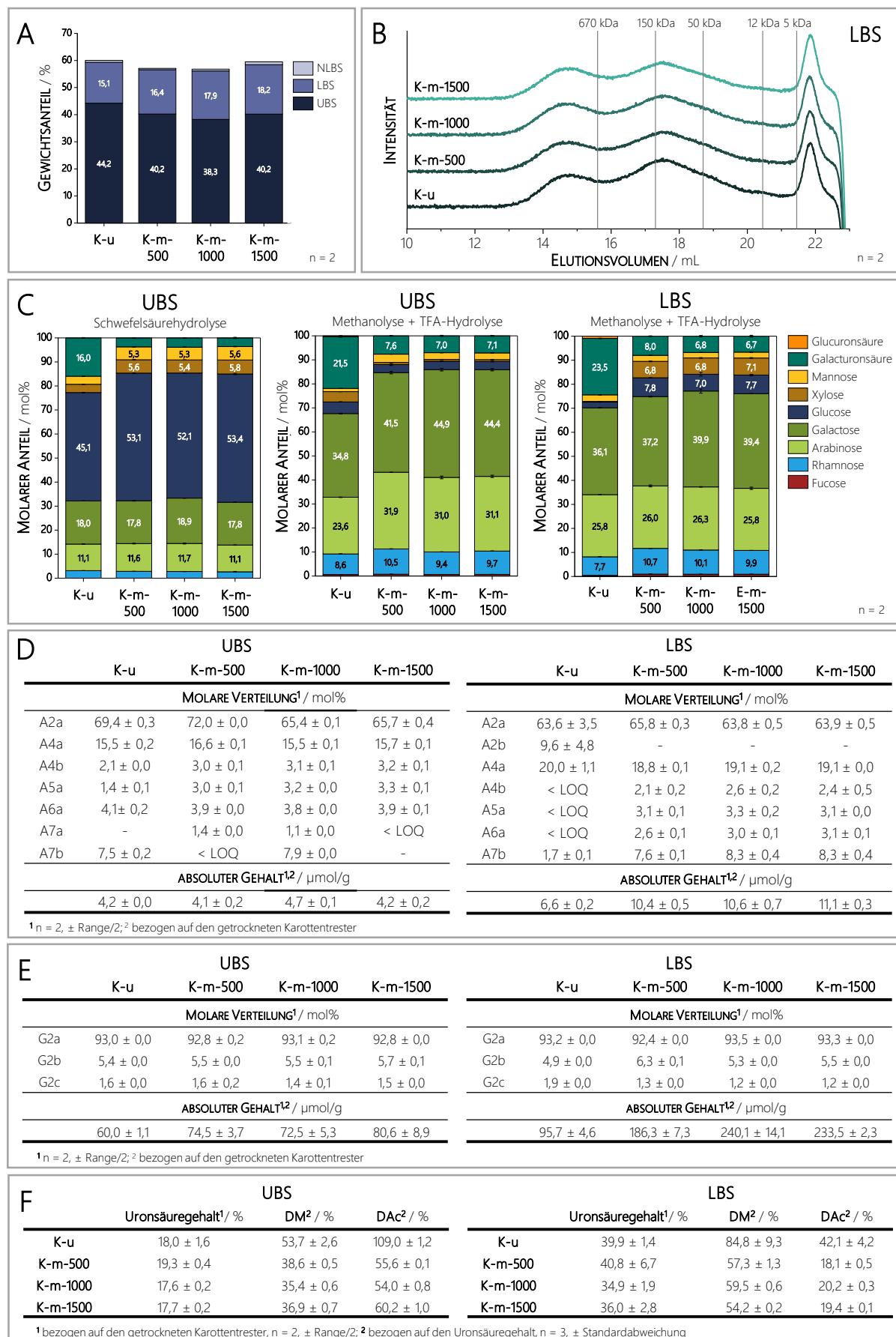


Abbildung A - 17: Ballaststoffanteile bezogen auf den getrockneten Karottentrester (A), gemittelte Molekulargewichtsverteilung der löslichen Ballaststoffe (LBS) mit Dextransubstanzen (5, 12, 50, 150 und

670 kDa) als Molekulargewichtsmarker (B), Monosaccharidzusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe (UBS), LBS und niedermolekularen, löslichen Ballaststoff (NLBS)-Fraktionen (C), molare Verteilung und absoluter Summengehalt enzymatisch freigesetzter Arabino- (D) bzw. (Arabino-)Galactooligosaccharide (E) sowie Gehalt polymergebundener Uronsäuren, Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrad (DAc) (F) der unbehandelten (K-u) und mechanisch behandelten Karottentrester (K-m-500/1000/1500), A2a - A7b = Arabinobiose bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1), G2a - G2c = (Arabino-)Galactobiose (vgl. Abbildung A - 2), LOQ = Bestimmungsgrenze, n = Anzahl an Messungen

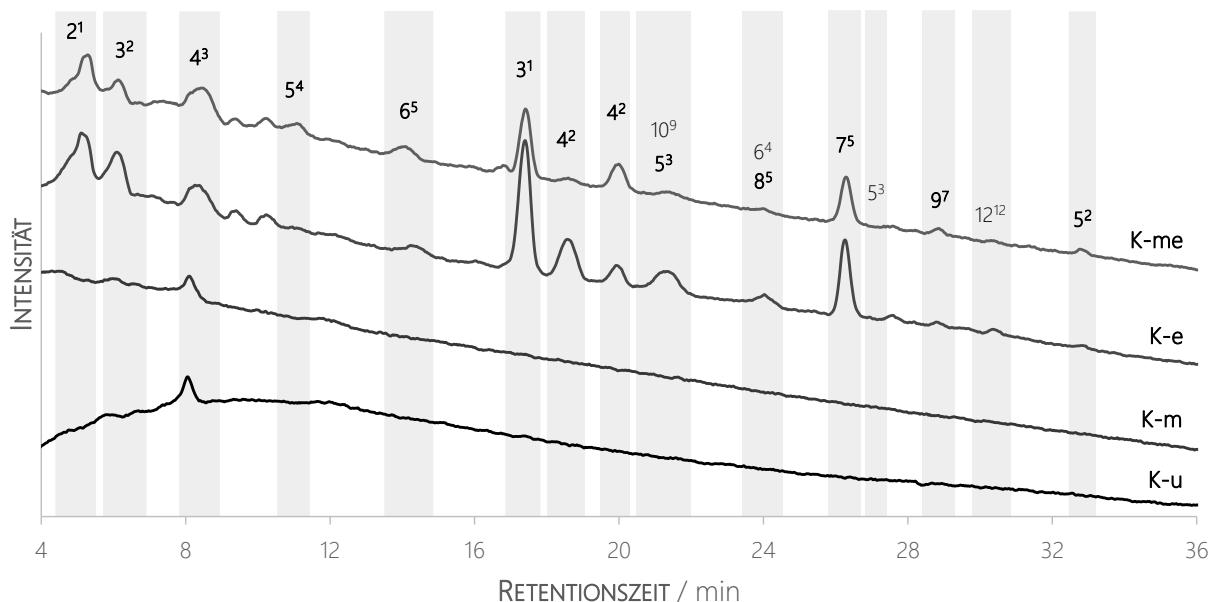


Abbildung A - 18: Ausschnitte der Chromatogramme zur Analyse veresteter ungesättigter Galacturonsäure-oligosaccharide (uGalA-OS) aus den niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me) mit der entwickelten Profilingmethode mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Photodiodenarraydetektor und Massenspektrometrie, 2, 3, 4, ... = Polymerisationsgrad der ungesättigten Galacturonsäureoligosaccharide, 2³, 3⁴, ... = Anzahl der Methylester; 5³, 6⁴, 10⁹ und 12¹² nur in Spuren nachweisbar

9.2 TABELLEN

Tabelle A - 1: Übersicht und Bezeichnung der analysierten (un)behandelten Erbsenschalen und Karottentrester

BEHANDLUNG	BEZEICHNUNG	MIKROFLUIDISIERUNG	ZUSAMMENSETZUNG ENZYMMISCHUNG / %			
			ERBSENSCHALE			
			CELLULASE	XYLANASE	POLYGALAC-TURONANASE	ARABINANASE
keine	E-u	-			-	
mechanisch ¹	E-m-1x	1 + 1 Durchläufe mit 1750 bar				
	E-m-3x	1 + 3 Durchläufe mit 1750 bar	-			
	E-m-5x	1 + 5 Durchläufe mit 1750 bar				
enzymatisch-mechanisch ^{1, 2}	E-em-1	1 + 5 Durchläufe mit 1750 bar	50,0	5,0	22,5	22,5
	E-em-2		50,0	45,0	2,5	2,5
	E-em-3		70,0	5,0	12,5	12,5
	E-em-4		50,0	25,0	12,5	12,5
mechanisch-enzymatisch ^{1, 3}	E-me-3x	1 + 3 Durchläufe mit 1750 bar	50,0	-	-	50,0
	E-me-5x	1 + 5 Durchläufe mit 1750 bar				
KAROTTENTRESTER						
			CELLULASE	POLYGALAC-TURONANASE	ARABINANASE	GALACTANASE
keine	K-u	-			-	
mechanisch ¹	K-m-500	1 Durchlauf mit 500 bar				
	K-m-1000	1 Durchlauf mit 1000 bar	-			
	K-m-1500	1 Durchlauf mit 1500 bar				
enzymatisch-mechanisch ^{1, 2}	K-em-1	1 Durchlauf mit 500 bar	5,0	90,0	2,5	2,5
	K-em-2		47,5	5,0	23,8	23,8
	K-em-3		5,0	47,5	23,8	23,8
	K-em-4		33,3	33,3	16,7	16,7
			CELLULASE	PEKTINLYASE	ARABINANASE	
mechanisch ⁴	K-m	1 Durchlauf mit 500 bar			-	
enzymatisch ⁵	K-e	-	33,3	33,3	33,3	
mechanisch-enzymatisch ^{4, 5}	K-me	1 Durchlauf mit 500 bar				

¹ Mikrofluidizer®, LM20² Enzym:Substrat-Verhältnis: 5 %, 30 min, 50 °C, Enzymaktivierung: 10 min 80 °C³ Enzym:Substrat-Verhältnis: 2 %, 30 min, 50 °C, Enzymaktivierung: 10 min 95 °C⁴ Hochdruckhomogenisator, Panda 2K⁵ Enzym:Substrat-Verhältnis: 6 %, 30 min, 45 °C, Enzymaktivierung: 10 min 95 °C

Tabelle A - 2: Zusammensetzung der Enzymmischungen zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse vor der Mikrofluidisierung von Erbsenschale und Karottentrester in Prozent (%), CEL = Cellulase, XYL = Xylanase, PG = Polygalacturonanase, ARA = Arabinanase, GAL = Galactanase

ERBSENSCHALE				KAROTTENTRESTER			
CEL	XYL	PG	ARA	CEL	PG	ARA	GAL
90,0	5,0	2,5	2,5	90,0	5,0	2,5	2,5
70,0	25,0	2,5	2,5	47,5	47,5	2,5	2,5
70,0	5,0	12,5	12,5	47,5	5,0	23,8	23,8
63,3	18,3	9,2	9,2	33,3	33,3	16,7	16,7
50,0	45,0	2,5	2,5	5,0	90,0	2,5	2,5
50,0	25,0	12,5	12,5	5,0	47,5	23,8	23,8
50,0	5,0	22,5	22,5	5,0	5,0	45,0	45,0

Tabelle A - 3: Versuchsansätze zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von mikrofluidisierten Erbsenschalen, Mikrofluidisierung bei 1750 bar für 1 + 1/1 + 3/1 + 5 Durchläufe, enzymatische Hydrolyse bei 50 °C mit 1 %iger Suspension, grau: Ansätze nur mit 1 + 5 Durchläufen mikrofluidisierter Erbsenschale, CEL = Cellulase, XYL = Xylanase, ARA = Arabinanase, PG = Polygalacturonanase, x = durchgeführter Versuchsansatz

ENZYM:SUBSTRAT-VERHÄLTNIS				HYDROLYSEZEIT / min			ENZYM:SUBSTRAT-VERHÄLTNIS				HYDROLYSEZEIT / min		
CEL	XYL	ARA	PG	10	30	60	CEL	XYL	ARA	PG	10	30	60
BLINDWERT													
-	-	-	-	x	x	x							
ZUSATZ EINZELNER ENZYME													
1:20	-	-	-	x	x	x	-	-	-	1:20	-	x	x
1:50				x	x	x				1:50		x	x
1:100				x	x	x				1:100		x	x
1:200				x	x	x				1:200		x	x
-	1:20	-	-	x	x	x	-	-	-	1:20	x	x	x
	1:50			x	x	x				1:50	x	x	x
	1:100			x	x	x				1:100	x	x	x
	1:200			x	x	x				1:200	x	x	x
ZUSATZ VON ENZYMMISCHUNGEN													
-	1:20	1:20	1:20	x	x		-	1:20	-	1:20	x	x	
	1:50	1:50	1:50	x	x			1:50		1:50	x	x	
	1:100	1:100	1:100	x	x	x		1:100		1:100	x	x	x
	1:200	1:200	1:200		x	x		1:200		1:200	x	x	x
1:50	1:20	1:20	1:20	x	x		1:100	1:100	1:100	1:100	x	x	x
	1:20	1:20		x	x			1:100	1:100		x	x	x
	1:20		1:20	x	x			1:100		1:100	x	x	x
	1:20			x	x			1:100			x	x	x
			1:20	x	x					1:100	x	x	x
	1:50	1:50	1:50	x	x			1:200	1:200	1:200		x	x
	1:50	1:50		x	x			1:200	1:200			x	x
	1:50		1:50	x	x			1:200		1:200		x	x
			1:50	x	x					1:200		x	x
	1:100	1:100	1:100	x	x	x							
	1:100	1:100		x	x	x							
	1:100		1:100	x	x	x							
	1:100			x	x	x							
			1:100	x	x	x							

Tabelle A - 4: Versuchsansätze zur Optimierung der enzymatischen Hydrolyse von mikrofluidisierten Karotten-trestern, Mikrofluidisierung bei 500, 1000 bzw. 1500 bar für 1 Durchlauf, enzymatische Hydrolyse bei 45 °C mit 1 %iger Suspension, CEL = Cellulase, ARA = Arabinanase, GAL = Galactanase, PL = Pektinlyase, x = durchgeführter Versuchs-ansatz

ENZYM:SUBSTRAT-VERHÄLTNIS				HYDROLYSEZEIT / min			ENZYM:SUBSTRAT-VERHÄLTNIS				HYDROLYSEZEIT / min		
CEL	ARA	GAL	PL	10	30	60	CEL	ARA	GAL	PL	10	30	60
BLINDWERT													
-	-	-	-	x	x	x							
Zusatz EINZELNER Enzyme													
1:20	-	-	-	x	x	x	-	-	1:20	-	x	x	x
1:50				x	x	x			1:50		x	x	x
1:100				x	x	x			1:100		x	x	x
1:200				x	x	x			1:200		x	x	x
	-	-	-	x	x	x	-	-	1:20	-	x	x	x
				x	x	x			1:50		x	x	x
				x	x	x			1:100		x	x	x
				x	x	x			1:200		x	x	x
Zusatz von ENZYMMISCHUNGEN													
-	1:20	1:20	1:20	x	x		-	1:100	1:100	1:100		x	x
-	1:50	1:50	1:50	x	x	x							
1:100	1:20	1:20	1:20	x	x		1:200	1:20	1:20	1:20	x	x	
	1:20	-	1:20	x	x			1:20	-	1:20	x	x	
	1:20	1:20	-	x	x			1:20	1:20	-	x	x	
	1:20	-	-	x	x			1:20	-	-	x	x	
	-	1:20	1:20	x	x			-	1:20	1:20	x	x	
	-	1:20	-	x	x			-	1:20	-	x	x	
	-	-	1:20	x	x			-	-	1:20	x	x	
	1:50	1:50	1:50	x	x	x		1:50	1:50	1:50	x	x	x
	1:50	-	1:50	x	x	x		1:50	-	1:50	x	x	x
	1:50	1:50	-	x	x	x		1:50	1:50	-	x	x	x
	1:50	-	-	x	x	x		1:50	-	-	x	x	x
	-	1:50	1:50	x	x	x		-	1:50	1:50	x	x	x
	-	1:50	-	x	x	x		-	1:50	-	x	x	x
	-	-	1:50	x	x	x		-	-	1:50	x	x	x
	1:100	1:100	1:100		x	x		1:100	1:100	1:100		x	x
	1:100	-	1:100		x	x		1:100	-	1:100		x	x
	1:100	1:100	-		x	x		1:100	1:100	-		x	x
	1:100	-	-		x	x		1:100	-	-		x	x
	-	1:100	1:100		x	x		-	1:100	1:100		x	x
	-	1:100	-		x	x		-	1:100	-		x	x
	-	-	1:100		x	x		-	-	1:100		x	x

Tabelle A - 5: Versuchsansätze zur Charakterisierung der kommerziellen Enzympräparate hinsichtlich Temperaturoptimum, Hitzeinaktivierung und Nebenaktivitäten, CEL = Cellulase, ARA = Arabinanase, GAL = Galactanase, XYL = Xylanase, PG = Polygalacturonanase, PL = Pektinlyase, x = durchgeführter Versuchsansatz

SUBSTRAT (10 mg/mL)	ENZYMZUSATZ (Enzym:Substrat-Verhältnis = 1 %)						HYDROLYSEZEIT / min	TEMPERATUR / °C			
	CEL	ARA	GAL	XYL	PG	PL		30	40	50	60
TEMPERATUROPTIMUM											
Arabinan	x						60	x	x	x	x
Galactan		x						x	x	x	x
Xylan			x					x	x	x	x
Pektin Classic CU 901				x				x	x	x	x
Pektin Classic CU 201					x			x	x	x	x
Erbenschale						x		x	x	x	x
HITZEINAKTIVIERUNG											
Arabinan	x						60 Hitze- inaktivierung 60			x	
Galactan		x							x		
Xylan			x						x		
Pektin Classic CU 901				x					x		
Pektin Classic CU 201					x				x		
Erbenschale						x			x		
NEBENAKTIVITÄTEN											
Arabinan		x	x	x	x	x	60			x	
Galactan	x		x	x	x	x			x		
Xylan	x	x		x	x	x			x		
Pektin Classic CU 901	x	x	x		x	x			x		
Pektin Classic CU 201	x	x	x	x		x			x		
Erbenschale	x	x	x	x	x	x			x		

Tabelle A - 6: Weitere Ergebnisse zur Validierung der Profilingmethode zur Analyse ungesättigter Galacturonsäureoligosaccharide (uGalA-OS) mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Photodiodenarraydetektor, uGalA_{2, 3, ...} = uGalA-OS mit Polymerisierungsgrad von 2, 3, ..., WF = Wiederfindung ± Standardabweichung (n = 3), ACN = Acetonitril, Matrix = wässrig extrahierte niedermolekulare, lösliche Ballaststofffraktion des unbehandelten Karottentresters

UGALA- OS	MESSPRÄZISION / %							WF - LÖSLICHKEIT / %	
	10 µM	28 µM	46 µM	64 µM	82 µM	100 µM	AUS 50 % ACN	AUS MATRIX	
uGalA ₂	-	5,6 ¹	2,8 ¹	3,6 ¹	2,9 ¹	-	73,3 ± 2,0	91,9 ± 4,4	
uGalA ₃	13,8 ²	4,9 ²	3,9 ²	3,2 ²	3,0 ²	5,3 ²	72,1 ± 2,4	91,1 ± 4,7	
uGalA ₄	12,6	2,4	5,8	4,8	4,2	3,0	74,7 ± 2,7	95,6 ± 4,5	
uGalA ₅	7,4	5,9	4,1	4,4	1,9	7,2	74,0 ± 2,4	87,4 ± 4,9	
uGalA ₆	5,4	5,5	3,5	3,4	2,5	4,5	73,5 ± 4,0	89,8 ± 4,0	
uGalA ₇	-	2,2	2,5	3,7	3,0	5,2	73,5 ± 3,2	62,9 ± 4,8	
uGalA ₈	-	6,7	3,6	3,2	2,0	6,0	71,2 ± 1,6	21,2 ± 8,0	
uGalA ₉	5,4	4,3	2,1	4,6	2,0	6,4	70,6 ± 0,5	17,1 ± 7,0	
uGalA ₁₀	12,1	3,9	1,6	2,5	3,3	6,7	71,5 ± 0,9	13,7 ± 7,2	
uGalA ₁₁	-	6,9 ³	0,2 ³	4,2 ³	3,5 ³	4,0 ³	65,8 ± 0,1	14,5 ± 11,1	
uGalA ₁₂	-	12,8	4,4	5,7	3,0	0,2	63,5 ± 3,8	12,5 ± 7,3	
uGalA ₁₃	-	14,8	13,2	7,6	3,3	2,8	61,6 ± 5,0	10,2 ± 5,8	

¹ Konzentrationen von 65, 107, 148 und 190 µM

² Konzentrationen von 8, 22, 37, 51, 66 und 80 µM

³ Konzentrationen von 8, 23, 38, 53, 67 und 82 µM

Tabelle A - 7: Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Xyloglucanscreenings der löslichen Ballaststoffe der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-1x/3x/5x), enzymatisch-mechanisch (E-em-1/2/3/4) und mechanisch-enzymatisch behandelten (E-me-3x/5x) Erbsenschalen, XX, XG, ... = Bezeichnung der freigesetzten Xyloglucan-oligosaccharide nach Nomenklatur von Fry und Mitarbeitenden (1993), + = nachgewiesen, - = nicht nachgewiesen (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023) und Verena Haitz (2024))

	E-u	E-m-1x	E-m-3x	E-m-5x	E-em-1	E-em-2	E-em-3	E-em-4	E-me-3x	E-me-5x
X	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
XX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XXX	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
XG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XXG	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
XXXG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XFG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XXFG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XLFG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
XLG	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
XXLG	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
XLLG	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-

Tabelle A - 8: Funktionelle Eigenschaften der unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-3x/5x), enzymatisch-mechanisch (E-em-1/2/3/4) und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x), D₅₀/D₉₀ = 50/90 % der Partikel sind ≤ dieser Partikelgröße, n. b. = nicht bestimmt (Daten erhoben von Dr. Rocío Morales-Medina am Department für Lebensmitteltechnologie und -materialwissenschaften, Institut für Lebensmitteltechnologie und -chemie, Fakultät III: Prozesswissenschaften an der Technische Universität Berlin)

BALLASTSTOFF-PRÄPARAT	SEDIMENTATION / %	WASSERRETENTIONSKAPAZITÄT / g Wasser/g unlösliche Masse	VISKOSITÄT / mPa s	D ₅₀ / µm	D ₉₀ / µm	UNLÖSLICHE MASSE / %
E-u	sofort	5,3	n. b.	139,8	330,5	n. b.
E-m-3x	sofort	n. b.	n. b.	35,5	99,1	n. b.
E-m-5x	2,7	20,3	14,0	38,2	93,8	80,4
E-em-1	-	20,9	13,4	34,9	85,0	73,7
E-em-2	-	22,5	15,2	40,1	91,8	72,2
E-em-3	-	21,6	16,0	32,8	80,8	70,5
E-em-4	-	21,6	13,2	32,5	85,0	71,7
E-me-3x	1,0 (nach 1 min) 29,8 (nach 60 min)	15,0	4,1	55,0	116,1	79,2
E-me-5x	6,0 (nach 30 min) 10,0 (nach 60 min)	25,2	7,6	59,7	105,8	74,7

Tabelle A - 9: Molare Verteilung und absoluter auf die getrocknete Erbsenschale bezogener Summengehalt von aus den unbehandelten (E-u), mechanisch (E-m-3x/5x) und mechanisch-enzymatisch behandelten Erbsenschalen (E-me-3x/5x) enzymatisch freigesetzten Arabinoxyloligosacchariden (\pm Range/2, n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, A2a - A7b = Arabinobiose bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1), LOQ = Bestimmungsgrenze (Daten partiell erhoben von Veronika Kurz (2023) und Verena Haitz (2024))

	E-u	E-m-3x	E-me-3x	E-m-5x	E-me-5x
UBS					
MOLARE VERTEILUNG / mol%					
A2a	84,6 \pm 0,0	89,6 \pm 0,0	92,5 \pm 0,1	90,7 \pm 0,0	92,7 \pm 0,0
A4a	1,1 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	< LOQ	0,8 \pm 0,0	< LOQ
A4b	12,0 \pm 0,0	8,2 \pm 0,0	7,5 \pm 0,1	7,2 \pm 0,0	7,3 \pm 0,0
A5a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A7b	2,3 \pm 0,0	1,4 \pm 0,0	< LOQ	1,2 \pm 0,0	< LOQ
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$					
	14,1 \pm 1,2	12,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,0	13,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,0
LBS					
MOLARE VERTEILUNG / mol%					
A2a	84,9 \pm 0,3	91,2 \pm 0,2	95,3 \pm 0,1	90,7 \pm 0,6	95,6 \pm 0,0
A4a	1,7 \pm 0,0	< LOQ	< LOQ	1,3 \pm 0,0	< LOQ
A4b	9,7 \pm 0,2	7,3 \pm 0,1	4,7 \pm 0,2	6,7 \pm 0,5	4,4 \pm 0,0
A5a	0,5 \pm 0,0	-	-	-	-
A7a	1,5 \pm 0,0	-	-	-	-
A7b	1,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	-	1,3 \pm 0,1	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$					
	311,1 \pm 14,1	77,9 \pm 7,5	59,7 \pm 4,0	108,8 \pm 7,8	42,5 \pm 0,5

Tabelle A - 10: Molare Verteilung und absoluter auf den getrockneten Karottentrester bezogener Summengehalt von aus den unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m-500) und enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrestern (K-em-1/2/3/4) enzymatisch freigesetzten Arabinooligosacchariden (\pm Range/2, n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, A2a - A7b = Arabinobiose bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1), LOQ = Bestimmungsgrenze

	K-u	K-m-500	K-em-1	K-em-2	K-em-3	K-em-4
UBS						
MOLARE VERTEILUNG / mol%						
A2a	69,4 \pm 0,3	72,0 \pm 0,0	75,4 \pm 0,4	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
A4a	15,5 \pm 0,2	16,6 \pm 0,1	12,6 \pm 0,2	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A4b	2,1 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1	3,5 \pm 0,0	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A5a	1,4 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	3,1 \pm 0,0	< LOQ	-	-
A6a	4,1 \pm 0,2	3,9 \pm 0,0	-	-	-	-
A7a	-	1,4 \pm 0,0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A7b	7,5 \pm 0,2	< LOQ	5,4 \pm 0,2	-	-	< LOQ
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$						
	4,2 \pm 0,0	4,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
LBS						
MOLARE VERTEILUNG / mol%						
A2a	63,6 \pm 3,5	65,8 \pm 0,3	66,3 \pm 0,3	100,0 \pm 0,0	< LOQ	< LOQ
A2b	9,6 \pm 4,8	-	-	-	-	-
A4a	20,0 \pm 1,1	18,8 \pm 0,1	17,8 \pm 0,1	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A4b	< LOQ	2,1 \pm 0,2	5,1 \pm 0,1	< LOQ	< LOQ	< LOQ
A5a	< LOQ	3,1 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	< LOQ	-	< LOQ
A6a	< LOQ	2,6 \pm 0,1	-	-	-	-
A7a	-	-	< LOQ	-	< LOQ	-
A7b	1,7 \pm 0,1	7,6 \pm 0,1	-	< LOQ	-	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$						
	6,6 \pm 0,2	10,4 \pm 0,5	15,9 \pm 0,9	0,6 \pm 0,0	< LOQ	< LOQ

Tabelle A - 11: Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Xyloglucanscreenings der löslichen Ballaststoffe der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m/K-m-500/1000/1500), enzymatisch-mechanisch (K-em-1/2/3/4), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me), XX, XG, ... = Bezeichnung der freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide nach Nomenklatur von Fry und Mitarbeitenden (1993), + = nachgewiesen, - = nicht nachgewiesen

	K-u	K-m	K-m-500	K-m-1000	K-m-1500	K-em-1	K-em-2	K-em-3	K-em-4	K-e	K-me
X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
XX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XXX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XXG	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
XXXG	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XFG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XXFG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XLFG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XLG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XXLG	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
XLLG	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

Tabelle A - 12: Ergebnisse der Analyse von Oligosacchariden in den niedermolekularen, löslichen Ballaststofffraktionen der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m-500) und enzymatisch-mechanisch behandelten Karottentrester (K-em-1/2/3/4), $\text{G}_2 \text{ - } \text{G}_5$ = Polymerisierungsgrad, $^{0/1/2}$ = Anzahl an Methylestern, A = Arabinoseeinheit, C = Glucoseeinheit; G = Galactoseeinheit, GalA = Galacturonsäure, rot: Coelution (C_3 und G_3), grau: nicht nachweisbar, grün: qualitativ nachweisbar

		K-u	K-m-500	K-em-1	K-em-2	K-em-3	K-em-4
ARABINO- OLIGOSACCHARIDE	A ₃						
	A ₄						
	A ₅						
	A ₆						
CELLO- OLIGOSACCHARIDE	C ₃						
	C ₄						
	C ₅						
	C ₆						
GALACTO- OLIGOSACCHARIDE	G ₃						
	G ₄						
	GalA ₃ ⁰ / ¹ / ²						
	GalA ₄ ¹ / ²						
GALACTURONSÄURE- OLIGOSACCHARIDE	GalA ₅ ¹						
	GalA ₅ ²						

Tabelle A - 13: Funktionelle Eigenschaften der unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m-500/K-m), enzymatisch-mechanisch (K-em-1/2/3/4), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrester (K-me), $D_{50}/D_{90} = 50/90\%$ der Partikel sind \leq dieser Partikelgröße, n. b. = nicht bestimmt (Daten erhoben von Dr. Rocío Morales-Medina am Department für Lebensmitteltechnologie und -materialwissenschaften, Institut für Lebensmitteltechnologie und -chemie, Fakultät III: Prozesswissenschaften an der Technische Universität Berlin)

BALLASTSTOFF- PRÄPARAT	SEDIMENTATION / %	WASSERRETENTIONSKAPAZITÄT / g Wasser/g unlösliche Masse	VISKOSITÄT / mPa s	D_{50} / μm	D_{90} / μm	UNLÖSLICHE MASSE / %
K-u	sofort	10,5	n. b.	134,7	324,3	n. b.
K-m-500	-	22,3	11,3	47,0	101,7	63,9
K-m	-	n. b.	n. b.	n. b.	108,7	n. b.
K-em-1	-	23,2	15,0	39,1	88,6	37,8
K-em-2	-	17,9	7,2	29,8	81,0	32,8
K-em-3	-	21,2	13,6	48,0	101,1	39,6
K-em-4	-	20,8	7,2	32,8	78,4	37,8
K-e	2,0 (nach 1 min), 31,8 (nach 60 min)	30,7	-	126,3	286,5	40,0
K-me	1,0 (nach 8 min), 10,5 (nach 60 min)	37,1	-	58,9	107,5	40,4

Tabelle A - 14: Molare Verteilung und absoluter auf den getrockneten Karottentrester bezogener Summengehalt von aus den unbehandelten (K-u), mechanisch (K-m), enzymatisch (K-e) und mechanisch-enzymatisch behandelten Karottentrestern (K-me) enzymatisch freigesetzten Arabinooligosacchariden (\pm Range/2, n = 2), UBS = unlösliche Ballaststoffe, LBS = lösliche Ballaststoffe, A2a - A7b = Arabinobiose bis -heptaose (vgl. Abbildung A - 1), LOQ = Bestimmungsgrenze

	K-u	K-m	K-e	K-me
UBS				
MOLARE VERTEILUNG / mol%				
A2a	69,4 \pm 0,3	67,8 \pm 0,1	-	-
A4a	15,5 \pm 0,2	16,4 \pm 0,1	-	-
A4b	2,1 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	-	-
A5a	1,4 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	-	-
A6a	4,1 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	-	-
A7a	-	< LOQ	-	-
A7b	7,5 \pm 0,2	7,9 \pm 0,0	-	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$				
	4,2 \pm 0,0	4,5 \pm 0,2	-	-
LBS				
MOLARE VERTEILUNG / mol%				
A2a	63,6 \pm 3,5	65,0 \pm 0,1	-	-
A2b	9,6 \pm 4,8	-	-	-
A4a	20,0 \pm 1,1	18,2 \pm 0,1	-	-
A4b	< LOQ	2,2 \pm 0,0	-	-
A5a	< LOQ	2,4 \pm 0,1	-	-
A6a	< LOQ	2,7 \pm 0,0	-	-
A7b	1,7 \pm 0,1	9,6 \pm 0,2	-	-
ABSOLUTER SUMMENGEHALT / $\mu\text{mol/g}$				
	6,6 \pm 0,2	9,3 \pm 0,2	-	-

10 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

Schmidt, R. E., Bunzel, M. (2025): Evaluation of AOAC-method 2017.16: Detection of oligosaccharides as low molecular weight soluble dietary fiber. *Cereal Chemistry*, DOI: <https://doi.org/10.1002/cche.10885>

Vorträge auf Fachtagungen

Schmidt, R. E.; Steffan, J.; Keller, J.; Morales-Medina, R.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2024): Charakterisierung enzymatisch-mechanisch hergestellter Ballaststoffpräparate aus Karottentrester. *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Kaiserslautern, Deutschland.

Schmidt, R. E.; Kurz, V.; Haitz, V.; Steffan, J.; Keller, J.; Morales-Medina, R.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2024): Charakterisierung mechanisch-enzymatisch hergestellter Ballaststoffpräparate aus Erbsenschale und Karottentrester aus Lebensmittelnebenströmen. *52. Deutsche Lebensmittelchemietage*, Freising, Deutschland.

Schmidt, R. E.; Kurz, V.; Haitz, V.; Steffan, J.; Keller, J.; Morales-Medina, R.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2024): Charakterisierung von Ballaststoffpräparaten hergestellt aus den Lebensmittelnebenströmen Erbsenschale und Karottentrester durch mechanisch-enzymatische Behandlung. *135. VDLUFA-Kongress*, Karlsruhe, Deutschland.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Schmidt, R.; Steffan, J.; Keller, J.; Morales-Medina, R.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2022): Charakterisierung und Vergleich der Ballaststoffstrukturen von Erbsenschote und Karottentrester aus Lebensmittelnebenströmen. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg, Deutschland.

Schäfer, D. S.; Sitter, L.; Schmidt, R.; Bunzel, M. (2022): Screening-Methode zur Bestimmung von (Arabino)-Xylooligosacchariden mittels HPAEC-PAD/MS. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg, Deutschland.

Steffan, J.; Schmidt, R.; Keller, J.; Morales-Medina, M.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2022): Lupineninnenfaser – Charakterisierung der Ballaststoffe aus Nebenströmen der lebensmittelverarbeitenden Industrie. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg, Deutschland.

Steffan, J.; Schmidt, R. E.; Keller, J.; Morales-Medina, M.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2023): Structural characterization of the cell wall polysaccharides from the by-products of the legumes pea (*Pisum sativum L.*) and lupin (*Lupinus angustifolius L.*). *4th Annual Research Spotlight Meeting Plant Protein Innovation Center*, Minnesota, USA.

Schmidt, R. E.; Kurz, V.; Steffan, J.; Keller, J.; Morales-Medina, R.; Drusch, S.; Bunzel, M. (2023): Charakterisierung niedrigviskoser Ballaststoffpräparate der Erbsenschale aus Lebensmittelnebenströmen nach enzymatisch-mechanischer Behandlung, 51. Deutsche Lebensmittelchemietage, Bonn, Deutschland.