

Hochschule Neubrandenburg
Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften
Studiengang Lebensmitteltechnologie

Bachelorarbeit

Charakterisierung von pektinolytischen Enzymen der Zuckerrübe

Verfasser: Guido Fischer

Betreuer: Prof. Dr. Peter Meurer
Prof. Dr. Mark Rüschen gen. Klaas

Neubrandenburg, 16.02.2010

URN: urn:nbn:de:gbv:518-thesis2010-0102-0

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Meurer danke ich für das Überlassen des interessanten Themas, sowie für die Unterstützung, die ich durch ihn im Vorfeld und während der Bearbeitung des Themas erfahren habe.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dipl.-Ing. Andrea Dörnbrack für die fachliche, praktische und moralische Unterstützung während der Labortätigkeit.

Abstract

One of the most important hydrocolloids is pectin. In the last time became the production of pectin's from sugar beet more interesting. At the moment the sugar beet pectin is produced by using the sugar beet shred from the sugar industry. The pulp of sugar beet using for the production of Methane contains a lot of pectin. But during the storage the pectin's may be degraded by plant's own pectin degrading enzymes. So the activity of these enzymes is analysed in this paper. The activities of three pectin degrading enzymes were analysed. Pectin methyl esterase activity has been identified by titration the free carboxyl groups with 0.01 M NaOH. The pectin methyl esterase exhibited optimum activity at pH 8.5. The NaCl-optimum was detected at a NaCl-concentration from 0.2 mol/l substrate. The activity of exo-Polygalacturonase was analysed with method from Honda et al. (1982). There was clearly no activity of exo-Polygalacturonase found. Endo-Polygalacturonase activity is the most important factor for the degradation of pectin. It was analysed with capillary viscometry, but the method did not fit optimal. So rotation viscometry was used to found the pH optimum of endo-Polygalacturonase from sugar beet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Stand von Wissenschaft und Technik	2
2.1 Die Zuckerrübe	2
2.1.1 Geschichte der Zuckerrübe	2
2.1.2 Biologie und Abstammung der Zuckerrübe	2
2.1.3 Verwendung von Zuckerrüben und statistische Kennzahlen	4
2.2 Das Pektin	5
2.2.1 Vorkommen und Gewinnung von Pektin	7
2.2.2 Chemischer Aufbau von Pektin	8
2.2.3 Verwendung von Pektin	10
2.3 Pektinolytische Enzyme	10
2.3.1 Enzyme	10
2.3.2 Polygalacturonase	14
2.3.3 Pektinesterase	16
3 Materialien und Methoden	18
3.1 Herstellung des Enzymextraktes mittels Ultrafiltration	18
3.1.1 Geräte und Materialien Ultrafiltration	19
3.1.2 Durchführung Ultrafiltration	20
3.2 Methode zur Bestimmung der Pektinesteraseaktivität	20
3.2.1 Geräte und Materialien Pektinesteraseuntersuchung	22
3.2.2 Durchführung Pektinesteraseuntersuchung	22
3.3 Methode zur Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität	23
3.3.1 Geräte und Materialien exo-Polygalacturonaseuntersuchung	26
3.3.2 Durchführung exo-Polygalacturonaseuntersuchung	26
3.4 Methode zur Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität	27
3.4.1 Geräte und Materialien Kapillarviskosimetrie	29
3.4.2 Durchführung Kapillarviskosimetrie	30
3.5 Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität mittel Rotationsviskosimetrie	30
3.5.1 Geräte und Materialien Rotationsviskosimetrie	31
3.5.2 Durchführung Rotationsviskosimetrie	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Ergebnisse der Pektinesteraseuntersuchung	33

4.2 Ergebnisse exo-Polygalacturonaseuntersuchung	37
4.3 Ergebnisse Kapillarviskosimetrie	40
4.4 Ergebnisse Rotationsviskosimetrie	43
5 Diskussion	46
6 Zusammenfassung	48
7 Literaturverzeichnis	51
8 Verzeichnis der verwendeten Tabellen	54
9 Verzeichnis der verwendeten Abbildungen	54
10 Verzeichnis der verwendeten Formeln	55
Anhang	56

1. Einleitung

Die Zuckerrübe ist eine der wichtigsten europäischen Kulturpflanzen, die gerade in den letzten 2 Jahrhunderten die europäische Zuckerversorgung sicherten. Ursprünglich wurde Zuckerrohr (*Saccharum officinarum*) als Ausgangsmaterial für die Zuckerherstellung genutzt. Und auch heute wird der größte Teil des weltweit produzierten Zuckers aus Zuckerrohr hergestellt. Laut ZMP (2008) wird sogar dreiviertel der Weltzuckerproduktion aus Zuckerrohr hergestellt. Im europäischen Raum hat sich Ende des 18. Jahrhunderts die Zuckerrübe als Rohstoff für die Zuckerherstellung etabliert. Eine Kulturpflanze, die aus vielerlei Hinsicht recht interessant und zukunftssträftig ist. Momentan wird der europäische Zuckermarkt noch durch die Quotenregelung der Europäischen Union gestützt und vor den Gesetzen der Marktwirtschaft geschützt, doch ist schon jetzt ersichtlich, dass der europäische Zucker aus Rüben auf dem Weltmarkt kaum eine Chance, im Vergleich zum wesentlich billiger produzierten Rohrzucker, hat.

Umso interessanter sind andere Verwertungsmöglichkeiten für die Zuckerrübe geworden. Ein Beispiel ist die Bioethanolerzeugung, die sich momentan in Europa etabliert und in Zeiten des Klimawandels und Förderung nachwachsender Rohstoffe weltweit von den Regierungen der einzelnen Nationen unterstützt wird. So ist Brasilien beispielsweise ein Vorreiter bei der Entwicklung von Automobilen, die auf der Basis von Bioethanol fahren und auch in Deutschland wurde begonnen dem Benzin einen Teil Bioethanol beizumengen.

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit der Zuckerrübe ist die Biogaserzeugung, die schon seit einigen Jahren einen wahren Boom erlebt und immer neue Rohstoffe entdeckt, die momentan sogar extra aus diesem Grund angebaut werden. So lobt beispielsweise die Firma KWS (2009) die Zuckerrübe als den „Turbo“ in der Biogasanlage. Auch wurden bereits zahlreiche Versuche gemacht, um die Zuckerrüben dauerhaft haltbar und verfügbar für die Biogasanlagen zu machen. Dabei soll sich die silierte Zuckerrübe als ein echter „Methanbooster“ herauskristallisiert haben, denn bei dieser Form der Aufbereitung beträgt die Verweilzeit in der Biogasanlage nur noch 10-15 Tage (KWS, 2009).

Ein weiterer interessanter Inhaltsstoff der Zuckerrübe ist das Pektin, das beispielsweise aus Pressschnipseln der Zuckerherstellung gewonnen wird. Momentan ist aber auch die Verarbeitung von Zuckerrüben zu Dicksaft denkbar, der zu Biogas verarbeitet wird. Und gerade dieser Dicksaft, könnte eine erhebliche Menge Pektine enthalten, die von gewissem wirtschaftlich Wert wäre.

Dabei ist es von Interesse, in welchem Umfang die Zuckerrübe pektinolytische Enzyme enthält und wie aktiv diese Enzyme sind. So ist gerade die Aktivität der endo-Polygalacturonasen von größerem Interesse, da sie langkettige Pektine zu kurzkettigen Pektinfragmenten abbauen. Diese Pektinfragmente sind wiederum von geringerem wirtschaftlichem Interesse, weil sie veränderte Geliereigenschaften und auch andere Viskositäten in wässrigen Lösungen aufweisen. Somit ist eine Aktivität der endo-Polygalacturonase während der Lagerung des Dicksaftes unerwünscht.

Die Aktivität einer Pektinesterase wäre jedoch von Vorteil, da Pektine mit geringerem Vesterungsgrad von größerem wirtschaftlichem Interesse sind. So wäre es möglich, bei ausreichender Aktivität der pflanzeigenen Pektinesterase, den Schritt einer Entesterung durch zugesetzte mikrobielle Pektinesterasen einzusparen.

Eine wichtige Rolle bei dieser Betrachtung spielt der pH-Wert, da es während der Lagerung des Dicksaftes zu einer Milchsäuregärung kommt, die den pH-Wert auf ca. 3,5 sinken lässt.

Aus diesem Grund ist das Anliegen dieser Arbeit, die Enzyme der Zuckerrübe zu untersuchen, die vorrangig für den Abbau der Pektine verantwortlich sind, um somit herauszufinden, wie aktiv diese Enzyme sind und unter welchen Bedingungen die Enzyme Pektin optimal abbauen.

2. Stand von Wissenschaft und Technik

2.1 Die Zuckerrübe

2.1.1 Geschichte der Zuckerrübe

Die Zuckerrübe ist eine der jüngsten Kulturpflanzen der Menschheit. Am Ende des 18. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass die Vorläuferformen der heutigen Zuckerrübe, die in der Mittelmeerregion als Gartenpflanze angebaut wurden, in ihren Wurzeln Zucker speichern.

Der Berliner Chemiker und Apotheker Andreas Sigismund Maggraf stellte 1747 fest, dass der Zucker in der Runkelrübe dem Rohrzucker identisch ist. Dies nahm sein Schüler Franz Carl Achard zum Anlass, mit der Selektion von weißen Zuckerrübenformen aus Runkelrübenpopulationen zu beginnen. Die züchterische Tätigkeit von Achard führt so zu einer Steigerung des Zuckergehaltes der Rüben von 1,6 % auf 5 %.

Achard entwickelte 1799 auch das erste Verfahren, um aus Rüben Zucker zu gewinnen und schaffte es mit Hilfe des preußischen Königs Friedrich Wilhelm III. im schlesischen Cunern die erste Zuckerfabrik zu errichten, die 1802 den ersten Zucker aus Rüben gewann. 1803 veröffentlichte er seine Schrift „Anleitung zum Anbau der zur Zuckerfabrikation anwendbaren Runkelrübe und zur vorteilhaften Gewinnung des Zuckers aus derselben“. Anfang der 30er Jahre des 19. Jahrhunderts erlebte die Rübenzuckerproduktion ausgehend von Frankreich einen wahren Boom, der nicht zuletzt darin begründet lag, dass die Franzosen durch ihre Kontinentalsperre gegen England während der Napoleonischen Kriege die Einfuhr von Rohrzucker unterbanden. Zu dieser Zeit entstanden Zuckerfabriken in Bayern, Böhmen, Württemberg und im Rheinland. Den Züchtern jener Zeit gelang ein sensationeller Durchbruch bei der Steigerung des Zuckergehaltes der Rüben, der dann bei 12 statt 5 % lag. Im Vergleich dazu weisen die heutigen Zuckerrüben ca. 17 % auf (Junghans, E., 1984; Proplanta, 2006).

Bereits 1839/40 existierten auf dem Gebiet des Zollvereins 152 Zuckerfabriken, in denen 12660 t Zucker aus 220282 t Rüben hergestellt wurden. Magdeburg und die Magdeburger Börde kristallisierten sich dabei als Zentrum der Zuckerherstellung und des Zuckerrübenanbaus heraus (Junghans, E., 1984).

2.1.2 Biologie und Abstammung der Zuckerrübe

Die Zuckerrübe, die als *Beta vulgaris* provar. *altissima* Döll bezeichnet wird, gehört zur Gattung *Beta*, die zur Familie der Gänsefußgewächse (*Chenopodiaceae*) gehört. Zu dieser Familie gehören viele Salz-, Steppen-, Strand-, Schutt- und Wegrandpflanzen. Ein Beispiel für eine

weitere Kulturpflanze dieser Familie ist der Spinat (Gattung *Spinacia* L.). Zahlreiche Vertreter dieser Familie werden allgemein als Unkräuter bezeichnet. Zu ihnen gehören so bekannte Pflanzen wie die Melden (Gattung *Atriplex* L.) und der Gänsefuß (Gattung *Chenopodium* L.). Die nächsten Verwandten der Zuckerrüben sind bezüglich der Nomenklatur andere Vertreter der Gattung *Beta* wie zum Beispiel Runkelrüben (*Beta vulgaris* L. provar. *crassa*), Mangold (*Beta vulgaris* L. convar. *vulgaris*) und Rote Bete (*Beta vulgaris* L. provar. *conditiva* Alef.) Als wild wachsender Verwandter, von dem die Zuckerrübe abstammt, gilt die *Beta maritima*, deren Verbreitungsgebiet sich über die Küsten des Mittelmeeres, die nordeuropäischen Küsten des Atlantischen Ozeans sowie die Nordseeküste erstreckt. Der oberirdische Teil dieser Strandpflanze weist große Ähnlichkeit mit dem kultivierter Rüben auf. In der Wurzel unterscheidet sie sich jedoch von kultivierten Rüben, da ihre Pfahlwurzel, die oft verzweigt ist, kaum dicker als der Stengel ist. Das Innere und Äußere dieser Rübe ist im Normalfall weiß, es gibt jedoch auch Typen mit gelblicher oder rötlicher Rinde. Wie die Zuckerrübe schosst *Beta maritima* erst im zweiten Wachstumsjahr (Oehme, H., 1984; Proplanta, 2006).

Die Zuckerrübe ist eine fremdbefruchtende, zweijährige Pflanze, die im ersten Jahr eine Blattrosette und einen Rübenkörper ausbildet, aus dem sich im zweiten Jahr ein Samenträger entwickelt. Diploide Formen der Zuckerrübe bilden grundständige, langstielige, löffelförmige Blätter aus, wohingegen tetraploide Formen herzförmige Blätter aufweisen.

Von besonderem Interesse ist der Rübenkörper, der in den Rübenkopf (beblätterter Teil), den Halszwischenenteil (Hypokotyl) und die Hauptwurzel unterteilt wird. Dabei nimmt die Hauptwurzel, die zwei Doppelzeilen Fasern trägt, den größten Teil des Rübenkörpers ein. Der Rübenkörper steckt nahezu vollständig im Boden. Die Zuckerrübe ist konisch geformt, weiß gefärbt und verdickt sich wie alle Beta-Rüben durch ein atypisches Dickenwachstum, was zur Ausbildung konzentrischer Kreise im Querschnitt führt. Die Wurzel und das Hypokotyl des Zuckerrübenkörpers fungieren als Speicherorgane, dabei unterscheiden sie sich laut KWS (2009) teilweise recht stark in ihrem Zuckergehalt.

Die Primärwurzel der Zuckerrübe kann eine Länge von 2,5 m erreichen und verzweigt sich, wenn sie auf Sperrschichten trifft. Dabei wird die Verzweigung des Rübenkörpers als Beinigkeit bezeichnet. An der Hauptwurzel befinden sich zahlreiche seitlich angeordnete dünne Nebenwurzeln, die der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen dienen. Nach dem Entfalten der Keimblätter (*Kotolydonen*) einwickelt sich aus der äußeren Schicht des Zentralzylinders ein *Kambium*, welches ein sekundäres Dickenwachstum aufweist. Die so wiederholt entwickelten Holz- und Bastringe führen dazu, dass die Zuckerrübe 8-12 Gefäßbündelringe aufweist. Die erste Vegetationsperiode endet mit dem Abbau der Schosshemmung, der durch einen Kälte-

reiz ausgelöst wird, was dazu führt, dass sich Ende Juni/ Anfang Juli des folgenden Jahres eine Blüte ausbildet, die ca. 40 Tage existiert und durch den Wind bestäubt wird. Die Blüte hat die Form einer rispigen Scheinähre, die bis zu 1,5 m hoch werden kann. An ihr stehen meist 2 bis 8 Blüten zusammen, die ein von den miteinander verwachsenen Perigonblättern umhülltes Samenknauel bilden. Nach einer langsamen Abreife, werden die Knauel durch die Berührung von Wild, Wind oder Hagel von der Pflanze getrennt. Dies geschieht jedoch nur äußerst selten bei gezieltem Anbau, da die Rübe dort schon im ersten Vegetationsjahr geerntet wird (Proplanta, 2006).

2.1.3 Verwendung von Zuckerrüben und statistische Kennzahlen

Das Gros der Zuckerrüben wird noch immer in den Zuckerfabriken zu Zucker verarbeitet, der dann anschließend in der menschlichen Ernährung oder zu technischen Zwecken eingesetzt wird. Die Erzeugung von Zucker stieg in den letzten Jahrzehnten nahezu kontinuierlich. Betrag die weltweite Erzeugung von Zucker 1970 noch 75 Mio. Tonnen, so lag sie 2005/2006 bereits bei 149 Mio. Tonnen. Dies war die größte Zuckerproduktion seit 25 Jahren und führte in den folgenden Monaten zum rasanten Preisverfall. Betrag der Preis für 100 Kilogramm Zucker im Februar 2006 noch 33 Euro, so lag er im Juni mit etwas unter 14 Euro pro 100 kg auf seinem absoluten Tiefststand. Der sinkende Preis seinerseits, führt dazu, dass es kaum mehr möglich ist, kostendeckend zu produzieren. Der Pro-Kopf-Verbrauch sank in den Jahren 2002 bis 2005 von 35,1 kg auf, die in Abbildung 1 dargestellten, 34,0 kg, was der Zuckerindustrie erhebliche Sorgen bereitete.

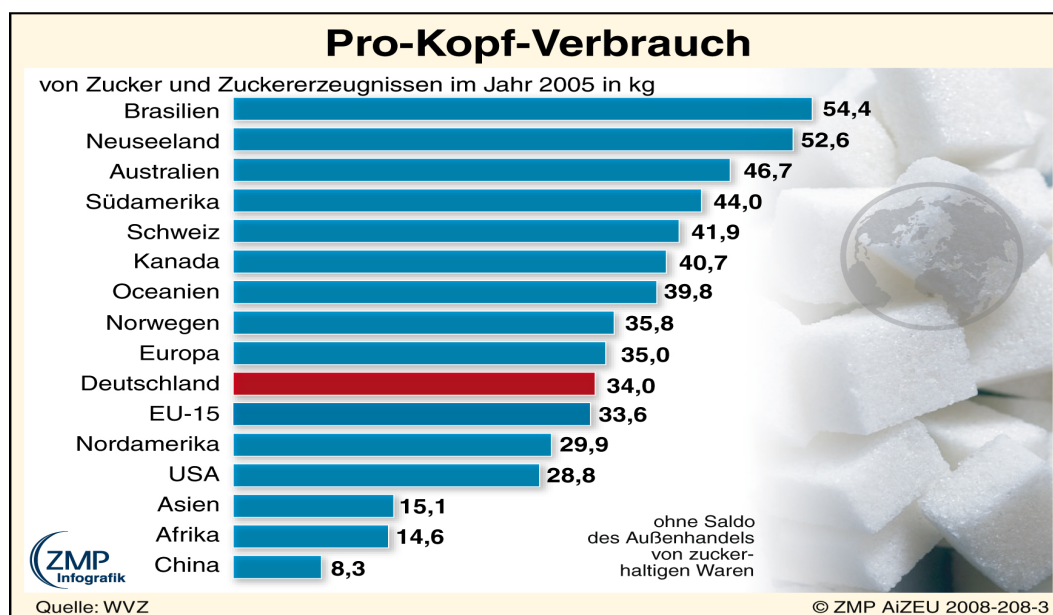


Abb. 1: Vergleich der Pro-Kopf-Zuckerverbräuche ausgesuchter Staaten im Jahr 2005

Durch den Verfall des Zuckerpreises und den starken Anstieg des Rohölpreises in den letzten Jahren, kam es zur Entwicklung weiterer Verwendungsmöglichkeiten für die Zuckerrübe und des daraus hergestellten Zuckers.

So ist schon seit einigen Jahren die Verarbeitung von Zucker zu Bioethanol gängig, die nicht zuletzt durch die deutsche Bundesregierung unter Schröder und Fischer durch zahlreiche Gesetze gefördert wurde. So wurde beispielsweise eine Direktbeimischung von bis zu 5 % Bioethanol zu Ottokraftstoff beschlossen. In diesem Verwendungsbereich wird Zucker aus Zuckerrüben auch in den kommenden Jahren wachsenden Anklang finden.

Eine völlig neue Verwendung ist die Verarbeitung von Zuckerrüben zu Biogas. Bei dieser Verarbeitung ist es möglich einen Energieträger zu erzeugen, ohne zuvor über den energieaufwendigen Weg der Zuckerherstellung zu gehen. Gerade deshalb und aufgrund der Förderung von Ökostrom, der in Blockkraftwerken aus Biogas (Methan) gewonnen wird, erfreut sich diese neue Art der Verwendung wachsender Begeisterung. Die Lagerung der Zuckerrüben für die Biogaserzeugung kann laut KWS (2009) sehr verschieden sein. Es ist möglich die Rübe als Ganzes zu silieren oder sie zu zerkleinern und dann anschließend zu silieren, sie direkt nach der Zerkleinerung in die Biogasanlage zu geben oder sie zu einem pumpfähigen Rübenmus aufzubereiten, der dann ebenfalls über eine Milchsäuregärung haltbar gemacht wird. Laut KWS (2009) sinkt der pH-Wert bei Zuckerrübensilage auf 3,5 ab. Bei der Verwendung zur Herstellung von Biogas, ist es nötig, das in den Zuckerrüben vorhandene Pektin abzubauen, um somit das Substrat aufzuschließen. Da Zuckerrübenpektin ein ebenfalls genutztes Produkt aus Zuckerrüben ist, stellt sich die Frage, ob es nicht sinnvoll ist, das Pektin, vor Einbringen des Rübenmuses in den Biogasreaktor, abzutrennen. Das Pektin würde so als Koppelprodukt anfallen, dessen Vermarktung weitere Gewinne erwirtschaften könnte (ZMP, 2008; KWS, 2009).

2.2 Das Pektin

Pektin ist neben Gelatine wohl das bedeutendste hochmolekulare Naturprodukt, das gelbildende Eigenschaften besitzt und somit vorrangig als Hydrokolloid verwendet wird. Laut Hanak (1997) sind Pektine eine Gruppe hochverzweigter Polysaccharide, die als Strukturelement in allen höheren Landpflanzen vorkommen. Die Pektine sind dort vorrangig in der Mittellamelle, einer Schicht, die sich zwischen den Zellen der Zellverbände befindet, lokalisiert und halten dort die Zellen zusammen. Die Pektine werden deshalb auch von Meurer (1991) und

Hammer (2005) als Kittsubstanzen bezeichnet. In der Mittellamelle bilden das Pektin mit der Hemicellulose und Glycoproteinen eine amorphe Matrix, in der Zellulosemikrofibrillen eingebettet sind. Von entscheidender Bedeutung ist dabei, dass sich zwischen den einzelnen Pektinmolekülen, wie in Abb. 3 dargestellt, Calciumbrücken ausbilden und so die Pektinmoleküle miteinander verknüpfen.

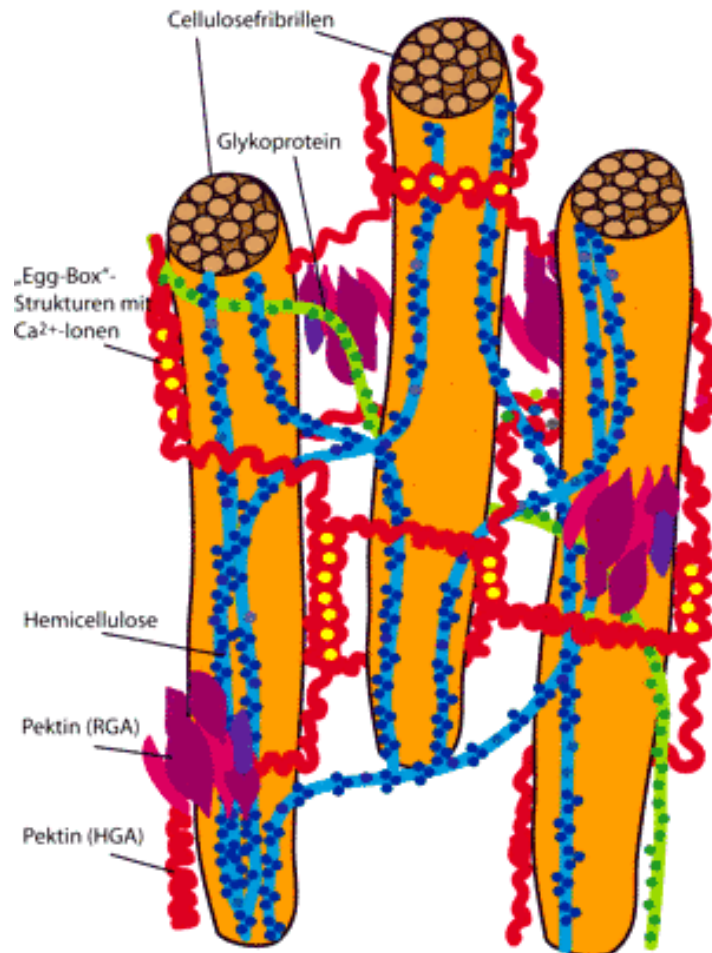


Abb. 2: Darstellung der Funktion des Pektins als Kittsubstanz (Hammer,2005)

Das Pektin übernimmt somit wichtige Stütz- und Festigungsfunktionen, aber regelt durch seine starke Quellfähigkeit und Kolloidnatur auch den Wasserhaushalt der Pflanzen (Hammer, 2005).

Nehring (1969) und Hannak (1997) bezeichnen das wasserunlösliche Pektin der Zellwände auch als Protopektin. Für die menschliche Ernährung ist dieses Protopektin mit anderen Polysacchariden wie z.B. Cellulose, Hemicellulose, Lignin, Agar und Carragen gleichzusetzen, da es wie sie als Ballaststoff fungiert und somit einen wichtigen Inhaltsstoff unserer Nahrung darstellt.

2.2.1 Vorkommen und Gewinnung von Pektin

Wie bereits erwähnt, sind Pektine natürliche Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden, die besonders stark in relativ zähen und harten Pflanzenteilen wie z.B. Schalen von Citrusfrüchten oder Fruchtständen von Sonnenblumen konzentriert sind. Besonders arm an Pektinen sind hingegen weiche Früchte, wie z.B. Erdbeeren.

Tab. 1: Pektingehalte verschiedener Obstarten (Hammer, 2005)

Trauben	0,20 – 0,35 %
Süßkirschen	0,28 – 0,45 %
Birnen	0,46 – 0,60 %
Pflaumen	0,57 – 0,90 %
Äpfel	0,55 – 0,92 %
Schwarze Johannesbeeren	0,79 - 1,52 %

Bei der Herstellung von Pektin werden pflanzliche Rohstoffe eingesetzt, deren Pektingehalt recht hoch ist, wie in Tabelle 2 dargestellt. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um Reststoffe aus der Saft- und Zuckerindustrie. Problematisch ist dabei jedoch die Tatsache, dass auch Enzyme bei der Safterstellung freigesetzt bzw. beabsichtigt eingesetzt werden. Um den Einfluss der pflanzeigenen Enzyme zu eliminieren, werden die Trester beim Getränkehersteller direkt nach der Pressung auf einen Feuchtigkeitsgehalt von unter 12 % getrocknet. Werden Pektinasen beabsichtigt als Mazerationsenzyme eingesetzt, so sind die Trester für die Pektinherstellung völlig unbrauchbar.

Tab. 2: Pektingehalte verschiedener Rohstoffe der Pektinherstellung (Hammer, 2005)

Apfeltrester	10 – 15 %
Rübenschnitzel	10 – 20 %
Sonnenblumen- 15-fruchtstände	25 %
Citrusshalen	20 - 35 %

Im Großen und Ganzen gibt es zwei mögliche Verfahrensgruppen der Pektinherstellung, wobei momentan der größte Teil des Pektins noch mit den konventionellen Verfahren gewonnen wird. Ein mögliches konventionelles Verfahren ist die saure Hydrolyse mit einer Schwefelsäurelösung, bei der das unlösliche Protopektin aus den Zellwänden der Ausgangsmaterialien gelöst wird. Die so extrahierte Pektinlösung wird gefiltert und eingedampft. Das Pektin wird

dann anschließend durch die Zugabe von Alkohol (z.B. Isopropanol) ausgefällt. Das so entstandene Rohpektin wird getrocknet, gemahlen und homogenisiert (Hammer, 2005).

Weiterhin ist es auch möglich, die extrahierten Pektine mittels Aluminiumsalze auszufällen, oder den getrockneten pflanzlichen Rückstand mit gasförmigem Ammoniak zu behandeln und die dadurch entstandenen amidierten Pektine mittels Wasser oder einer stark verdünnten Lauge zu extrahieren. Die so extrahierten Pektine werden mit einer Säure ausgefällt (DE4313549C1).

Die zweite große Verfahrensgruppe sind die biotechnologischen Verfahren, bei denen Enzyme genutzt werden, um das unlösliche Protopektin der Mittellamelle zu extrahieren und zu modifizieren. Die dazu genutzten Enzyme werden als Protopektinasen bezeichnet und können aus Mikroorganismen wie z.B. *Bacillus licheniformis* sp. und *Candida guilliermondi* gewonnen werden. Die biotechnologischen Verfahren sollen gegenüber den konventionellen Verfahren eine höhere Ausbeute erzeugen, sowie einen geringeren Energieaufwand verursachen und keine nitratbelasteten Trester produzieren (Hammer, 2005).

Das Herstellungsverfahren schlägt sich jedoch auf die chemische Struktur und somit auf die Eigenschaften des Pektins nieder.

2.2.2 Chemischer Aufbau von Pektin

Von besonderer Bedeutung ist die chemische Struktur des Pektins, die nicht nur von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich ist, sondern auch ähnlich der Struktur des Kollagens von den entsprechenden Teilen der Pflanzen und vom Alter des Organismus abhängig ist.

Pektin gehört ganz allgemein klassifiziert zur großen Gruppe der Polysaccharide und setzt sich in seiner Grundstruktur vorrangig aus α -1-4-glycosidisch verknüpften D-Galacturonsäuremolekülen zusammen, die teilweise mit Methanol verestert sind. Regionen, die wie in Abb. 4 dargestellt aussehen und sich nahezu ausschließlich aus Galacturonsäuremolekülen zusammensetzen, sind unverzweigt und werden als Homogalacturane bzw. „smooth regions“ bezeichnet. In diesen Regionen folgt auf ca. 200 Galacturonsäureeinheiten eine Rhamnoseeinheit.

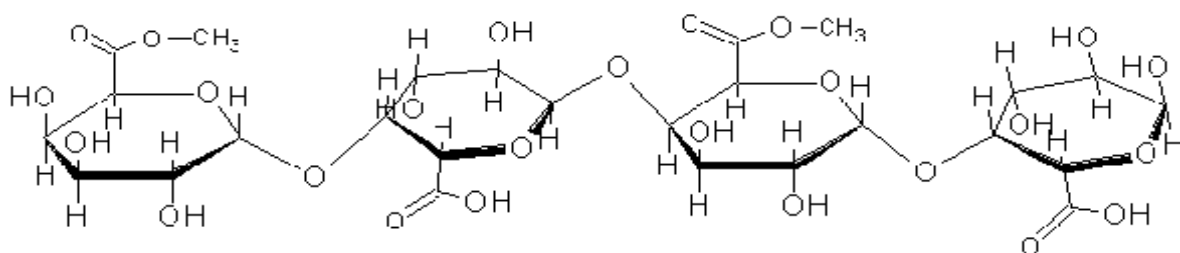


Abb. 3: „smooth region“ eines Pektinmoleküls (Czieslich, 2005)

Des Weiteren gibt es die stark verzweigten „hairy regions“ im Pektinmolekül, deren Rückgrat laut Hammer (2005) alternierend aus α -1-4-verknüpften D-Galacturonsäuremolekülen und α -1-2-verknüpften L-Rhamnosin aufgebaut ist. Die Seitenketten dieser Regionen setzen sich aus glycosidisch gebundenen D-Galactosen, L-Arabinosen und D-Xylosen zusammen. Diese Bereiche weisen eine recht hohe Widerstandsfähigkeit gegen pektinolytische Enzyme auf. Die „hairy regions“ weisen maximal 5 % des gesamten Galacturonsäuregehalts des Pektinmoleküls auf (Hannak, 1997).

Im Pektinmolekül sind die Galacturonsäureeinheiten gegeneinander um 120° verdreht, was dazu führt, dass jede 4. Einheit die gleiche Position hat. In Lösung nimmt das Molekül eine helicale Struktur ein, bei der 3 Galacturonsäureeinheiten eine Windung bilden. Diese Struktur wird durch sterische Faktoren und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Zwei benachbarte Helices ordnen sich in Lösung parallel zueinander an. Die regelmäßige Helixstruktur wird durch die Rhamnosin unterbrochen, was zu definierten Knicken in der linearen Struktur des Pektins führt und somit großen Einfluss auf das Hydratisationsvermögen und die Geliereigenschaften hat. Die so beeinflusste makromolekulare Organisation bzw. Dimerisierung der Pektinketten führt einerseits dazu, dass die Ausbildung wichtiger Haftzonen gestört wird und dass auf der anderen Seite die Immobilisierung von Lösungsmittel (Wasser) begünstigt wird. Entscheidend für die Eigenschaften der Pektine ist der Veresterungsgrad der Carboxylgruppen der Galacturonsäuremoleküle. Sie sind teilweise mit Methanol und teilweise oder vollständig durch negative Kationen (z.B. Na^+ und Ca^{2+}) neutralisiert (Hannak, 1997).

Bezüglich des Veresterungsgrades unterteilt Nehring (1969) die Pektine in hoch- und nieder- veresterte Pektine, wobei der Veresterungsgrad der hochveresterten Pektine über 50 % liegt. Hannak (1997) ergänzt diese Unterteilung noch um die Gruppe der mittelveresterten Pektine, die einen Veresterungsgrad von 45 – 65 % aufweisen.

Von besonderem Interesse ist die Fähigkeit der Pektine Gele auszubilden, dabei steht der Veresterungsgrad in engem Zusammenhang mit der Gelbildungsgeschwindigkeit und der Textur der Gele. Hochveresterte Pektine gelieren schneller bzw. bei höheren Temperaturen. Für die Gelbildung ist dazu ein Zuckeranteil von mindestens 55-Gew.-% und ein pH-Wert von 1-3,5 erforderlich. Die Säure sorgt dafür, dass die Pektine nicht negativ aufgeladen werden und sich somit abstoßen. Der Zucker bindet das Wasser, das sonst von den Pektinen aufgenommen wird und dazu führt, dass eine Bindung zwischen den Molekülen verhindert wird. Ist das Ver-

hältnis von pH-Wert und Säure richtig aufeinander abgestimmt und sind genug Pektinmoleküle vorhanden, dann werden die Pektinketten durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. Bei Pektinen mit einem Veresterungsgrad unter 50 % ist eine Zugabe von Calcium erforderlich, Zucker wird nicht mehr benötigt. Diese Reaktion läuft im pH-Bereich von 1-7 ab (Hammer, 2005).

Als Pektinsäure wird Pektin mit einem Veresterungsgrad unter 5 % bezeichnet. Pektinsäure bildet unter gleichen Bedingungen wie niedrigveresterte Pektine Gele. Bei hohen pH-Werten und einem hohen Gehalt an mehrwertigen Kationen fällt die Pektinsäure als Pektat aus (Hannak, 2005).

2.2.3 Verwendung von Pektin

Aufgrund seiner gelbildenden Eigenschaften wird Pektin in großen Mengen bei der Herstellung von Konfitüren und Gelees eingesetzt. Auch wird Pektin in der Milchtechnologie verwendet, um das Koagulieren des Kaseins durch Hitze zu vermeiden. Zunehmend wichtig ist der Einsatz der Pektine als Stabilisatoren in Getränken. Auch stabilisieren Pektine Salatsaucen und halten so beispielsweise Kräuter in der Schwebelage. In der pharmazeutischen Industrie wird auf Pektin zurückgegriffen, um Tabletten mit magensäurefesten Überzügen zu versehen (Hannak, 2005).

2.3 Pektinolytische Enzyme

2.3.1 Enzyme

Enzyme sind von Zellen gebildete Biopolymere bzw. Eiweißpolymere, die als Biokatalysatoren fungieren und aus einer oder mehreren Untereinheiten bestehen (Steffens, 2007), die sich wiederum aus Aminosäuren zusammensetzen. Insgesamt handelt es sich dabei um 20 Aminosäuren, die proteinspezifisch in einer gewissen Reihenfolge miteinander über Peptidbindungen verknüpft sind. Die Peptidbindung wird von den Carboxyl- und Aminogruppen der einzelnen Aminosäuren unter Abspaltung von Wasser gebildet. Verbindungen von mehr als 100 Aminosäuren werden als Proteine bezeichnet. Besteht die Verbindung aus 10-100 Aminosäuren, so wird sie als Polypeptid bezeichnet. In einem Enzym nehmen die Proteine eine gewisse Struktur ein und sind räumlich zueinander angeordnet, so dass ein dreidimensionales Gebilde entsteht, das laut Ewest (2008) eine taschenartige Vertiefung besitzt, die als aktives Zentrum bezeichnet wird. Auch Steffens (2007) bezeichnet den spezifischen dreidimensiona-

len Aufbau der Enzyme als Voraussetzung dafür, dass Enzyme mit bestimmten Stoffen, die als Substrate bezeichnet werden, einen „Enzym-Substrat-Komplex“ eingehen können. Er bezeichnet die dynamische räumliche Anordnung im aktiven Zentrum des Enzyms als „induced fit Prinzip“, das im allgemeinen deutschen Sprachgebrauch gern als „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bezeichnet wird. Durch diese Anordnung der Reaktionspartner kann die Aktivierungsenergie herabgesetzt werden, was sich in einer extremen Geschwindigkeitssteigerung des Reaktionsverlaufes niederschlägt. Chemische und biochemische Reaktionen können durch den Einsatz von Katalysatoren um das 10^6 bis 10^{15} fache gesteigert werden. Jedoch unterliegen enzymatisch katalysierte Reaktionen einer typischen Sättigungskinetik (Steffens, 2007). Auch Löffler und Petrides (1998) geben den Faktor $10^{10} - 10^{20}$ für die Beschleunigung einer Reaktion durch den Einsatz von Enzymen an. Dabei kann das Molekulargewicht der Enzyme zwischen 10 und mehreren tausend Kilodalton liegen.

Enzyme werden im Vergleich zu chemischen Katalysatoren als reaktionsspezifische Katalysatoren bezeichnet, da sie jeweils nur eine einzige oder sehr wenige Reaktionen katalysieren. Diese Spezifität der Enzymkatalyse betrifft gelegentlich nicht nur das Substrat als Gesamtmolekül, sondern nur chemische Gruppen des Substrates (Löffler, Petrides, 1998).

Bei der Betrachtung der Nomenklatur der Enzyme, ist festzustellen, dass für viele Enzyme meist mehrere Namen gebräuchlich sind. Dies liegt an der Tatsache, dass in der Frühzeit der Enzymologie den Enzymen willkürlich Namen gegeben wurden. Erst später wurden Enzymnamen dadurch gebildet, dass an das von dem Enzym umgesetzte Substrat die Endung *-ase* angefügt wurde. Somit hießen Enzyme, die Stärke spalteten Amylasen und fettspaltende Enzyme Lipasen. Nach ihrer Funktion wurden einige Enzymgruppen auch als Oxidasen, Dehydrogenase und Decarboxylasen bezeichnet. Diese Trivialnamen haben sich teilweise bis heute erhalten.

Ein genaueres Nomenklatursystem ist das IUB-System (Internation Union of Biochemistry), da es den Mechanismus der Reaktion genauer beschreibt. Nach diesem System setzt sich der Name des Enzyms aus zwei Teilen zusammen. Im ersten Teil wird der Name des Substrates bezeichnet, der Zweite, welcher auf *-ase* endet, bezeichnet den Typ der katalysierten Reaktion. Somit wird die Endung *-ase* nicht mehr direkt an das Substrat angehängt. Liegt eine spezielle Art der Reaktion vor, so werden zusätzliche Informationen in Klammern hinzugefügt. Wie z.B. das Enzym, das die Reaktion



katalysiert und mit seinem Trivialnamen als Malatenzym bezeichnet wird. Dieses Enzym wird nach den IUB-Nomenklaturregeln als L-Malat: NAD-Oxidoreduktase (decarboxylierend) bezeichnet (Löffler, Petrides, 1998).

Grundsätzlich kann man Enzyme in 6 Hauptklassen einteilen:

- Die sogenannten Oxidoreduktasen bilden die erste besonders wichtige Hauptgruppe. Sie katalysieren Redoxreaktionen, die beispielsweise beim Abbau von Substraten zur Energiegewinnung eine außerordentlich wichtige Rolle spielen. Oftmals weisen die Oxidoreduktasen ein mehr oder weniger fest gebundenes Coenzym auf, das als Wasserstoffüberträger fungiert. Oxidoreduktasen katalysieren unter anderem die Oxidation von CHOH -, CHNH_2 - sowie $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ -Gruppen.
- In der zweiten Hauptgruppe sind die Transferasen angesiedelt, die den Transfer einer Gruppe zwischen zwei Substraten katalysieren. Als ein Beispiel für diese wichtige Gruppe von Enzymen können die Kinasen angesehen werden, denn sie vermitteln den Phosphortransfer von Adenosintriphosphat auf das entsprechende Substrat. Weitere Transferasen können Glykosyl-, Acyl- oder Alkyl-Gruppen übertragen.
- Eine besonders wichtige Enzymgruppe sind die Hydrolasen, die für den Abbau verschiedener Makromoleküle verantwortlich sind. Sie katalysieren ganz allgemein die hydrolytische Spaltung von Estern, Ethern, Peptiden, Glykosiden, Säureanhydriden oder C-C-Bindungen. Vertreter dieser dritten Gruppe sind beispielsweise Polygalacturonasen, Pektinesterasen aber auch viele Enzyme des Verdauungstraktes.
- Lyasen sind im Gegensatz zu den Hydrolasen Enzyme, die verschiedene Gruppen nichthydrolytisch abspalten. Lyasen spalten C - C -, C - O - und C - N - Bindungen durch Elimination und Einführen einer Doppelbindung.
- Isomerasen stellen eine weitere wichtige Gruppe der Enzyme dar. Sie ermöglichen es, dass Isomere, die in der Natur vorkommen, ineinander umgewandelt werden können. Als Beispiele können die Aldose-Ketose-Isomerase der Glykolyse sowie die verschiedenen Epimerasen und Cis-Trans-Isomerasen betrachtet werden.
- Die letzte Hauptgruppe stellen die Ligasen dar, die im Wesentlichen in biosynthetischen Prozessen genutzt werden, um das energieabhängige Knüpfen von Bindungen zu katalysieren. Als Energiedonator fungiert bei diesen Reaktionen das Adenosintriphosphat beziehungsweise andere Verbindungen mit hohem Gruppenübertragungspotential (Löffler, Petrides, 1998).

Laut Ewest (2008) wird jedem Enzym nach IUB eine Schlüsselnummer zugewiesen, die als EC-Nummer bezeichnet wird und deren erste Zahl die Hauptklasse der Enzyme angibt. So besitzt die Pektinesterase beispielsweise die Schlüsselnummer „PE, EC 3.1.1.11“, wobei die 3 für die dritte Hauptgruppe der Enzyme steht und somit angibt, dass es sich bei diesem Enzym um eine Hydrolase handelt.

Eine wichtige Rolle bei enzymatischen Reaktionen spielen Cofaktoren bzw. Coenzyme, die Nichtprotein-Moleküle sind und besonders von den Enzymen der Hauptgruppen 1, 2, 5 und 6 benötigt werden. Nehmen die Coenzyme wie ein zweites Substrat an der Reaktion teil, so werden sie auch als Cosubstrate bezeichnet. Eines der wichtigsten Co-Enzyme ist dabei das NADP^+ -Molekül, das ein wasserstoffübertragendes Coenzym ist. Diese Coenzyme sind häufig relativ fest mit dem eigentlichen Enzym verbunden. Gelegentlich sind sie sogar durch covalente Bindungen an das Protein gebunden. Der so entstandene Komplex aus Enzym und Coenzym wird als Holoenzym bezeichnet. Der Proteinanteil allein wird als Apoenzym bezeichnet (Löffler, Petrides, 1998).

Die Anwesenheit von Coenzymen ist somit ganz entscheidend für die Aktivität eines Enzyms. Es gibt jedoch noch eine Reihe von weiteren Faktoren, die die Aktivität eines Enzyms beeinflussen. Als Beispiele sind da der pH-Wert, die Konzentration der gelösten Salze oder die Reaktionstemperatur zu nennen. Auch hat die Konzentration des Substrates einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms.

Angegeben wird die Aktivität eines Enzyms in internationalen Einheiten, die IU abgekürzt werden und sich vom englischen Begriff „international Unit“ ableiten. Dabei stellt eine Einheit die Menge Enzym dar, die den Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute unter definierten Standardbedingungen (Temperatur, pH-Wert des Substrates) katalysiert. Bei der Messung der Enzymaktivität ist darauf zu achten, dass die Reaktionspartner im Überschuss vorhanden sind, da nur in diesem Falle die Geschwindigkeit des Substratumsatzes proportional der Menge des vorhandenen Enzyms ist. Zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms misst man entweder den Substratverbrauch oder die Bildung der Reaktionsprodukte durch chemisch-physikalisch Methoden. Die dabei gebräuchlichste Methode ist die photometrische Messung. Haben Substrat bzw. Reaktionsprodukt eine spezifische Absorption bei einer definierten Wellenlänge, so kann anhand der Extinktionsänderung der durch das Enzym katalysierte Umsatz berechnet werden. Dieses Prinzip ist vor allem von Otto Warburg als optisch-enzymatischer Test in die biochemische Analytik etabliert worden (Löffler, Petrides, 1998).

Über die Zunahme der Reaktionsprodukte erfolgt auch die Bestimmung der Aktivität eines der wichtigsten pektinolytischen Enzyme, das neben der Pektinesterase und endo-

Polygalacturonase in dieser Arbeit untersucht wird. Es handelt sich dabei um die exo-Polygalacturonase, deren Aktivität über die Zunahme der Reaktionsprodukte photometrisch bestimmt wird.

2.3.2 Polygalacturonase

Die Polygalacturonasen, die von Faulstich und Schiedel (2008) auch als Polymethylgalacturonasen bezeichnet werden, gehören zur großen Hauptgruppe der Hydrolasen und katalysieren die Spaltung der α -1-4 glycosidischen Bindungen zwischen den Galacturonsäuremolekülen des Pektins. Dabei spaltet die endo-Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) die Pektinkette zufällig, wo hingegen die exo-Polygalacturonase (EC 3.2.1.67) laut Meurer (1991), wie in Abb. 5 dargestellt, Monogalacturonsäureeinheiten vom nichtreduzierenden Kettenende her abspalten.

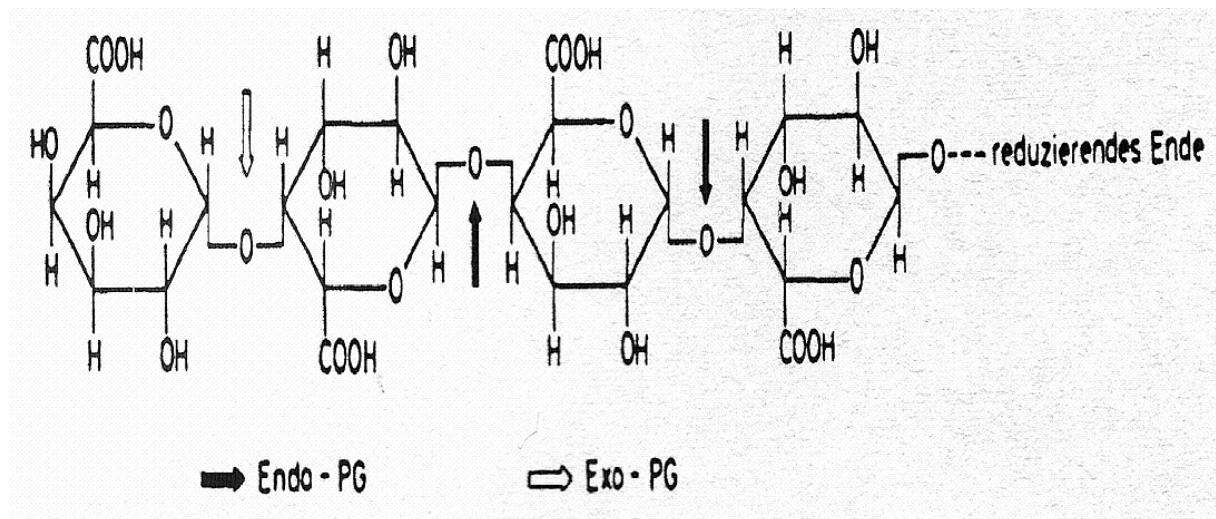


Abb. 5: Darstellung des Angriffs von endo- und exo-Polygalacturonase (Meurer, 1991)

Faulstich und Schiedel (2008) bestätigen, dass die exo-Polygalacturonase Monomere vom nichtreduzierenden Kettenende her abspalten. Sie gehen jedoch auch davon aus, dass Dimere abgespalten werden.

Laut Meurer (1991) kommen sowohl exo-Polygalacturonase und endo-Polygalacturonase in allen höheren Pflanzen und zahlreichen Mikroorganismen vor. Gerade für pathogene und saprophytische Pflanzenpilze sind die endo-Polygalacturonasen von entscheidender Bedeutung und kommen dementsprechend häufig vor. Laut Shen et al. (2003) verfügen aber auch einige Rüsselkäferarten über Polygalacturonasen. Auch andere Insekten wie z.B. Blattläuse verfügen über Polygalacturonasen. Im Falle der Fruchtfliege (*drosophila melanogaster*) wur-

de ebenfalls vermutete, dass sie über diese Enzyme verfügen, was von Shen et al. (2003) jedoch verneint wird.

Endo-Polygalacturonasen spielen eine entscheidende Rolle bei dem Erweichen der Früchte während der Fruchtreife, die sowohl von Meurer (1991) als auch von Ewest (2008) besonders betont wird. Dabei ist es nicht zwingend notwendig, dass die reifenden Früchte ein Gemisch aus exo- und endo-Polygalacturonase enthalten. Als ein Beispiel für die Tatsache, dass exo- und endo-Polygalacturonase als Gemisch in einer Frucht vorkommen, nennen Faulstich und Schiedel (2008) die Papaya. Dabei stellen sie jedoch heraus, dass die endo-Polygalacturonasen häufiger auftreten, was auch von Duvetter et al. (2009) bestätigt wird.

Somit stellen die Polygalacturonasen gerade für die Ernte, Lagerung und Vermarktung von empfindlichen Obst- und Gemüsesorten eine wichtige Einflussgröße dar. Ein Paradebeispiel aus diesem Bereich ist die Tomate, denn kein anderes Lebensmittel wurde bezüglich der Aktivität von pektinolytischen Enzymen so intensiv untersucht. Der Versuch, das Erweichen der Tomaten während der Reifung durch Gen-Silencing der entsprechenden Gene für die Polygalacturonasen zu beeinflussen, blieb jedoch ohne Erfolg. Es gelang zwar die Aktivität der endo-Polygalacturonase auf unter 1% ihrer ursprünglichen Aktivität zu senken, jedoch führte dies laut Lösch (2000) zu keiner Verbesserung der Fruchtfestigkeit. Somit wurden Tomatensorten wie „Mac Gregor“ und „Endless Summer“, deren Erbgut diesbezüglich verändert wurde, wieder vom Markt zurückgenommen. Eine Verbesserung wurde in diesem Zusammenhang lediglich bei pastösen Tomatenprodukten erreicht. Der Versuch, die Aktivität der Pektinesterase in Tomaten durch Gen-Silencing zu senken und somit auch die Aktivität der endo-Polygalacturonase zu beeinflussen, da diese lediglich entestertes Pektin abbauen kann, war ebenfalls nicht erfolgreich (Lösch, 2000).

Nach Duvetter et al. (2009) suggeriert der hohe isoelektrische Punkt der endo-Polygalacturonase, dass das Enzym elektrostatisch mit dem Substrat interagiert. Das Molekül weist ein Molekulargewicht von 23,2 – 120 Kilodalton auf.

Laut Beltitz, Grosch und Schieberle (2001) werden Polygalacturonasen durch NaCl und manchmal auch zusätzlich durch Calcium-Ionen aktiviert. Ihr Optimum weisen sie gewöhnlich im Bereich von pH 5-6,5 auf. Es gibt jedoch auch Polygalacturonasen, deren Optimum bei niedrigeren pH-Werten liegt. So finden Bartley et al. (1982) endo-Polygalacturonasen in reifenden Birnen, deren pH-Optimum bei 4,5 liegt. Pathak und Sanwal (1998) finden bei ihrer Suche nach multiplen Formen von Polygalacturonasen in Bananen sogar eine endo-Polygalac-

turonase, deren pH-Optimum bei 3,3 liegt. In diesem Zusammenhang stoßen sie auch auf eine exo-Polygalacturonase, deren pH-Optimum bei einem pH-Wert von 3,7 liegt.

Polygalacturonasen werden industriell aus Mikroorganismen gewonnen und vorrangig in der Saft- und Weinindustrie eingesetzt, um sowohl Pressausbeuten zu erhöhen, als auch gewonnene Säfte zu klären. Des Weiteren ist ein Einsatz von Polygalacturonasen bei der Biogasfermentation in den Focus der Wissenschaft gerückt, um somit die Aktivität der methanerzeugenden Mikroorganismen, durch den Aufschluss der Rohstoffe, zu fördern.

Als wichtigen Einflussfaktor für den Abbau von Pektin bzw. Polygalacturonsäure durch die endo-Polygalacturonase stellen sowohl Faulstich und Schiedel (2008) als auch Duvetter et al. (2009) das Vorhandensein von Pektinmethylesterase im Substratgemisch dar. Während Faulstich und Schiedel davon ausgehen, dass die Pektinmethylesterase ein geeignetes Milieu für die Aktivität der endo-Polygalacturonase schafft, wird durch die Aussage von Duvetter et al., dass die endo-Polygalacturonase entestertes Pektin als Substrat bevorzugt, klar, dass die Polymethylesterase das Pektin durch die Entesterung erst zugänglich macht für die endo-Polygalacturonase. Das Enzym weist sogar eine sinkende Aktivität bei steigendem Veresterungsgrad auf.

2.3.3 Pektinesterase

Die Pektinesterasen, die von Faulstich und Schiedel (2008) aber auch von Duvetter et al. (2009) als Pektinmethylesterasen bezeichnet werden, gehören wie auch die Polygalacturonasen zur großen Hauptgruppe der Hydrolasen. Bei genauerer Betrachtung gehören sie dort zur Untergruppe der Carboxyester-Hydrolasen. Wie der Name schon sagt hydrolysieren diese Enzyme die Methylestergruppen des Pektins, wodurch laut Meurer (1991) aus hochverestertem Pektin niederverestertes Pektin entsteht. Nach Faulstich und Schiedel (2008) kommt es durch das Einwirken von Pektinmethylesterase auf die Methylestergruppen des Pektins zur Bildung von Pektinsäure und Methanol.

Voraussetzung für diese Hydrolyse sind freie Carboxylgruppen, da es nur in ihrer Nachbarschaft zur Ausbildung des Enzym-Substratkomplexes kommen kann. Somit entstehen entlang der Pektinkette größere Abschnitte, in denen das Pektin entestert ist, was als eine Voraussetzung für eine weitere hydrolytische Spaltung durch Polygalacturonasen gilt. Bei Anwesenheit von Calcium bilden sich zwischen den entesterten Carboxylgruppen benachbarter Pektinmoleküle Calciumbrücken aus, die den weiteren Abbau durch Polygalacturonasen behindern (Meurer, 1991; Faulstich und Schiedel, 2008).

Pektinesterase kommen in vielen höheren Pflanzen vor und sind dort an die Zellwand absorbiert. Durch Zunahme der Ionenkonzentration werden sie in die sie umgebende Flüssigkeit von der Zellwand gelöst. Pektinmethylesterasen von Pilzen und höheren Pflanzen unterscheiden sich dabei in ihrem pH-Optimum, ihrer Inaktivierungstemperatur sowie durch den Einfluss von NaCl auf ihre Aktivität (Faulstich und Schiedel, 2008).

Laut Lösch (2000) werden die Pektinesterasen auch durch mono- und bivalente Kationen aktiviert, wobei die Aktivierung durch bivalente Kationen um den Faktor 5 bis 20 stärker ist. Eine zu hohe Kationenkonzentration wirkt jedoch der Aktivierung der Pektinesterase dadurch entgegen, dass die freien Carboxylgruppen des Pektins neutralisiert werden und das Pektin somit nicht mehr als Substrat für die Pektinesterase zugänglich ist.

Pektinesterasen besitzen im Allgemeinen ein Molekulargewicht von 25 – 54 Kilodalton und sind als Monomer aktiv. Haben sie ihren Ursprung in einer eukariotischen Zelle, so sind sie Glykoproteine. Der isoelektrische Punkt der Pektinesterasen kann zwischen einem pH-Wert von 3,1 bei Pilzen und 11 bei Tomaten variieren, wobei die meisten pflanzlichen Pektinmethylesterasen ihren isoelektrischen Punkt bei einem pH-Wert von 7 oder im alkalischen aufweisen. Die Aktivität ist somit sehr stark vom pH-Wert abhängig und weist ihr Optimum bei einem pH-Wert von 6-8 auf, für den Fall, dass das Enzym pflanzlicher Herkunft ist. Mikrobielle Pektinmethylesterasen hingegen weisen ihr Optimum bei pH-Werten zwischen 4-9 auf. Auch die Temperaturstabilität dieses Enzyms ist sehr stark von der biologischen Herkunft abhängig, wobei die Esterasen, die aus Bananen gewonnen werden, die größte Temperaturtoleranz aufweisen (Duvetter et al., 2009).

Nach Lösch (2000) weisen auch Pektinesterasen aus Kartoffeln eine sehr hohe Temperaturtoleranz auf. Generell werden Enzyme beim Blanchieren inaktiviert, im Falle von Kartoffeln konnte jedoch die Erfahrung gemacht werden, dass trotz einer Vorerhitzung auf 60-70°C die Pektinesterase aktiv blieb.

Da Pektinesterasen gerade in der Saft- und Weinindustrie eingesetzt werden, um Säfte zu schönen und bei der Erhöhung der Pressausbeuten mitzuwirken, sind Pektinesterasen mit niedrigerem pH-Optimum technologisch wertvoller, was daran liegt, dass die Substrate sich in einem Milieu befinden, das einen recht sauren pH-Wert aufweist. Aber gerade aus diesem Grunde ist es nötig die Pektinesterasen und auch andere Enzyme, die industriell genutzt werden sollen, auf ihre Optimalbedingungen zu untersuchen, um somit das passende Enzym zu finden, was im Produktionsprozess später eine beachtliche Zeit- und Energieersparnis bringen kann.

3 Materialien und Methoden

3.1 Herstellung des Enzymextraktes mittels Ultrafiltration

Da pektinolytische Enzyme im Gewebe der Pflanzen nur in sehr geringen Mengen vorkommen, ist es nötig, sie in Form eines Extraktes zu konzentrieren. Dafür werden vorrangig zwei Varianten genutzt, von denen eine die Ammoniumsulfatfällung ist, bei der ein Ausfällen der Enzyme mittels Ammoniumsulfat vorgenommen wird. Ewest (2009) favorisiert jedoch die Enzymextraktgewinnung mittels Ultrafiltration, da sie weniger zeitintensiv ist und die Enzymaktivität weniger beeinflusst. Bei beiden Herstellverfahren ist jedoch zu beachten, dass alle Verfahrensschritte bei 4 °C ausgeführt werden, da die Enzyme thermisch labil sind.

Die Herstellung des Enzymextraktes mittels Ultrafiltration lässt sich im Wesentlichen in drei Verfahrensschritte untergliedern, von denen der Aufschluss des Zellgewebes der erste ist. In diesem Verfahrensschritt wird das Pflanzengewebe über eine Messermühle bzw. Küchenmaschine zerkleinert, was unter Zusatz einer wässrigen NaCl-Lösung geschieht, die zudem noch mit Saponin versetzt ist. Saponine sind Chemikalien, die über tensidähnliche Eigenschaften verfügen und eingesetzt werden, um den Zellaufschluss zu verbessern. Nach dem Vorzerkleinern über die Küchenmaschine erfolgt das Homogenisieren und weitere Zerkleinern der Pflanzengewebestücke mittels eines Ultra-Turrax. Die so erzeugte Suspension wird 2 Stunden gerührt und dann durch ein Nylontuch gegeben, um die festen Bestandteile abzutrennen, dabei wird der sich bildende Filterkuchen mit dem Nylontuch ausgewrungen. Das so erzeugte Filtrat wird dann bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand durchläuft anschließend den zweiten wesentlichen Herstellungsschritt. Er wird mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. In diesem Verfahrensschritt werden der Enzymlösung vorrangig Wasser, Salze und andere Stoffe, wie z.B. reduzierende Zucker, die in der Lage sind die Membran zu passieren, entzogen. Ist die Enzymlösung auf ein bestimmtes Volumen aufkonzentriert, wird die Membran mit einem definierten, auf 4 °C temperierten Volumen NaCl-Lösung gespült, das dem Retentat zugegeben wird. Der so erzeugte Enzymextrakt wird nun dem dritten großen Verfahrensschritt unterzogen, in dem er von löslichen Stoffen mit niedriger Molekülmasse befreit wird. Dazu wird ein Dialysebad verwendet, in dem sich eine Dialyselösung befindet, die aus entionisiertem Wasser, NaCl und einer sehr geringen Menge Natriumazid zusammensetzt. Das Natriumazid dient der Unterdrückung mikrobiellen Wachstums. Der Enzymextrakt befindet sich in einer semipermeablen Membran aus Cellulose, die Dialyseschlauch genannt wird. Dieser Dialyse-

schlauch muss vor dem Befüllen mit dem Enzymextrakt ausgekocht werden, um so Keime und andere Verunreinigungen zu entfernen. Der gefüllte Dialyseschlauch verbleibt anschließend jeweils zweimal für mindestens 4 Stunden in einer Dialyselösung, die im Voraus auf 4 °C temperiert wird und deren Temperatur während der Dialyse auf 4 °C konstant gehalten wird. Abschließend wird der Extrakt erneut zentrifugiert, um geringe Niederschlagsbildungen zu entfernen. Der Enzymextrakt kann dann direkt für die Bestimmung der Pektinesteraseaktivität und der endo-Polygalacturonaseaktivität eingesetzt werden (Meurer, 1991; Ewest, 2009).

3.1.1 Geräte und Materialien Ultrafiltration

- Küchenmaschine
- Ultra-Turrax
- Magnetrührer
- Kühlzentrifuge (Hettich UNIVERSAL 30 RF)
- Ultrafiltrationssystem Vivaflow (Membran aus Polypropylen, 10.000 MWCO)
- Schlauchpumpe
- Heizplatte
- Nylontuch
- Zentrifugenbecher
- Dialyseschlauch (ZelluTrans ROTH, Ø 25,5 mm, 8.000 bis 10.000 D Ausschlussgrenze)
- diverse Bechergläser
- Messer
- Schneidbrett
- Zuckerrübe (Sorte: Belize)
- 0,75 M NaCl-Lösung
- Saponin (Roth)
- Eis
- Dialyselösung bestehend aus
 - 0,1 M NaCl
 - 0,01 M Acetatpuffer pH 5,6 nach GOMORI (1955)
 - 0,001 M Natriumazid

3.1.2 Durchführung Ultrafiltration

Die Zuckerrüben der Sorte Belize wurden zur Vorbereitung auf den Aufschluss unter Verwendung eines Messers und eines Schneidbrettes geschält und in grobe Stücke geschnitten, die dann unter Verwendung einer Zerkleinerungsmaschine in 0,6 cm dicke Scheiben zerteilt wurden. Die Scheiben wurden anschließend dünn in Gefriertüten geschichtet und bei -20 °C eingefroren. Somit konnte bei den Versuchen auf bereits gereinigtes und tiefgekühltes Material zurückgegriffen werden. Lediglich der erste Extrakt wurde aus frischen Zuckerrüben hergestellt. Für den Aufschluss wurden 100 g der tiefgekühlten bzw. frischen Zuckerrüben zusammen mit 200 ml auf 4°C gekühlter 0,75 M NaCl-Lösung und 100 g Saponin in die Küchenmaschine gegeben, mit der das Material eine Minute zerkleinert wurde. Um das Probenmaterial weiter zu homogenisieren, wurde die entstandene Masse für eine Minute mit dem Ultra-Turrax behandelt. Die dabei entstandene Suspension wurde anschließend 2 Stunden unter Verwendung eines Magnetrührers gerührt. Dabei wurde das Probengefäß in ein wesentlich größeres Gefäß gestellt, welches mit Eis gefüllt war und es somit ermöglichte, die Suspension auf ca. 4°C zu temperieren. Im Anschluss wurde die Suspension durch ein Nylontuch gefiltert und das Filtrat bei 3200 Umdrehungen pro Minute und 4 °C in der Kühlzentrifuge 25 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde mit Hilfe des Membranfiltersystems auf 35 ml aufkonzentriert. Dies geschah unter ständiger Kühlung der Membran und des Extraktes mittels Eis. Bei Beendigung der Aufkonzentration wurde die Membran mit 10 ml einer 0,5 M NaCl-Lösung, die auf 4°C temperiert war, gespült. Die Spülflüssigkeit wurde dem Extrakt zugesetzt. Der Extrakt wird dann in den Dialyseschlauch, der zuvor zweimal für 15 Minuten in entionisiertem Wasser ausgekocht wurde, eingefüllt und mittels der Schlauchklemmen, die wie der Schlauch zweimal ausgekocht wurden, verschlossen. Der gefüllte Dialyseschlauch wurde nun für mindestens zweimal 4 Stunden in je 2 Litern Dialyselösung verbracht und dort bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren des dialysierten Extraktes bei 5000 Umdrehungen pro Minute und einer Temperatur von 4 °C. Der dabei entstandene Überstand wurde dann volumetrisch erfasst, um bei den Versuchen einen Bezug auf die Einwage der Zuckerrübe herstellen zu können.

3.2 Methode zur Bestimmung der Pektinesteraseaktivität

Die Pektinesterase ist ein Enzym, welches die Esterbindung zwischen dem Methylrest und der Carboxylgruppe des Pektins spaltet. Laut Meurer (1991) gibt es vielfältige Methoden zur Bestimmung der Pektinesteraseaktivität, die entweder die Änderung des Substrates oder ein

Freisetzen von Methanol erfassen. Bell et al. (1951) bezeichnen das Messen der freigesetzten Carboxylgruppen über das Titrieren mit einer alkalischen Maßlösung als Möglichkeit die Pektinesterase zu analysieren.

Bei dieser Methode wirkt die Pektinesterase auf hochverestertes Pektin ein und setzt somit Carboxylgruppen frei, die zu einem Absenken des pH-Wertes in der Analysenlösung führen. Die freigesetzten Carboxylgruppen lassen sich über das Titrieren mit einer verdünnten Natronlauge quantitativ bestimmen. Dies kann zum Einen über das manuelle Zudosieren von Natronlauge mittels eines Dosimaten oder einer Bürette geschehen, oder über die Verwendung eines Autotitrators, der den pH-Wert während der ganzen Analysedauer durch Zutitrieren der verdünnten Natronlauge konstant hält. Die allgemeine Aktivitätsbestimmung erfolgt bei dem pH-Wert von 7,0. Bei der Bestimmung des pH-Optimums werden die entsprechenden pH-Werte während der Analysedauer konstant gehalten. Dabei ist zu beachten, dass es bei pH-Werten über 7,5 zu einer Entesterung durch die Lauge kommt. Aus diesem Grunde ist es nötig, bei den entsprechenden pH-Werten Laugenblindwerte zu bestimmen, die dann von den eigentlichen Messwerten abgezogen werden. Von Bedeutung ist auch, dass der pH-Wert der Substratlösung zwischen 3 und 4 liegt. Somit ist eine Vortitration unter Verwendung einer etwas stärker konzentrierten Natronlauge angebracht, da es bei Verwendung der schwach konzentrierten Maßlösung zu einer starken Verdünnung des Substrates kommen würde, was sich wiederum auf die Enzymaktivität auswirken würde, da die Substratkonzentration laut Steffens (2007) in die Michaelis-Menten-Gleichung einfließt und sich somit auf die Enzymaktivität auswirkt.

Als Substrat wurde, wie von Ewest (2009) und Meurer (1991) bereits beschrieben, eine 0,5%ige Citruspektinlösung verwendet, deren Veresterungsgrad zwischen 70 und 75 % lag. Der Natriumchloridgehalt der Substratlösung lag bei 0,15 mol/l. Bei der Bestimmung des Natriumchlorid-Optimums wurde das Pektin in der Salzlösung aufgelöst, da es bei direkter Zugabe von NaCl oder konzentrierter NaCl-Lösung in die Pektinlösung zu Ausflockungen kommt. Die Aktivität der Pektinesterase kann unter Verwendung der Formel 1 berechnet werden

$$U_{PE} / ml = \frac{\mu mol \text{ freigesetzte } COO^-}{Zeit \text{ in Minuten} \times ml \text{ Enzymextrakt}} \quad (1)$$

Da bei der Titration 0,01 M NaOH verwendet wird, von der 1 ml mit 10 μ mol COO^- korrespondiert, muss die Formel 1 um den Faktor 10 ergänzt werden, wie in Formel 2 dargestellt.

$$U_{PE} / ml = \frac{\mu mol \text{ freigesetzte } COO^- \times 10}{Zeit \text{ in Minuten} \times ml \text{ Enzymextrakt}} \quad (2)$$

3.2.1 Geräte und Materialien Pektinesteraseuntersuchung

- Dosimat 775 mit 1 ml-Wechseleinheit (Hersteller: Metrohm)
- pH-Meter InoLab (WTW) mit pH-Glaselektrode
- Thermostat
- Stoppuhr
- Wasserbad (T = 30°C)
- Pipetten
- Heizplatte mit Magnetrührer
- diverse Bechergläser
- Enzymextrakt aus Zuckerrüben
- Citruspektin (Veresterungsgrad 70-75%, Cargill)
- 1 M NaCl-Lösung
- 0,3 M NaOH
- 0,01 M NaOH-Maßlösung als Titer

3.2.2 Durchführung Pektinesteraseuntersuchung

Zu Beginn des Versuches muss eine 0,5%ige Pektinlösung als Substrat hergestellt werden. Dazu wird 1 g Pektin C in 30 ml einer 1 M NaCl-Lösung unter ständigem Rühren verteilt. Im Anschluss wird die Lösung unter Rühren auf ca. 60 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mittels der 0,3 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Bei der Bestimmung des pH-Optimums entfällt die Einstellung des pH-Wertes auf 6,5.

In das über einen Doppelmantel temperierte Reaktionsgefäß wurden 15 ml Substrat eingefüllt und mit 1,5 ml Enzymextrakt vermischt. Bei Kontakt des Enzymextraktes mit dem Substrat wurde die Stoppuhr betätigt. In den dann folgenden 2 Minuten wurde das Enzymextrakt-Substrat-Gemisch auf pH 7 eingestellt. Nach Ablauf der 2 Minuten wurde die Anzeige des Dosimaten auf 0 gestellt und dann über 4 weitere Minuten der pH-Wert des Enzym-Substrat-Gemisches auf pH 7 gehalten. Über den Verbrauch an 0,01 M NaOH-Lösung wurde mittels Formel 2 die Aktivität der Pektinesterase der Zuckerrübe berechnet.

Bei der Bestimmung des pH-Optimums wurde der pH-Wert des Substrat-Enzym-Gemisches während der ersten 2 Minuten auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt, bei dem die Un-

tersuchung stattfinden sollte und in den anschließenden 4 Minuten wurde der pH-Wert durch das Zugabe der Maßlösung auf diesem Wert gehalten und der Verbrauch an Maßlösung erfasst.

Bei der Bestimmung des NaCl-Optimums, wurde das Pektin in einer entsprechenden NaCl-Lösung eingestreut und gelöst. Die Messung erfolgte bei einem pH-Wert von 7.

3.3 Methode zur Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität

Durch die Aktivität der exo-Polygalacturonasen werden Galacturonsäuren vom nichtreduzierenden Ende der Polygalacturonsäuren abgespalten. Honda et al. (1982) betrachteten die Zunahme der reduzierenden Gruppen in einer polygalacturonsäurehaltigen Reaktionslösung als ein Maß für die Aktivität der in der Reaktionslösung vorhandenen exo-Polygalacturonase.

Alle anderen Verfahren, mit denen man die Aktivität des Enzyms bestimmen konnte nutzten ebenfalls die Tatsache, dass reduzierende Gruppen freigesetzt wurden. Als übliche Verfahren der Bestimmung galten bis 1982 die Kupfer-Arsenmolybdate-Methode nach Nelson und die Nitrosalicylsäure-Methode nach Luchsinger und Cornesky, wobei die Kupfer-Arsenmolybdate-Methode von Gross (1982) als die wesentlich sensiblere Methode dargestellt wurde. Als Mittel der Wahl stellte Gross (1982) jedoch die Methode nach Honda et al. dar, da sie um ca. 140 % sensibler sei als die üblichen Methoden.

Bei der Methode nach Honda et al. (1982) wurde 2-Cyanacetamid genutzt, welches mit den Aldehydgruppen der reduzierenden Zuckern reagierte, wobei es durch Kondensationsreaktionen zu Reaktionsprodukten kam, die ihr Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 276 nm hatten. Auch kam es bei längerer Reaktionsdauer als Folge von Dehydrierungen zur Bildung von Ringverbindungen wie Pyrrol- und Pyridinderivaten, die ihr Extinktionsoptimum ebenfalls bei einer Wellenlänge von 276 nm hatten.

Das Interessante an diesem Verfahren ist, dass mit ihm nicht nur Galacturonsäure nachweisbar ist, sondern auch eine Vielzahl weiterer reduzierender Kohlehydrat-Verbindungen wie z.B. Arabinose, Glucomannose und Mannose. Honda et al. selbst nutzten Glucose bei der Entwicklung des Verfahrens. Wichtig ist daher, dass mit der entsprechenden Substanz, die nachgewiesen werden soll, eine Eichkurve erstellt werden muss, um so die absolute Menge des nachzuweisenden Stoffes berechnen zu können, was für die Bestimmung der Aktivität des Enzyms nötig ist. Honda et al. (1982) und Gross (1982) nutzten dazu Glucose-Standards in einem Bereich von 5-250 nmol. Meurer (1991) und Ewest (2009) hingegen nutzen Konzentrationen von 50-200 $\mu\text{mol/l}$ Galacturonsäure, um eine Eichgerade zu erstellen. Aus den so gemessenen

Extinktionen kann nach Abziehen der Extinktion eines Blindwertes, der dem Pufferblindwert aus Tabelle 4 unter 3.3.2 entspricht, über eine Regressionsrechnung die Gleichung der Eichgerade ermittelt werden.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität muss zuerst eine Aufreinigung des Enzymextraktes unter Verwendung einer Gelfiltrationssäule erfolgen, da sonst laut Meurer (1991) zu hohe Blindwerte entstehen. Der so aufgereinigte Enzymextrakt wird zu einer 0,1%igen Natriumpolygalacturonatlösung gegeben und mit einem Acetatpuffer des pH-Wertes 5,0 versehen, der eine Calciumchlorid-Konzentration von 0,4 mM enthält. Dabei wurde der pH-Wert des Puffers von Meurer (1991) so gewählt, da er dort das pH-Optimum der endo-Polygalacturonase bei Gurken fand. Auch Ewest (2009) nutzte den gleichen Puffer, um ihre Untersuchungen an Äpfeln durchzuführen. Der Anteil Calciumchlorid wurde beigemischt, da laut Meurer (1991) Calcium ein Co-Faktor für die exo-Polygalacturonase darstellt. Er stellte bei seinen Untersuchungen an Gurken einen optimalen Calciumchloridgehalt von 0,2 mM fest, der durch die Zugabe des mit Calciumchlorid versetzten Acetatpuffers eingestellt wird. Die so hergestellte Reaktionsmischung wird für drei Stunden bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wird der Reaktionsmischung eine 1%ige 2-Cyanacetamidlösung und ein Boratpuffer des pH-Wertes 9,0 hinzugesetzt. Dabei kommt dem pH-Wert des Boratpuffers besondere Bedeutung zu, da bereits Honda et al. (1982) dort die maximale Extinktion der Reaktionsprodukte der Glucose gemessen haben. Nach dem Mischen der Zugaben mit der ursprünglichen Reaktionslösung wird die Probe in kochendem Wasser 11 Minuten erwärmt, was das Umsetzen der 2-Cyanacetamidlösung mit den Galacturonsäuremolekülen beschleunigt und die Enzyme inaktiviert. Das Abkühlen auf 20 °C erfolgt über ein Eisbad, da der Prozess so recht schnell abläuft und die Probe umgehend im Spektralphotometer bei 276 nm vermessen werden kann. Meurer (1991) und Ewest (2009) setzen dafür eine Frist von einer Stunde. Honda et al. (1982) setzten dafür eine Frist von zwei Stunden an, da sie während dieser Zeit bei 25 °C gerade einmal den Abbau von 2 % der Reaktionsprodukte feststellen.

Um die so erhaltenen Messwerte auswerten zu können, ist es notwendig, einige Blindwerte zu messen, da eine Reihe von anderen Faktoren das Untersuchungsergebnis beeinträchtigt. So wird beispielsweise ein Enzymblindwert gemessen, um den Einfluss der reduzierenden Zucker, die sich im Enzymextrakt befinden, zu eliminieren. Auch können laut Meurer (1991) andere Polysaccharide im Enzymextrakt enthalten sein, die durch andere Enzyme, die ebenfalls im Enzymextrakt vorhanden sind, abgebaut werden und somit zu einer Zunahme der reduzierenden Gruppen im Reaktionsgemisch führen. Ebenfalls notwendig ist es einen Substratblindwert zu bestimmen, da auch im Substrat selbst schon ein gewisser Anteil an reduzie-

renden Gruppen vorhanden ist. Diese beiden Blindwerte werden zu einem Gesamtblindwert zusammenaddiert, von dem ein Pufferblindwert subtrahiert wird, da die Absorption des Puffers sonst doppelt in den Gesamtblindwert eingehen würde. Der so wie in Formel 3 berechnete Gesamtblindwert wird von den Messwerten, die bestimmt werden, abgezogen und die daraus entstehenden Differenzen können so genutzt werden, um über die Gleichung der Eichgerade die Konzentration der freigesetzten Galacturonsäure wie in Formel 4 zu berechnen.

$$B_G = B_E + B_S - B_P \quad (3)$$

$$\Delta E = ax + b \quad (4)$$

a: Steigung der Geraden

b: Schnittpunkt mit der Ordinatenachse

x: Konzentration der Polygalacturonsäure

ΔE : Differenz von Probenabsorption und Gesamtblindwert

Die Aktivität der *exo*-Polygalacturonase kann berechnet werden indem man die über die Eichgerade berechnete Konzentration der Galacturonsäure in die Formel 5 einsetzt.

$$U_{PG} = x \times \frac{1}{1000 \times \text{Inkubationsdauer in Minuten} \times \text{Enzymmenge in ml}} \times \frac{V_1 \text{ in ml}}{V_2 \text{ in ml}} \quad (5)$$

U_{PG} : *exo*-Polygalacturonaseeinheit

1000: Umrechnungsfaktor von nmol in μmol

V_1 : Volumen des entionisierten Wassers, das genutzt wird den Enzymextrakt zu eluieren

V_2 : Volumen des Enzymextraktes, das über die Gelsäule eluiert wird

Um das pH-Optimum zu bestimmen, werden in Anlehnung an die Arbeit von Ewest (2009) Acetatpuffer mit pH-Werten von 3,5 bis 6 verwendet. Um im neutralen und alkalischen pH-Bereich untersuchen zu können, ist es nötig, andere Puffer wie z.B. Phosphatpuffer einzusetzen. Für die Bestimmung des NaCl-Optimums werden in Anlehnung an die Arbeit von Meurer (1991) NaCl-Konzentrationen von 0 – 0,4 mol/l verwendet. Dabei wird die das Natriumpolygalacturonat in der NaCl-Lösung gelöst, da beim Zutropfen einer konzentrierten Salzlösung oder bei Zugaben von NaCl das Substrat präzipitiert.

3.3.1 Geräte und Materialien exo-Polygalacturonaseuntersuchung

- Spektralfotometer specords s100 (Analytik Jena AG) und Software Aspect Plus
- Klimaschrank (T = 30°C)
- Wasserbad (T = 100°C)
- Stoppuhr
- Reagenzgläser mit Deckel
- Quarzküvetten (d = 10 mm)
- PD – 10 Gelfiltrationssäulen mit Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare)
- Eisbad
- Pipetten
- Bechergläser
- Enzymextrakt
- Na-Salz der Polygalacturonsäure, 0,1%ige Lösung (Sigma)
- 0,2 M Acetatpuffer (pH 5 nach Gomori ,1955), mit 0,4 mM gelöstem CaCl₂
- zur Bestimmung des pH-Optimum wurden Acetatpuffer weitererer pH-Werte genutz
- 0,2 M Boratpuffer (pH 9,0 nach Opitz und Kaltoven, 1998)
- 2-Cyanacetamid, 1%ige Lösung
- Galacturonsäure, 0,01 M Stammlösung in entionisiertem Wasser

3.3.2 Durchführung exo-Polygalacturonaseuntersuchung

Vorbereitend auf die Untersuchung wurde eine Eichgerade erstellt, wozu aus der 0,01 M Stammlösung durch Verdünnungen Standardlösungen hergestellt wurden, die 50, 100, 150 und 200 µM Galacturonsäure enthielten. Von diesen Standardlösungen wurden jeweils 0,5 ml in ein Reagenzglas pipettiert und mit 0,5 ml des Acetatpuffers versetzt. Des Weiteren wurden jeweils 1ml Cyanacetamidlösung und 2 ml des Boratpuffers hinzupipettiert. Nach dem Verschließen der Reagenzgläser, wurde der Inhalt durch Schütteln gemischt und die Reagenzgläser für 11 Minuten in einem Wasserbad bei 99,9 °C erwärmt. Anschließend wurden die Reagenzgläser in einem Eisbad auf 20 °C abgekühlt und ihr Inhalt innerhalb einer Stunde in einem Spektralphotometer unter Verwendung von Quarzküvetten bei 276 nm vermessen, wobei die Referenzmessung gegen Luft erfolgte.

Eine Gelfiltrationssäule wird mit 2 mal 20 ml entionisiertem Wasser gespült und anschließend mit 2,5 ml Enzymextrakt beaufschlagt, der mit 3,5 ml entionisiertem Wasser eluiert wurde. Da die Gelfiltrationssäule mehrfach genutzt wurde, wurde das Spülen mit 2 mal 20 ml entionisiertem Wasser vor jedem Gebrauch der Säule wiederholt.

Im Anschluss wurden 0,25 ml des gereinigten Enzymextraktes mit 0,25 ml der 0,1 %igen Polygalacturonsäurelösung und 0,5 ml des Acetatpuffers in ein Reagenzglas pipettiert und nach dem Verschließen durch Schütteln gemischt. Das Gemisch wurde dann für 3 Stunden bei 30 °C in einem Klimaschrank inkubiert. Anschließend wurden dem Gemisch 1ml 1%ige 2-Cyanacetamidlösung und 2 ml des Boratpuffers (pH 9,0) hinzupipettiert und das Reagenzglas 11 Minuten in einem Wasserbad bei 99,9 °C erwärmt. Das Abkühlen des Reagenzglases auf 20 °C erfolgte in einem Eisbad. Nach dem erneuten Mischen des Reagenzglasinhaltes wurde die Lösung in dem Spektralphotometer unter Verwendung von Quarzküvetten bei 276 nm vermessen.

Begleitend zu der Enzymprobe wurden bei jeder Untersuchung drei Blindproben angefertigt, die zu einem Gesamtblindwert (B_G) zusammengefasst wurden und von der Extinktion der Enzymprobe abgezogen wurden. Aus diesem Grunde wurden ein Enzymblindwert (B_E), ein Substratblindwert (B_S) und ein Pufferblindwert (B_P), wie in Tabelle 4 dargestellt, angefertigt.

Tab. 3: Darstellung der Zusammensetzung der Blindwerte

Blindwert	Zusammensetzung
B_E	0,5 ml Acetatpuffer 0,25 ml Enzymlösung 0,25 ml entionisiertes Wasser
B_S	0,5 ml Acetatpuffer 0,25 ml Polygalacturonsäurelösung 0,25 ml entionisiertes Wasser
B_P	0,5 ml Acetatpuffer 0,5 ml entionisiertes Wasser
B_G	$B_E + B_S - B_P$

3.4 Methode zur Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität

Die endo-Polygalacturonase ist ein Enzym, das die Hydrolyse der α -1,4-glycosidischen Bindungen der Polygalacturonsäure katalysiert. Somit kann ihre Aktivität über die Änderung der Viskosität einer Polygalacturonsäure- bzw. Pektinlösung unter definierten Bedingungen bestimmt werden.

Laut Meurer (1991) ist Citruspectin das optimale Substrat für die Untersuchung der endo-Polygalacturonaseaktivität, da die Viskosität einer Citruspectinlösung deutlich schneller ge-

senkt wird, als die einer Na-Polygalacturonatlösung, was bedeutet, dass geringere Enzymaktivitäten erfassbar sind. Apfelpectin hingegen ist ungeeignet als Substrat, da es laut Meurer (1991) erst zu einer Zunahme der Viskosität führt, was an dem Abbau des stark verzweigten Apfelpektins zu langen fadenförmigen Molekülbruchstücken liegen soll, die dann erst anschließend zu kürzeren Molekülen gespalten werden, was sich dann auch in einer Viskositätsabnahme niederschlägt.

Unter Verwendung eines Enzymextraktes ist es sehr wahrscheinlich, dass auch exo-Polygalacturonasen auf die Pektinlösung einwirken und somit ebenfalls einen Einfluss auf die Viskosität haben. Um dies zu vermeiden, verwendet Meurer (1991) einen Citrat-Phosphatpuffer, da dieser die Aktivität der exo-Polygalacturonase vollständig hemmt. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass die Citronensäure als Komplexbildner fungiert und beispielsweise Ca-Ionen bindet, die als Co-Faktoren fungieren können. Diese Vermutung wird untermauert durch die Feststellung Meurers (1991), dass sich Calciumchlorid in geringen Mengen stimulierend auf die Aktivität der exo-Polygalacturonase auswirkt.

Zu beachten bei der Untersuchung der endo-Polygalacturonase ist auch die Tatsache, dass das Enzym das Substrat nur hydrolysieren kann, wenn es Stellen gibt, an denen das Pektin entestert ist. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Aktivität der Pektinesterase sukzessiv auf die Aktivität der endo-Polygalacturonase wirkt. Aus dieser Sicht wäre die Verwendung von Polygalacturonsäure als Substrat vorteilhaft, da sie bereits vollständig bzw. so gut wie vollständig entestert ist. Aus den bereits genannten Gründen wird jedoch Citruspectin verwendet. So wurde für alle Messungen eine 0,4%ige Citruspectinlösung als Substrat verwendet, wie sie bereits von Ewest (2009) und Meurer (1991) verwendet wurde. Als Messinstrument diente ein Ubbelohde Viskosimeter, das mit einer elektronischen Steuereinheit (AVS 350) der Firma Schott ausgestattet war. Die Kapillare war ebenfalls von der Firma Schott, trug die Typenbezeichnung 53210/I und hatte die Konstante $K = 0,009651 \text{ mm}^2/\text{s}^2$. Die Probe setzte sich aus 12,5 ml Pektinlösung und 2,5 ml Enzymextrakt zusammen und wurde vor dem Einfüllen in die Kapillare gemischt. Die befüllte Kapillare wurde dann an die Steuereinheit angeschlossen und in das Wasserbad gestellt und bei 30 °C temperiert. Die erste Messung erfolgte 3 Minuten nach der Vereinigung von Substrat und Enzymextrakt. Dem Enzym und dem Substrat wurde somit Gelegenheit gegeben, sich zu akklimatisieren und bereits einzuwirken. Das Messen erfolgte durch die beiden Lichtschranken, über die die Zeit gestoppt wurde, die ein definiertes Volumen der Lösung benötigte, um durch eine Kapillare auszulaufen und die als t_0 bezeichnet wurde. Nach 10 weiteren Minuten erfolgte eine weitere Messung, bei der erneut die Durchlaufzeit t_1 bestimmt wurde. Ebenfalls bestimmt wurde die Auslaufzeit eines definierten Volu-

mens von entionisiertem Wasser, die als t_w bezeichnet wurde. Aus den drei Auslaufzeiten wurde wie bereits von Ewest (2009) und Meurer (1991) der Kehrwert einer spezifischen Viskosität nach der Formel Nummer 6 berechnet.

$$\Delta \frac{1}{\eta_{spez}} = \frac{t_w}{t_1 - t_w} - \frac{t_w}{t_0 - t_w} \quad (6)$$

η_{spez} : spezifische Viskosität

t_w : Durchlaufzeit von reinem Wasser

t_0 : Durchlaufzeit der Reaktionslösung bei der 1. Messung (nach 3 Minuten Einwirkzeit)

t_1 : Durchlaufzeit der Reaktionslösung bei der 2. Messung (10 Minuten nach t_0)

Eine endo-Polygalacturonaseeinheit entspricht der Menge Enzym, die $\Delta 1/\eta_{spez}$ einer Polygalacturonsäurelösung in 10 Minuten um 0,001 Einheiten senkt (Ewest, 2009). Bei der Nutzung einer Pektinlösung als Substrat wurde sowohl von Meurer (1991) als auch von Ewest (2009) bei der Berechnung der endo-Polygalacturonaseeinheiten die Pektinlösung mit der Polygalacturonsäurelösung gleichgesetzt.

Um zu prüfen, ob die Viskositätserniedrigung durch die endo-Polygalacturonase oder durch die exo-Polygalacturonase verursacht wird kann man sich der Comparison ratio methode von Tam (1983) bedienen, bei der die bestimmten CR-Werte zwischen 3 und 11,5 liegen sollen, um nachzuweisen, dass es sich um die Aktivität einer endo-Polygalacturonase handelt. Liegen die CR-Werte deutlich unter 3, so handelt es sich um die Aktivität einer exo-Polygalacturonase.

3.4.1 Geräte und Materialien Kapillarviskosimetrie

- Ubbelohde Kapillarviskosimeter
- Glaskapillare der Firma Schott Typ 53210/I ($K = 0,009651 \text{ mm}^2/\text{s}^2$)
- Steuereinheit AVS 350 (Schott)
- Wasserbad mit Thermostaten ($T = 30^\circ\text{C}$)
- Pipetten
- Heizplatte mit Magnetrührer
- Enzymextrakt aus Zuckerrüben
- Citruspektin (Veresterungsgrad 70-75 %, Cargill)
- Citrat-Phosphatpuffer ($\text{pH} = 5,5$ nach GOMORI, 1955)

- 1 M NaOH
- Aceton
- G2-Fritte

3.4.2 Durchführung Kapillarviskosimetrie

Zu Beginn des Versuches wurde eine 0,4 %ige Pektinlösung, die als Substrat diente, hergestellt, wobei das Pektin unter ständigem Rühren in 100 ml Citrat-Phosphat-Puffer eingestreut wurde und die Suspension auf 60 – 70 °C erwärmt wurde. Nach dem Abkühlen erfolgte das Auffüllen der Lösung auf 200 ml. Dazu wurde entionisiertes Wasser verwendet. Die Lösung wurde anschließend unter Verwendung eines Ultraschallbades entgast.

Für die Messung wurden 12,5 ml der Substratlösung in ein Becherglas pipettiert und mit 2,5 ml Enzymextrakt versetzt und gemischt. Im Moment der Zugabe des Enzymextraktes wurde die Stoppuhr betätigt. Das Gemisch wurde dann in die Kapillare eingefüllt und diese unverzüglich in das Wasserbad des Kapillarviskosimeters, das auf 30 °C temperiert war, gestellt. Die erste Messung bzw. das Hochpumpen der Lösung in der Kapillare wurde 3 Minuten nach Zugabe des Enzymextraktes gestartet. Die Zeit, die ein definiertes Volumen des Substrat-Enzym-Gemisches benötigte, um die Kapillare zu durchströmen wurde über zwei Lichtschranken erfasst. 10 Minuten nach Ablesung des ersten Messwertes wurde die Lösung erneut hoch gepumpt und wiederum wurde die Zeit erfasst, die das definierte Flüssigkeitsvolumen benötigte, um die Kapillare zu durchströmen.

Ebenfalls erfasst wurde die Zeit, die entionisiertes Wasser benötigt, um bei 30 °C die Kapillare zu durchströmen. Bei jedem Probewechsel erfolgte ein dreimaliges Spülen der Kapillare mit 1 M NaOH-Lösung und ein Nachspülen mit entionisiertem Wasser. Um die Kapillare anschließend zu trocknen, wurde sie mit Aceton gespült. Um den Trocknung mittels Aceton zu beschleunigen und letzte Acetonreste aus der Kapillare zu entfernen, wurde kurzzeitig Druckluft durch die Kapillare geleitet.

3.5 Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität mittel Rotationsviskosimetrie

Rotationsviskosimeter, die auch als Rotations-Rheometer bezeichnet werden, sind oft zylindrische Messsysteme, die aus einem rotierenden zylindrischen Körper, der als Rotor bezeichnet wird und einer ruhenden Gegenfläche, die Stator genannt wird, bestehen. Grundsätzlich werden bei dieser Art der Viskosimetrie, im Falle eines koaxialen Zylindermesssystems, wie in Abb. 5 dargestellt, zwei Systeme unterschieden.

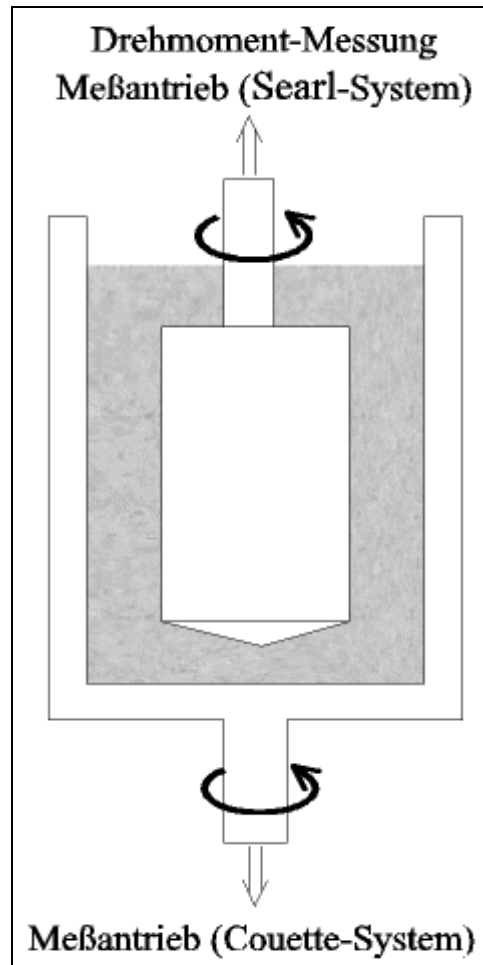


Abb. 5: Darstellung des Searl- und Couette-Systems (Rheologie und Rheometrie, 2010)

Vom Searl-System wird gesprochen, wenn der zylindrische Drehkörper in einem feststehenden Becher rotiert. Rotiert hingegen der Becher um einen feststehenden zylindrischen Becher, so wird vom Couette-System gesprochen. Das Messprinzip der beiden Systeme besteht darin, dass die Probe im Messspalt zwischen den beiden Zylindern, von denen einer rotiert, deformiert wird. Die dabei auftretende Strömung wird Couette-Strömung genannt. Die Steuerung der Systeme erfolgt über die Drehzahl (Schergeschwindigkeitsgesteuert) des Innen- oder Außenzylinders bzw. über das Drehmoment (Scherspannungsgesteuert). Gemessen werden die Drehzahl oder das Drehmoment (Figura, 2004; Rheologie und Rheometrie, 2010).

3.5.1 Geräte und Materialien Rotationsviskosimetrie

- Rotationsviskosimeter der Firma Paar Physica

- Applikation: RHEOPLUS/32 V3.31 21002083-33025
- Messgerät: MC200 SN353175; FW3.04
- Messsystem: Z3 DIN (25mm)

- Zusatzgerät: TU1=TEZ 180
- Heizplatte mit Magnetrührer
- Stoppuhr
- Enzymextrakt
- Citruspektin (Veresterungsgrad 70 – 75 %, Cargill)
- Citratpuffer verschiedener pH-Werte nach Gomori

3.5.2 Durchführung Rotationsviskosimetrie

Als Substrat für diesen Versuch dient eine 0,4 %ige Pektinlösung, die wie unter 4.4.2 beschrieben hergestellt wurde.

Zur Bestimmung der dynamischen Viskosität wurde ein Messmodus erstellt, der sich an das Verfahren zur Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität mittels Kapillarviskosimetrie anlehnt. Aus diesem Grunde wurden 7 Messabschnitte definiert. Der erste Messabschnitt, der 10 Sekunden andauerte, diente dazu die Scheerrate von 30 Reziproksekunden einzustellen. In dem darauf folgenden Messabschnitt, der 180 Sekunden umfasste, wurde eine Zehnfachbestimmung (10 Messpunkte á 18 Sekunden) der Viskosität bei 30 Reziproksekunden vorgenommen. Die Dauer des zweiten Abschnittes wurde mit 180 Sekunden gewählt, da dies in etwa der Zeit entspricht, die das definierte Volumen des Reaktionsgemisches benötigt, um die Kapillare im Kapillarviskosimeter zu durchströmen. Im dritten Messabschnitt, der wiederum 10 Sekunden andauerte, wurde die Scheerrate von 30 Reziproksekunden auf 0 Reziproksekunden heruntergefahren. In den folgenden vierten Messabschnitt, der 580 Sekunden umfasste, wurde das Reaktionsgemisch nicht gescheert. Im fünften Messabschnitt wurde wieder innerhalb von 10 Sekunden die Scheerrate von 30 Reziproksekunden eingestellt. Die Messung der Viskosität erfolgte im sechsten 180 Sekunden andauernden Abschnitt als Zehnfachbestimmung (10 Messpunkte á 18 Sekunden). Der folgende siebente Abschnitt diente wiederum, um die Scheerrate von 30 Reziproksekunden auf 0 Reziproksekunden herunterzufahren.

Vor Beginn der Messung wurden sowohl, das Viskosimeter, als auch die Messzelle und der Rotationszylinder bei 30 °C temperiert. Das Reaktionsgemisch bestand aus 20 ml Substrat und 4 ml Enzymextrakt. Bei dem Zusammenführen von Enzymextrakt und Substrat wurde eine Stoppuhr betätigt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Becherglas gründlich umgerührt und dann bis zur Markierung in den Messbecher eingefüllt. Dieser wurde dann ins Gerät eingespannt und der Messzylinder in die dafür vorgesehene Kupplung eingesetzt. Anschließend wurde das Gerät in Messposition gefahren. Die Messung wurde drei Minuten nach dem Vereinigen von Enzymextrakt und Substrat gestartet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Pektinesteraseuntersuchung

Bei Untersuchung der Pektinesteraseaktivität konnte eine deutliche Aktivität der Zuckerrübenpektinesterase nachgewiesen werden. Dies spiegelt sich ganz deutlich, wie in Abb. 6 dargestellt, in den Verbräuchen des Titrationsmittels (0,01 M NaOH) wieder. Dabei konnten deutliche Entesterungen bei den pH-Werten von 5-9 nachgewiesen werden. Auch war die Entesterung des Pektins durch den basischen pH-Wert im Bereich von pH 7,5-9,0 deutlich nachzuweisen. Der Verbrauch an Titrationsmittel stieg gerade in diesem Bereich der Verbrauchskurve sehr stark an.

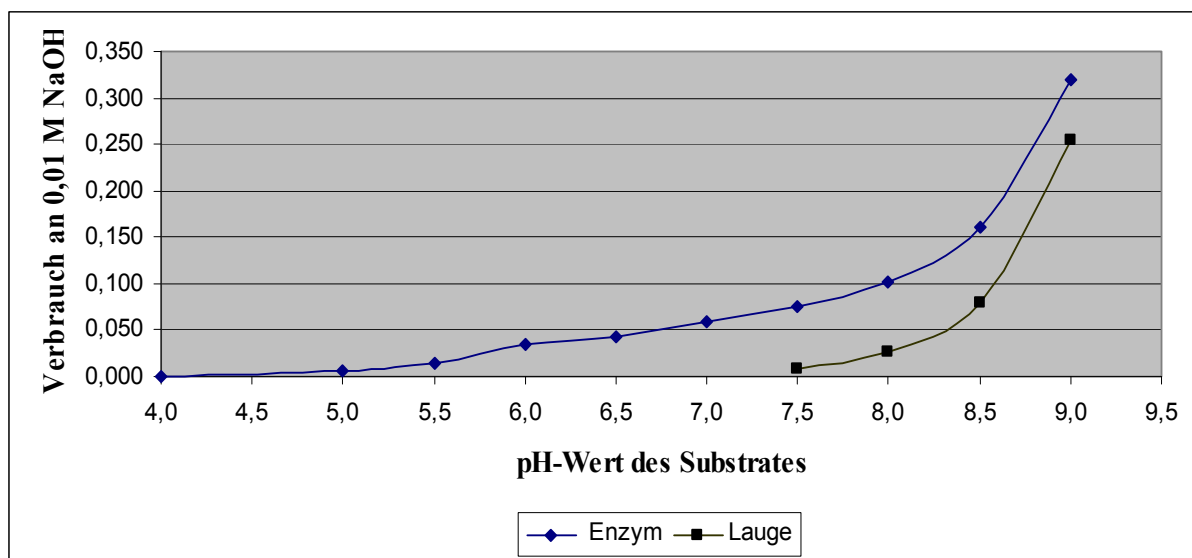


Abb. 6: Darstellung des Verbrauches an 0,01 M NaOH bei der Bestimmung des pH-Optimums der Pektinesterase aus Zuckerrüben

Um das pH-Optimum der Zuckerrübenpektinesterase ermitteln zu können, wurden die Titrationsmittelverbräuche der einzelnen basischen pH-Werte von den Werten der Enzymtestierung abgezogen und die daraus resultierenden Differenzen unter Verwendung von Formel 2 in Enzymaktivitäten umgerechnet, die dann auf die Zuckerrübeneinwaage bezogen wurden, um so eine vorstellbare Größe zu erhalten. In Abb. 7 ist die so ermittelte Entwicklung der Enzymaktivität pro Gramm Zuckerrübe bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Aus der Grafik geht ganz deutlich hervor, dass die aus Zuckerrüben gewonnene Pektinesterase ihr Optimum bei einem pH-Wert von 8,5 aufweist. Die Enzymaktivität liegt dort bei 0,067 Units/g Zuckerrübe. Bei einem pH-Wert von 9 sank die Enzymaktivität bereits wieder stark ab, was daran liegen könnte, dass die Eiweißstruktur des Enzyms durch den pH-Wert geschädigt wird. Es ist

jedoch auch möglich, dass das basische Milieu bei der Entesterung des Pektins in Konkurrenz zum Enzym tritt, so dass bereits große Bereiche durch das basische Milieu entestert werden, wodurch das Enzym nicht das Pektinmolekül entlang wandern kann, sondern immer wieder neue noch veresterte Pektinmoleküle „suchen“ muss.

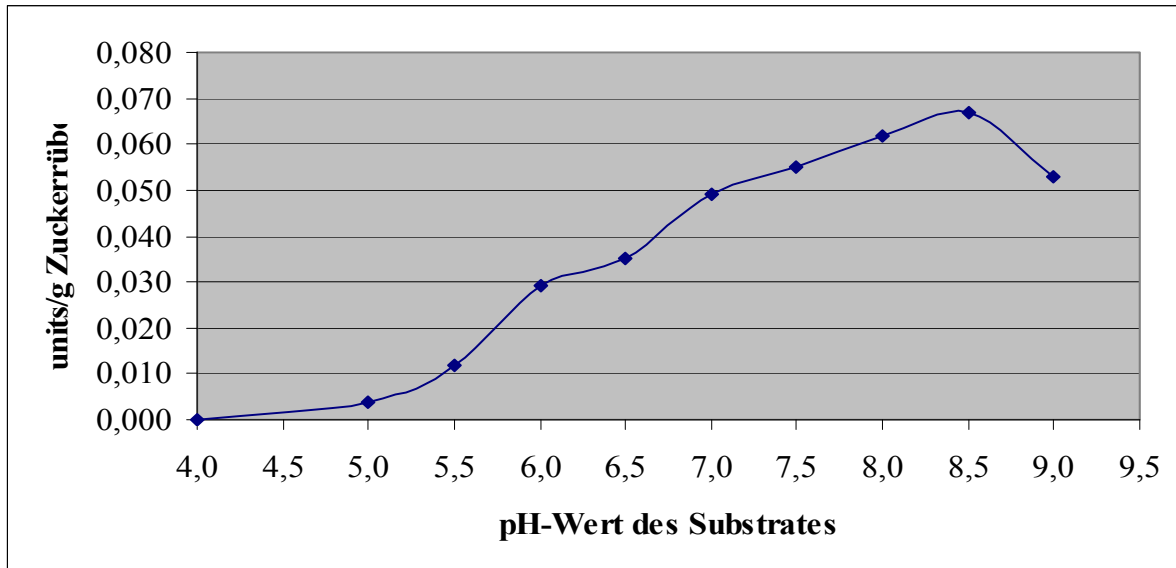


Abb. 7: Entwicklung der Aktivität der Pektinesterase bei verschiedenen pH-Werten

Setzt man die einzelnen Enzymaktivitäten, unter der Voraussetzung, dass die Aktivität am pH-Optimum 1 beträgt, in Relation zueinander und stellt sie wie in Abb. 8 graphisch dar, so wird deutlich, dass die Aktivität bei einem pH-Wert von 9 bereits um 20 % gesunken ist, wo-

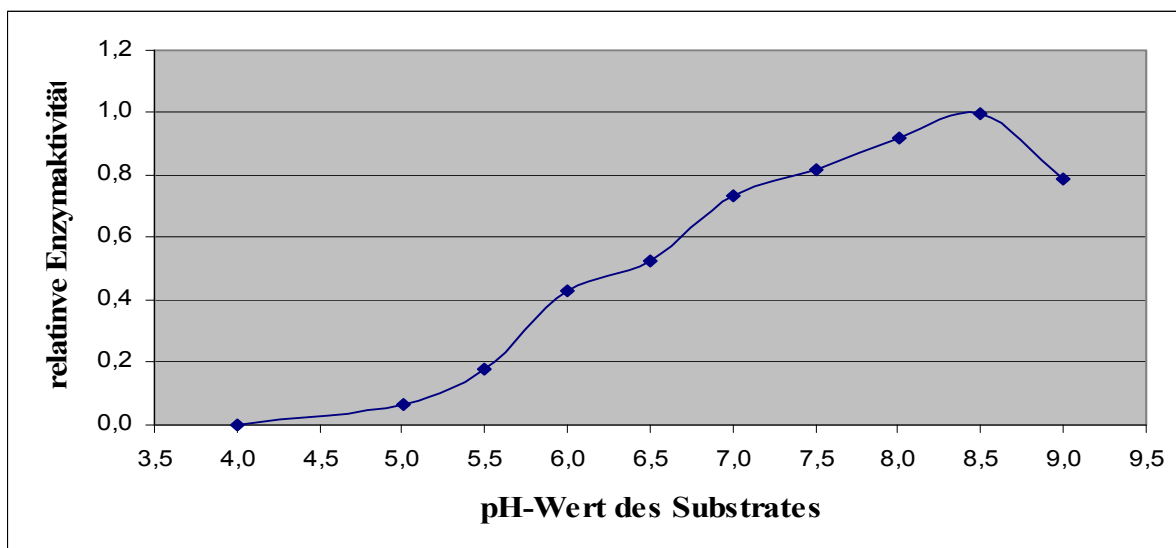


Abb. 8: Darstellung der Entwicklung der relativen Aktivität der Pektinesterase aus Zuckerrüben bei verschiedenen pH-Werten

hingegen sie bei einem pH-Wert von 8 nicht einmal um 10 % gesunken ist. Dieses langsame Absinken der Aktivität setzt sich bis in den schwach sauren Bereich fort. Bei einem pH-Wert von 5,0 ist die Aktivität der Zuckerrübenpektinesterase bereits unter 10 % gesunken. Und bei einem pH-Wert von 4,0 war sie innerhalb von 4 Minuten nicht mehr messbar. Fraglich ist, ob sie bei einer längeren Laufzeit wie zum Beispiel 20 Minuten messbar gewesen wäre. Da aber das pH-Meter auch einer gewissen Genauigkeit unterliegt und die zweite Stelle nach dem Komma somit gewissen Schwankungen ausgesetzt ist, die sich dann sofort in einem Verbrauch von 0,004 – 0,006 ml Titrationslösung niederschlagen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass es mit Sicherheit hätte geklärt werden können, ob eine Aktivität bei einem pH-Wert von 4,0 noch vorhanden ist.

Die Aktivität der Zuckerrübenpektinesterase lag am Neutralpunkt bzw. unter Standardbedingungen, wie in Tabelle 3 dargestellt, zwischen 0,048 und 0,050 Pektinesteraseeinheiten pro 100 g Zuckerrübe.

Tab. 4: Vergleich zweier Enzymextrakte (pH 7, Na-Cl-Gehalt 0,15 mol/l Substrat)

Extrakt	Messung	Verbrauch NaOH in ml	Mittelwert	units/ml	units/g Zuckerrübe
1	1	0,059	0,061	0,101	0,050
	2	0,062			
	3	0,061			
2	1	0,06	0,063	0,105	0,048
	2	0,063			
	3	0,066			

Bei der Untersuchung des Na-Cl-Optimums der Zuckerrübenpektinesterase konnte ein Optimum bei einem Natriumchloridgehalt von 0,2 mol/l Substratlösung nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich katalysiert die Zuckerrübenpektinesterase auch die Entesterung von Pektin, wenn kein Natriumchlorid in der Substratlösung vorhanden ist. Sie liegt dort immerhin noch bei einem Wert von 0,017 Units/g Zuckerrübe. Beim Überschreiten des Natriumchloridoptimums, sinkt die Aktivität der Zuckerrübenpektinesterase wesentlich stärker, als beim Unterschreiten des Optimums.

Im Filtrat, das bei der Extraktgewinnung anfiel, konnte keine Pektinesteraseaktivität nachgewiesen werden.

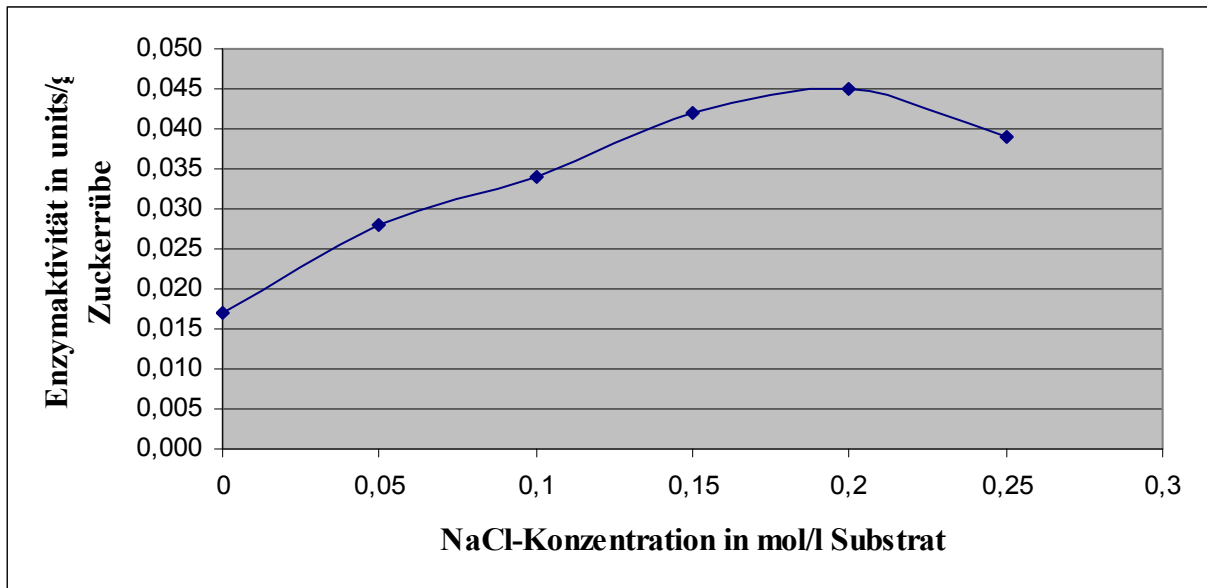


Abb. 9: Darstellung der Zuckerrüben-Pektinesteraseaktivität bei verschiedenen Natriumchloridgehalten in der Substratlösung

Werden die Aktivitäten unter der Voraussetzung, dass die Aktivität bei optimaler Natriumchloridkonzentration 1 beträgt, in Relation zueinander gesetzt wie in Abbildung 10 dargestellt, so fällt auf, dass die Aktivität bei einer Natriumchloridkonzentration von 0 mol/l Substrat noch immer 38,5 % beträgt. Dabei ist die Tatsache zu beachten, dass die Natriumchloridkonzentration des Reaktionsgemisches während der Reaktion nicht bei 0 mol/l Reaktionsgemisch liegt, da der Enzymextrakt einen gewissen Natriumchloridgehalt aufweist.

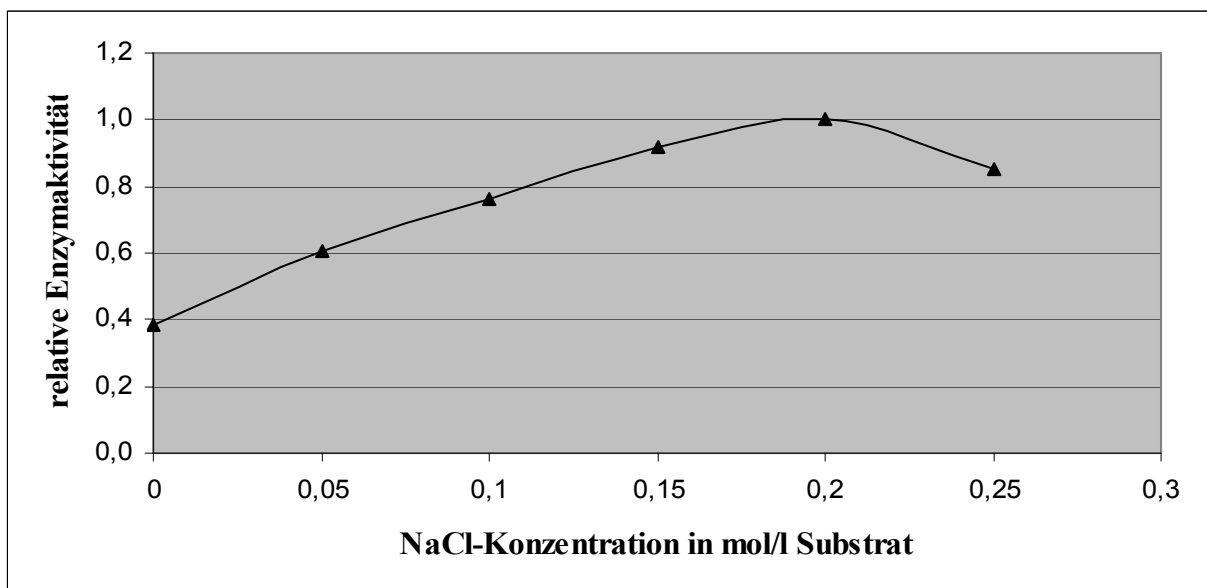


Abb. 10: relative Pektinesteraseaktivität bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

4.2 Ergebnisse exo-Polygalacturonaseuntersuchung

Die vermessenen Standardlösungen ergeben nach Abzug des Pufferblindwertes den in Abbildung 11 dargestellten Graphen, dessen Ausgleichsgeraden $y = 0,0022x - 0,0092$ lautet und über eine Regressionsrechnung bestimmt wurde.

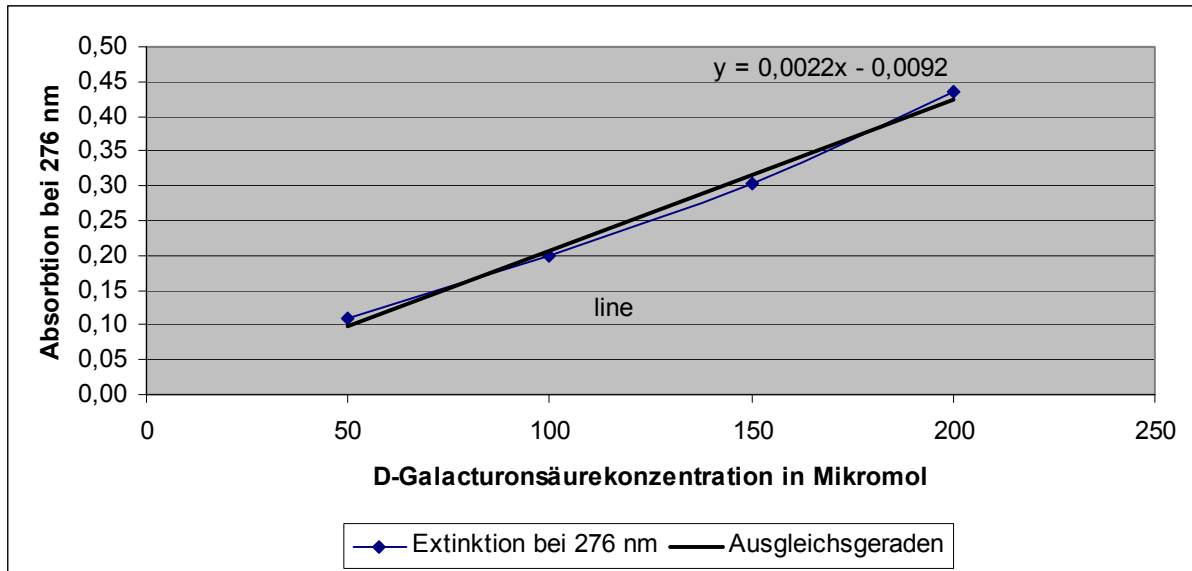


Abb. 11: Darstellung der Eichgeraden zur Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität

Für die Eichgerade wurde, wie in Abb. 12 dargestellt ein Bestimmtheitsmaß bzw. Korrelationskoeffizient zum Quadrat (R^2) von 0,9922 berechnet.

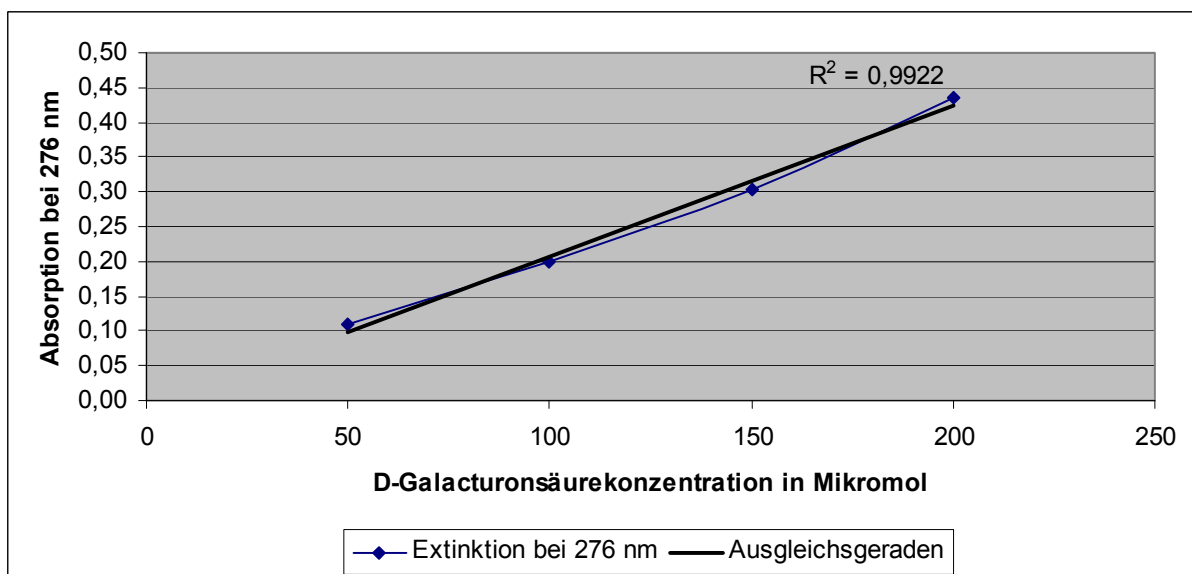


Abb. 12: Untersuchung der Eichgeraden auf Linearität

Bei der Untersuchung des Enzymextraktes in Bezug auf die Aktivität der exo-Polygalacturonaseaktivität wurde das Verfahren nach Honda et al. (1982) eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird Galacturonsäure mittels 2-Cyanacetamid bei pH 9 umgesetzt und der Gehalt der so entstehenden Substanz photometrisch bestimmt. Über eine Eichgerade kann dann der Gehalt an Galacturonsäure berechnet werden, der durch die Enzymaktivität freigesetzt wurde.

Unter Standardbedingungen konnte wie in Tabelle 5 dargestellt kaum eine Aktivität der exo-Polygalacturonase nachgewiesen werden. Es ist recht wahrscheinlich, dass es sich bei der nachgewiesenen Aktivität, die gegen Null tendiert, um die Aktivität der endo-Polygalacturonase handelt.

Tab. 5: Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität zweier Enzymextrakte unter Standardbedingungen

Probe		Extinktion	ΔE	units/ml	units/g Zuckerrübe	\square in units/g Zuckerrübe	σ (\pm)
Extrakt 1	1	0,7025	0,0154	0,0001	0,0000	0,0000	$2,8 \times 10^{-5}$
	2	0,7086	0,0215	0,0002	0,0001		
	3	0,7002	0,0131	0,0001	0,0000		
	4	0,6969	0,0098	0,0000	0,0000		
	B_E	0,5775					
	B_S	0,2339					
	B_P	0,1243					
	B_{ges}	0,6871					
Volumen Enzymextrakt in ml					46,5		
Zuckerrübenmasse in g					100,0		
Extrakt 2	1	0,4378	0,0343	0,0004	0,0002	0,0001	$1,3 \times 10^{-5}$
	2	0,4346	0,0311	0,0003	0,0001		
	3	0,4338	0,0303	0,0003	0,0001		
	4	0,4391	0,0356	0,0004	0,0002		
	B_E	0,3195					
	B_S	0,2120					
	B_P	0,1280					
	B_{ges}	0,4035					
Volumen Enzymextrakt in ml					43,0		
Zuckerrübenmasse in g					100,0		

Als problematisch erwies sich bei diesem Versuch, dass sich das Substrat kaum lösen ließ. Es handelte sich dabei eher um eine Suspension. Auch der Versuch, die Suspension auf 50 °C im Ultraschallbad über längere Zeit zu erwärmen, zeigte keinen Erfolg. Die Versuche den pH-Wert des Lösungsmittels zu erhöhen und zu senken, waren ebenfalls erfolglos. Die schlechte Löslichkeit kann gegebenenfalls an der Herstellung des Natriumsalzes der Polygalacturonsäure

re liegen. Es ist auch möglich, dass der Rohstoff, der zur Herstellung des Salzes genutzt wurde, durch seinen chemischen Aufbau, dieses schlechte Lösungsverhalten hervorruft. Es handelt sich dabei um ein Naturprodukt, das auch gewissen Schwankungen in seiner chemischen Zusammensetzung unterliegen kann.

Somit ist davon auszugehen, dass der Gehalt an Substrat bei den einzelnen Proben unterschiedlich war, wofür auch die unterschiedlichen Extinktionen der in Tabelle 5 dargestellten Substratblindwerte sprechen. Dies kann auch die Ursache dafür sein, dass bei der Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität bei verschiedenen pH-Werten im Bereich des Standard-pH-Wertes eine geringfügig abweichende Aktivität des Enzyms festgestellt wurde, die 0,0008 units/g Zuckerrübe betrug und somit weiterhin gegen Null tendiert. Überraschend waren die Entwicklungen im sauren pH-Bereich. Wie in Abbildung 13 dargestellt, sinkt die Aktivität der exo-Polygalacturonase erheblich unter die Marke von Null, was im Normalfall nicht möglich ist.

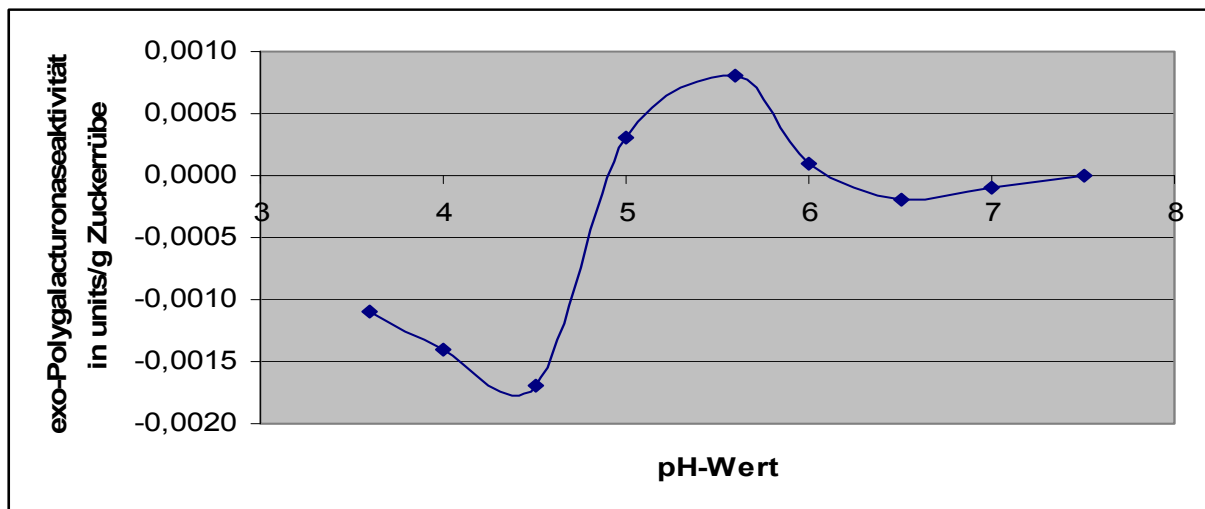


Abb. 13: Entwicklung der exo-Polygalacturonaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Setzt man dieses Absinken in Bezug zum Maximalwert der Kurve, der bei pH 5,5 auftritt, so fällt auf, dass die relative Aktivität, wie in Abb. 14 dargestellt, bei einem pH-Wert von 4,5 auf -200 % sinkt. Der Nachweis dieser negativen Aktivität kommt durch die Tatsache zustande, dass die Extinktion des Gesamtblindwertes wesentlich höher ausfällt als die Extinktion der einzelnen Proben. Dabei ist zu beachten, dass bereits die Extinktion des Enzymblindwertes höher ausfällt als die Extinktion der einzelnen Proben. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommt, die durch die Polygalacturonsäure oder durch das Natrium, das mit der Polygalacturonsäure eingetragen wird, gehemmt werden. Es

ist möglich, dass diverse andere Enzyme, die im Enzymextrakt vorhanden sind, gerade bei einem pH-Wert von 4,5 ihr pH-Optimum haben und so andere Polysaccharide, die im Enzymextrakt vorhanden sind, abbauen. Dies wiederum führt zu einer Zunahme der reduzierenden Gruppen, die dann die Extinktion der Probe erhöhen. So könnte beispielsweise eine Invertase die Saccharose des Enzymextraktes abbauen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass noch größere Mengen Saccharose nach der Ultrafiltration und Dialyse im Extrakt sind. Für die Theorie, dass es sich dabei um ein Enzym handelt, spricht die Tatsache, dass, wie in Abb. 14 dargestellt, bereits bei pH 4 wieder ein deutlicher Rückgang dieser Aktivität zu verzeichnen ist.

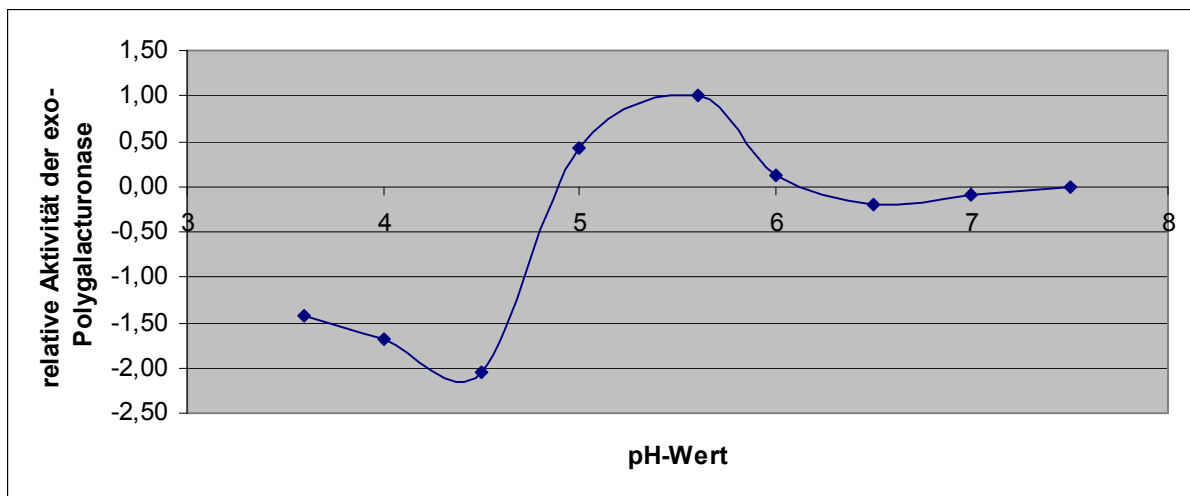


Abb. 14: Relativen Aktivität der exo-Polygalacturonase in Abhängigkeit vom pH-Wert

Oberhalb eines pH-Wertes von 5,5 ist keine Zunahme der reduzierenden Gruppen zu verzeichnen gewesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Enzym, das für eine Zunahme der reduzierenden Gruppen im Bereich von pH 5 und 5,5 sorgt, nicht mehr aktiv ist, bzw. in so geringem Maße aktiv ist, dass es nicht nachweisbar ist.

4.3 Ergebnisse Kapillarviskosimetrie

Die Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität war mit der unter 3.4 beschriebenen Methode nur sehr schwer zu realisieren. Bei den Versuchen kam es bei nahezu jeder Messung zu Beeinträchtigungen durch einer oder mehrerer Schaumblasen, die sich auf dem Flüssigkeitsmeniskus beim zweiten Hochpumpen der Flüssigkeit bildeten. Bei kleineren Blasen war es trotzdem möglich die Messung vorzunehmen, obwohl diese Bläschen die Form des Meniskus des Reaktionsgemisches beeinträchtigten und somit auch das definierte Volumen geringfügig verändert haben dürften. Unbrauchbar wurden Messungen vorrangig von größeren Schaum-

blasen gemacht, die die obere Lichtschranke auslösten, noch weit bevor der Flüssigkeitspegel diese erreichte. So begann das Auslaufen der Kapillare noch bevor das definierte Volumen an Reaktionsgemisch hochgepumpt wurde. Gebildet wurden diese Schaumbläschen von geringen Resten des Reaktionsgemisches, die nach Bestimmung der ersten Auslaufzeit der Reaktionslösung, nicht vollständig aus dem stark verengten Teil der Kapillare zurückliefen. Auch das Erhöhen der Molarität der Reinigungslauge von 0,1 mol/l auf 1,0 mol/l und das Abnutschen der Pektinlösungen über eine G2-Fritte konnten das Problem nicht lösen.

Bereits der Enzymextrakt neigte sehr stark dazu, einen über mehrere Tage stabilen Schaum auszubilden, was entweder an Saponinresten gelegen haben könnte oder an Eiweißbestandteilen. Dabei ist die Theorie, dass es sich dabei um Eiweißbestandteile handelt wahrscheinlicher, da weder Meurer (1991) noch Ewest (2009) in ihren Arbeiten Ähnliches beschrieben. Trotz dieser Vermutung wurde die Vierfachbestimmung der Durchlaufzeit einer Pektinlösung vorgenommen. Dazu wurde die Kapillare frisch gereinigt und mit 15 ml Pektinlösung gefüllt. Die Durchlaufzeit dieser Lösung wurde viermal nacheinander bestimmt. Dabei fiel auf, dass die zweite bis vierte Durchlaufzeit gerade einmal in einem Bereich von 0,04 Sekunden variierte. Die erste Durchlaufzeit hingegen lag ca. 0,2 Sekunden unter den anderen drei Durchlaufzeiten. Wahrscheinlich waren Acetonreste, die nach dem Reinigen im stark verengten Teil der Kapillare verblieben und mit bloßem Auge sichtbar waren, dafür verantwortlich. Auch Ewest (2009) vermutete einen Einfluss dieser Rückstände auf die Durchlaufzeit. Der Versuch dieses Problem über längere Trocknungszeiten zu lösen, brachte nicht den gewünschten Erfolg, da zu viel Zeit nötig war, bis die Acetonreste verdunsteten. Der Versuch die Acetonreste über das Durchleiten von Druckluft durch die Kapillare zu entfernen, war hingegen sehr erfolgreich, da die Kapillare so schon nach 30 - 40 Sekunden völlig frei von Acetonresten war.

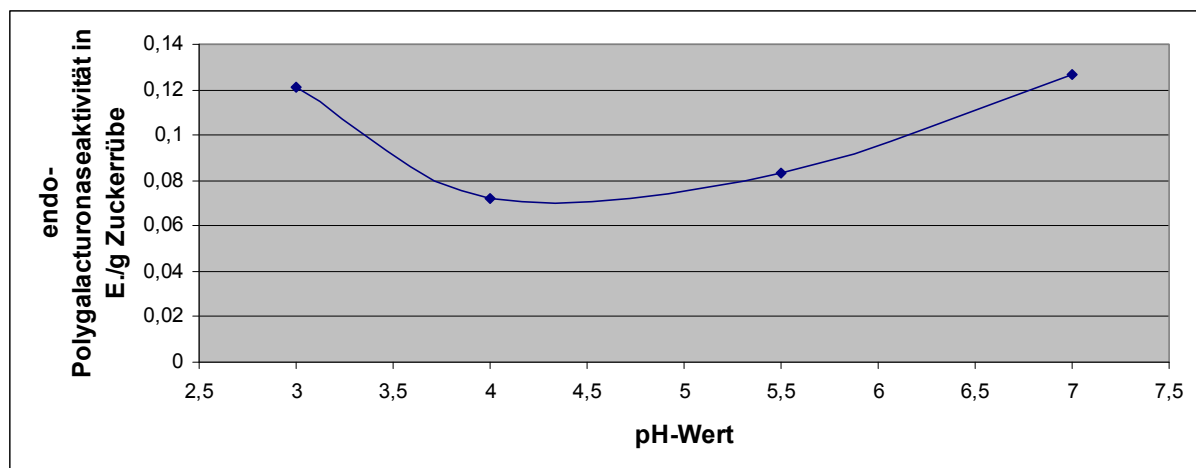


Abb. 15: Entwicklung der endo-Polygalacturonaseaktivität bei verschiedenen pH-Werten

Trotz der Bemühungen, war es, wie in Abbildung 15 ersichtlich wird, nicht möglich ein pH-Optimum zu bestimmen. Das pH-Optimum der endo-Polygalacturonasen von Pflanzen liegt im Allgemeinen im Bereich von 5 – 6. In diesem Fall steigt die Aktivität der endo-Polygalacturonase noch bei einem pH-Wert von 7 an. Da es nicht möglich war einen Citrat-Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8 herzustellen, wurde ein Phosphatpuffer (nach Sørensen) dieses pH-Wertes hergestellt und eingesetzt. Dies geschah, da wie unter 4.3.3 beschrieben, die Aktivität der exo-Polygalacturonase kaum bzw. gar nicht vorhanden war und somit die Aktivität dieses Enzyms durch die Bindung der Calciumionen mittels Komplexbildung mit der Citronensäure überflüssig erschien.

Um zu prüfen, ob der Phosphatpuffer geeignet ist, wurde die Aktivität des Enzyms bei pH 7 unter Verwendung eines Phosphatpuffers (nach Sørensen) mittels Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei fielen bei beiden Messungen die zweiten Durchlaufzeiten um ca. 0,8 Sekunden höher aus als bei den ersten Messungen. Somit nahm die Viskosität der Lösungen nicht ab sondern noch zu. Dies könnte gerade an dem Verzicht auf die Citronensäure begründet liegen, da Calcium mit Pektin reagiert und es so zur Ausbildung von Calciumbrücken zwischen Pektinmolekülen kommen kann. Diese wiederum könnten sich zum einen in einer Erhöhung der Viskosität niederschlagen und zum anderen die Aktivität der endo-Polygalacturonase stark einschränken, wie von Van Buggenhout (2009) beschrieben, da das Pektin durch die Verknüpfung für das Enzym nicht zugänglich ist. Das für diesen Vorgang erforderliche Calcium wurde wahrscheinlich über den Enzymextrakt eingebracht. Die Zuckerrübe als Ausgangsmaterial weist nach Wöhlert (1984) 0,04 % Calcium und 0,05 % Calcium in Form von Calciumoxid auf. Es wurde sicher ein Teil des Calciums über die Ultrafiltration und die Dialyse entfernt, doch ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Teil Calcium im Extrakt verbleibt. Somit scheint der Einsatz eines Komplexbildners unausweichlich zu sein. Eventuell wäre aber auch der Zusatz eines Komplexbildners zum Puffersystem möglich. So wäre eine Möglichkeit den Phosphatpuffer mit Ethylendiamin-tetraacetat zu versetzen, um so das Calcium zu binden. Fraglich ist jedoch, ob dieser Stoff sich auf die Viskosität der Lösung und auf die Aktivität der Enzyme auswirkt.

Interessant ist der starke Anstieg der Kurve im Bereich von pH 3. Es ist nahezu ausgeschlossen, dass es sich dabei um einen Anstieg der Enzymaktivität handelt. Diese Erscheinung ist vielmehr auf die Säurehydrolyse von Polysacchariden zurückzuführen. So wäre es beispielsweise möglich, dass Polysaccharide, die sich im Enzymextrakt befinden, hydrolysiert werden. Laut Univie wird aber auch das Pektin bereits ab einem pH-Wert von 3,0 abgebaut, was diesen scheinbar starken Anstieg der endo-Polygalacturonaseaktivität bei pH 3,0 erklären könnte.

Unter Standardbedingungen konnte eine endo-Polygalacturonaseaktivität von 0,083 Einheiten pro g Zuckerrübe nachgewiesen werden, jedoch unterliegt dieser Wert den Fehlereinflüssen, die durch die Bläschenbildung auf dem Flüssigkeitsmeniskus verursacht werden. Gekennzeichnet sind die Ergebnisse dieses Versuches jedoch durch recht hohe Standardabweichungen. Im Falle der Bestimmung der Aktivität unter Standardbedingungen beträgt die Standardabweichung sogar $1,3 \times 10^{-2}$ Einheiten/g Zuckerrübe. Aus diesem Grunde wurde der Versuch unternommen, die Änderung der Viskosität mittels eines anderen Messsystems zu bestimmen.

4.4 Ergebnisse Rotationsviskosimetrie

Bei dem Versuch das pH-Optimum der endo-Polygalacturonase mittel Rotationsviskosimetrie zu bestimmen, konnte ebenfalls kein eindeutiger Erfolg erzielt werden.

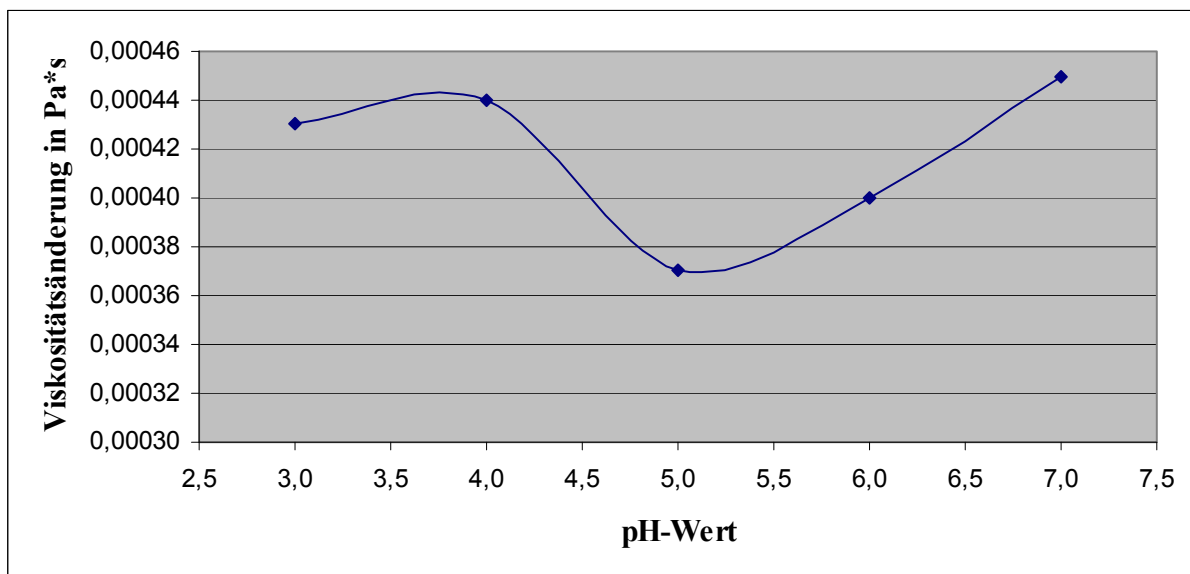


Abb. 16: Entwicklung der dynamischen Viskosität von Reaktionsgemischen bei verschiedenen pH-Werten

Wie in Abbildung 16 dargestellt, kam es auch unter Verwendung der Rotationsviskosimetrie zu keiner Ausprägung eines Maximalwertes im Kurvenverlauf. Generell liegen die Werte dieser Messung sehr dicht beieinander. Verallgemeinernd kann gesagt werden, dass sich die Viskositätsänderung bei allen Versuchen im Bereich von 4×10^{-4} befindet. Bei Betrachtung der Messwerte ist festzustellen, dass im Bereich der pH-Werte 5 und 6 die Messwerte der Erst- und Zweitbestimmung recht stark voneinander abweichen (Anhang Tab. 10). Liegen die Messwerte der zweiten Messung nur geringfügig unter denen der Messungen bei anderen pH-Werten, so unterscheiden sich die Messwerte der ersten Messung recht deutlich von denen

den Messwerten bei anderen pH-Werten. Diese Abweichungen könnten durch Fehlereinflüsse, wie Aufwärmen des Messzylinders und der Messkammer während des Abspülens mit warmen Wassers, oder durch den Eintrag von Luftbläschen während des Befüllens des Messbechers, hervorgerufen worden sein.

Als problematisch sind die Entwicklungen der Messwerte während der Zehnfachbestimmungen in den Messabschnitte 2 und 6 zu betrachten, da sich die Viskosität bei allen Messungen im Messabschnitt 6, wie in Abbildung 17 dargestellt, recht ungewöhnlich entwickelt.

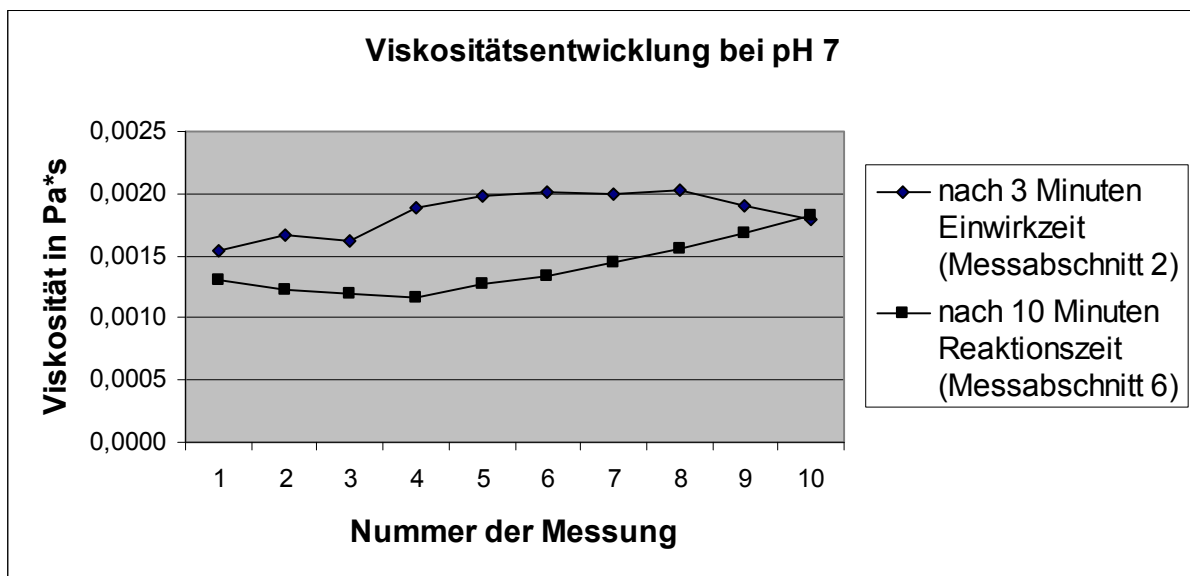


Abb. 17: Vergleich der Viskositätsentwicklungen während der Zehnfachbestimmungen nach 3 Minuten Einwirkzeit und 10 weiteren Minuten Reaktionszeit

Nimmt die Viskosität im Messabschnitt 2 erst zu und sinkt dann geringfügig im Laufe der Messung ab, so kann im Messabschnitt 6 ein ganz anderes Verhalten beobachtet werden. Dort liegt die Viskosität zu Beginn deutlich unter der letzten bestimmten Viskosität des Messabschnittes 2. Am Ende des Messabschnittes, bei der zehnten Messung, liegt sie jedoch wieder auf der letzten bestimmten Viskosität (zehnte Messung) des Messabschnittes 2. Es scheint somit zu einer Erhöhung der Viskosität durch längere Scherbeanspruchung zu kommen. Figura (2004) bezeichnet ein solches Verhalten als rheopex. Er weist aber auch für Polymerlösungen, zu denen Pektinlösungen gehören, ein viskoelastisches Fließverhalten aus, das zur Obergruppe der nicht-Newtonschen Fluide mit zeitunabhängigen Fließverhalten gehört.

Interessant ist die Tatsache, dass es, wie ebenfalls aus Abbildung 17 hervorgeht, im Bereich der Messwerte 1-8 zwischen den Messabschnitten 2 und 6 einen deutlichen Unterschied in der Viskosität gibt. Es ist möglich, dass dieser Viskositätsunterschied durch die Aktivität der en-

do-Polygalacturonase hervorgerufen wurde. Werden beispielsweise die Messwerte der jeweils ersten Messung im Messabschnitt 2 und 6 gemittelt und die Viskositätsänderung aus den gemittelten Werten berechnet, so ergibt sich daraus, der in Abbildung 18 dargestellte Graph.

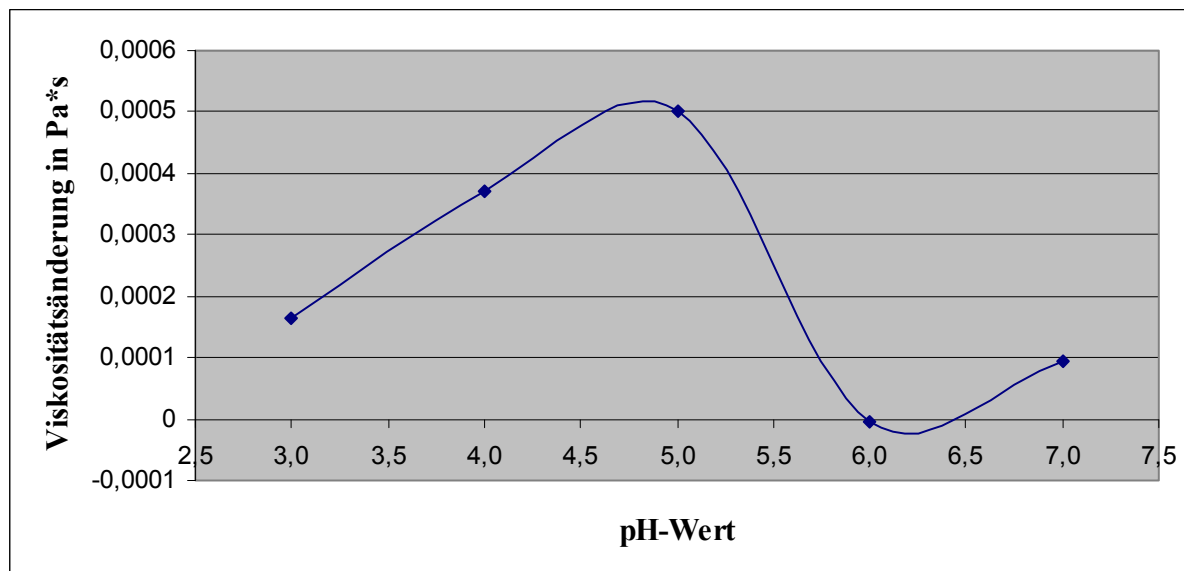


Abb. 18: Entwicklung der Viskositätsänderung zwischen den jeweils ersten Messpunkten der Messabschnitte 2 und 6 in Abhängigkeit vom pH-Wert

Aus dem Graphen geht eine maximale Änderung der Viskosität bei einem pH-Wert von 5,0 hervor. Bei diesem pH-Wert wird auch in etwa die maximale Aktivität der endo-Polygalacturonase erwartet. Somit besteht die Möglichkeit, dass dieses Maximum in der Viskositätsänderung dem pH-Optimum der endo-Polygalacturonase aus Zuckerrüben entspricht. Somit wäre es angebracht, das Verfahren dahingehend abzuändern, dass anstatt der Zehnfachbestimmung in den Messabschnitten 2 und 6 nur eine Einfach- bzw. Zweifachbestimmung durchgeführt wird und die Messabschnitte auf wenige Sekunden verkürzt werden.

Mit dem in der jetzigen Modifikation eingesetzten Verfahren, war es nicht möglich, den optimalen pH-Wert für das Enzym eindeutig zu bestimmen, weil aus den Abbildungen 16 und 18 ein Widerspruch hervorgeht. Der Widerspruch besteht in der Tatsache, dass der Graph in Abbildung 16 sein Minimum bei einem pH-Wert von 5 aufweist, wohin gegen der Graph in Abbildung 18 sein Maximum bei diesem pH-Wert aufweist. Um die Methode so zu modifizieren, dass sie verlässliche Werte liefert, wäre es angebracht, mit einem Enzym zu arbeiten, dessen pH-Optimum bekannt ist und das eine möglichst hohe Aktivität aufweist. Zu diesem Zweck würden sich mikrobielle Enzyme eignen, die kommerziell vermarktet werden und auf die die entsprechenden Anforderungen zutreffen.

Es wäre auch möglich den Messversuch über einen längeren Zeitraum laufen zu lassen und in definierten Abständen immer wieder die Viskosität zu messen, um somit einen Viskositätsverlust über eine längerfristige Entwicklung eindeutig nachweisen zu können.

Interessant wäre letzten Endes auch die Tatsache, ob die Pektinlösungen wirklich rheopexe Fließeigenschaften aufweisen, oder ob diese durch Bestandteile des Enzymextraktes hervorgerufen werden.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, pektinolytische Enzyme, die aus der Zuckerrübe (Sorte Belize) gewonnen wurden, zu charakterisieren. Zu diesem Zwecke wurde der Enzymextrakt, der mittels Ultrafiltration aus der Zuckerrübe hergestellt wurde, auf die Aktivität der drei wichtigsten pektinolytischen Enzyme untersucht. Als eines der wichtigsten pektinolytischen Enzyme gilt die Pektinesterase, deren Aktivität mittels Titration der durch das Enzym freigesetzten Carboxylgruppen bestimmt wurde. Dabei erwies sich das Verfahren als geeignet, um die Aktivität der Pektinesterase, die aus Zuckerrüben gewonnen wurde, zu bestimmen. In diesem Zusammenhang wurde ein pH-Optimum bei einer NaCl-Konzentration von 0,15 mol/l Substrat bestimmt. Dieses Optimum lag bei einem pH-Wert von 8,5 und liegt somit, was den pH-Wert betrifft, über dem Optimum, das von Meurer (1991) für Gurkenpektinesterase bestimmt wurde. Es gibt jedoch auch Pektinesterasen, deren pH-Optimum bei höheren pH-Werten angesiedelt ist. So bestimmte Ewest (2009) für die Pektinesterase von Äpfeln ein pH-Optimum von 9.

Bezüglich des pH-Optimums muss damit gerechnet werden, dass es sich wie von Meurer (1991) festgestellt wurde, bei der Veränderung der NaCl-Konzentration in der Substratlösung verschiebt.

Das NaCl-Optimum wurde bei einem pH-Wert von 7 untersucht und lag bei 0,2 mol NaCl/l Substrat. Es liegt somit dicht neben dem NaCl-Optimum der Pektinesterase aus der Gurkensorte Othello, die von Meurer (1991) untersucht wurde. Auch in diesem Falle ist es sehr wahrscheinlich, dass die Änderung des pH-Wertes zu einem anderen NaCl-Optimum führen würde.

Als erfolglos muss die Bestimmung der Aktivität der exo-Polygalacturonase betrachtet werden. Diese Untersuchung wurde unter Verwendung der Methode nach Honda et al. (1982) durchgeführt. Bei dieser Methode werden reduzierende Kohlenwasserstoffe mit 2-Cyanacetamid umgesetzt, was zur Bildung von Substanzen führt, die bei einem pH-Wert von

9 und einer Wellenlänge von 276 nm spektralphotometrisch nachweisbar sind. Über eine Eichgerade kann mittels der gemessenen Extinktion die Menge an reduzierenden Kohlenwasserstoffen bestimmt werden. Beim Einsatz dieser Methode zur Bestimmung der Aktivität der exo-Polygalacturonase wird die Tatsache genutzt, dass es durch die Aktivität der exo-Polygalacturonase zur Freisetzung von reduzierenden Gruppen bzw. reduzierenden Kohlenwasserstoffen kommt.

Eine Zunahme der reduzierenden Gruppen konnte nur in einem sehr engen pH-Bereich nachgewiesen werden und auch in diesem Bereich tendiert die Zunahme noch gegen Null. Es ist somit recht wahrscheinlich, dass das Enzym in der Zuckerrübe (Belize) nicht oder nur in verschwindend geringen Mengen vorkommt. Die Zunahme der reduzierenden Gruppen in dem engen pH-Bereich ist wahrscheinlich durch die Aktivität der endo-Polygalacturonaseaktivität zustande gekommen. Da eine Zunahme der reduzierenden Gruppen unter Standardbedingungen, bei pH 5,5 und 0,4 mM CaCl_2 im Acetatpuffer, kaum nachgewiesen werden konnte, wurde auf die Bestimmung eines NaCl-Optimums verzichtet. Als Fehlereinfluss ist auch das bereits erwähnte schlechte Löseverhalten des Natriumsalzes der Polygalacturonsäure zu nennen, das als Substrat für die exo-Polygalacturonase eingesetzt wurde.

Die Möglichkeit das Problem durch die Verwendung von Pektin als Substrat zu beheben entfällt, da es durch das ebenfalls zugesetzte Calcium, das die Funktion der exo-Polygalacturonase unterstützt, zur Bildung von Calciumbrücken zwischen den Pektinmolekülen kommen könnte, die so die Aktivität der exo-Polygalacturonase einschränken würden.

Als problematisch ist auch die Tatsache zu nennen, dass gerade im niedrigen pH-Bereich die Extinktionen der Enzymblindwerte größer sind als die Extinktionen der Proben. Es ist möglich, dass dieses Problem durch eine Extrakterstellung mittels Ammoniumsulfatfällung behoben werden könnte, da so der Gehalt an Polysacchariden im Enzymextrakt stark gesenkt werden könnte.

Die Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität mittels Kapillarviskosimetrie stellte sich in Bezug auf den Enzymextrakt, der aus Zuckerrüben gewonnen wurde, als ein eher ungünstiges Verfahren dar. Trotz der Tatsache, dass unter Standardbedingungen (pH 5,5) eine Aktivität von 0,083 Einheiten pro g Zuckerrübe nachgewiesen werden konnte, ist in diesem Zusammenhang die Wahl eines anderen Verfahrens zu prüfen. Gegebenenfalls wäre es auch möglich das Verfahren nach Honda et al. so zu modifizieren, dass die Aktivität der endo-Polygalacturonase damit bestimmt werden kann. Denkbar wäre dabei der Austausch des Acetatpuffers gegen den Citratpuffer. Außerdem könnte die Beimengung von Calcium zum Puffer entfallen. Als Substratlösung könnte sogar Pektinlösung verwendet werden. Dabei könnte

nicht ausgeschlossen werden, dass durch andere Enzyme, die im Extrakt enthalten sind, auch andere reduzierende Zucker aus den Pektinmolekülen herausgelöst werden könnten. Bei Verwendung einer Polygalacturonatlösung, würde dieses Problem nicht bestehen, in diesem Falle müsste drauf geachtet werden, dass sich das Substrat löst.

Der Versuch, das pH-Optimum der Zuckerrüben-endo-Polygalacturonase mittels eines Rotationsviskosimeters zu bestimmen, war in der gewählten Versuchsanordnung nicht erfolgreich. Es wäre möglich die Scherrate als eine Einflussgröße zu verändern, auch wäre es möglich die Zeit zwischen dem 2. Messabschnitt, in dem die erste Viskositätsbestimmung vorgenommen wird und dem 6. Messabschnitt, in dem die zweite Viskositätsbestimmung vorgenommen wird, deutlich zu verlängern. Generell wäre auch zu prüfen, zu welcher großen Untergruppe der nicht-Newtonschen-Fluide Pektinlösungen gehören, um somit sicherzustellen, ob ihr Fließverhalten zeitabhängig oder zeitunabhängig ist. Gegebenenfalls muss der Messmodus auch dahingehend abgeändert werden, dass an Stelle der Zehnfachbestimmung über 180 Sekunden nur eine Doppel- bzw. Einfachbestimmung in den Messabschnitten 2 und 6 vorgenommen wird und diese Messabschnitte zeitlich auf 5-10 Sekunden verkürzt werden. Um ein passendes Verfahren zum Nachweis der endo-Polygalacturonaseaktivität mittels Rotationsviskosimeter zu konzipieren, wäre es jedoch von Vorteil, für die Versuche eine reaktionsfreudige mikrobielle endo-Polygalacturonase zu verwenden.

Mit einem solchen Verfahren wäre es dann möglich zahlreiche Probleme, die die Kapillarviskosimetrie, gerade im Bezug auf den Extrakt aus Zuckerrüben, mit sich bringt zu umgehen. Das Entwickeln und Prüfen eines solchen Verfahrens wäre sicher vom Umfang her bereits ein eigenes Thema für eine wissenschaftliche Arbeit.

6 Zusammenfassung

Die Zuckerrübe, die ursprünglich nur zur Zuckergewinnung genutzt wurde, ist in den letzten Jahren in den Fokus einer anderen Industrie geraten. Schon seit einigen Jahren ist es üblich Bioethanol aus Zuckerrüben herzustellen, doch gerade in den letzten zwei Jahren ist es in Mode gekommen, Biogas aus Zuckerrüben zu gewinnen. Bei diesem Vorgang stellen die in der Zuckerrübe enthaltenen Pektine ein Hindernis dar, das durch den Einsatz spezieller Mikroorganismen und Enzyme beseitigt wird. Da Pektin ebenfalls ein gefragtes Industrieprodukt ist, besteht ein gewisses Interesse daran das Pektin zu gewinnen, bevor die Zuckerrüben bzw. der Dicksaft in die Biogasanlage gelangen. Weil es bei der Lagerung des Dicksaftes zu einem

durch pflanzeigene Enzyme hervorgerufenen Pektinabbau kommen kann, steht die Aktivität der drei wichtigsten pektinolytischen Enzyme im Mittelpunkt dieser Arbeit.

Es handelt sich bei diesen drei Enzymen um die Pektinesterase, die exo-Polygalacturonase und die endo-Polygalacturonase. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Aktivitäten der drei Enzyme bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen in den Substratlösungen.

Um die Enzyme zu charakterisieren, bzw. sie quantitativ in der Zuckerrübe zu bestimmen, wurde mittels Ultrafiltration aus Zuckerrüben ein Extrakt hergestellt, der für die Durchführung aller Untersuchungen genutzt wurde.

Die Aktivität der Pektinesterase wurde über die Titration der freigelegten Carboxylgruppen, die bei der Entesterung entstehen, bestimmt. Dabei wurde 0,01 M NaOH-Lösung als Titrationsmittel verwendet. Das pH-Optimum der Zuckerrübenpektinesterase der Sorte Belize konnte bei einem pH-Wert von 8,5 ermittelt werden. Die optimale NaCl-Konzentration lag bei 0,2 mol/l Substratlösung. Bei einem pH-Wert von 7,0 und einer NaCl-Konzentration von 0,15 mol/l Substratlösung weist die Zuckerrübenpektinesterase der Sorte Belize eine Aktivität von 0,049 units/g Zuckerrübe auf.

Die Untersuchung der exo-Polygalacturonase erfolgte mittels der Methode nach Honda et al. (1982). Dabei werden die Galacturonsäuremoleküle, die durch die Enzymaktivität der exo-Polygalacturonase freigesetzt werden, mit Cyanacetamid umgesetzt und die dabei entstehenden Reaktionsprodukte photometrisch erfasst.

Ein pH-Optimum der exo-Polygalacturonase konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Eine Aktivität des Enzyms konnte kaum nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 5,0 und einer CaCl_2 -Konzentration von 0,4 mmol/l Acetatpuffer lag die Aktivität zwischen 0 und $1 \cdot 10^{-4}$ units/g Zuckerrübe. Das NaCl-Optimum wurde nicht untersucht, weil die Aktivität des Enzyms zu gering war. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der festgestellten Aktivität nicht um die Aktivität einer Zuckerrüben-exo-Polygalacturonase handelt sondern um die Aktivität der Zuckerrüben-endo-Polygalacturonase.

Die endo-Polygalacturonaseaktivität sollte mittels Kapillarviskosimetrie nachgewiesen werden. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass die Aktivität der endo-Polygalacturonase zum Viskositätsverlust bei Pektinlösungen führt.

Das Verfahren erwies sich in Bezug auf den Enzymextrakt, der aus Zuckerrüben hergestellt wurde, als äußerst ungeeignet. Es konnte kein pH-Optimum bestimmt werden. Im Bereich des zu erwartenden pH-Optimums war die Aktivität eher minimal.

Der Versuch die Messung mittels Rotationsviskosimetrie durchzuführen, brachte nicht den gewünschten Erfolg, zeigte aber, dass es möglich ist einen Viskositätsverlust nachzuweisen und dass es möglich sein dürfte, ein Methode zur Bestimmung der endo-Polygalacturonase-aktivität mittels Rotationsviskosimetrie zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

Bell, T. A.; Etchells, J. L.; Ivan, J. D.: Pectinesterase in the Cucumber. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1951), Nr. 31, Seite 431-444

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (Hrsg.): Agrarpolitischer Bericht der Bundesregierung 2007. Bonn: BMELV, 2007

Czieslich, W.: Wie aus Erdbeeren Erdbeermarmelade wird. 2005. http://www.voneinanderlernen.uni-kiel.de/typo3/fileadmin/daten/Unterricht/Unterricht_Pektin_VortragMNUBremerhaven14112005.pdf; 04.01.2010

Duvetter, T.: Pectin in Processed Fruit and Vegetables: Part-I Stability and Catalytic Activity of Pectinases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2009), Nr. 8, 75-85

Ewest, S.: Bestimmung der Aktivität von pectolytischen Enzymen im Apfel: Hochschule Neubrandenburg, Diplomarbeit, 2009

Faulstich, M.; Schieder, D.: Reduzierung des Anfalls an klimarelevanten Treibhausgasen durch eine optimierte Energieausbeute und –nutzung bei der Biogasgewinnung aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen. 2008. http://uok.bayern.de/portal/internalfile/download/EULV9_Abschlussbericht_I-Net_1229341736831.pdf; 11.01.2010

Figura, L. O.: *Lebensmittelphysik: Physikalische Kenngrößen – Messung und Anwendung*. 5. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004

Goessler, R. (Hrsg.): *Agrarmärkte in Zahlen: Europäische Union 2008*. Bonn: ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH, 2008

Gross, K. C.: A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanacetamid. *Hort Science* (1982), Nr. 17, Seite 933-934

Hammer, I.: Sachanalyse Pektin. 2005. <http://www.voneinanderlernen.uni-kiel.de/typo3/index.php?id=63>; 04.01.2010

Hannak, C.: Einflüsse der chemischen Zusammensetzung sowie besonders der Verteilung der Molekulargewichte und der freien Carboxylgruppen auf die Geliereigenschaften von ausgewählten Pektinen: Universität Hohenheim, Dissertation, 1997

Honda, Nishimura u.a.: A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanacetamide. *Analytical Biochemistry* (1982), Nr. 119, Seite 194-199

Huang, L. K.; Mahoney, R. R.: Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Verticillium alba-atrum*. 1998. <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119098967/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

Bartley, I. M. et al.; Fruit Softening I. Changes in Cell Wall Composition and endo-Polygalacturonase in Ripening Pears. *Journal of Experimental Botany* (1982), Nr. 137, Seite 1248-1255

Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Auflage. Berlin: Springer-Verlag, 2001

Junghans, E.; Oehme, H.; Wöhlert W.: *Die Zuckerherstellung: Ein Lehr- und Fachbuch über die Gewinnung von Zucker aus Zuckerrüben*. 3. Auflage. Leipzig: VEB Fachbuchverlag, 1984

Kaltofen, R.; Opitz, R.: *Tabellenbuch Chemie*. 13. Auflage. Frankfurt am Main: Verlag Harri Deutsch, 1998

KWS (Hrsg.): *Biogaspotenziale der nutzen: Technische Ansätze aus der Praxis*. 2009. <http://www.kws.de/aw/KWS/Germany/Produkte/~bvvu/zuckerruebe/>

Löffler, G.; Petrides, P. E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage. Berlin: Springer-Verlag, 1998

Lösch, K.: *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie*. 1. Auflage. Hamburg: Behrs Verlag GmbH und Co., 2000

Meurer, P.: Einfluss pflanzeneigener Enzyme und anderer Faktoren auf die Textur fermentierter Gurken: Universität Hohenheim, Dissertation, 1991

Nehring, P.: Konserventechnisches Handbuch: der Obst- und Gemüseverwertungsindustrie. 15. Auflage. Magdeburg: Verlag Günter Hempel, 1969

Pathak, N.; Sanwal, G. G.: Multiple Forms OF POLYGALACTURONASE FROM BANANA FRUITS. *Phytochemistry* (1998), Nr. 2, 248-255

Proplanta (Hrsg.): Kulturpflanzen: Zuckerrübe. <http://www.proplanta.de/web/themen.php?;> 15.01.2010

Rheologie und Rheometrie – Rheologische Messungen. <http://rheologie.homepage.t-online.de/mess.html>. 2010

Steffens, C.: Enzymkinetik: Ableitung des Michaelis-Menten Gesetzes: Hochschule Neubrandenburg, Zusammenfassung 11 zum Fach Mikrobiologie, 2007

Shen, Z. et al.: Polygalacturonase from *Sitophilus oryzae*: Possible horizontal transfer of a pectinase gen from fungi to weevils 2003. http://www.insectscience.org/3.24/Shen_et_al_JIS_3_24_2003.pdf. 03.02.2010

Tam, S. Y. T.: A new calculation method for distinguishing endo- from exo-polygalacturonases. *Journal of Food Science* (1983), Nr. 48, 532-533, 538

Univie (Hrsg.): Oligosaccharide. http://www.univie.ac.at/anchem/publikation/LMC1_BA_Teil10b.pdf; 21.01.2010

Van Buggenhout, S.: et al.: Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part-III – Texture Engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2009), Nr. 8, 105-117

Verfahren zur Gewinnung von Pektin – Extrakt aus Zuckerrüben und dessen Verwendung. Patentschrift DE4313549 C1. 13.10.1994

8 Verzeichnis der verwendeten Tabellen

Tab. 1: Pektingehalte verschiedener Obstsorten (Hammer, 2005)

Tab. 2: Pektingehalte verschiedener Rohstoffe der Pektinherstellung (Hammer, 2005)

Tab. 3: Darstellung der Zusammensetzung der Blindwerte

Tab. 4: Vergleich zweier Enzyme unter Standardbedingungen

Tab. 5: Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität zweier Enzymextrakte unter Standardbedingungen

Tab. 6: Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums der Zuckerrübenpektinesterase

Tab. 7: Messungen zum Natriumchlorit-Optimum der Zuckerrübenpektinesterase

Tab. 8: Bestimmung des pH-Optimums der exo-Polygalacturonase (σ bezieht sich auf units / g Zuckerrübe)

Tab. 9: Bestimmung des pH-Optimums der endo-Polygalacturonase (σ bezieht sich auf units / g Zuckerrübe)

9 Verzeichnis der verwendeten Abbildungen

Abb. 1: Vergleich der Pro-Kopf-Zuckerverbräuche ausgesuchter Staaten im Jahr 2005 (ZMP, 2008)

Abb. 2: Darstellung der Funktion des Pektins als Kittsubstanz (Hammer, 2005)

Abb. 3: „smooth region“ eines Pektinmoleküls (Czieslich, 2005)

Abb. 4: Darstellung des Angriffs von endo- und exo-Polygalacturonase (Meurer, 1991)

Abb. 5: Darstellung des Searl- und Couette-Systems (Rheologie und Rheometrie, 2010)

Abb. 6: Darstellung des Verbrauches an 0,01 M NaOH bei der Bestimmung des pH-Optimums der Pektinesterase aus Zuckerrüben

Abb. 7: Entwicklung der Aktivität der Pektinesterase bei verschiedenen pH-Werten

Abb. 8: Darstellung der Entwicklung der relativen Aktivität der Pektinesterase aus Zuckerrüben bei verschiedenen pH-Werten

Abb. 9: Darstellung der Zuckerrüben-Pektinesteraseaktivität bei verschiedenen Natriumchloritgehalten in der Substratlösung

Abb. 10: relative Pektinesteraseaktivität bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

Abb. 11: Darstellung der Eichgeraden zur Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität

Abb. 12: Untersuchung der Eichgeraden auf Linearität

Abb. 13: Entwicklung der exo-Polygalacturonaseaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert

Abb. 14: Relativen Aktivität der exo-Polygalacturonase in Abhängigkeit vom pH-Wert

Abb. 15: Entwicklung der endo-Polygalacturonaseaktivität bei verschiedenen pH-Werten

Abb. 16: Entwicklung der dynamischen Viskosität von Reaktionsgemischen bei verschiedenen pH-Werten

Abb. 17: Vergleich der Viskositätsentwicklungen während der Zehnfachbestimmungen in Messbereich 2 und 6

Abb. 18: Entwicklung der Viskositätsänderung zwischen den jeweils ersten Messpunkten der Messabschnitte 2 und 6 in Abhängigkeit vom pH-Wert

10 Verzeichnis der verwendeten Formeln

- (1) Berechnung der Pektinesteraseaktivität
- (2) Berechnung der Pektinesteraseaktivität
- (3) Berechnung des Gesamtblindwertes
- (4) allgemeine Form der Eichgeraden
- (5) Berechnung der exo-Polygalacturonaseaktivität
- (6) Berechnung der endo-Polygalacturonaseaktivität

-Anhang-**Messwerte zur Bestimmung der Pektinesteraseaktivität****Tab. 6: Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums der Zuckerrübenpektinesterase**

pH-Wert	Messung	Zeit in min	Verbrauch NaOH in ml	Mittelwert	units/ml	units/g Zuckerrübe	rel. Enzymaktivität
4	1	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	4	0,000				
5	1	4	0,004	0,006	0,010	0,004	0,064
	2	4	0,007				
5,5	1	4	0,014	0,015	0,024	0,012	0,177
	2	4	0,015				
6,0	1	4	0,033	0,035	0,058	0,029	0,427
	2	4	0,037				
6,5	1	4	0,042	0,043	0,072	0,035	0,524
	2	4	0,044				
7,0	1	4	0,058	0,060	0,100	0,049	0,732
	2	4	0,062				
7,5	1	4	0,075	0,076	0,112	0,055	0,817
	2	4	0,077				
8,0	1	4	0,099	0,102	0,126	0,062	0,921
	2	4	0,104				
8,5	1	4	0,164	0,161	0,137	0,067	1,000
	2	4	0,158				
9,0	1	4	0,311	0,319	0,108	0,053	0,787
	2	4	0,326				
Volumen des Enzymextraktes in ml			49,0	Zuckerrübenmasse in g		100,0	
Volumen 2 für pH-Wert 4 und 5			43,0				

Tab. 7: Messungen zum Natriumchlorit-Optimum der Zuckerrübenpektinesterase

NaCl-Konzentration in mol/l	Messung	Verbrauch NaOH in ml	Mittelwert	units/ml	units/g Zuckerrübe	relative Enzymaktivität
0,00	1	0,026	0,023	0,038	0,017	0,385
	2	0,019				
0,05	1	0,037	0,036	0,059	0,028	0,607
	2	0,034				
0,10	1	0,044	0,045	0,074	0,034	0,761
	2	0,045				
0,15	1	0,053	0,054	0,089	0,041	0,915
	2	0,054				
0,20	1	0,059	0,059	0,098	0,045	1,000
	2	0,058				
0,25	1	0,046	0,050	0,083	0,039	0,855
	2	0,054				
	3	0,050				
Volumen des Enzymextraktes in ml		46,5	Zuckerrübenmasse in g		100,0	

Messwerte zur Bestimmung der exo-Polygalacturonaseaktivität

Tab. 8: Bestimmung des pH-Optimums der exo-Polygalacturonase (σ bezieht sich auf units / g Zuckerrübe)

pH-Wert	Probe	Extinktion	Δ Extinktion	units/ ml Extrakt	units/g Zuckerrübe	□ in units/g Zuckerrübe	rel. Aktivität	σ (\pm)
3,6	1	0,5513	-0,1834	-0,0027	-0,0012	-0,0011	-1,426	$5,9 \times 10^{-5}$
	2	0,5714	-0,1633	-0,0024	-0,0010			
	3	0,5523	-0,1824	-0,0027	-0,0012			
	4	0,5452	-0,1895	-0,0028	-0,0012			
	BE	0,6950						
	BS	0,1483						
	BP	0,1086						
4,0	1	0,5461	-0,2251	-0,0033	-0,0014	-0,0014	-1,684	$6,1 \times 10^{-5}$
	2	0,5733	-0,1979	-0,0029	-0,0013			
	3	0,5528	-0,2184	-0,0032	-0,0014			
	4	0,5571	-0,2141	-0,0032	-0,0014			
	BE	0,7259						
	BS	0,1588						
	BP	0,1135						
4,5	1	0,5376	-0,2710	-0,0040	-0,0017	-0,0017	-2,053	$3,9 \times 10^{-5}$
	2	0,5555	-0,2531	-0,0037	-0,0016			
	3	0,5430	-0,2656	-0,0039	-0,0017			
	4	0,5470	-0,2616	-0,0038	-0,0016			
	BE	0,7524						
	BS	0,1697						
	BP	0,1135						
5,0	1	0,7982	0,0764	0,0010	0,0004	0,0003	0,414	$5,9 \times 10^{-5}$
	2	0,7904	0,0686	0,0008	0,0004			
	3	0,7719	0,0501	0,0006	0,0002			
	4	0,7831	0,0613	0,0007	0,0003			
	BE	0,6444						
	BS	0,1828						
	BP	0,1054						
5,6	1	0,7239	0,1425	0,0019	0,0008	0,0008	1,000	$2,6 \times 10^{-5}$
	2	0,7219	0,1405	0,0019	0,0008			
	3	0,7291	0,1477	0,0020	0,0008			
	4	0,7174	0,1360	0,0018	0,0008			
	BE	0,5276						
	BS	0,2251						
	BP	0,1713						
5,6*	1	0,5918	0,0303	0,0003	0,0001	0,0002	0,248	$4,5 \times 10^{-5}$
	2	0,6122	0,0507	0,0006	0,0003			
	3	0,6062	0,0447	0,0005	0,0002			
	4	0,6042	0,0427	0,0005	0,0002			
	BE	0,5322						
	BS	0,1791						
	BP	0,1498						

pH-Wert	Probe	Extinktion	Δ Extinktion	units/ ml Extrakt	units/g Zuckerrübe	□ in units/g Zuckerrübe	rel. Aktivität	σ (\pm)
6,0*	1	0,5916	0,0161	0,0001	0,0000	0,0001	0,116	$4,5 \times 10^{-5}$
	2	0,5974	0,0219	0,0002	0,0001			
	3	0,5994	0,0239	0,0002	0,0001			
	4	0,6120	0,0365	0,0004	0,0002			
	BE	0,5178						
	BS	0,1942						
	BP	0,1365						
6,5*	1	0,4927	-0,0325	-0,0006	-0,0003	-0,0002	-0,209	$9,2 \times 10^{-5}$
	2	0,5010	-0,0242	-0,0005	-0,0002			
	3	0,5007	-0,0245	-0,0005	-0,0002			
	4	0,5322	0,0070	0,0000	0,0000			
	BE	0,4433						
	BS	0,2390						
	BP	0,1571						
7,0*	1	0,4583	0,0007	-0,0001	-0,0001	-0,0001	-0,100	$6,4 \times 10^{-5}$
	2	0,4529	-0,0047	-0,0002	-0,0001			
	3	0,4371	-0,0205	-0,0004	-0,0002			
	4	0,4658	0,0082	0,0000	0,0000			
	BE	0,3951						
	BS	0,2267						
	BP	0,1642						
7,5*	1	0,4768	0,0127	0,0000	0,0000	0,0000	0,000	$5,1 \times 10^{-5}$
	2	0,4663	0,0022	-0,0001	0,0000			
	3	0,4667	0,0026	-0,0001	0,0000			
	4	0,4531	-0,0110	-0,0003	-0,0001			
	BE	0,3953						
	BS	0,2289						
	BP	0,1601						
Zuckerrübeinwaage in g				100,0	Volumen des Enzymextraktes in ml			43,0

(* = Einstellen des pH-Wertes über Phosphatpuffer)

Messwerte zur Bestimmung der endo-Polygalacturonaseaktivität mittels Kapillarviskosimeters

Tab. 9: Bestimmung des pH-Optimums der endo-Polygalacturonase (σ bezieht sich auf units / g Zuckerrübe)

pH-Wert	Messung	t_0 in s	t_1 in s	Δ $1/\eta_{\text{spez}}$	units/ min	units/g Zu- ckerrübe	□ units/g Zu- cker- rübe	rel. Aktivi- tät	σ (\pm)
3,0	1	189,24	188,39	0,0067	0,666	0,115	0,121	0,982	$8,5 \times 10^{-3}$
	2	189,33	188,45	0,0069	0,689	0,118			
	3	188,66	187,74	0,0073	0,730	0,131			
4,0	1	188,44	187,91	0,0042	0,421	0,072	0,072	0,583	0×10^{-3}
	2	188,81	188,28	0,0042	0,418	0,072			

pH-Wert	Messung	t ₀ in s	t ₁ in s	Δ 1/ η_{spez}	units/ min	units/g Zu- ckerrübe	□ units/g Zucker- rübe	rel. Aktivi- tät	σ (±)
5,5	1	183,29	182,88	0,0036	0,360	0,066			$1,3 \times 10^{-2}$
	2	183,17	182,67	0,0044	0,440	0,080			
	3	183,25	182,7	0,0048	0,484	0,088			
	4	182,74	182,14	0,0053	0,534	0,097	0,083	0,669	
7,0	1	161,49	161,03	0,0067	0,667	0,121			$3,1 \times 10^{-3}$
	2	161,44	160,96	0,0070	0,697	0,127			
	3	161,52	161,05	0,0068	0,681	0,123	0,124	1,000	
Durchlaufzeit von Wasser									84,805

Messwerte zur Bestimmung des pH-Optimums der endo-Polygalacturonase mittels Rotationsviskosimetrie

pH-Wert	Messung	Nummer des Messpunktes	Viskosität in Pa*s		Mittelwert Δ Vis- kosität in Pa*s
			Messabschnitt 2	Messabschnitt 6	
3	1	1	0,00190	0,00157	
		2	0,00199	0,00148	
		3	0,00212	0,00149	
		4	0,00222	0,00152	
		5	0,00224	0,00158	
		6	0,00229	0,00167	
		7	0,00228	0,00179	
		8	0,00222	0,00193	
		9	0,00213	0,00204	
		10	0,00203	0,00215	
		Mittelwert Viskosität in Pa*s			
Δ Viskosität in Pa*s			0,00042		
	2	1	0,00174	0,00174	
		2	0,00186	0,00162	
		3	0,00198	0,00156	
		4	0,00210	0,00151	
		5	0,00221	0,00153	
		6	0,00228	0,00159	
		7	0,00231	0,00165	
		8	0,00230	0,00175	
		9	0,00227	0,00188	
		10	0,00220	0,00199	
		Mittelwert Viskosität in Pa*s			
Δ Viskosität in Pa*s			0,00044		0,00043
4	1	1	0,00219	0,00178	

pH-Wert	Messung	Nummer des Messpunktes	Viskosität in Pa*s		Mittelwert Δ Viskosität in Pa*s
			Messabschnitt 2	Messabschnitt 6	
		2	0,00231	0,00172	
		3	0,00241	0,00174	
		4	0,00251	0,00177	
		5	0,00254	0,00184	
		6	0,00255	0,00194	
		7	0,00255	0,00206	
		8	0,00247	0,00219	
		9	0,00239	0,00232	
		10	0,00226	0,00242	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00242	0,00198	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00044		
	2	1	0,00198	0,00165	
		2	0,00209	0,00158	
		3	0,00219	0,00156	
		4	0,00231	0,00158	
		5	0,00234	0,00166	
		6	0,00234	0,00174	
		7	0,00240	0,00186	
		8	0,00239	0,00198	
		9	0,00222	0,00211	
		10	0,00212	0,00222	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00224	0,00179	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00044		0,00044
5	1	1	0,00260	0,00198	
		2	0,00271	0,00202	
		3	0,00270	0,00208	
		4	0,00274	0,00221	
		5	0,00273	0,00210	
		6	0,00262	0,00224	
		7	0,00257	0,00236	
		8	0,00242	0,00234	
		9	0,00227	0,00243	
		10	0,00217	0,00248	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00255	0,00222	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00033		
	2	1	0,00209	0,00169	
		2	0,00220	0,00161	
		3	0,00230	0,00162	
		4	0,00240	0,00166	
		5	0,00244	0,00174	
		6	0,00243	0,00188	
		7	0,00242	0,00199	

pH-Wert	Messung	Nummer des Messpunktes	Viskosität in Pa*s		Mittelwert Δ Viskosität in Pa*s
			Messabschnitt 2	Messabschnitt 6	
		8	0,00235	0,00212	
		9	0,00227	0,00224	
		10	0,00213	0,00235	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00230	0,00189	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00041		0,00037
6	1	1	0,00166	0,00169	
		2	0,00178	0,00159	
		3	0,00189	0,00151	
		4	0,00184	0,00146	
		5	0,00210	0,00149	
		6	0,00219	0,00156	
		7	0,00218	0,00161	
		8	0,00221	0,00171	
		9	0,00222	0,00185	
		10	0,00213	0,00193	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00202	0,00164	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00038		
	2	1	0,00158	0,00162	
		2	0,00172	0,00150	
		3	0,00182	0,00142	
		4	0,00198	0,00138	
		5	0,00205	0,00140	
		6	0,00216	0,00149	
		7	0,00215	0,00151	
		8	0,00216	0,00166	
		9	0,00217	0,00178	
		10	0,00208	0,00187	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00199	0,00156	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00042		0,00040
7	1	1	0,00154	0,00130	
		2	0,00167	0,00122	
		3	0,00162	0,00119	
		4	0,00189	0,00116	
		5	0,00198	0,00127	
		6	0,00202	0,00133	
		7	0,00199	0,00145	
		8	0,00203	0,00155	
		9	0,00191	0,00169	
		10	0,00180	0,00183	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00185	0,00140	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00045		
	2	1	0,00156	0,00161	

pH-Wert	Messung	Nummer des Messpunktes	Viskosität in Pa*s		Mittelwert Δ Viskosität in Pa*s
			Messabschnitt 2	Messabschnitt 6	
		2	0,00169	0,00149	
		3	0,00183	0,00138	
		4	0,00192	0,00134	
		5	0,00205	0,00133	
		6	0,00213	0,00144	
		7	0,00214	0,00149	
		8	0,00215	0,00162	
		9	0,00217	0,00172	
		10	0,00206	0,00183	
Mittelwert Viskosität in Pa*s			0,00197	0,00153	
Δ Viskosität in Pa*s			0,00045		0,00045

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort, Datum

Unterschrift