



Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Masterstudiengang Lebensmitteltechnologie und Bioprodukttechnologie

# Enzymnachweis in Fruchtsäften

Wissenschaftliche Abschlussarbeit  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science (M.Sc.)



in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH

unter der Betreuung von  
Dr. rer. nat. Nadine Fischbach  
Prof. Dr. Peter Meurer

von Juliane Walter  
Dezember 2013

urn:nbn:de:gbv:519-thesis2013-0145-2

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Mikko Hofsommer und Frau Dr. rer. nat. Nadine Fischbach bei der Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH in Berlin durchgeführt. Ich möchte mich bei der GfL und insbesondere bei Mikko Hofsommer für das Ermöglichen meiner Abschlussarbeit im Masterstudium bedanken.

Mein besonderer Dank gilt

... *Dr. Nadine Fischbach*, die meine Arbeit und mich betreut hat. Ich bedanke mich bei ihr für die Bereitstellung der interessanten Thematik und die freundliche und wissenschaftliche Unterstützung. Außerdem möchte ich ihr für die immer neuen wegweisenden und konstruktiven Vorschläge sowie für die stets entgegengebrachte Geduld danken. Die Einführung in die wissenschaftliche Gerätepraxis, die fachlichen Erläuterungen zur Aufgabenstellung sowie zu Excel und Word haben mir sehr geholfen.

... *Prof. Dr. Peter Meurer* für die wertvollen Hilfestellungen im Studium.

... *Silke Sommer, Antje Steinweg* und *Josef Roblero* für das überaus angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bei laborspezifischen sowie privaten Angelegenheiten.

... *Peggy Zelmer-Mayer* für ihre Freundlichkeit und die stets vorhandene Bereitschaft bei anstehenden Fragen zu helfen.

... *der Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung* und *ihren Mitarbeitern*, die mir stets Ansprechpartner waren, mein Projekt durch ihre Ideen und ihre Anregungen bereicherten.

... *meinen lieben Eltern* sowie *meiner Familie*, die zu jeder Zeit an mich geglaubt und mich mit unendlicher Geduld und Fürsorge unterstützt haben.

... *meinem Freund*, der immer für mich da war, mir Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

## Abstract

Pectin is one of the major cell wall components and probably the most complex macromolecule in nature. In food that naturally contain pectin, e.g. fruit, important quality changes during storage and processing are related to changes in pectin structure. Native or added pectic enzymes can play an important role in these changes.

In the present work the changes in activity of the pectic enzymes pectinmethyl esterase, endo-polygalacturonase and pectin lyase in self-squeezed orange juices and orange fresh juices was investigated during cold storage. The activities were determined with three different detection methods. The activity of pectinmethyl esterase was stable during cold storage. The determination of the endo-polygalacturonase could not be performed due to the lack of a capillary viscosimeter. Pectin lyase could not be detected in both types of juices.

In addition, the activity of pectinmethyl esterase in mixtures of self-squeezed orange juice and pasteurized orange juice was tested to evaluate a possible consumer deception by such mixtures. The activity in the mixtures decreased compared to the original self-squeezed orange juice. A deception of the consumer is still possible.

Furthermore, a suitable method for determination of galacturonic acid oligomers using high-performance anion-exchange chromatography is developed. With this method, enzyme treatment in fruit juices should be detected.

## Abkürzungsverzeichnis

Ara	Arabinose
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
Endo-PG	Endo-Polygalacturonase
FE	Flächeneinheiten
g	Gramm
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
HR	hairy region
h	Stunde
l	Liter
M	molar
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PEF	Pulsed Electric Field
PEU	pectin esterase units
PGU	polygalacturonase units
PLU	pectin lyase units
Rha	Rhamnose
s	Standardabweichung
sec	Sekunde
$\sigma$	Sigma
$\eta_{\text{spez}}$	Spezifische Viskosität

SR	smooth region
t	Zeit
U	Spannung
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
$\bar{x}$	Mittelwert
Xyl	Xylose

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>2 Aufgaben- und Problemstellung</b>	<b>11</b>
<b>3 Wissenschaftliche Grundlagen</b>	<b>13</b>
3.1 Die Technologie der Orangenverarbeitung zu Fruchtsaft	13
3.2 Die Charakterisierung des Polysaccharids Pektin und der Galacturonsäure	15
3.3 Die Gruppe der pektolytischen Enzyme	17
3.3.1 Pektinesterasen - Pektinmethylsterase	18
3.3.2 Polygalacturonasen - Endopolygalacturonase	19
3.3.3 Lyasen – Pektinlyase	20
3.4 Die Funktionsweise der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	22
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1 Aktivitätsbestimmungen drei pektolytischer Enzyme	27
4.1.1 Material	27
4.1.2 Bestimmung der Pektinmethylsterase-Aktivität nach Kimball [14]	27
4.1.3 Bestimmung der Endo-Polygalacturonase-Aktivität	29
4.1.4 Bestimmung der Pektinlyase-Aktivität	30
4.2 Analytik der Galacturonsäureprofile mittels HPLC	31
4.2.1 Enzyme und Substrat	31
4.2.2 Enzymatische Abbauversuche des Pektins	31
4.2.3 Bestimmung des Galacturonsäureprofils	33
4.3 Statistische Auswertungen der Messergebnisse	37
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>39</b>
5.1 Nachweise der pektolytischen Enzyme	39
5.1.1 Bestimmung der Pektinmethylsterase-Aktivität nach Kimball [14]	39
5.1.1.1 Vorversuche	39
5.1.1.2 Kalibrierungsversuche mit Handelsenzympräparat	40
5.1.1.3 Beweise der chemischen Entesterung	43

5.1.1.4 Aktivitätsbestimmungen in selbst gepressten Orangensaften und Orangenfrischsaften	45
5.1.2 Bestimmung der Endo-Polygalacturonase-Aktivität	51
5.1.2.1 Vorversuche	51
5.1.2.2 Versuchsdurchführung mit Handelsenzympräparat	52
5.1.2.3 Aktivitätsnachweise in Orangensaften	55
5.1.3 Bestimmung der Pektinlyase-Aktivität	55
5.2 Analytische Untersuchungen des Galacturonsäure-Profils mittels HPAEC	57
5.2.1 Ermittlung des Gradienten zur Auftrennung von Oligo-Galacturonsäure	57
5.2.2 Ergebnisse des enzymatischen Abbaus	60
5.2.3 Quantifizierung und Identifizierung der Galacturonsäure-Oligomere	74
<b>6 Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>77</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>8 Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>Verzeichnisse</b>	<b>91</b>
Literaturverzeichnis	91
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	98
<b>Anhang</b>	<b>101</b>
A Rezepturen und Durchführung der Aktivitätstests	101
B Ergebnisse	107
<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>121</b>

## 1 Einleitung

Fruchtsäfte sind von Natur aus wertvolle Lebensmittel, die aus ernährungsphysiologischer Sicht zu einer gesunden und ausgewogenen Ernährung gehören. Nach der deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) werden sie deshalb nicht als Getränke, sondern in die wichtige Kategorie der pflanzlichen Lebensmittel eingeordnet. Seit Anfang der Neunziger Jahre liegt der Pro-Kopf-Verbrauch an Fruchtsäften und -nektaren bei bis zu 40 l im Jahr [1]. Nach dem Apfelsaft ist der Orangensaft der zweitbeliebteste Saft in Deutschland [1]. Für den Verzehr stehen Orangendirektsäfte und Orangensaft aus Konzentrat in den Regalen der Supermärkte bereit. Doch seit einigen Jahren besteht der Wunsch des Konsumenten darin, einen Saft zu erhalten, wie ihn die Natur bietet [2]. Das Produkt soll nach den Vorstellungen der Verbraucher keine Veränderungen bei der Herstellung und Lagerung erfahren [2]. Die Fruchtsaftindustrie brachte ein Erzeugnis mit dem Namen „Orangenfrischsaft“ auf den Markt und verkauft diesen als frische Ware aus dem Kühlregal. Gekühlt wird er deshalb, weil der Saft keinerlei Wärmebehandlung unterzogen wird und bei der Lagerung bei Raumtemperatur schnell verderben würde.

Im Hinblick auf das Wort „Frischsaft“ ist es schwierig, das Produkt eindeutig und sachgerecht zu definieren [2]. In der Fruchtsaftverordnung (FrSaftErfrischGetrV) wird eine Definition für den Begriff „Frischsaft“ nicht aufgeführt. Diese Bezeichnung wirft jedoch einige Fragen auf, zum Beispiel was der Konsument unter einem Frischsaft versteht oder was „frisch“ bedeutet. Gilt ein Saft nur als frisch, wenn er erst vor kurzer Zeit gewonnen und nicht thermisch behandelt wurde? Und ab wann ist ein Saft nicht mehr frisch? Im Wesentlichen erwarten viele Verbraucher ein nur kurze Zeit vor dem Verzehr hergestelltes Produkt, wobei aber keine klare Vorstellung bezüglich der vergangenen Zeitspanne zu bestehen scheint [2]. Der Knackpunkt liegt wohl eher in der Erwartung, dass der Saft nicht pasteurisiert, nicht konzentriert

wurde und auch sonst keine Zusätze erhalten hat. Die Wärmebehandlung ist für viele Konsumenten ein qualitätsmindernder Eingriff, der sensorische Veränderungen des Saftes zur Folge hat. Jedoch ist „pasteurisieren“ nicht das Gegenteil von „frisch“ [2]. Sondern die Qualität und Frische eines Saftes sind abhängig von der Beschaffenheit der eingesetzten Rohware und dem technischen Standard der angewandten Technologie der Verarbeitung [2]. Der Unterschied vom Frischsaft zu einem pasteurisierten Orangensaft liegt also nur im Vorhandensein der natürlichen mikrobiellen Flora und in den Veränderungen des Saftes durch die Aktivität aller in der Frucht vorkommenden Enzyme.

Schon lange wird in der Lebensmittelindustrie die besondere Wirkung von Enzymen genutzt. Sie führen eine Reifung oder eine Verbesserung von Geschmack, Geruch und Konsistenz in Lebensmitteln herbei [34]. Enzyme helfen zu einer besseren Sensorik und vereinfachen dazu viele Herstellungsprozesse von Produkten. Zum Beispiel werden Enzyme zur Gewinnung von Käsebruch oder zur Klärung von Wein eingesetzt [34].

Der Einsatz von pektinabbauenden Enzymen zur Verarbeitung von Früchten zu Fruchtsaft ist teilweise unerlässlich. Früchte werden in einer Mühle zu Maische vermahlen. Ohne eine geeignete Behandlung der Maische kann nur ein schwach gefärbter Saft gewonnen werden. Die Farbe des Saftes hat zum Beispiel bei der Entsaftung von rotem Beerenobst eine große Bedeutung. Niemand möchte einen nur schwach rosa gefärbten Johannisbeersaft trinken. Die Lösung des Problems liegt in der Erhitzung der Maische auf 20 – 45 °C [7]. Die Zellwände werden durch die Wärmebehandlung für die Farbstoffe durchlässig [3]. Dadurch ist ein direkter Übergang der Farbstoffe in den Saft möglich [3]. Mit der Farbfreisetzung kommt es jedoch gleichzeitig zu einer Umwandlung von wasserunlöslichem Protopektin zu wasserlöslichem Pektin [3]. Die Entsaftung von Früchten ist dann ohne den Einsatz von Enzymen ein

eher ineffizientes Verfahren. Der Fruchtsaft wird vom Pektin gebunden, so dass die Maische geliert und sich nicht mehr entsaften lässt.

Die Gelierkraft hängt vom Pektингehalt der Früchte ab, jedoch führt bereits eine geringe Konzentration von Pektin zu Gelbildung [3]. Aus diesem Grund muss eine Behandlung der Maische mit pektinabbauenden Enzymen durchgeführt werden. Durch den enzymatischen Abbau des Pektins geht dessen Wasserbindungsvermögen verloren [3]. Daraus resultiert eine Fest-Flüssig-Trennung, die kurze Presszeiten und hohe Saftausbeuten ermöglicht [3]. Da Fruchtmaischen erhitzt werden und sehr sauer sind, ist die Zusammensetzung der Präparate so optimiert, dass sie bei niedrigen pH-Werten, zwischen pH 3 und 4, und bei Temperaturen von 20 - 45 °C ausreichend stabil sind. Das Pektin wird je nach Enzym zu Galacturonsäure, Methanol und Neutralzucker abgebaut. Diese Abbauprodukte lassen sich mit Hilfe von analytischen Untersuchungsverfahren nachweisen und damit auch die Enzymierung der Fruchtmaische [36]. Eine herausragende Rolle spielt dabei die Galacturonsäure, die einer der Grundbausteine des Pektins ist [4]. Bestimmte Enzyme bauen das Pektin zu Galacturonsäure-Monomeren ab [5]. Mit chromatographischen Analysen lässt sich der Gehalt dieser Monomere einfach und schnell bestimmen [3]. Je höher der Gehalt der Galacturonsäure ist, desto stärker wurde eine Enzymierung der Maische bei der Fruchtsaftherstellung vorgenommen [3]. Die Verwendung von pektinabbauenden Enzymen ist zwar erlaubt und die Enzymierung der Maischen kein qualitätsmindernder Eingriff, aber die Fruchtsafthersteller geben dennoch ungern zu, dass sie Enzyme für eine größere Saftausbeute verwenden. Die Enzymindustrie bietet für dieses „Problemfeld“ Spezialenzyme an, die die Bildung von Galacturonsäure-Monomeren unterdrücken. Mit anderen Worten bauen diese Enzyme Pektinbruchstücke ab, die aus mehreren Galacturonsäure-Einheiten bestehen. Diese größeren Bruchstücke werden als Di-, Tri- und Oligomere der Galacturonsäure bezeichnet. Der Nachweis dieser Bruchstücke stellt für bestehende Analyseverfahren eine größere Herausforderung dar.

## 2 Aufgaben- und Problemstellung

Der Unterschied zwischen einem Orangenfrischsaft und einem pasteurisierten Orangensaft liegt in der Aktivität der Enzyme, die in der Frucht vorkommen. Den größten Einfluss auf den Saft haben dabei die pektolytischen Enzyme. Ohne eine thermische Inaktivierung verursacht die Endo-Polygalacturonase den Abbau von noch vorhandenem Pektin im Orangensaft und damit eine Phasentrennung der Flüssigkeit [7]. Das Enzym Pektinmethylesterase spaltet die Esterbindungen zwischen der Galacturonsäure und dem Methylrest und setzt dadurch Methanol im Orangensaft frei [8]. Pektinlyase ist kein von Pflanzen synthetisiertes Enzym [10]. Durch die intakte mikrobielle Flora im Frischsaft kann dieses Enzym jedoch durch möglicherweise vorhandene Schimmelpilze gebildet werden. Pektinlyase spaltet, wie der Name schon sagt, Pektin und kann ebenfalls für eine Phasentrennung des Saftes verantwortlich sein [10]. Hinsichtlich dieser drei Enzyme sollen Frischsätze aus dem Handel und selbst gepresster Orangensaft untersucht werden.

Das wichtigste Enzym ist bei diesen Untersuchungen die Pektinmethylesterase. Sie kann als Leitenzym bei der Inaktivierung von Enzymen während der Pasteurisation von Fruchtsäften angesehen werden, da sie ubiquitär vorhanden und ihre Aktivität einwandfrei messbar ist [8]. Unter diesem Aspekt sollen Veränderungen der Aktivitäten dieser drei Enzyme während der Kühl Lagerung von Frischsäften und selbst gepressten Säften untersucht werden. Außerdem soll die Aktivität der Pektinmethylesterase in Mischungen aus selbst gepresstem und pasteurisiertem Saft geprüft werden und so eine Täuschung des Verbrauchers durch solche Mischungen möglich ist.

Mittlerweile existieren Enzympräparate auf dem Markt, die das Pektin in Di-, Tri- und Oligomere der Galacturonsäure abbauen und somit eine Enzymierung nicht mehr offensichtlich anzeigen. Deshalb ist der Nachweis einer En-

zymierung von Fruchtmaischen über den Gehalt der Mono-Galacturonsäure nicht ausreichend. Unter diesem Aspekt sollen in dieser Arbeit Präparate mit bekannter Enzymzusammensetzung auf ihre Spaltungswirkung und auf das daraus resultierende Galacturonsäure-Profil untersucht werden. Anschließend sollen Abbauversuche mit Präparaten folgen, deren Enzyme nicht bekannt sind. Es ist ein weiteres Ziel, anhand von Vergleichen mit den Galacturonsäure-Profilen der bekannten Enzyme Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der unbekannten Präparate zu ziehen.

Um Zusammenhänge zwischen dem Galaturonsäure-Profil und der Zusammensetzung von Enzympräparaten aufzeigen zu können, soll zunächst in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung eine geeignete Methode für die Messung der Di-, Tri- und Oligomere erarbeitet werden. Die Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzen erfolgt mit Hilfe der HPAEC.

## 3 Wissenschaftliche Grundlagen

### 3.1 Die Technologie der Orangenverarbeitung zu Fruchtsaft

Über die technologischen Prozessschritte der Herstellung von Orangensaft gibt Abbildung 1 einen Überblick.

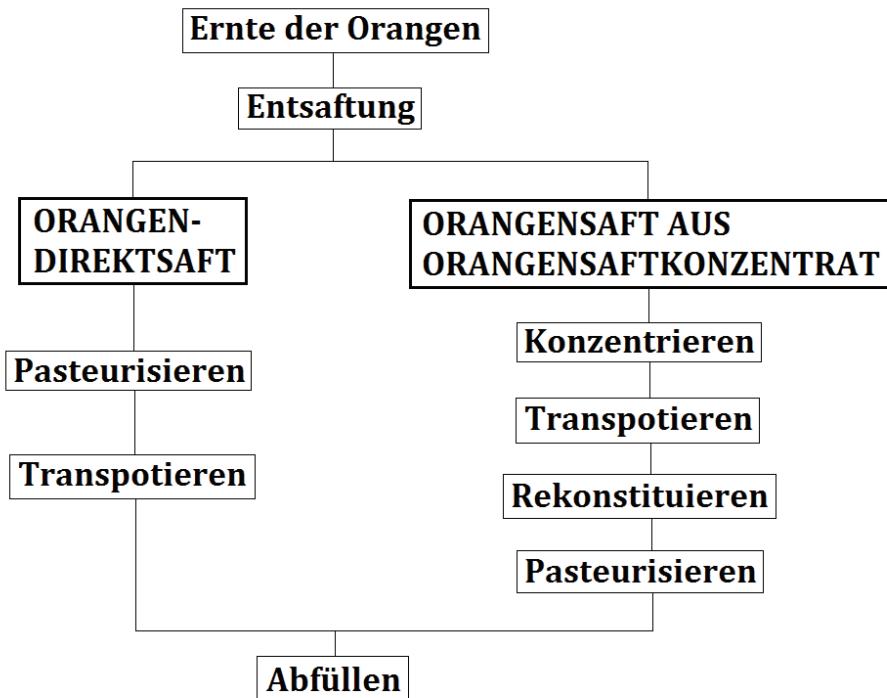


Abbildung 1: Herstellungsprozess von der Orange bis zum Saft

Brasilien ist das Hauptanbaugebiet von Orangen, gefolgt von den USA, Italien und Spanien [1]. Die Orangen werden nach dem Ernten sortiert und dabei beschädigte oder unreife Früchte entfernt. Nach gründlichem Waschen werden die Orangen im Ursprungsland verarbeitet. So werden die Qualität des Saftes und deren Inhaltsstoffe erhalten. Die Früchte werden in einer speziellen Zitruspresse entsaftet. Die Presse ist so konstruiert, dass beim Pressen keine Bitterstoffe aus der Schale in den Saft gelangen und den Geschmack verändern [1]. Danach teilt sich das Herstellungsverfahren in zwei voneinander getrenn-

te Produktionswege. Zum einen wird der so genannte Direktsaft pasteurisiert, abgefüllt und ins Zielland transportiert. Zum anderen wird der Großteil des frisch gepressten Saftes im Anbualnd zu Orangensaftkonzentrat verarbeitet [1]. Dazu werden dem Saft unter Vakuum bei niedrigen Temperaturen zuerst die Aromen, anschließend das Wasser entzogen. Bei diesem Prozessschritt erfolgt schon eine Inaktivierung der Enzyme. Es bleibt ein Sechstel des Ausgangsvolumens übrig [1]. Das Konzentrat und die Aromen werden für die Lagerung und den Transport tiefgefroren. Im Zielland wird das Konzentrat rekonstituiert, d.h. aufbereitetes Trinkwasser, Konzentrat und Aromen werden in ihren natürlichen Verhältnissen wieder gemischt [1]. Der rückverdünnte Orangensaft wird dann durch Pasteurisation haltbar gemacht, sodass er ungeöffnet auch bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Die Pasteurisation gewährleistet die Abtötung der für den Verderb verantwortlichen Mikroorganismen und die Inaktivierung von Enzymen [5]. Dabei wird der Saft schnell auf 82 bis 90 °C erhitzt, für wenige Sekunden bei dieser Temperatur gehalten und schnell wieder abgekühlt. Dieses Verfahren wird Hochtemperatur-Kurzzeiterhitzung genannt [1]. Zum Schluss wird der Saft abgefüllt.

Wenn aus Orangen Frischsaft hergestellt wird, werden diese als unbehandelte Rohware nach Deutschland transportiert. Dann werden sie gepresst und danach unpasteurisiert in sterile Flaschen abgefüllt.

Der Frischsaft weist einen niedrigeren Grad der Stabilität auf. Daher sollte er gegenüber dem erhitzten Saft andere Qualitätskriterien erfüllen [2]. Die natürliche mikrobielle Flora ist der Grund für eine begrenzte Haltbarkeit [2]. Ein weiterer Grund ist die Aktivität aller vorhandenen Enzyme der Frucht, die zu einer Phasentrennung führt [2; 7]. Dieser als Frischsaft deklarierte Orangensaft besitzt Frische und Fruchtaroma in überdurchschnittlichem Maße und weitgehende Ähnlichkeit mit dem Geruch der frischen Frucht [2]. An die für die Herstellung von Frischsaft verwendete Rohware müssen auf Grund dieser Voraussetzungen ungewöhnlich hohe qualitative Anforderungen gestellt wer-

den [2]. Die Früchte müssen reif, ausnahmslos mikrobiell einwandfrei und frei von Druckstellen sein. Das Pressen von gekühlten Orangen führte Untersuchungen zufolge zu einem besseren Aroma und Geschmackserlebnis des Saftes [2]. Diese Kriterien sind im Hinblick auf die Farbe, Stabilität und das Aroma des Saftes von Bedeutung.

### **3.2 Die Charakterisierung des Polysaccharids Pektin und der Galacturonsäure**

Pektin ist ein komplexes, saures Polysaccharid, das als unlösliches Protopektin Hauptbestandteil in pflanzlichen Zellwänden ist [Sauer]. Innerhalb der Zelle kommt es im Zellsaft gelöst vor [Sauer]. Das molekulare Gerüst des Pektins ist aus einer großen Anzahl von D-Galacturonsäuremolekülen aufgebaut, die über  $\alpha$ -1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind und dessen Carboxylgruppen am C6-Atom teilweise mit Methanol verestert sind [5]. Der Veresterungsgrad wird angegeben als das prozentuale molare Verhältnis zwischen veresterter Galacturonsäure und der Gesamtgalacturonsäure [5].

Wenn mehr als 25 unverzweigte Galacturonsäuremoleküle vorliegen, wird diese Pektinfraktion als „smooth region“ bezeichnet [5]. Es gibt des Weiteren Fraktionen, in denen Rhamnosemoleküle<sup>1</sup> in die Galacturonsäurekette eingebaut sind. Diese Moleküle verursachen einen „Knick“ in der räumlichen Struktur des Pektins und werden als „Heterogalacturonane“ oder „hairy regions“ bezeichnet [3]. Einen Ausschnitt des Aufbaus der „hairy region“ (HR) eines Pektinmoleküls zeigt Abbildung 2.

---

<sup>1</sup> Rhamnose ist ein Monosaccharid und besteht aus sechs Kohlenstoffatomen.

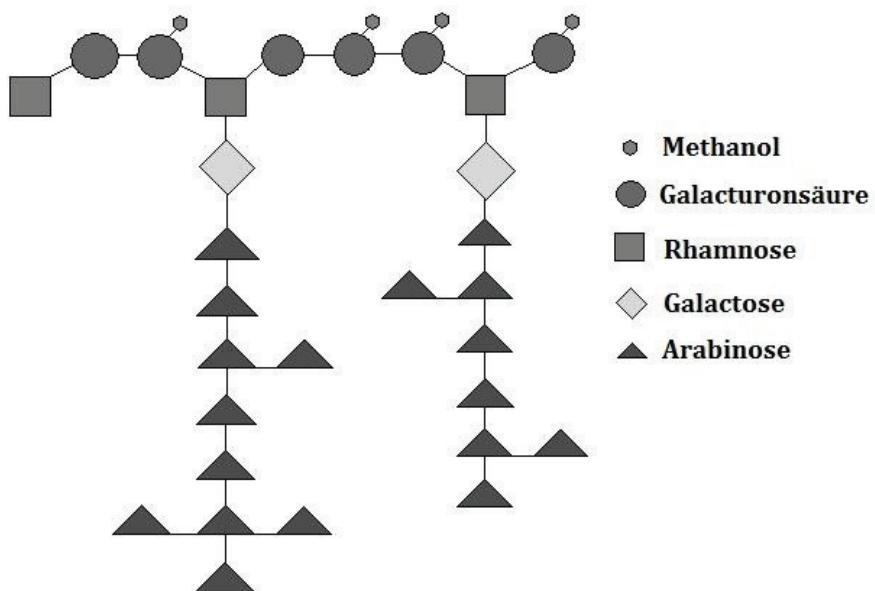


Abbildung 2: Struktur des Pektinmoleküls

An den Rhamnosemolekülen sind Seitenketten aus Neutralzuckern wie Galactose<sup>2</sup> und Arabinose<sup>3</sup> angelagert. Eine vollständige Hydrolyse von gereinigtem Pektin ergibt laut Untersuchungen folgende Durchschnittswerte der Zusammensetzung: D-Galacturonsäure 65 bis 95 %, Methanol 3 bis 8 % und Neutralzucker 8 bis 10 % [5].

In der Fruchtsaftindustrie sind Pektine eher unerwünscht, da sie als Gewebeelement in den pflanzlichen Zellen den Saft zurückhalten und damit die Saftausbeute verringern. Sie stören als feines, unsichtbares Gerüst im Saft die Klärung und Filtration. Mit dem Einsatz von pektinabbauenden Enzymen wird diesen Faktoren entgegengewirkt [5].

Galacturonsäure (s. Abb. 3) ist eine organische Verbindung aus den Elementen Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff und zählt zu den Uronsäuren [6]. Sie gehört als Monomer zur Gruppe der Kohlenhydrate. Galacturonsäure ist die

<sup>2</sup> Galactose als Monosaccharid besteht aus sechs Kohlenstoffatomen.

<sup>3</sup> Arabinose ist ein Monosaccharid und aus fünf Kohlenstoffatomen aufgebaut.

oxidierte Form der D-Galactose und kann deshalb auch als 6-Carboxy-D-Galactose bezeichnet werden [6].

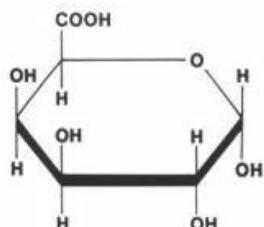


Abbildung 3: D-Galacturonsäuremolekül in Haworth-Schreibweise

Bei der Bearbeitung von Fruchtmaischen mit pektolytischen Enzymen wird das Pektin in Mono-, Di-, Tri- und Oligomere<sup>4</sup> der Galacturonsäure abgebaut [29]. Die gebildete Menge dieser Bruchstücke ist von der Verwendung der auf dem Markt erhältlichen Enzympräparate und der Prozessführung abhängig. Auf Grund des Einsatzes verschiedenster pektolytischer Enzyme, die nur die „smooth regions“ des Pektinmoleküls angreifen, ergeben sich unterschiedliche Galacturonsäureprofile. Bei analytischen Untersuchungen, zum Beispiel mit Hilfe chromatographischer Verfahren, kann durch das Galacturonsäureprofil auf die verwendeten Enzyme für die Fruchtmaische geschlossen werden.

### 3.3 Die Gruppe der pektolytischen Enzyme

1897 beobachtete der deutsche Chemiker Eduard Buchner, dass filtrierter Hefepresssaft und nicht nur Hefen selbst die alkoholische Gärung bewirken [7]. Er prägte den Begriff *en zyma* (=in Hefe) [7]. Enzyme sind aktive, hochmolekulare Eiweißstoffe [27]. Sie sind an einer Vielzahl von biochemischen Reaktionen beteiligt, werden aber dabei selbst nicht verbraucht [27]. Sie werden daher als Biokatalysatoren bezeichnet.

Zu den pektinabbauenden Enzymen gehören die Gruppen der Pektinesterasen, Polygalacturonasen und pektinspaltenden Lyasen. Enzyme, die nur inner-

<sup>4</sup> Oligomere sind Moleküle aus mehreren (4-10) gleichen Monosacchariden.

halb der Seitenketten des Pektins spalten, zählen nicht zu den pektolytischen Enzymen. Die beiden erstgenannten Enzymgruppen kommen sowohl in allen Pflanzengeweben vor, werden aber auch von Bakterien und Pilzen gebildet [8; 9]. Von den Lyasen wurde derzeit einzig die Pektatlyase in Pflanzen nachgewiesen [10]. Die Pektinlyase konnte bisher nur in Mikroorganismen identifiziert und isoliert werden [10].

Grundlegend befinden sich die Angriffspunkte dieser Enzyme an der methylierten Polygalacturonsäurekette des Pektins. Pektinesterasen spalten Esterbindungen in der Galacturonsäurekette [8]. Dazu gehören acetylierte Hydroxylgruppen und methylierte Carboxylgruppen, die sich in den einzelnen Galacturonsäuremolekülen befinden [8]. Die Polygalacturonasen greifen die glycosidischen Bindungen innerhalb der linear verlaufenden Pektinhauptkette, den „smooth regions“, an [9]. Damit sorgen sie für eine Depolymerisation<sup>5</sup> des gesamten Pektinmoleküls [9]. Lyasen katalysieren die Eliminierungreaktion [10].

#### **3.3.1 Pektinesterasen - Pektinmethylesterase**

Derzeit unterscheidet man drei Klassen von Esterasen: die Pektinmethylesterase, die Pektinacetylesterase und die Rhamnogalacturonacetylesterase [8].

Die Pektinmethylesterase kommt als pektolytisches Enzym in allen Gewebearten höher entwickelter Pflanzen vor [8]. Die Pektinmethylesterase hydrolysiert die Esterbindungen zwischen dem Methylrest und der Carboxylgruppe der Galacturonsäure (s. Abb. 4) [8].

Untersuchungen zufolge wurden mehrere Formen der Pektinmethylesterase erforscht [8]. Dabei wurden basische, neutrale und saure Isoformen gefunden, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften wie Molmasse und pH-Optimum unterscheiden [8].

---

<sup>5</sup> Depolymerisation ist der Abbau hochpolymerer Substanzen zu kleineren Bruchstücken bis hin zu Monomeren.

Das pH-Optimum der pflanzlichen und bakteriellen Pektinmethylesterase liegt zwischen pH 6 und 8, während das der aus Pilzen isolierten Pektinmethylesterase zwischen pH 4 und 6 liegt [8]. Die Temperaturoptima dieser drei Formen bewegen sich zwischen 30 und 70 °C, wobei pflanzliche Pektinmethylesterasen eine höhere Temperaturtoleranz aufweisen [8].

**Pektinmethylesterase:**

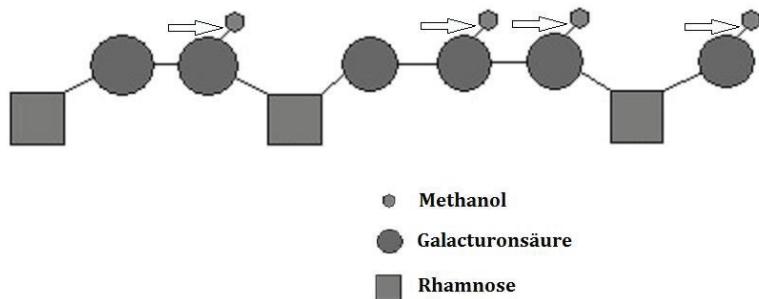


Abbildung 4: Angriffspunkt der Pektinmethylesterase

Somit ist diese Wirkung des Enzyms für die Bildung von Methanol, freien Carboxylgruppen und Hydroniumionen verantwortlich [8]. Das vollständige Reaktionsprodukt ist die entesterte Galacturonsäure im Pektinmolekül, die auch als Pektinsäure bezeichnet wird.

### 3.3.2 Polygalacturonasen - Endopolygalacturonase

Zu der Klasse der Polygalacturonasen gehören die Endo-Polygalacturonasen und die Exo-Polygalacturonasen [9]. Sie kommen in höher entwickelten Pflanzen, Pilzen, in einigen Hefen und Bakterien vor [9]. Die Namen dieser Enzyme deuten auf das Substrat hin, dass sie verwerten. Exo-Polygalacturonase spaltet Galacturonsäure als Monomer vom Ende einer Pektinkette [9]. Endo-Polygalacturonase greift das Pektinmakromolekül mitten drin an und besitzt aus diesem Grund eine depolymerisierende Wirkung [9]. Die Abbildung 5 zeigt die Angriffspunkte der Endo-Polygalacturonase.

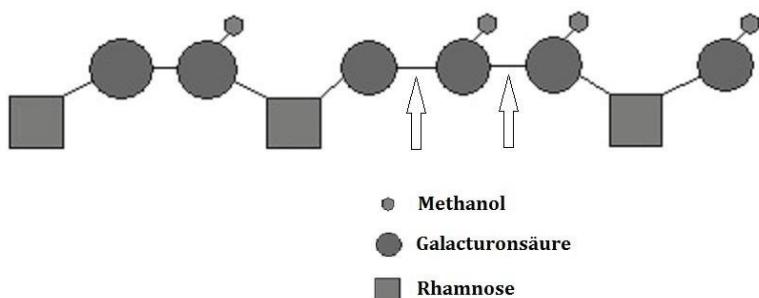
**Endo-Polygalacturonase:**

Abbildung 5: Angriffspunkte der Endo-Polygalacturonase

Am aktivsten sind diese Enzyme, wenn der Veresterungsgrad des Pektins unterhalb von 50 % liegt. Die mikrobielle Endo-Polygalacturonase dient Mikroorganismen dazu, das Pektin in pflanzlichem Gewebe abzubauen und Zugang zu den Nährstoffen zu erlangen [9]. Dieser Vorgang konnte bei einigen Hefen dokumentiert werden [9].

Während des Wachstums, der Reifung und der Lagerung von Früchten verändert sich die Textur des Obstes, und es wird weich. Dies geschieht durch die kombinierte Wirkung der Pektinmethylsterase und der Polygalacturonasen [9].

### 3.3.3 Lyasen – Pektinlyase

Die Gruppe der pektinspaltenden Lyasen wird in Pektinlyasen und Pektatlyasen klassifiziert. Beide Enzyme spalten die glycosidische Bindung zwischen zwei Galacturonsäuremolekülen in einer Pektinkette. Dabei entsteht eine Doppelbindung zwischen dem 4. und 5. C-Atom des einen Galacturonsäuremoleküls, wie in der Abbildung 6 dargestellt [10].

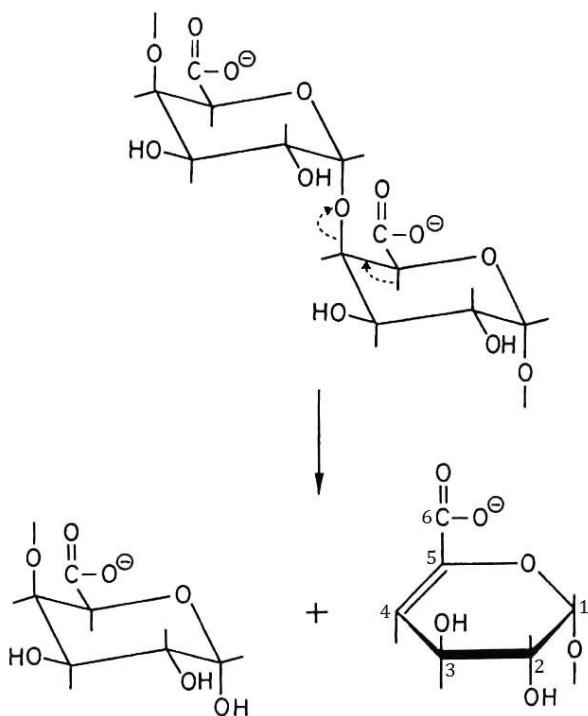


Abbildung 6: Spaltungsreaktion der Pektinlyase

Pektinlyase spaltet nur an Stellen, an denen Galacturonsäure methyliert ist [10]. Die Aktivität dieses Enzyms ist umso größer je höher der Veresterungsgrad ist [10]. Pektinlyase besitzt ein pH-Optimum bei pH 6 und ist bis zu einer Temperatur von ca. 50 °C aktiv [10]. Sie ist in der Lebensmittelindustrie selten als Einzelenzympräparat erhältlich, sondern findet eher Anwendung in Mischungen mit anderen pektolytischen Enzymen. Pektatlyase wird als Maischenzym nicht verwendet, auf Grund ihres hohen pH-Optimums, das bei pH 8 liegt [10]. Außerdem ist die Anwesenheit von Calcium-Ionen Voraussetzung für die Aktivität der Pektatlyase [10]. Diese Ionen sind bei der Pektinlyase nicht zwingend notwendig, erhöhen aber dennoch die Aktivität dieses Enzyms [10]. Derzeit ist nur „endo“-spaltende Pektinlyase bekannt [10]. Sie wurde hauptsächlich aus Pilzen der Gattungen *Neurospora*, *Botrytis*, *Penicillia* und *Aspergilli* isoliert [10].

### 3.4 Die Funktionsweise der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie ist ein leistungsfähiges Verfahren zur analytischen und präparativen Auf trennung und zur quantitativen Bestimmung von organischen und anorganischen Verbindungen [12]. Die Auf trennung eines Stoffgemisches in einzelne Komponenten erfolgt in einer Säule. In der Säule befinden sich eine mobile und eine stationäre Phase.

Die mobile Phase wird auch als Fließmittel oder Eluent bezeichnet. Es wird permanent durch die Trennsäule gepumpt und transportiert das Probengemisch unter hohem Druck hindurch [12]. Die Analyten treten dabei mit der stationären Phase in Wechselwirkungen, was zu einer Auf trennung des Probengemisches führt [12]. Notwendige Voraussetzung für den Stofftransport durch die Säule ist, dass die Probe im Fließmittel lösbar ist und die Substanzen schwerflüchtig sind.

Die Säule enthält ein Packungsmaterial aus festen, porösen Teilchen, deren Oberfläche chemisch modifiziert ist. Von dieser Grenzschicht gehen Wechselwirkungen aus, die die einzelnen Komponenten der Probe für kurze Zeit adsorbieren [12]. Nach einer gewissen Verweilzeit werden die Komponenten wieder in das Fließmittel abgegeben. Sobald die Einzelkomponenten von der stationären Phase in die mobile Phase gelangen, werden sie weiter transportiert, und der Vorgang wiederholt sich von neuem [12]. Durch unterschiedliche Wechselwirkung der einzelnen Komponenten entstehen unterschiedliche Verweilzeiten in der stationären Phase [12]. Dadurch kommt es zu einer Verzögerung. Die Wechselwirkungen der Einzelkomponenten durch die stationäre Phase muss für jede Komponente unterschiedlich sein [12]. Nur so ist eine Trennung eines Gesamtgemisches möglich. In einer chromatographischen Säule werden die einzelnen Komponenten in der Reihenfolge zunehmender Verzögerung getrennt und treten somit nach unterschiedlichen Zeiten aus der Säule wieder aus. An dieser Stelle werden sie detektiert.

Für die Bestimmung von Galacturonsäure wird die Anionenaustausch-Chromatographie (engl.: High-Performance Anion-Exchange Chromatography, HPAEC) genutzt [12]. Bei diesem Verfahren werden Ionen aus der Probe an die stationäre Phase der Säule gebunden und gegen Ionen gleicher Ladung ausgetauscht, die sich in der stationären Phase befinden.

Eine HPLC-Anlage besteht aus fünf Hauptgeräten: einer Pumpe, einer Injektionseinheit, dem Trennsäulensystem, dem Detektions- und Auswertungssystem [12]. In Abbildung 8 ist ein HPLC-Schema vereinfacht dargestellt.

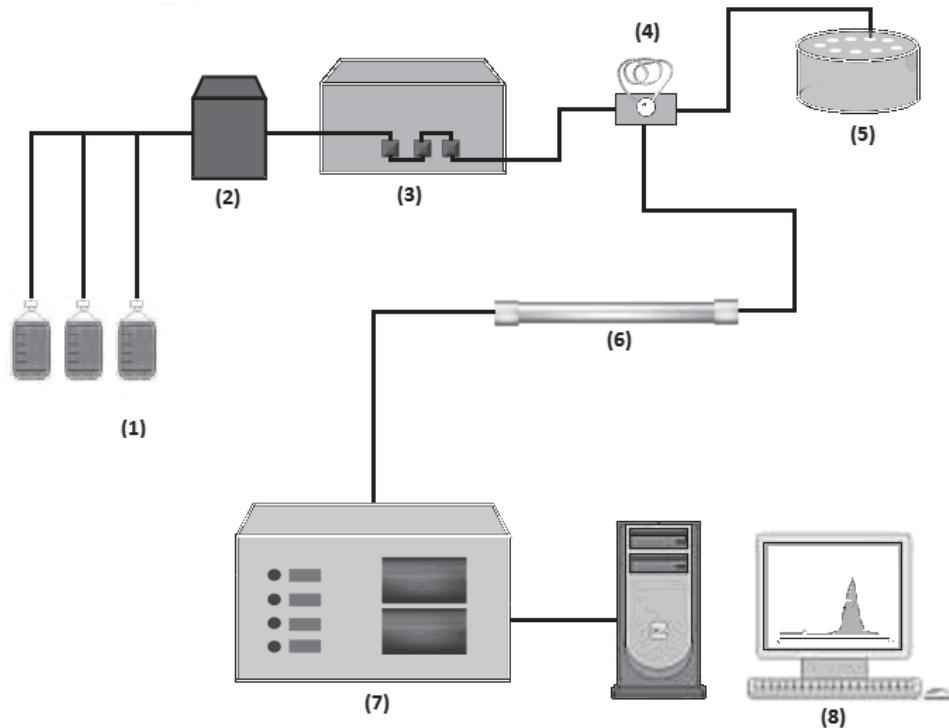


Abbildung 7: Modell einer HPLC-Anlage

Am Anfang einer HPLC-Anlage befindet sich die Versorgungseinheit mit dem Fließmittelvorrat (1), der aus einem oder mehreren Eluenten bestehen kann. Zur Auftrennung von Kohlenhydratgemischen, die Galacturonsäure enthalten, werden drei verschiedene Fließmittel eingesetzt: Reinstwasser, Natronlauge

und Natriumacetat [12]. Hinter den Eluentgefäßen ist ein Entgaser (2) geschaltet, da die Eluenten ausreichend frei von gelösten Gasen sein müssen. Gasblasen stören den gleichmäßigen Fluss der mobilen Phase und würden das Rauschen im Detektor verstärken [12]. Die Pumpe (3) saugt das Lösungsmittel aus den Vorratsgefäßen. Sie leitet es in einem konstanten Fluss über das Injektionsventil (4) durch die Trennsäule. Die Probe kann entweder manuell, mittels einer Spritze, oder automatisch, mittels Autosampler (5) in das Trennsystem eingebracht werden [12]. Der Autosampler ist ein elektronisch gesteuertes Gerät mit dem eine bestimmte Menge der Probe entnommen wird. Die Probe wird ebenfalls über das Injektionsventil injiziert. Die Säule (6) kann mit unterschiedlichen Trennmaterialien gefüllt sein [12]. Das zu trennende Stoffgemisch bestimmt das Füllmaterial. Für die Bestimmung von Galacturonsäure besteht das Trennmaterial aus Ethylvinylbenzol [18]. Um eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wird die Trennsäule bei konstanten Temperaturen betrieben [12]. Das ist entweder durch eine Klimaanlage oder, wenn höhere Temperaturen benötigt werden, einen Säulen-Ofen möglich [12]. Zusätzlich kann eine Vorsäule direkt vor die Trennsäule geschaltet werden, um deren Verschmutzung zu verringern. Die Vorsäule beinhaltet fast immer dasselbe Trennmaterial wie die Trennsäule. Die aus der Trennsäule fließende mobile Phase durchströmt den Detektor (7). Die Aufgabe des Detektors besteht darin, die getrennten Einzelkomponenten zu erkennen [12]. Die Informationen werden in Form von elektrischen Signalen an eine Auswerteeinheit (8) weitergeleitet. Es gibt konzentrations- und stoffmengenabhängige Detektoren [12]. Konzentrationsabhängige Detektoren erzeugen ein Signal, das proportional zur Konzentration der Probe im Eluat ist [12]. Stoffmengenabhängige Detektoren erzeugen ein Signal, das proportional zur Anzahl der Probenmoleküle pro Zeiteinheit im Eluat ist [12]. Anschließend werden das Fließmittel und die getrennte Probe als Abfall verworfen. Zur Bestimmung von Galacturonsäure in Fruchtsäften nutzt man die sogenannte gepulste Amperometrie (PAD). Die Detektion verläuft in drei Stufen [12]. Zunächst wird eine

positive Spannung angelegt, so wird der gesuchte Analyt an der Elektrode gesammelt [12]. In der zweiten Stufe wird ein Impuls ausgelöst, der stärker positiv ist und durch den die Reaktionsprodukte mittels Oxidation an der Elektrode gemessen werden [12]. Durch den dritten negativen Impuls werden die Oxide auf der Elektrodenoberfläche reduziert und damit wieder entfernt [13]. Zur Steuerung der Anlage und zur Auswertung der Messergebnisse wird eine spezielle HPLC-Software verwendet. Die Software zeichnet ein so genanntes Chromatogramm auf, in dem die Signale der eluierten Substanzen in Abhängigkeit ihrer Elutionszeit dargestellt werden [12]. Die Signale werden als Peaks bezeichnet. Die Peaks liefern qualitative und quantitative Informationen über die untersuchte Probe [12]. Bei der qualitativen Auswertung wird die Retentionszeit herangezogen. Das entspricht der Zeit, die eine Komponente von der Injektion bis zur Detektion benötigt [12]. Die Höhe und Fläche eines Peaks stellen die Konzentration einer einzelnen Substanz dar. Die Substanzen können durch Vergleichsinjektionen von Standards identifiziert und quantifiziert werden.

#### HPAEC-System

Saure Kohlenhydrate werden durch die Messung des elektrischen Stroms, der durch ihre Oxidation an der Oberfläche einer Goldelektrode generiert wird, detektiert. Die Produkte dieser Oxidationsreaktion lagern sich aber auf der Oberfläche der Goldelektrode ab. Aus diesem Grund muss sie zwischen einzelnen Messungen gereinigt werden. Das wird durch eine Erhöhung des Potentials erreicht, sodass die Oberfläche der Goldelektrode oxidiert wird. Dies bewirkt die Desorption der Oxidationsprodukte der Kohlenhydrate. Das Potential wird anschließend wieder gesenkt, um die Elektrodenoberfläche wieder zu Gold zu reduzieren. Die gepulste amperometrische Detektion (PAD) beinhaltet die wiederholte Abfolge von drei Potentialen. Optimale Potentiale können durch die zyklische Voltammetrie erreicht werden, die auch bei dem Detektorprogramm in dieser Arbeit angewendet wurde. Dabei wird das angelegte

Potential langsam vorwärts und rückwärts zwischen negativen und positiven Potentialgrenzen abgetastet [24]. Der Elektrode wird ausgehend von einem negativen Startpotential  $E_1$  ein sich ins positive änderndes Potential  $E_2$  angelegt. Nach dem Erreichen des Umkehrpotentials  $E_2$  wird es wiederum auf ein negatives Potential  $E_3$  zurückgeführt. Der Potentialbereich wird so gewählt, dass einzig die zu bestimmenden Substanzen einer Oxidation unterliegen und der fließende Strom gemessen werden kann. Die elektroaktiven Oligosaccharide werden dann an der Goldelektrode elektrochemisch umgesetzt und ändern ihren Ladungszustand ins anionische. Der resultierende Strom wird auf der y-Achse mit dem Oxidationsstrom nach oben und dem Reduktionsstrom nach unten in einem Chromatogramm aufgetragen. Einige Probenbestandteile sind ebenfalls oxidierbar, sie stören aber dabei nicht die Analyse der sauren Kohlenhydrate, da sie über die Chromatographiesäure abgetrennt werden.

## 4 Material und Methoden

Die Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Pektinlösungen, Stamm- bzw. Standardlösungen sowie die Durchführung der Aktivitätstests werden im Anhang erläutert.

### 4.1 Aktivitätsbestimmungen drei pektolytischer Enzyme

Die Enzymaktivität ist ein Maß für die Wirksamkeit eines Enzyms. Diese Wirksamkeit wird darüber definiert, wie viel Substrat in einem bestimmten Zeitraum umgesetzt wird.

#### 4.1.1 Material

Der selbst gepresste Saft wird aus Orangen der Sorte Valencia Late hergestellt. Die Orangen werden mit einer geeigneten Presse entsaftet und in einer Weithalsflasche bei 4 °C gelagert. Die Weithalsflasche und die Saftpresse werden zuvor mit 70 %igem Ethanol gespült, um die mikrobielle Belastung möglichst gering zu halten.

Der Orangenfrischsaft wird aus dem Handel von Kaisers und dem Bioladen Bio Company bezogen. Er wird ebenfalls bei 4 °C gelagert.

#### 4.1.2 Bestimmung der Pektinmethylesterase-Aktivität nach Kimball

[14]

Die Bestimmung der Pektinmethylesterase erfolgt indirekt durch den Nachweis von Carboxylgruppen, die das Enzym aus dem Saft in einer zugesetzten Pektinlösung freisetzt. Durch die entstehende freie Säurefunktion des Pektins wird der pH-Wert der Substrat/Enzym-Probe gesenkt. Die Probe wird mit Natriumhydroxid auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt. Es wird die Zeit

gemessen, die verstreckt, um eine definierte Menge 0,05 M Natriumhydroxid zu neutralisieren. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 9 dargestellt.

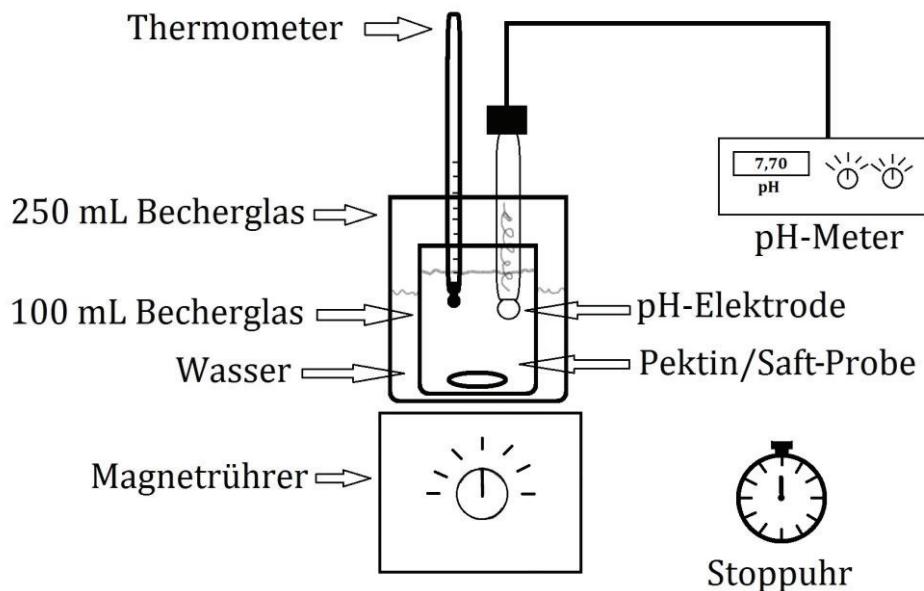


Abbildung 8: Modell zum Versuchsaufbau der Pektinmethylesterase-Bestimmung

Für die Untersuchung der Orangensaftes auf dieses Enzym wird Citruspektin als Substrat verwendet. Das Pektin besaß einen Veresterungsgrad von 8,2 %. Das Substrat wird in entionisiertem Wasser mit einer Salzkonzentration von 1,53 % gelöst. Der pH-Wert der Substratlösung wird mit 0,05 M und 2,0 M Natriumhydroxid auf 5,70 eingestellt. Für diese Untersuchung wird kein Puffer als Lösungsmittel für das Pektin verwendet, da der Nachweis dieses Enzyms auf einer pH-Wert-Änderung beruht. Die Bestimmung erfolgt außerdem bei pH 7,70, der außerhalb der eigenen Puffersysteme des Saftes liegt. Die Temperatur liegt während der Untersuchungen bei 30 °C. Von jeder Probe wird eine 3-fach Bestimmung durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

#### 4.1.3 Bestimmung der Endo-Polygalacturonase-Aktivität

Dieses Enzym spaltet die glycosidische Bindung zwischen zwei Galacturonsäure-Molekülen innerhalb einer Pektinkette. Auf Grund dieser Wirkung depolymerisiert es Pektinmoleküle und senkt die Viskosität einer Pektin enthaltenden Flüssigkeit. Die Änderung der Viskosität ist ein Maß für die Aktivität der Endo-Polygalacturonase und kann mit einem Kapillarviskosimeter gemessen werden [15]. Die Bestimmung der Viskosität erfolgt dabei über die Messung der Zeit, die das genau vorgegebene Probenvolumen zum Durchfließen einer definiert dimensionierten Kapillare benötigt. Diese Zeit wird von einem Steuergerät über zwei Lichtschranken gestoppt [15]. Ein solches Viskosimeter stand während des Untersuchungszeitraumes für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung mit einer 1 ml Messpipette durchgeführt. Das Probenvolumen beträgt dabei genau 1 ml und die Zeit, die die Probe benötigt, um aus der Pipette zu fließen, wird manuell gestoppt. Die Pipette wird dafür an einem Stativ befestigt und die zu untersuchende Substrat/Enzym-Lösung mit einem Howorka-Ball aufgezogen. Auf Grund des größeren Durchmessers wird statt einer 0,4 %igen eine 2 %ige Citruspektin-Lösung hergestellt. Das Pektin wird in einem Citrat-Phosphat-Puffer gelöst, um ausschließlich die Aktivität der Endo-Polygalacturonase zu messen, da Untersuchungen gezeigt haben, dass Citrat die Wirkung der Exo-Polygalacturonase hemmt, die nach längerer Einwirkungszeit ebenfalls eine Viskositätsenkung hervorrufen würde [15].

Nach jeder Messung wird die Pipette zuerst gründlich mit entionisiertem Wasser gespült, anschließend dreimal mit 0,1 M Natronlauge gereinigt und nach einer weiteren Wasserspülung mit Aceton getrocknet.

Der Blindwert wird mittels der Pektinlösung und entionisiertem Wasser anstelle des Saftes ermittelt.

#### 4.1.4 Bestimmung der Pektinlyase-Aktivität

Durch den Abbau der Pektinlyase entstehen an den Spaltungstellen Doppelbindungen in den Galacturonsäure-Molekülen. Diese Doppelbindungen besitzen die Eigenschaft, UV-Licht bei einer Wellenlänge von 235 nm zu absorbieren. Aus diesem Grund wird die Aktivität der Pektinlyase spektralphotometrisch bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für Pektin bei 235 nm ist  $\varepsilon_{235} = 5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16]. Die Untersuchung wird mit einem Spektralphotometer von Hach Laye durchgeführt.

Als Substrat wird statt Citruspektin das Natriumsalz der Poly-Galacturonsäure in einem Acetat-Puffer verwendet. Eine Lösung aus Citruspektin besitzt eine enorme Trübung und ist damit für die Messungen mittels Photometer ungeeignet. Die Substratlösung mit dem Natriumsalz ist zunächst auch trüb, durch das Abnutschen über eine G3-Fritte entsteht dann eine klare Flüssigkeit.

Die Anzahl der Doppelbindungen sollte am Anfang des Abbauprozesses linear ansteigen. Unter Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes kann das Enzym quantifiziert werden. Da die Reaktion in einer Küvette gemessen wird, sind die Probenvolumina dementsprechend klein.

## 4.2 Analytik der Galacturonsäureprofile mittels HPLC

### 4.2.1 Enzyme und Substrat

Für den enzymatischen Abbau des Pektins wurden fünf verschiedene Handelsenzympräparate von der Firma Erbslöh verwendet. Eine Übersicht wird in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der Enzympräparate, die für die Abbaupläne eingesetzt wurden

Hersteller	Erbslöh		
Handelsname	CAS-Nr.	Formulierung	Aktivität
Fructozym PRESS	9032-75-1	flüssig	Pektinasen <sup>6</sup>
Fructozym P-6L	9032-75-1	flüssig	Pektinasen
Citrolase TF CLEAR	9032-75-1	flüssig	Pektinasen
Fructozym COLOR	9032-75-1	flüssig	Pektinasen
Fructozym P-LG	9032-75-1	flüssig	Pektinasen

Bei der Enzymierung des Pektins geht es um Enzympräparate, die eine pektolytisch ausgerichtete Hauptaktivität besitzen. Die Nebenaktivitäten sind dabei von geringerer Bedeutung. Die Präparate der Firma Erbslöh werden als Maischeenzyme eingesetzt. Aus diesem Grund werden sie für die vorliegende Arbeit herangezogen, um herauszufinden, welche Abbauprodukte von Pektin entstehen und so eine Maischeenzymierung nachweisbar ist.

Für die enzymatischen Abbaupläne wird Citruspektin mit einem Verestungsgrad von 8,2 % von Sigma-Aldrich in Pulverform eingesetzt.

### 4.2.2 Enzymatische Abbaupläne des Pektins

Für die Abbaupläne werden 500 ml einer 1 %igen Lösung (w/v) des Citruspektins hergestellt. Mittels eines beheizbaren Magnetrührers wird Reinstwasser auf 60 °C erhitzt und darin 5 g Pektin gelöst.

<sup>6</sup> Enzyme, die Pektinsäure und andere Galacturonane spalten, werden unter dem Begriff „Pektinasen“ zusammengefasst [7].

Insgesamt stehen 5 Enzympräparate zur Verfügung. Von jedem Präparat wird eine 10 %ige Lösung (v/v) hergestellt und zu jeweils 50 ml Substratlösung in unterschiedlichen Mengen gegeben. Die Dosage der Enzyme richtet sich nach den Angaben der Hersteller auf den Datenblättern und wird in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 2: Übersicht der Dosagen der fünf Enzympräparate

Hersteller/Präparat	Dosage pro ml*	Dosage pro 50 ml
<b>Erbslöh</b>		
Fructozym PRESS	0,75 µl	37,5 µl
Fructozym P6-L	0,3 µl	15 µl
Citrolase TF Clear	0,5 µl	25 µl
Fructozym COLOR	1,5 µl	75 µl
Fructozym P-LG	0,3 µl	15 µl

\* laut Hersteller

Die Ansätze werden in 100 mL Weithalsflaschen gefüllt, verschlossen und vorsichtig umgeschwenkt. Zur Inkubation werden die Flaschen in einen auf 30 °C temperierten Trockenschrank gestellt. Aus jeder Flasche werden jeweils 10 ml Probe nach 300, 120, 300 und 900 Minuten entnommen. Unmittelbar nach der Probenentnahme werden die Enzyme durch Erhitzen in der Mikrowelle (800 W, 30 sec) inaktiviert. 10 mL Substratlösung dienen als Blindwert ohne Enzymzusatz, die in gleicher Weise wie die anderen Proben behandelt werden. Die Proben werden dann ohne weitere Vorbehandlung mittels HPAEC auf ihren Gehalt an Mono-, Di-, Tri- und Oligo-Galacturonsäure untersucht.

### 4.2.3 Bestimmung des Galacturonsäureprofils

Der Einsatz der HPLC bei der Analytik von Pflanzensacchariden wurden von Patz et al. (1993) und Patz (1994) eingehend erforscht [3]. Von diesen Autoren wurden verschiedene Methoden zur Polysaccharidanalytik mittels HPLC und gepulstem elektrochemischen Detektor entwickelt und optimiert [3].

Die nachfolgend beschriebene Methode zur Bestimmung von Mono-, Di-, Tri- und Oligo-Galacturonsäure in Fruchtsäften basiert auf einem Prüfverfahren der Internationalen Fruchtsaftunion [36] und der Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung. Die in der Probenlösung enthaltene Galacturonsäure wird nach eventueller Verdünnung und ionenchromatographischer Trennung mit gepulster amperometrischer Detektion nachgewiesen.

#### HPAEC-System

Dionex-Komponentenanlage

Gradientenpumpe ICS 3000

Autosampler AS 50

Externs Säulenschaltventil von Rheodyne

PAD-Detektor ED 40 mit Goldelektrode

Trennsäulen: 2x Carbopac PA-100 (4x250 mm) mit Vorsäule Carbopac PA-100 (4x50 mm)

Säulentemperatur: Raumtemperatur (20 °C)

Eluenten: Reinstwasser, 1 N Natriumhydroxid, 0,5 N Natriumacetat

Injektionsvolumen: 25 µl

Flussrate: 0,7 ml/min

Eluentprogramm:

t [min]	B [%]	C [%]
0,0	10	0
1,0	10	0
36,0	10	10
55,0	10	41,8
61,0	15	65
65,0	35	65
70,0	50	15
86,0	50	15
91,0	85	15
93,0	50	0
93,1	10	0
105	10	0

Detektorprogramm:

t [sec]	U [V]
	mit Ag/AgCl-Referenzelektrode
0,00	0,10
0,40	0,10
0,41	-2,00
0,42	-2,00
0,43	0,60
0,44	-0,10
0,50	-0,10

Integrationsfenster von 0,20 – 0,40 sec

### Datenerfassung/-auswertung

Datenerfassung mit Dionex Chromeleon Chromatographie-Datensystem Version 6.8, Peakzuordnung und Quantifizierung mit externem Standard über eine Einpunktkalibrierung

### Herstellung der Fließmittel

Für einen störungsfreien Betrieb der Ionenchromatographie ist die Verwendung kohlendioxidfreier Fließmittel von entscheidender Bedeutung. Deshalb muss besondere Sorgfalt auf die Herstellung der Eluenten gelegt werden. Diese werden wöchentlich frisch angesetzt.

Für die Herstellung des entsprechenden Eluenten benötigt man:

Tabelle 3: Angaben für die Herstellung der Eluenten

Eluent		Reinstwasser (entgast)
<b>A</b> Wasser	-	5000 ml [g]
<b>B</b> 1 N Natriumhydroxid	50 %ige Natronlauge 104 ml	2000 ml [g]
<b>C</b> 0,5 N Natriumacetat	Natriumacetat ( $\geq 99\%$ ) 82,0 g	2000 ml [g]

Zunächst wird das Reinstwasser durch Durchleiten von Helium für 15 Minuten entgast. Helium besitzt eine geringe Löslichkeit und entfernt freie Gase wie Kohlenstofftrioxid und Sauerstoff aus den Eluenten. Das Entgasen der Eluenten verhindert die Bildung von Gasblasen in der mobilen Phase im HPAEC-System. Gasblasen stören den gleichmäßigen Fluss der Eluenten, verstärken das Rauschen im Detektor oder erzeugen Geisterpeaks. Die Zugabe der 50 %igen Natronlauge muss sehr schnell erfolgen, um die Bildung von Carbonat aus dem Kohlenstoffdioxid in der Luft auszuschließen. Carbonat führt zu einer verminderten Auflösung.

Für die Herstellung des externen Standards werden die entsprechenden Uronsäuren (Mono-, Di- und Tri-Galacturonsäure) in einer Konzentration von 20 bis 40 mg/l in wässriger Lösung angesetzt. Zuvor wird von jeder Substanz eine Stammlösung hergestellt und im Ultraschallbad gelöst. Diese wird dann auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Stammlösung kann tiefgefroren mehrere Monate aufbewahrt werden. Vor Beginn der Probeninjektion

wird die Anlage durch mehrmaliges Einspritzen der Standardlösung konditioniert und auf konstante Retentionszeiten und Signalstärken überprüft.

In Abbildung 12 ist das Chromatogramm eines Mono-, Di- und Tri-Galacturonsäure-Standards in einer Carbopac PA-100-Säule wiedergegeben.

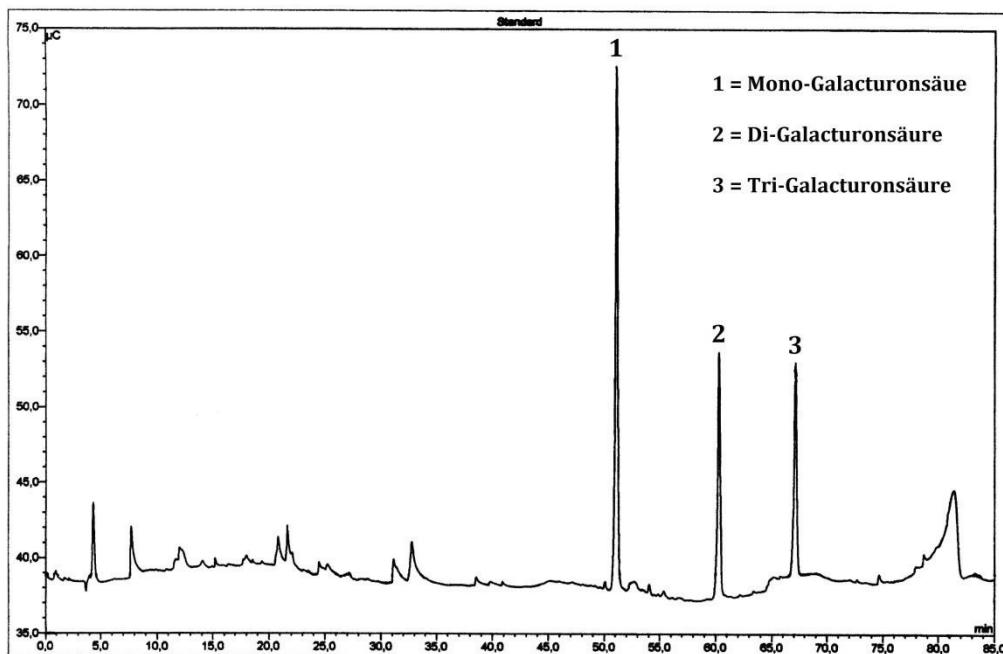


Abbildung 9: Chromatogramm eines Standards in einer Carbopac PA 100-Säule mit PAD-Detektion

Retentionszeiten:

Mono-Galacturonsäure	~ 50,0 min
Di-Galacturonsäure	~ 59,4 min
Tri-Galacturonsäure	~ 65,9 min

Die Konzentrationen der Uronsäuren im Standard sind:

Mono-Galacturonsäure	21,8 mg/l
Di-Galacturonsäure	36,5 mg/l
Tri-Galacturonsäure	26,8 mg/l

### 4.3 Statistische Auswertungen der Messergebnisse

#### Mittelwert

Der Mittelwert beschreibt den statistischen Durchschnittswert einer Messreihe. Für diesen Wert werden alle Werte eines Datensatzes addiert und die Summe durch die Anzahl aller Werte geteilt [37]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

#### Standardabweichung

Die Standardabweichung gibt an, wie weit die Einzelwerte einer Verteilung vom Mittelwert abweichen. Im Bereich der einfachen Standardabweichung um den Mittelwert befinden sich bei einer Normalverteilung etwa 68 % aller Messwerte [37].

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

#### Berechnung der Konzentrationen der Oligomere

Bei der HPAEC berechnet ein Software-Programm die Konzentrationen der Oligo-Galacturonsäuren in der Probe über die Peakflächen im Chromatogramm [12]. Die Peakflächen sind proportional zu den Konzentrationen der Oligomere [12].

$$c_P = \frac{A_P \cdot c_{STD} \cdot VF_P}{A_{STD}}$$

$c_P$  Konzentration des Analyten [mg/l]

$A_P$  Peakfläche des Analyten

$c_{STD}$  Konzentration des Standards [mg/l]

$A_{STD}$  Peakfläche des Standards

$VF_P$  Verdünnungsfaktor des Analyten

## 5 Ergebnisse

In diesem Kapitel der Arbeit werden die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen und der HPAEC-Untersuchungen in Abbildungen und Diagrammen veranschaulicht. Die vollständigen Messergebnisse befinden sich im Anhang.

### 5.1 Nachweise der pektolytischen Enzyme

#### 5.1.1 Bestimmung der Pektinmethylesterase-Aktivität nach Kimball

[14]

Das Prinzip der Pektinmethylesterase-Bestimmung beruht auf der Freisetzung entesterter Carboxylgruppen in einer zugesetzten Pektinlösung durch das Enzym [14]. Die entstandenen Säuregruppen verursachen eine Absenkung des pH-Wertes der Saft/Pektin-Probe [14]. Die Dauer der Absenkung wird manuell gemessen und in die Aktivität des Enzyms umgerechnet [14].

##### 5.1.1.1 Vorversuche

Dieser Aktivitätstest wurde zuerst mit einem selbst gepressten Orangensaft und einem Orangenfrischsaft auf seine Funktionalität geprüft. Die Ergebnisse beider Untersuchungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

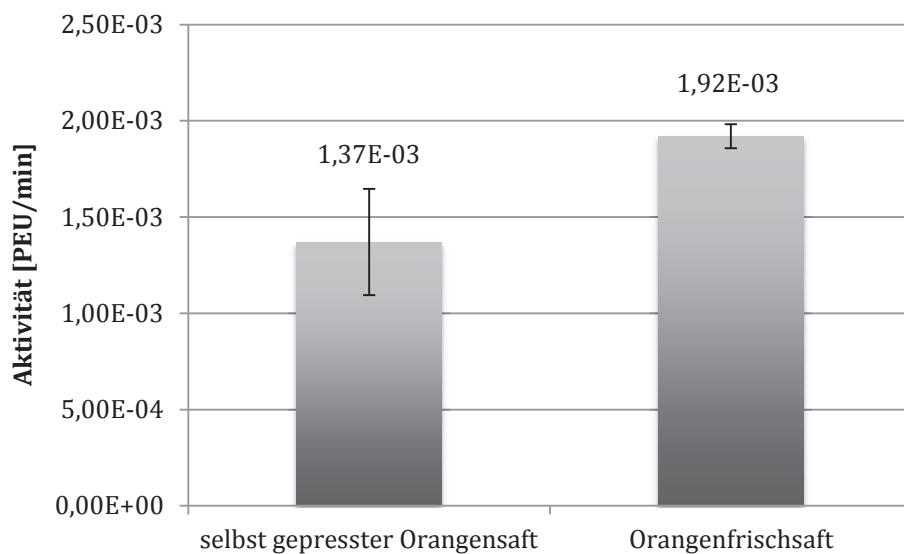


Abbildung 10: Aktivitätsbestimmungen der PME in selbst gepresstem Orangensaft und Orangenfrischsaft; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Die gemessene Aktivität im selbst gepressten Orangensaft beträgt  $1,37 \cdot 10^{-3}$  PEU/min (engl.: PEU, pectin esterase units) und ist kleiner als die Aktivität im Orangenfrischsaft von  $1,92 \cdot 10^{-3}$  PEU/min. Die Zeitmessung ergab bei dem selbst gepressten Saft einen Wert von durchschnittlich 0,38 Minuten und bei dem Orangenfrischsaft einen Mittelwert von 0,26 Minuten. Die höhere Aktivität im Orangenfrischsaft könnte durch den fortgeschrittenen Reifegrad der verarbeiteten Orangen oder durch eine andere Sortenwahl für den Saft zu erklären sein. Diese zwei Vorversuche bestätigen die Funktionalität der Bestimmung nach Kimball.

### 5.1.1.2 Kalibrierungsversuche mit Handelsenzympräparat

Mit Hilfe des Handelsenzympräparat *Rohapect MA Plus HC* von AB Enzymes wurde versucht, eine Kalibrierkurve für die Bestimmung der Pektinmethylesterase zu erstellen. Das Präparat enthält laut den Spezifikationen des Herstellers ausschließlich Pektinesterase und Polygalacturonase. Das Präparat besaß eine Gesamtaktivität von  $172.500.000$  PGU · ml<sup>-1</sup> (engl.: PGU, polygalacturonase).

se units). Laut Hersteller sollen zur Maischebehandlung 25-100 mg der Enzymlösung auf 1 Liter Saft gemischt werden. Dies entspricht einer Aktivität von 43.130 – 172.500 PGU/10 ml. Es wurde mit entionisiertem Wasser auf 1.000.000, 100.000, 1000, 100 und 10 PGU/10 ml verdünnt. Die Zeitmessungen dieser fünf Verdünnungen sind in Abbildung 11 veranschaulicht.

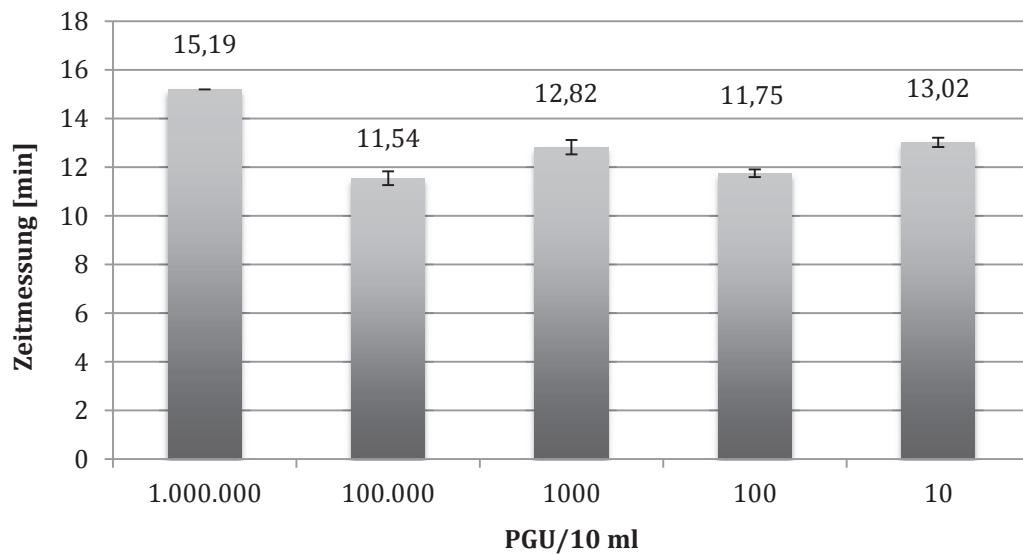


Abbildung 11: Zeitmessungen von fünf Verdünnungen des Handelspräparates; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

In dieser Abbildung werden die Zeitmessungen der einzelnen Verdünnungen und nicht die Aktivitäten dargestellt. Damit soll präzisiert werden, dass die Zeitmessung der Neutralisation von Natriumhydroxid durch die Wirkung der Pektinmethylsterase auf keinen Fall 11,54 bis 15,19 Minuten dauert. Im Vergleich dazu lagen die Zeitmessungen beim selbst gepressten Orangensaft nur bei 0,38 Minuten und beim gekauften Orangenfrischsaft nur bei 0,26 Minuten. Dieser erste Versuch lässt darauf schließen, dass das Präparat zur Erstellung einer Kalibrierkurve ungeeignet ist. Um diese Vermutung revidieren zu können, wurden weitere Versuche mit diesem Präparat durchgeführt.

### Letzter Verdünnungsschritt in Saft aus Orangensaftkonzentrat

Die Verdünnungen im vorherigen Versuch erfolgten ausschließlich in entionisiertes Wasser. Da das Präparat *Rohapect MA Plus HC* sonst in Fruchtmaischen zum Einsatz kommt, wäre es möglich, dass die Pektinesterase in den Maischen einen Kofaktor<sup>7</sup> zur Verfügung hat, der sich in entionisiertem Wasser nicht befindet. Aus diesem Grund erfolgte der letzte Verdünnungsschritt des Präparates einer 10.000 und 10 PGU/10 ml Verdünnung in einem Saft aus Orangensaftkonzentrat. Dieser Saft könnte den benötigten Kofaktor bereitstellen.

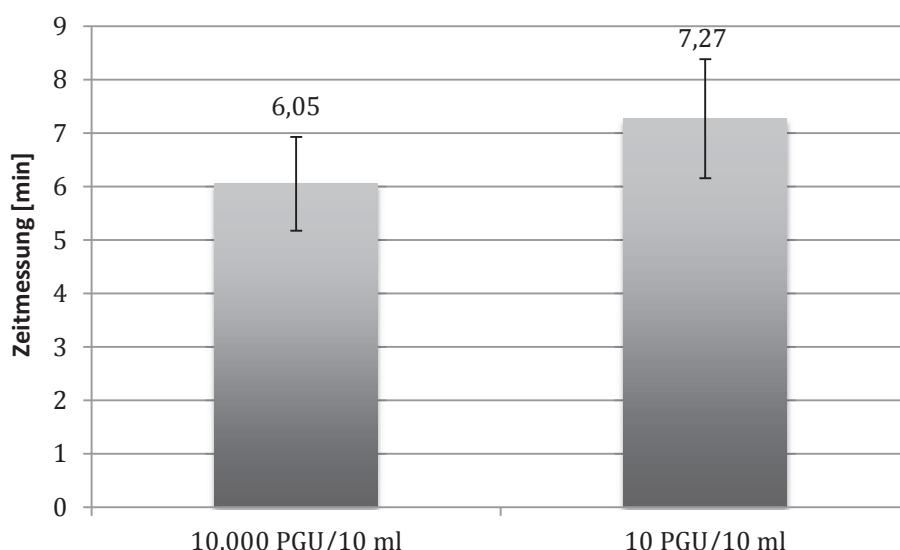


Abbildung 12: Zeitmessungen von zwei Verdünnungen des Handelspräparates mit letztem Verdünnungsschritt im Saft, Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Bei den Verdünnungen von 10.000 und 10 PGU pro 10 ml haben sich die Zeitmessungen zwar deutlich verringert (s. Abb. 12), sind aber im Vergleich zu den beiden Orangensaften in Kap. 5.1.1.1 noch immer viel zu hoch. Diese Tatsache deutet stark darauf hin, dass die gemessene pH-Wert-Absenkung nicht ausschließlich auf eine Enzymaktivität zurückgeführt werden kann. Es scheint ein weiterer Einflussfaktor beteiligt zu sein.

<sup>7</sup> Das Wort Kofaktor bildet einen Überbegriff für verschiedene Moleküle und Molekülgruppen, die für die Funktion von bestimmten Enzymen unerlässlich sind [27].

### 5.1.1.3 Beweise der chemischen Entesterung

Die Messergebnisse der Präparatversuche könnten auf eine chemische Entesterung des Pektins hinweisen. Im Vergleich zu den Zeitmessungen der Orangensaft, die zwischen 0,26 und 0,38 Minuten dauerten, erstreckten sich die Messungen mit dem Präparat *Rohapect MA Plus HC* zwischen 6,05 und 15,19 Minuten.

Die Bestimmung der Aktivität wird bei einem pH-Wert von 7,70 durchgeführt. Durch die Zugabe von 100  $\mu$ l Natriumhydroxid (0,05 M) wird der pH-Wert der Analysenlösung nochmals auf ca. 7,82 erhöht. Laut MEURER [15] beginnt bei pH-Werten über 7,50 die chemische Entesterung des Substrates. Das bedeutet, dass nicht nur die Pektinmethylsterase zu einer Entesterung des Pektins führt, sondern auch ein basischer pH-Wert oberhalb von 7,50. Es liegt also die Vermutung nahe, dass anstelle einer Enzymaktivität lediglich die chemische Entesterung gemessen wurde.

#### Einstellung des pH-Wertes der Pektinlösung

Durch die gewonnenen Erkenntnisse wurde die Pektinlösung ab diesem Zeitpunkt nicht mehr auf einen pH-Wert von 7,70, sondern auf 5,70 eingestellt, um der chemischen Entesterung des Pektins vorab schon entgegenzuwirken.

#### Versuchsdurchführung mit entionisiertem Wasser

Um einen Beweis für die chemische Entesterung zu erlangen, wurden statt Orangensaft bzw. Enzymlösung 10 ml entionisiertes Wasser zu den 40 ml Pektinlösung gegeben und der Test durchgeführt. Das Ergebnis der Bestimmung ist in Abbildung 13 dargestellt.

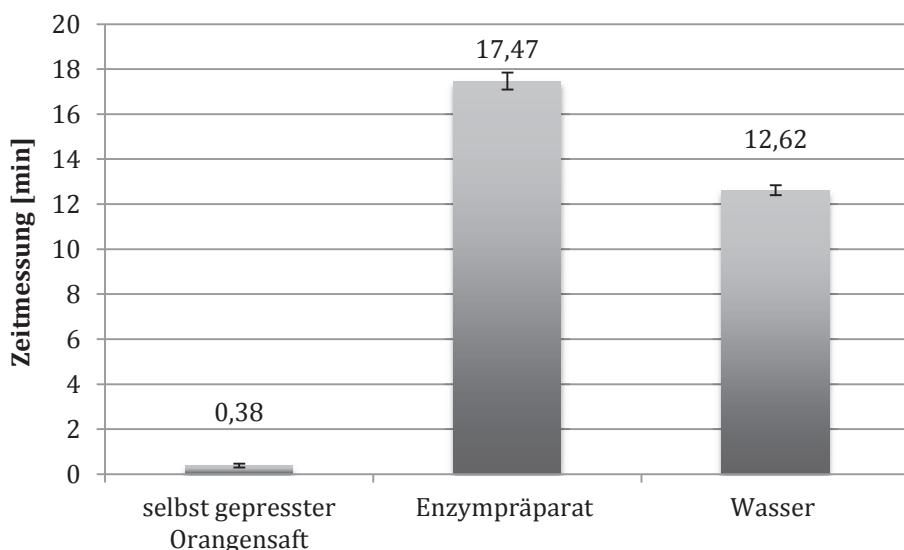


Abbildung 13: Zeitmessungen in selbst gepresstem Orangensaft, Enzympräparat und Wasser im Vergleich; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Nach Zusammenmischen von Pektinlösung und entionisiertem Wasser lag der pH-Wert bei allen drei Messungen bei 5,35. Der pH-Wert bei Mischungen aus Orangensaft und Pektinlösung liegt im Durchschnitt bei 3,7.

Um den pH-Wert auf 7,70 einzustellen, wurde mit 2 M und 0,05 M Natronlauge gearbeitet. In dem Versuch ohne Enzyme wurden für die Einstellung 12 Tropfen 0,05 M Natronlauge mittels Pasteurpipette hinzugegeben. Im Vergleich dazu bedurfte es bei den Orangensaften zusätzlich zwischen 15 und 20 Tropfen 2 M Natronlauge. Das ist durch die Pufferwirkung der verschiedenen organischen Säuren im Saft zu erklären.

Der pH-Wert stieg nach Einstellung der Analysenlösung auf pH 7,70 und nach Zugabe von 100 µl Natriumhydroxid auf ein Mittel von pH 8,71 an. Im Versuch mit den Orangensaften überstieg der pH-Wert niemals einen Wert von 7,79.

Die in Abbildung 13 dargestellten Zeitmessungen von selbst gepresstem Orangensaft, Enzympräparat und entionisiertem Wasser zeigen vergleichend die schnelle pH-absenkende Wirkung der Pektinmethyllesterase im Orangensaft. Dahingegen ist die deutlich langsamere pH-absenkende Wirkung der

chemischen Entesterung bei den Versuchen mit Enzympräparat und entionisiertem Wasser ersichtlich.

Die Tatsache, dass eine Zeitmessung mit entionisiertem Wasser möglich war, beweist die chemische Entesterung des Pektins ab einem pH-Wert von 7,50.

#### **5.1.1.4 Aktivitätsbestimmungen in selbst gepressten Orangensaften und Orangenfrischsäften**

##### Lagerversuch mit selbst gepresstem Orangensaft der Sorte *Valencia*

Es wurde ein Lagertest mit selbst gepresstem Orangensaft der Sorte *Valencia* durchgeführt, um einen Einblick zu erhalten, wie sich die Aktivität der Pektinmethyllesterase innerhalb der Lagerung verändert. Dazu wurde der gepresste Saft in einer Weithalsflasche, die zuvor mit 70 %igem Ethanol gespült wurde, für 21 Tage bei 4 °C gelagert. Der Zeitraum wurde so ausgewählt, weil das Amt für Zitrusfrüchte in Florida die Haltbarkeitsspanne für frisch gepressten, nicht pasteurisierten Orangensaft auf 17 Tage berechnet hat [33].

An Tag 0 (unmittelbar nach der Pressung), 2, 5, 8, 12, 16 und 21 wurde die Aktivität der Pektinmethyllesterase im Saft gemessen. Die Messergebnisse der Aktivitätsbestimmungen sind in Abbildung 14 dargestellt.

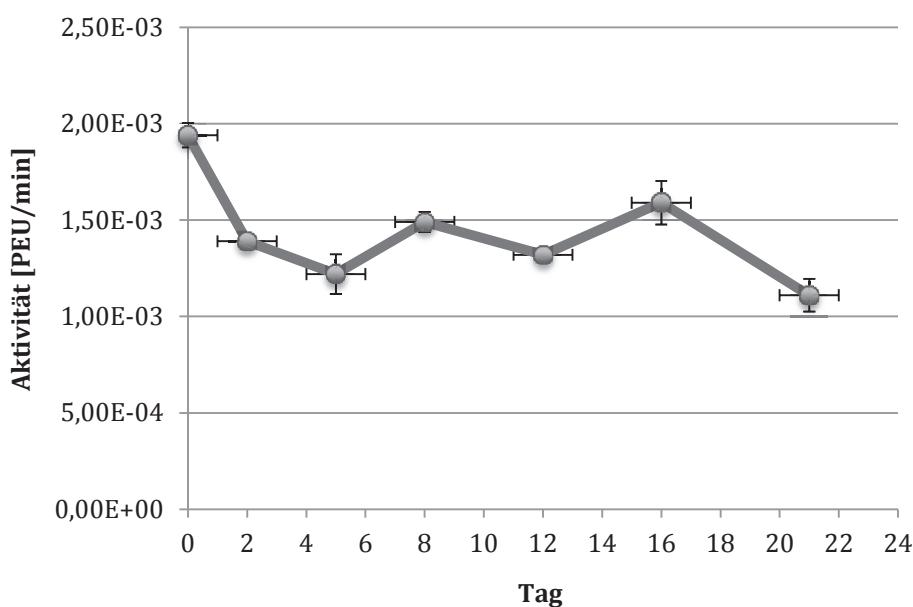


Abbildung 14: Aktivitätsveränderungen der Pektinmethyl esterase in selbst gepresstem Orangensaft innerhalb von 21 Tagen; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Die gemessene Aktivität ist unmittelbar nach der Entsaftung am höchsten und nimmt anschließend geringfügig ab. Bis Tag 21 bleibt die Aktivität nahezu konstant. Die Schwankungen der Messwerte sind auf manuelle Messunsicherheiten zurückzuführen.

Während der Lagerung konnte eine zunehmende Phasentrennung des selbst gepressten Saftes beobachtet werden. Dies ist auf die Abspaltung der Methylreste aus dem Pektinmolekül und damit dem Ausfallen des Pektins zurückzuführen.

#### Vergleich von gelagertem selbst gepresstem Orangensaft und gelagerter Orange

Der selbst gepresste Orangensaft wurde 21 Tage bei 4 °C gelagert. Parallel dazu wurde eine ganze Orange der Sorte *Valencia* 21 Tage bei Raumtemperatur zwischen 20 und 22 °C aufbewahrt und unmittelbar vor der Messung entsaftet. Alle Orangen wurden am selben Tag gekauft.

In Abbildung 15 werden die Aktivitäten der Pektinmethyl esterase in dem gepressten Saft an Tag 0 und 21 sowie in der gelagerten Orange an Tag 21 veranschaulicht.

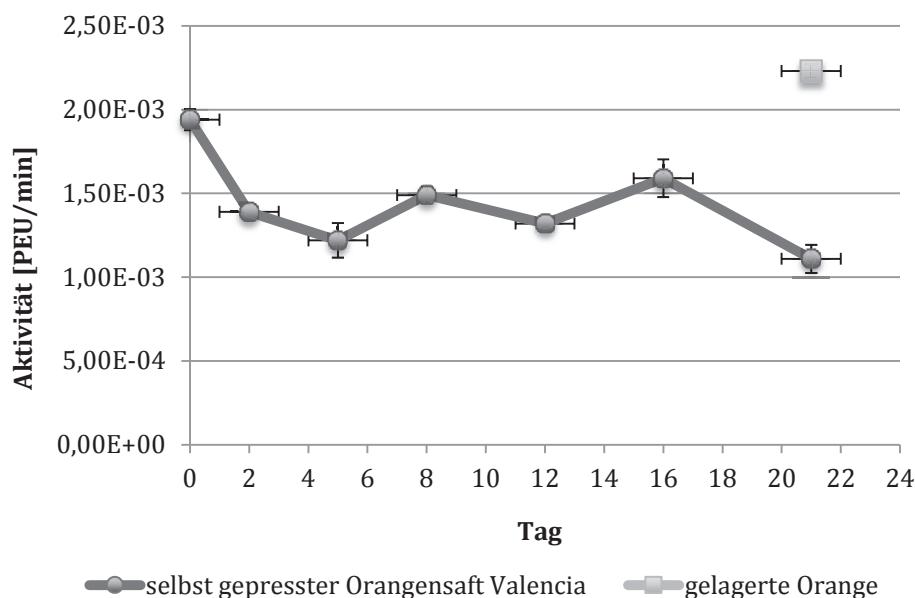


Abbildung 15: Vergleich der Aktivitäten von gelagertem gepresstem Orangensaft und einer gelagerten Orange; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Nach 21 Tagen blieb die Aktivität des Enzyms im gelagerten Orangensaft nahezu konstant. Die Aktivität in der als Frucht gelagerten Orange zeigte nach 21 Tagen Lagerung mit  $2,23 \cdot 10^{-3}$  PEU/min praktisch denselben Wert wie die Anfangsaktivität im gepressten Saft (s. helles Quadrat in Abbildung 15).

#### Lagerversuch eines Orangenfrischsaftes

Um auch in einem Frischsaft die Veränderungen der Aktivität der Pektinmethyl esterase nachvollziehen zu können, wurde ein Orangenfrischsaft von Kaisers über 8 Tage bei 4 °C gelagert. Die Lagerung erstreckte sich über 8 Tage, weil zum Ende der 8 Tage das Mindesthaltbarkeitsdatum des Frischsaftes erreicht war. Für die Aktivitätsmessung wurde eine Flasche an Tag 0 geöffnet und bis zum Tag 8 jeweils eine Probe von ca. 50 ml entnommen. Jede Probe

wurde unmittelbar vor der 3-fach Messung durch ein Sieb gegossen, um das Orangenfruchtfleisch zu entfernen. Die Aktivitätskurve ist in Abbildung 16 dargestellt.

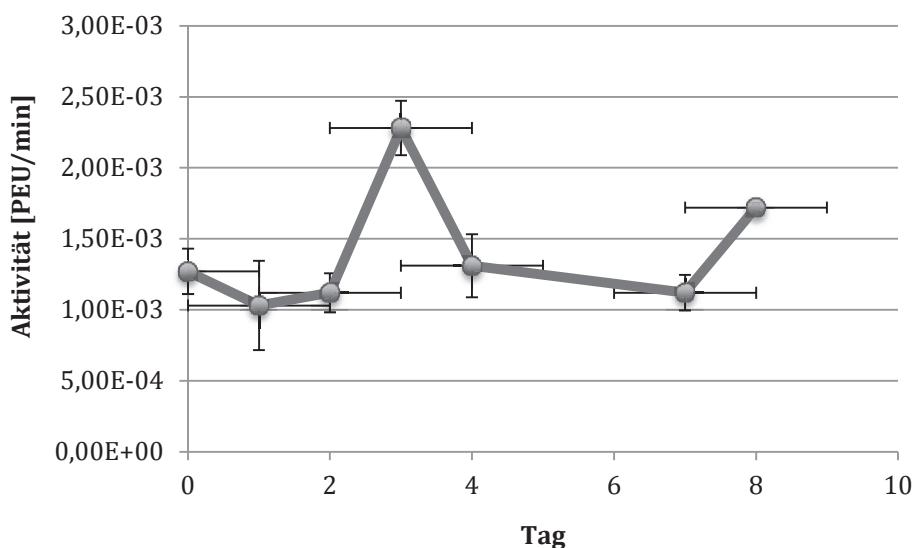


Abbildung 16: Aktivitätsveränderungen der Pektinmethyl esterase in Orangenfrischsaft innerhalb von 8 Tagen; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

In der Abbildung unterliegt die Aktivität des Enzyms einigen Schwankungen, die jedoch wahrscheinlich auf Messunsicherheiten zurückzuführen sind. Daraus kann auch beim Orangenfrischsaft die Aktivität als konstant betrachtet werden.

#### Chemische Entesterung in pasteurisierten Orangensaften

In pasteurisierten Orangendirektsäften sowie in Orangensaften aus Konzentrat ist die Aktivität aller fruchteigenen Enzyme durch die Erhitzung des Saftes nicht mehr vorhanden. Diese Tatsache wurde mit einem Direktsaft von Lidl und einem Saft aus Konzentrat von Kaisers überprüft. Die Zeitmessung bei dem Direktsaft betrug 15,92 Minuten und bei dem Saft aus Konzentrat 13,52 Minuten. Da diese Messungen der Zeit der chemischen Entesterung des

eingesetzten Pektins entsprechen, kann davon ausgegangen werden, dass alle Enzyme bei der Pasteurisation inaktiviert wurden.

Da Lagersuche zeigten, dass die Aktivität der Pektinmethylsterase innerhalb der üblichen Haltbarkeit von Frischsäften keiner maßgeblichen Veränderung unterliegen, könnte eventuell eine Zumischung von pasteurisiertem Orangensaft aus Kostengründen über diese Enzymaktivität detektierbar sein. Dies wird in Versuchen mit Mischungen aus selbst gepresstem und pasteurisiertem Direktsaft geprüft.

#### Aktivitätsbestimmungen in Mischungen aus selbst gepresstem Orangensaft und pasteurisiertem Direktsaft

Die Herstellung eines Frischsaftes verlangt von einem Fruchtsafthersteller einen höheren Hygieneaufwand und damit höhere Kosten als die Herstellung eines pasteurisierten Direktsaftes. Aus diesem Grund werden Frischsäfte für einen höheren Preis an die Verbraucher abgegeben. Für den Hersteller wäre die Option einer Zumischung von pasteurisiertem Saft gewinnbringend, für den Kunden allerdings eine Täuschung.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden Mischungen aus selbst gepresstem Saft und 5 bis 15 % Direktsaft hergestellt und die Aktivität der Pektinmethylsterase bestimmt. Theoretisch muss die Aktivität mit steigendem Anteil an Direktsaft sinken. Die ermittelten Aktivitäten werden nun mit der Aktivität in 100 % selbst gepresstem Saft verglichen.

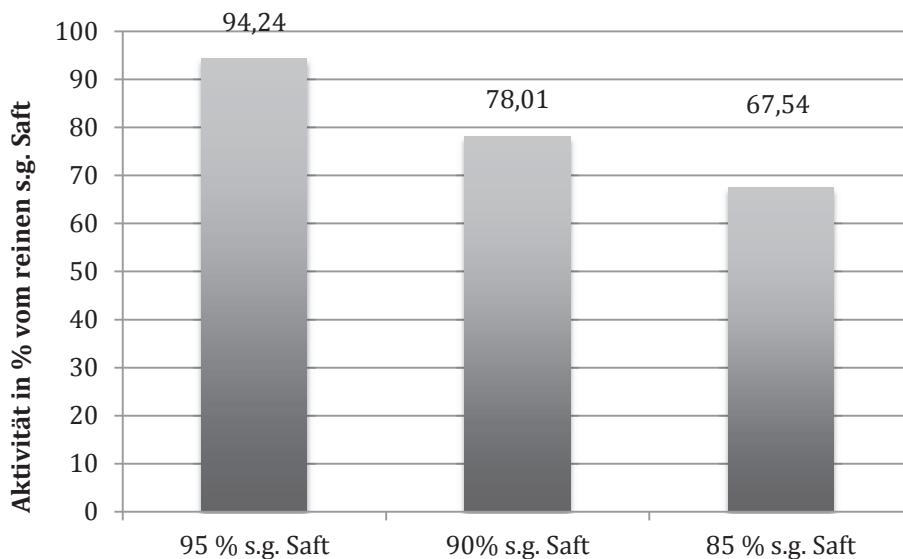


Abbildung 17: Aktivitätsbestimmungen in Mischungen aus selbst gepresstem Orangensaft (= s.g. Saft) und Orangendirektsaft

Die Aktivität im puren gepressten Orangensaft betrug  $1,91 \cdot 10^{-3}$  PEU/min (= 100 %). Je höher der Anteil des Direktsaftes wird, desto mehr verringert sich die Aktivität der Pektinmethylesterase. Würden die Balken im Diagramm die 100 % Aktivität vom reinen selbst gepressten Saft erreichen, könnte kein Unterschied zwischen Original und „Fälschung“ festgestellt werden.

#### Enzymaktivitäten in zwei unterschiedlichen Frischsäften

In Abbildung 18 werden die Aktivitäten der Pektinmethylesterase von frisch gepresstem Saft und zwei Frischsäften aus dem Handel dargestellt. Die Aktivität des selbst gepressten Saftes liegt etwas höher als die Aktivitäten der beiden Frischsäfte. Diese hingegen unterscheiden sich nicht voneinander.

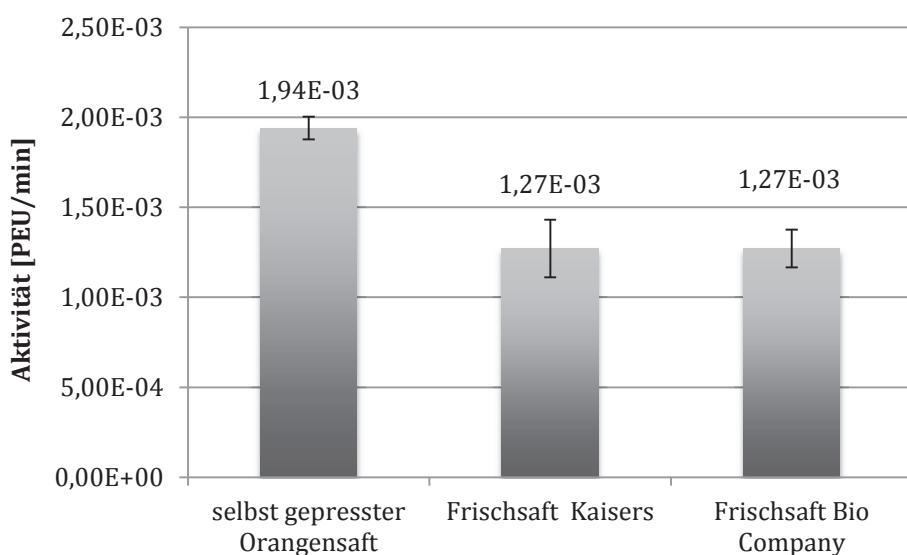


Abbildung 18: Vergleich der Enzymaktivitäten von frisch gepresstem Saft mit zwei Frischsäften aus dem Handel; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Der Unterschied zwischen selbst gepresstem Saft und Handelsware liegt bei ca. 0,6 PEU/min. Dies entspricht mehr oder weniger dem Unterschied zwischen der Messung direkt nach der Pressung und der Lagerung des selbst gepressten Saftes, der bereits in Abbildung 15 zu erkennen war.

### 5.1.2 Bestimmung der Endo-Polygalacturonase-Aktivität

#### 5.1.2.1 Vorversuche

Die Absenkung der Viskosität der Citruspektinlösung wurde manuell mittels einer 1 mL Messpipette gemessen. Entgegen der ursprünglichen Arbeitsvorschrift wurde der Pektингehalt von 0,4 % auf 2 % erhöht, um dem größeren Durchmesser im Vergleich zu einem Kapillarviskosimeter Rechnung zu tragen.. Als Blindwert wurde die Ablaufzeit von Pektinlösung und entionisiertem Wasser anstelle von Saft ermittelt. Dieser betrug im Mittel 26,71 Sekunden.

Zunächst wurden zwei Versuche mit selbst gepresstem Orangensaft über eine Inkubationszeit von fünf Stunden durchgeführt, um die Funktionalität und Reproduzierbarkeit dieser Methodik zu überprüfen. Der Saft wurde vor der

Inkubation zentrifugiert, um alle Partikel zu entfernen, die den Ablauf aus der Pipette stören könnten. Sowohl der Blindwert als auch die Messung mit Saft ergaben Werte zwischen 26 und 27,5 Sekunden. So ist auch auch nach fünf Stunden Inkubationszeit kein Unterschied ersichtlich. Aus dem zentrifugierten Saft resultierte dementsprechend keine viskositätssenkende Wirkung auf die Pektinlösung, da sich die Werte der Zeitmessung über den Inkubationszeitraum nicht verändert haben.

### **5.1.2.2 Versuchsdurchführung mit Handelsenzympräparat**

Der Versuchsablauf wurde mit einem industriell hergestellten Enzympräparat von der Firma AB Enzymes überprüft. Es handelte sich um das Präparat Rohapect MA Plus HC, bei dem bekannt war, dass es Aktivitäten einer Endo-Polygalacturonase und einer Pektinmethylesterase enthielt. Grundvoraussetzung für das Wirken der Endo-Polygalacturonase ist die Aktivität einer Pektinmethylesterase (s. Kap. 3.3.2). Diese Voraussetzung ist sowohl in dem Präparat als auch im Orangensaft (s. Kap. 5.1.1) erfüllt.

Laut Spezifikation des Herstellers enthielt das Präparat eine Gesamtaktivität von  $172.500.000 \text{ PGU} \cdot \text{ml}^{-1}$ . 25-100 mg des Enzyms sollen zur Maischebehandlung mit 1 Liter Saft gemischt werden. Dies entspricht einer Aktivität von  $12.939 - 51.750 \text{ PGU}/3 \text{ ml}$ .

Das Präparat wurde zuerst auf  $100.000 \text{ PGU} \cdot 3 \text{ ml}^{-1}$  mit entionisiertem Wasser verdünnt, da unbekannt war, welche Aktivität der Endo-Polygalacturonase notwendig war, um eine Viskositätssenkung feststellen zu können. Es wurden 3 mL Enzymlösung zu 15 mL Pektinlösung (2 %ig) gegeben, vorsichtig umgerührt und eine 3-fach Bestimmung des Versuchs durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 19 dargestellt.

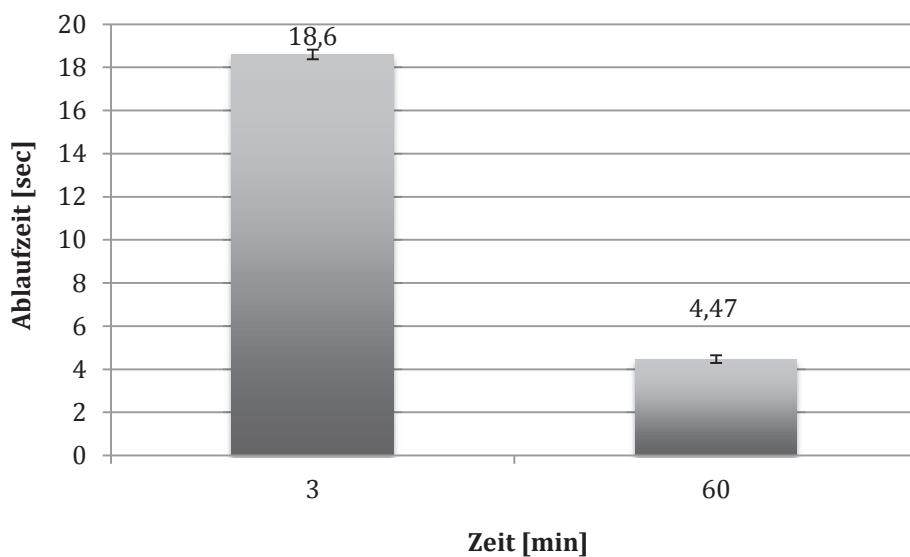


Abbildung 19: Ablaufzeiten des ersten Enzymversuches; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Nach drei Minuten ist die Ablaufzeit aus der 1 ml Pipette im Vergleich zum Blindwert (26,71 Sekunden) auf 18,6 Sekunden und nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C auf 4,47 Sekunden gesunken. Eine Viskositätsenkung durch die Wirkung der Endo-Polygalacturonase im Präparat konnte nachgewiesen werden.

Nach diesem Versuch wurde das Enzympräparat weiter verdünnt, um die Empfindlichkeit der Methode weiter zu überprüfen. Das verdünnte Präparat besaß eine berechnete Aktivität von  $1000 \text{ PGU} \cdot 3 \text{ ml}^{-1}$ . Die Abbildung 20 werden die Messergebnisse der 3-fach Bestimmung veranschaulicht.

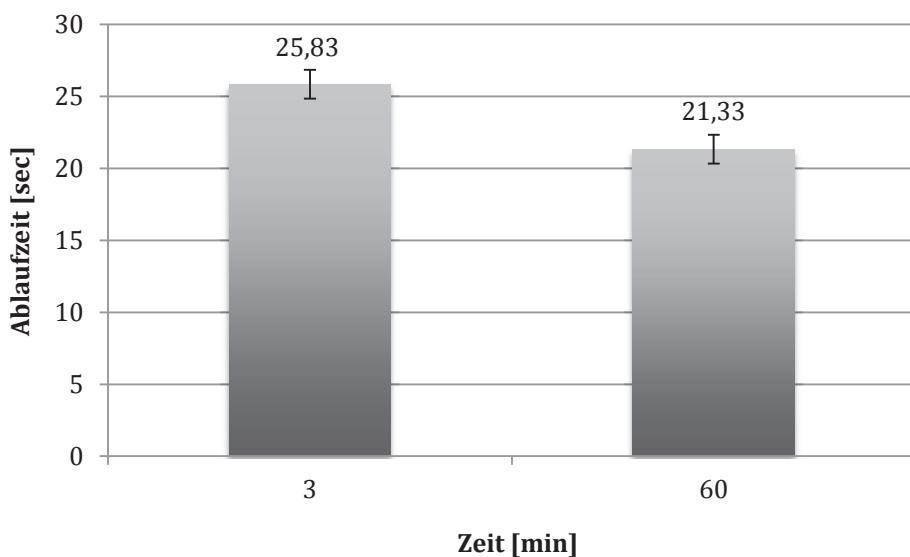


Abbildung 20: Ablaufzeiten des zweiten Enzymversuches; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen

Nach drei Minuten beträgt die Ablaufzeit 25,83 Sekunden und nach einer Stunde Inkubationszeit 21,33 Sekunden. Im Vergleich zum vorherigen Versuch unterscheidet sich die Ablaufzeit nach drei Minuten nur noch geringfügig vom Blindwert aus Pektinlösung und entionisiertem Wasser. Anhand dieser Zeit ist also die niedrigere Enzymaktivität erkennbar. Die Ablaufzeit von 21,33 Sekunden nach einer Stunde Inkubation unterscheidet sich sehr von dem vorherigen Messwert von 4,47 Sekunden.

Die Enzymaktivitäten konnten mit Hilfe der Berechnungsformel nicht ermittelt werden, da diese nur bei Zeitmessungen mittels Kapillarviskosimeter anwendbar ist.

### 5.1.2.3 Aktivitätsnachweise in Orangensaften

Auf Grund der Ergebnisse aus Kap. 5.1.1, durch die vermutet wurde, dass Enzyme membrangebunden sind, wurde Orangenfrischsaft vor der Inkubation statt zentrifugiert nur filtriert (Papierfilter 150 nm). Die Ablauf der Saft/Pektin-Probe betrug nach 3 Minuten im Durchschnitt 22,87 Sekunden. Nach einer Stunde Inkubation bei 30 °C wurde eine mittlere Ablaufzeit von 21,27 Sekunden gemessen. Da zwischen den Messwerten nach 3 Minuten und einer Stunde praktisch kein Unterschied besteht, war keine Enzymaktivität nachweisbar.

Anschließend wurde derselbe Versuch mit selbst gepresstem Orangensaft durchgeführt und vor der Inkubation ebenfalls nur filtriert. Die Ablaufzeit betrug nach 3 Minuten 26,4 Sekunden und nach einer Stunde 26,3 Sekunden. Da sich beide Werte nur sehr gering vom Blindwert mit 26,71 Sekunden unterscheiden, konnte im selbst gepressten Orangensaft keine Aktivität der Endo-Polygalacturonase nachgewiesen werden.

### 5.1.3 Bestimmung der Pektinlyase-Aktivität

In Abbildung 21 ist die Messung der Extinktion in selbst gepresstem Saft und in Orangenfrischsaft veranschaulicht. Für den Nachweis der Pektinlyase sollte die Extinktion innerhalb von einer Minute um 0,01 und jede weitere Minute linear ansteigen [17].

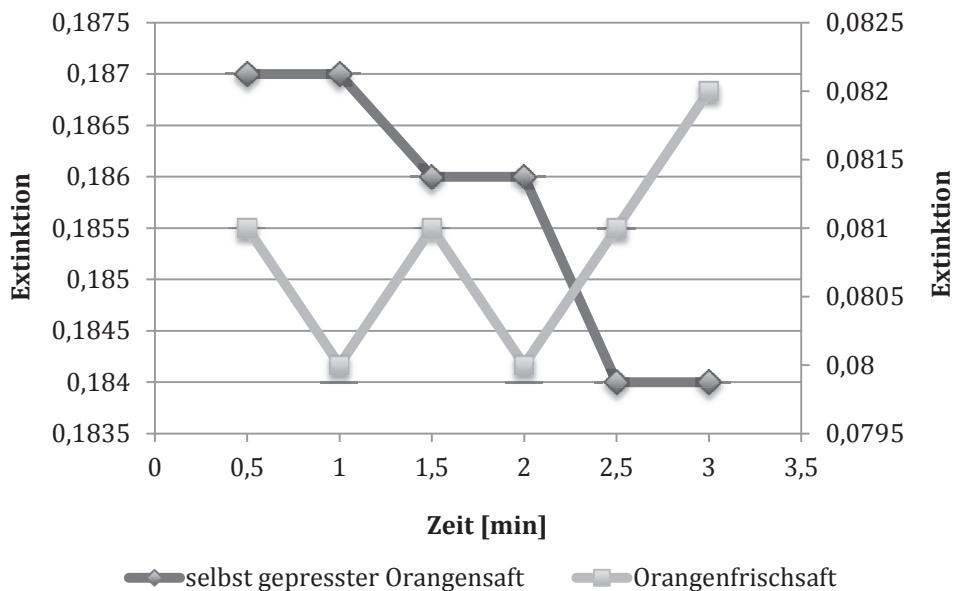


Abbildung 21: Extinktionsänderung von selbst gepresstem Orangensaft und Substratlösung über einen Zeitraum von 3 Minuten, der Orangenfrischsaft ist auf der Sekundärachse wieder-gegeben

In Abbildung 21 ist ersichtlich, dass die gemessenen Werte bei dem selbst gepressten Saft im Bereich von 0,187 bis 0,184 liegen und sogar abfallend sind. Die Extinktionen der Messung mit Orangenfrischsaft schwanken zwischen 0,080 und 0,082.

Die Änderungen der Extinktion wurden bei selbst gepresstem Orangensaft und Orangenfrischsaft über einen Zeitraum von drei Minuten gemessen. Die photometrische Messung der Pektinlyase ergab sowohl in selbst gepresstem Orangensaft, als auch in Orangenfrischsaft keine Aktivität.

## 5.2 Analytische Untersuchungen des Galacturonsäure-Profils mittels HPAEC

### 5.2.1 Ermittlung des Gradienten zur Auftrennung von Oligo-Galacturonsäure

Bei der Chromatographie bestimmen die zu trennenden Substanzen das Fließmittel und dessen Zusammensetzung. Für die analytische Untersuchung von enzymatischen Abbauprodukten des Pektins dienen Reinstwasser, Natriumhydroxid und Natriumacetat als Eluenten. Bei diesem Abbau entstehen Methanol, Neutralzucker (Rhamnose, Arabinose, Galactose, Xylose) und Galacturonsäure als Mono-, Di-, Tri- und Oligomere. Methanol wird als einzige Substanz nicht mit der Flüssigchromatographie, sondern mit gaschromatographischen Methoden nachgewiesen.

Die Neutralzucker werden wie die Galacturonsäure mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie bestimmt. Dabei verlassen diese die Trennsäule so schnell, dass ihre Peaks nach wenigen Minuten auf dem Chromatogramm erscheinen. Galacturonsäure eluiert als letztes und tauchen deshalb zum Schluss im Chromatogramm auf. Das Monomer der Galacturonsäure eluiert nach etwa 50 Minuten. Danach erscheinen Di-, Tri- und Oligo-Galacturonsäure in fast regelmäßigen Abständen in dem Chromatogramm. Di-Galacturonsäure weist eine Retentionszeit von ca. 59,4 Minuten und Tri-Galacturonsäure von 65,9 Minuten auf. Von den Oligo-Galacturonsäuren standen keine Standardsubstanzen zur Verfügung, deshalb waren deren Retentionszeiten noch unbekannt. Das ursprüngliche Eluentprogramm dauerte je Probe 95 Minuten. Dieses Programm gewährleistete die gesamte Auftrennung der höheren Oligomere nicht. Außerdem zeigte sich nach der Anwendung des ursprünglichen Eluentprogrammes, dass ein Matrixpeak mit dem Peak des Dimers der Galacturonsäure zusammen läuft. Aus diesen Gründen wurde das Programm während der Versuche mehrere Male verändert und angepasst, um optimale Trennvorgänge und -ergebnisse zu erhalten.

Monomere sind im HPLC-System wesentlich einfacher als Oligomere zu trennen. Die Trennung wird mit zunehmender Kettenlänge an Molekülen immer schwieriger. Zusätzlich nimmt die Retention mit wachsendem Molekulargewicht zu. Dennoch lassen sich mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie Polymere bis zu einem Molekulargewicht von ca. 10.000 g/mol erfassen [12]. Das Molekulargewicht von Galacturonsäure mit dem Polymerisationsgrad 10 liegt nur bei 1.941 g/mol.

Für eine optimale Trennleistung sind eine geeignete Säule und ein angepasstes Eluentprogramm notwendige Voraussetzungen. Die verwendete Säule Carbopac PA 100 von Dionex wurde speziell für die Trennung von Oligosacchariden entwickelt. Das Säulenmaterial besteht aus Ethylvinylbenzol/Divinylbenzol mit Ammoniumlatex [18]. Es sorgt für eine optimale Trennung der Galacturonsäure-Oligomere. Die eingesetzten Eluenten, die eine hohe Elutionskraft aufweisen und damit die Retentionszeiten beeinflussen, bestehen aus Natriumhydroxid und Natriumacetat, wobei Natriumacetat eine wesentlich höhere Elutionskraft besitzt [12]. Das Natriumhydroxid dient vorwiegend der Einstellung eines basischen pH-Wertes in der Säule. Die Hydroxid-Ionen der Lauge fungieren zusätzlich als Eluent-Ionen, deren Konzentration Auswirkungen auf das Retentionsverhalten der Oligomere hat [12]. Während mit steigendem pH-Wert die Dissoziation der Oligomere und dadurch ihre Retention zunimmt, bewirkt die damit verbundene Erhöhung der Konzentration der Eluent-Ionen eine Verringerung der Retention.

Die Herstellung und Zusammensetzung der Eluenten wurde nicht verändert. Die Verwendung eines tertiären Stufengradienten wurde beibehalten, der bei der Analyse von Oligomeren im höhermolekularen Bereich zu einer besseren Auflösung führt als ein linearer Gradient [12].

Das Eluentprogramm wurde um 20 Minuten auf 105 Minuten verlängert, damit alle Oligo-Galacturonsäuren mit einer Kettenlänge von 4 bis 10 Molekülen detektiert werden.

Der Eluentverlauf ist zu einer besseren Veranschaulichung in Abbildung 22 in einem Chromatogramm dargestellt.

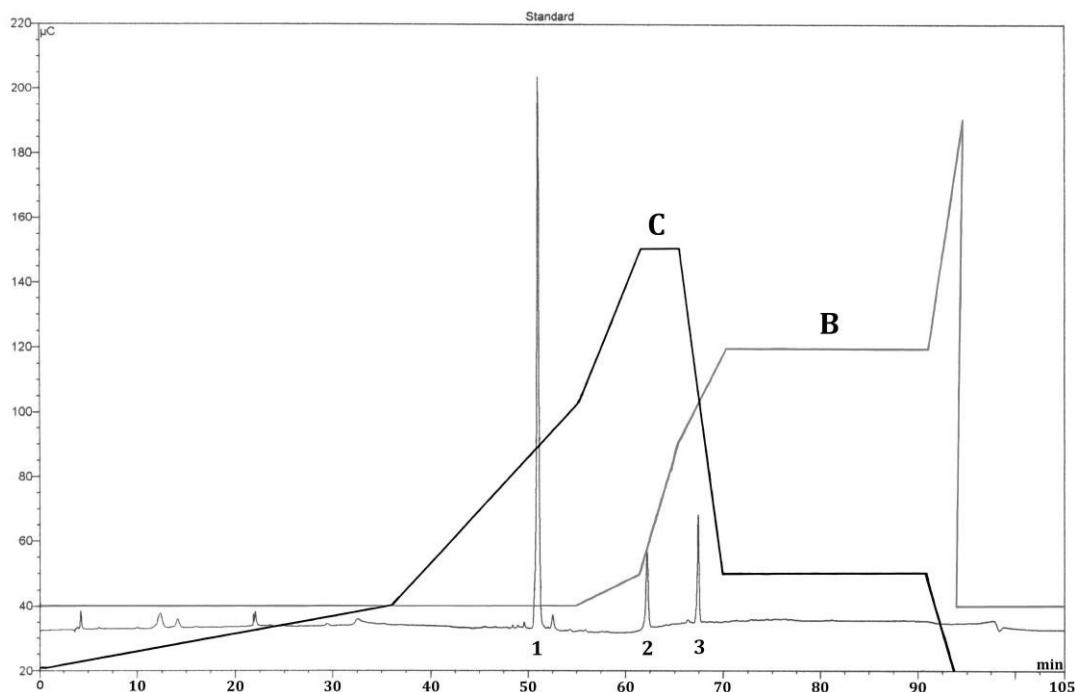


Abbildung 22: Chromatogramm eines Standardlaufes in 105 Minuten mit Eluent B = 1 N Natriumhydroxid und C = 0,5 N Natriumacetat; 1 = Mono-Galacturonsäure, 2 = Di-Galacturonsäure, 3 = Tri-Galacturonsäure

Die Menge an Natriumhydroxid (B) wurde ab der 61. Minute stufenweise erhöht, um eine schnellere Elution zu erzielen. Die Affinität der Oligomere zum Anionenaustauscherharz steigt mit der zunehmenden Zahl der Hydroxylgruppen in ihrem Molekül an [19]. Infolgedessen werden Oligosaccharide stärker an das Harz adsorbiert als Mono- oder Disaccharide [19]. Die Zunahme des Natriumacetats sorgt für eine schnellere Trennung der Oligo-Galacturonsäuren. Eine Erhöhung der Steilheit des Gradienten durch die verstärkte Zugabe von Natriumacetat ermöglicht eine getrennte Erfassung der höheren Oligomere. Allerdings darf die Steilheit nicht zu rasch und zu schnell erfolgen, um noch genügend Auflösung im höhernuklearen Bereich zu erhalten. Dementsprechend nimmt die Analysenzeit der Trennung zu.

### 5.2.2 Ergebnisse des enzymatischen Abbaus

Eine 1 %ige Citruspektin-Lösung wurde mit fünf Enzymen der Firma Ersblöh behandelt. Das hochmolekulare, langkettige Pektin wurde durch diese Enzymierung in kleinere Bruchstücke aus Galacturonsäure von 1 bis 10 Molekülen gespalten. Die Verteilung der Galacturonsäure-Bruchstücke ist abhängig von den Enzymhaupt- und Nebenaktivitäten in den fünf Präparaten. Nach dem enzymatischen Abbau wurden die Enzyme in der Substratlösung thermisch inaktiviert und die Abbauprodukte mit Hilfe der in Kap. 5.1.1 beschriebenen Methode chromatographisch analysiert. Ein Blindwert aus Substratlösung ohne Enzymzusatz, der in gleicher Weise wie die anderen Proben behandelt wurde, wurde ebenfalls chromatographisch untersucht.

Die Betrachtung der Galacturonsäure-Profile erfolgt anhand der Peakflächen, weil auf Grund fehlender Standardsubstanzen eine Quantifizierung der Oligomere ab dem Polymerisationsgrad von 4 Monomeren nicht möglich war.

#### Blindwert

Es wurde jeweils ein Blindwert der Pektinlösung mit und ohne 15 Stunden Inkubationsdauer in die Trennsäule eingespritzt. Die Messung des Blindwertes ohne Inkubation ergab eine Peakfläche für Mono-Galacturonsäure von 1,11 FE und mit Inkubation eine Peakfläche von 0,95 FE. Die Peakflächen sind auf Grund ihrer nur minimalen Abweichung voneinander als gleich anzusehen. Somit hat die Inkubation von 15 Stunden bei 30 °C keinen Einfluss auf die Pektinlösung. Der Gehalt an Mono-Galacturonsäure ist sehr gering, da das Pektin noch als langkettiges Makromolekül vorliegt.

Jedem Enzymansatz wurde nach 30, 120, 300 und 900 Minuten Inkubation eine Stichprobe entnommen und jeweils chromatographisch analysiert. Es wurde eine Zunahme der Oligomere nach fortschreitender Inkubationsdauer beobachtet.

Die Zunahme der Mono-Galacturonsäure ist bei jedem der fünf Enzyme zur besseren Übersicht in einzelnen Diagrammen dargestellt. Ihr Gehalt stieg innerhalb der 900 Minuten am meisten an und war damit für die Darstellung des Datenbereichs der anderen Oligomere zu groß.

#### **Fructozym PRESS – Zunahme der Galacturonsäure-Oligomere**

Die Abbildung 23 zeigt den Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure innerhalb von 900 Minuten Inkubation bei 30 °C. Bei dem Abbauversuch mit dem Präparat *Fructozym Press* stieg die Peakfläche der Galacturonsäure von 240,04 FE nach 30 Minuten auf 1569,46 FE nach 900 Minuten Inkubation an. Dies ist ein Anstieg um das 6,5-fache.

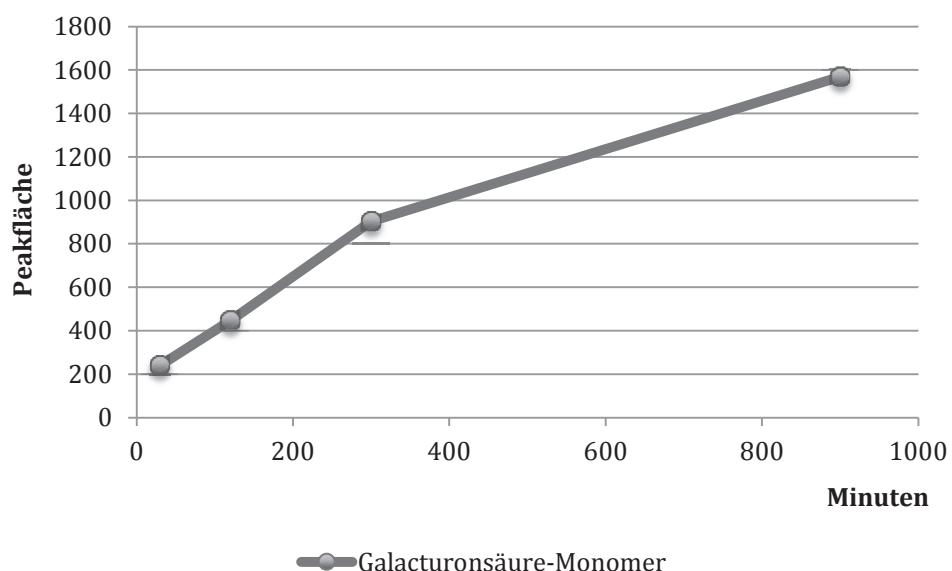


Abbildung 23: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure über einen Zeitraum von 900 Minuten Inkubation (Fructozym PRESS)

In Abbildung 24 sind die Zunahmen der Peakflächen der Oligomere Dimer bis Hexamer dargestellt. Die Peakflächen von Trimer und Tetramer haben sich nach 900 Minuten vergrößert. Die Peakfläche des Pentamers zeigt nach einem stetigen Anstieg bis zu einer Inkubation von 300 Minuten einen deutlichen

Abfall bei längerer Inkubation. Der Gehalt des Hexamers hat sich von 1,78 FE nach 30 Minuten auf 2,90 FE nach 900 Minuten kaum verändert.

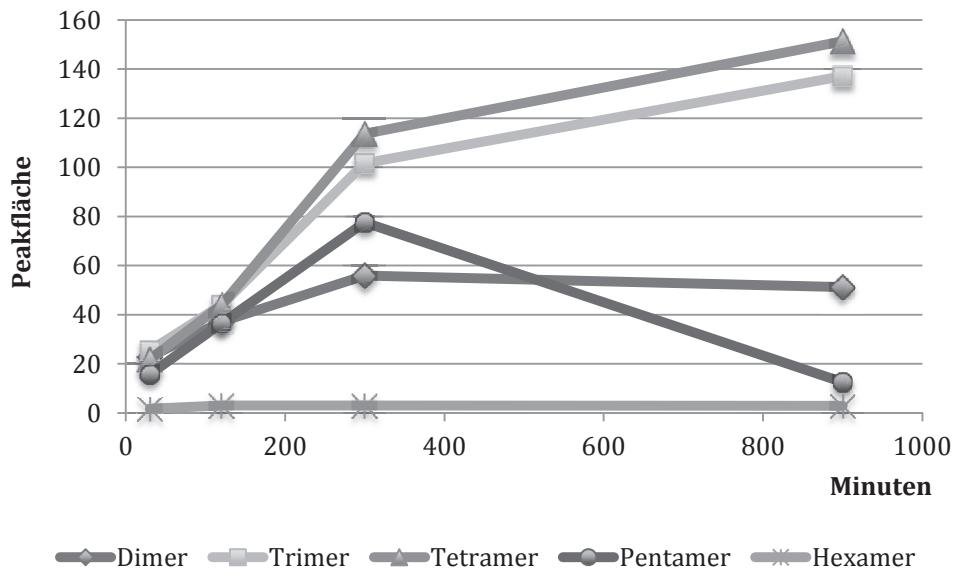


Abbildung 24: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer im Laufe von 900 Minuten (Fructozym PRESS)

Die Messergebnisse zur Beurteilung des Galacturonsäure-Profiles wurden nach 120 Minuten Inkubationsdauer als Richtwert herangezogen, da das der maximale Zeitraum für eine Maischebehandlung nach den Angaben der Enzymhersteller ist.

### Fructozym PRESS – Galacturonsäure-Profil

Die Behandlung der Pektinlösung mit dem Präparat *Fructozym PRESS* ergab nach 120 Minuten Inkubation folgende Galacturonsäure-Verteilung:

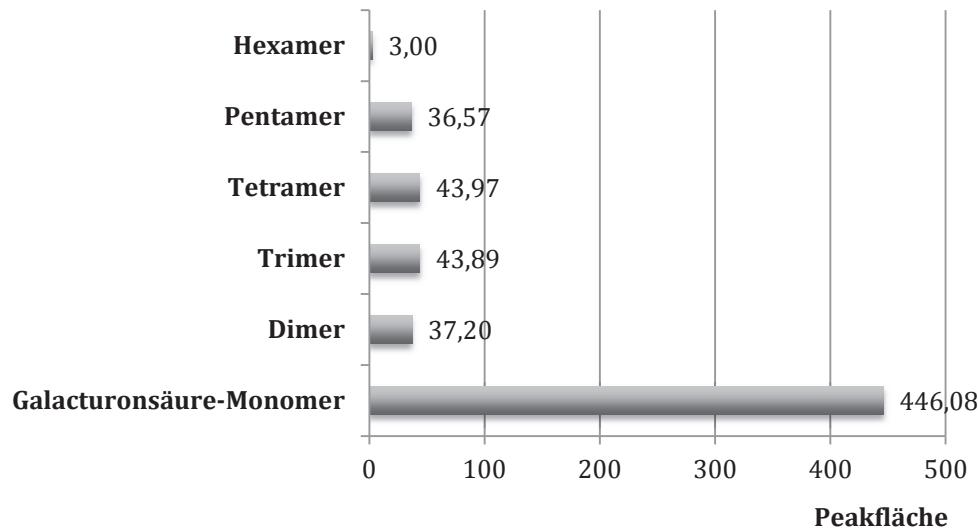


Abbildung 25: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym PRESS)

Mono-Galacturonsäure wurde mit einer Peakfläche von 446,08 FE am meisten gebildet. Die Oligomere vom Dimer bis zum Pentamer sind mit Peakflächen von 36,57 FE bis 43,97 FE vorhanden. Das Galacturonsäure-Hexamer ergibt nur eine Peakfläche von 3,00 FE.

### Fructozym P6-L – Zunahme der Galacturonsäure-Oligomere

Der Gehalt des Galacturonsäure-Monomers steigt nahezu linear innerhalb der 900 Minuten an. Die Peakfläche steigt dabei von 101,17 FE nach 30 Minuten auf 527,34 FE nach 900 Minuten an.

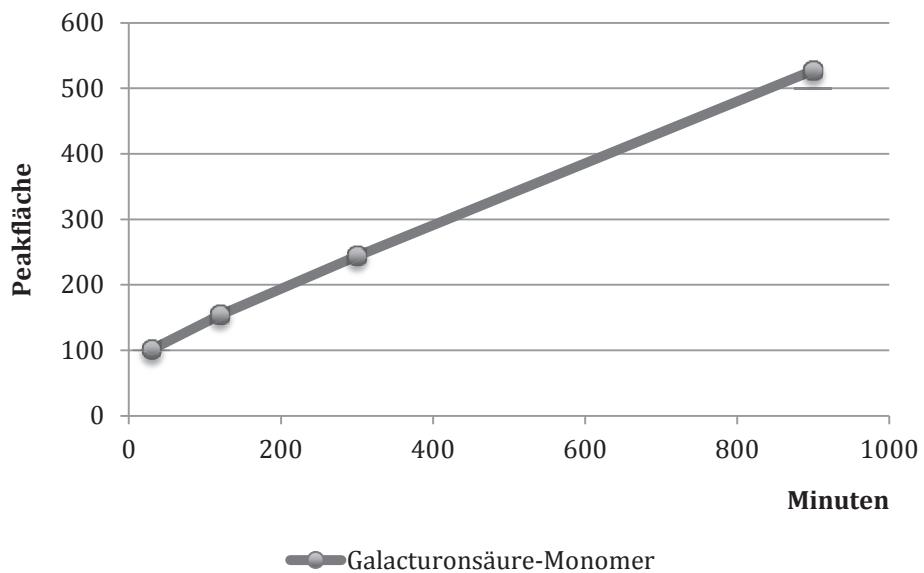


Abbildung 26: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Fructozym P6-L)

Die Peakflächen der Oligomere sind nach dem Pektinabbau durch das Präparat Fructozym P6-L bis zum Ende der Inkubation angestiegen. Den höchsten Anteil besitzt nach 900 Minuten das Tetramer mit einer Peakfläche von 78,18 FE.

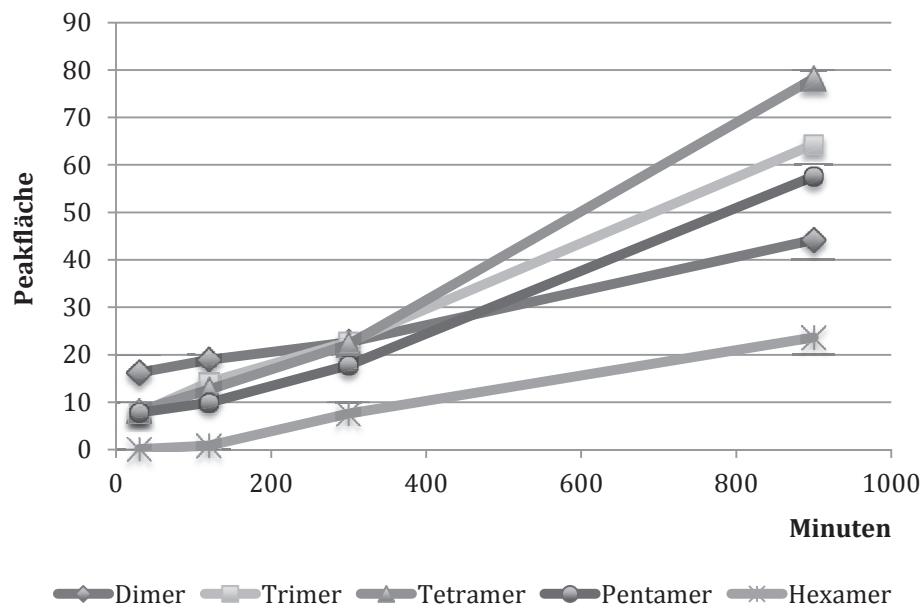


Abbildung 27: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Fructozym P6-L)

**Fructozym P6-L – Galacturonsäure-Profil**

Nach 120 Minuten Inkubation ergab sich für das Galacturonsäure-Monomer eine Peakfläche von 153,94 FE. Diese Fläche macht 73 % der gesamten Galacturonsäure-Peakfläche aus. Der Gehalt der anderen Oligomere nimmt mit Zunahme der Kettenlänge ab.

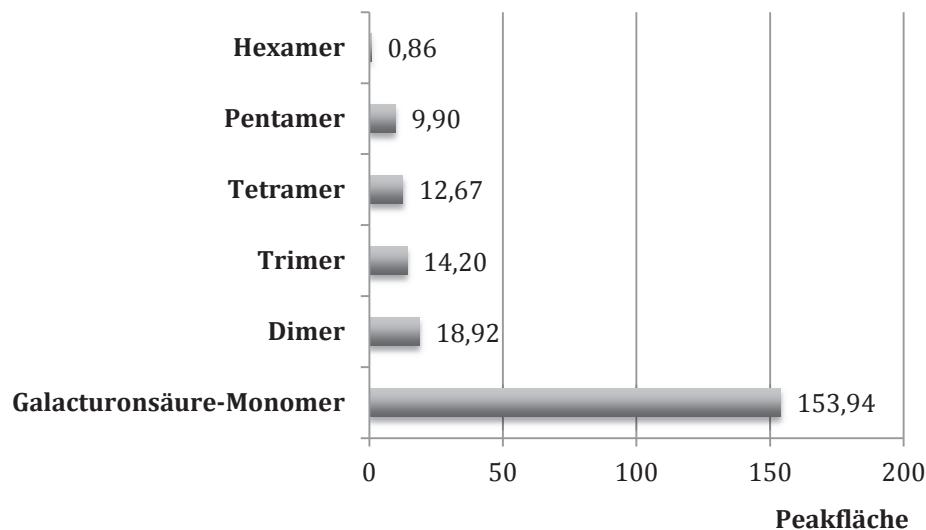


Abbildung 28: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym P6-L)

**Citrolase TF CLEAR – Zunahme der Galacturonsäure-Oligomere**

Der Anstieg der Mono-Galacturonsäure ist von 30 bis 300 Minuten linear von 145,77 FE auf 560,41 FE. Danach vergrößert sich die Peakfläche noch einmal auf 917,73 FE.

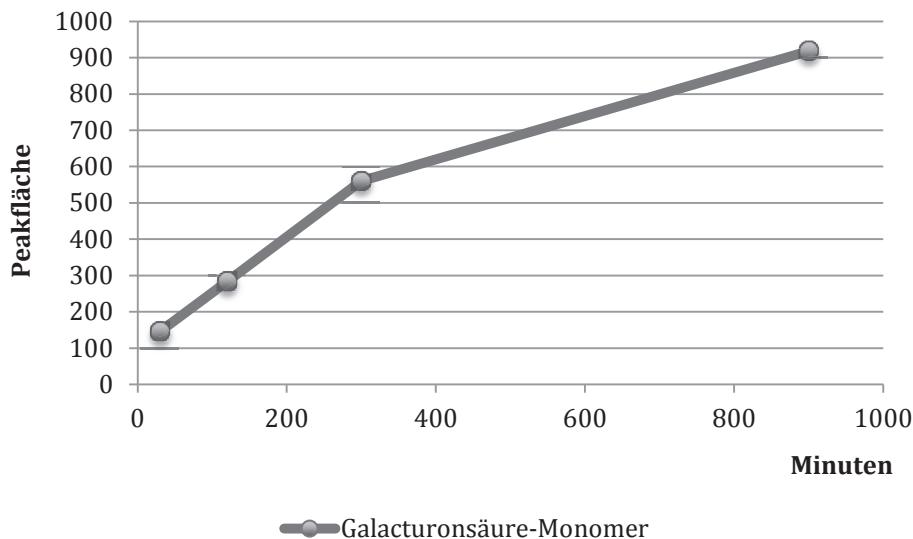


Abbildung 29: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Citrolase TF CLEAR)

Die Peakflächen aller Oligomere steigen bis 300 Minuten kontinuierlich an. Die Gehalte von Di-, Tri- und Tetramer steigen auch nach 300 Minuten noch an. Die Peakflächen von Penta- und Hexamer hingegen verringern sich nach 300 Minuten Inkubationszeit geringfügig.

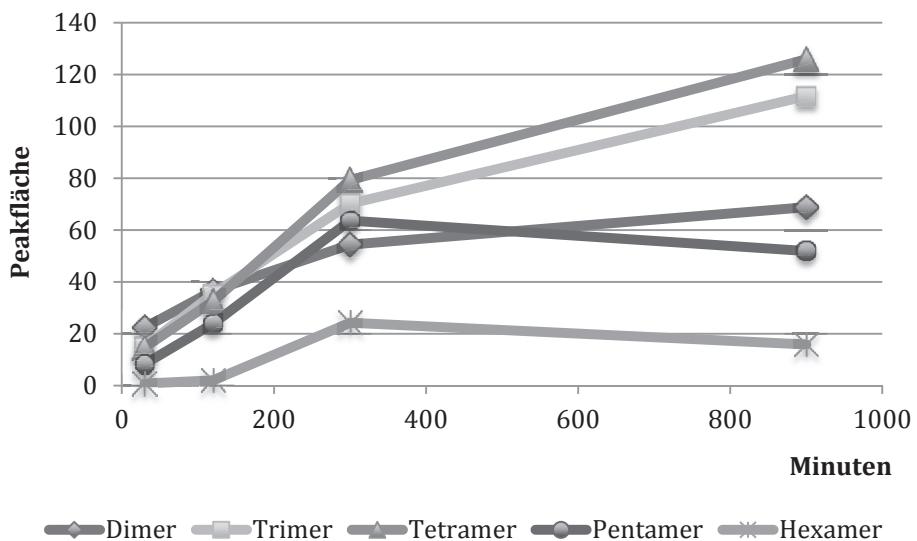


Abbildung 30: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Citrolase TF CLEAR)

### Citrolase TF CLEAR – Galacturonsäure-Profil

Der Mono-Galacturonsäure-Gehalt liegt auch nach dem Pektinabbau mit *Citrolase TF CLEAR* nach 120 Minuten weit über dem der anderen Oligomere. Die Oligomere von Dimer bis Pentamer weisen Peakflächen von 23,90 FE und 36,57 FE auf. Das Hexamer hat den geringsten Anteil mit einer Peakfläche von 2,09 FE.

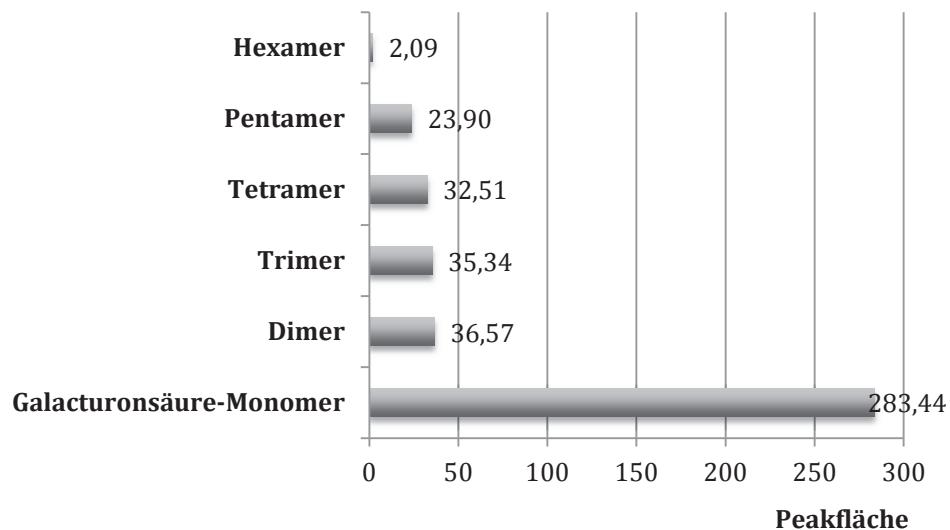


Abbildung 31: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Citrolase TF CLEAR)

### Fructozym COLOR – Zunahme der Galacturonsäure-Oligomere

Die Peakfläche des Galacturonsäure-Monomers erhöht sich von 154,42 FE auf 1106,35 FE. Die Fläche nimmt innerhalb der 900 Minuten um etwas mehr als das 7-fache zu.

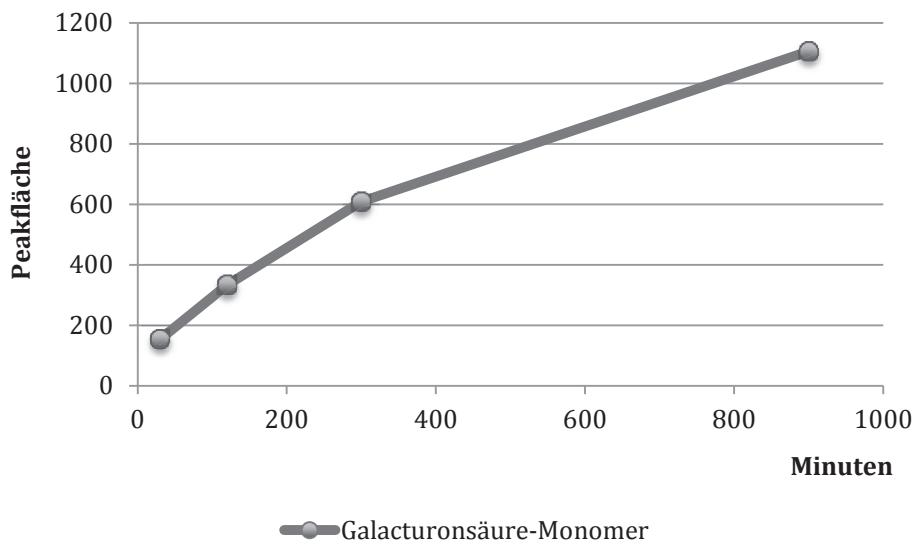


Abbildung 32: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Fructozym COLOR)

Auch bei diesem enzymatischen Abbau zeigt sich dasselbe Bild der Oligomere wie bei dem Präparat Citrolase. Dimer bis Tetramer nehmen an Gehalt durch den Abbau stets zu, während Penta- und Hexamer nach 300 Minuten abnehmen.

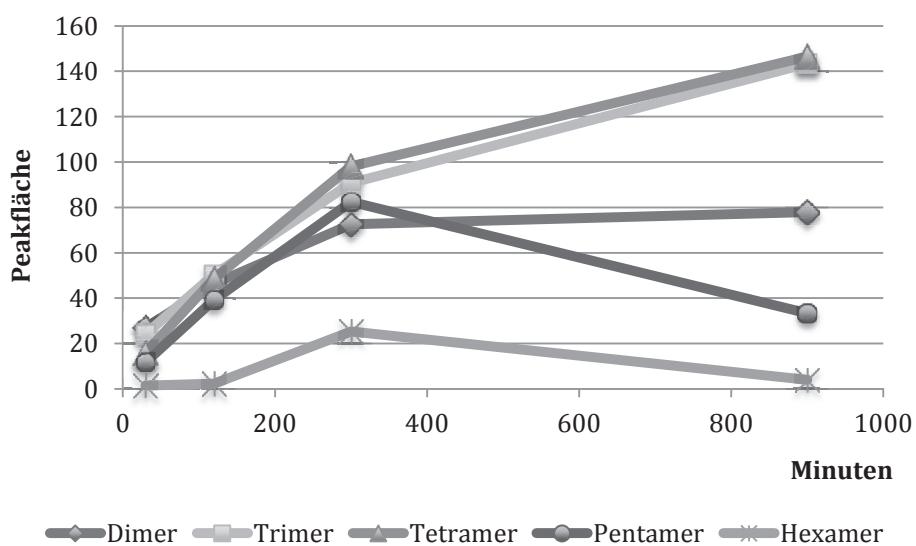


Abbildung 33: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Fructozym COLOR)

### Fructozym COLOR – Galacturonsäure-Profil

Der Abbau des Pektins mit dem Präparat Fructozym COLOR zeigt auch, dass Mono-Galacturonsäure am meisten gebildet wurde. Die Peakfläche hat eine Größe von 333,82 FE. Die Peakflächen der Oligomere von Dimer bis Pentamer sind fast gleichgroß. Das Hexamer weist die kleinste Fläche mit 2,39 FE auf.

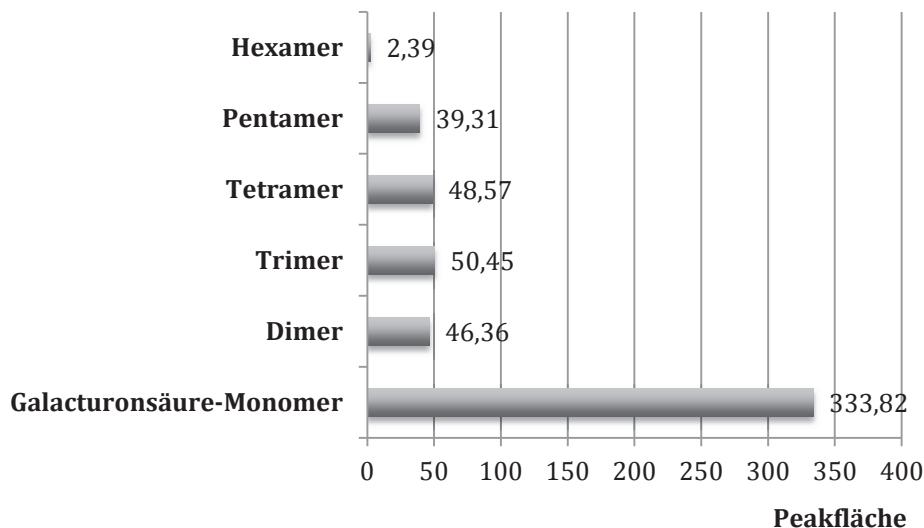


Abbildung 34: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym COLOR)

### Fructozym P-LG – Zunahme der Galacturonsäure-Oligomere

In der Abbildung 35 fällt auf, dass die Peakfläche zunächst sehr steil ansteigt, sich jedoch nach 300 Minuten kaum noch verändert. Die Peakfläche des Monomers nach der Enzymierung mit den zuvor beschriebenen Enzymen lag um ein Vielfaches höher (527 bis 1570 FE statt 80 FE nach 900 Minuten).

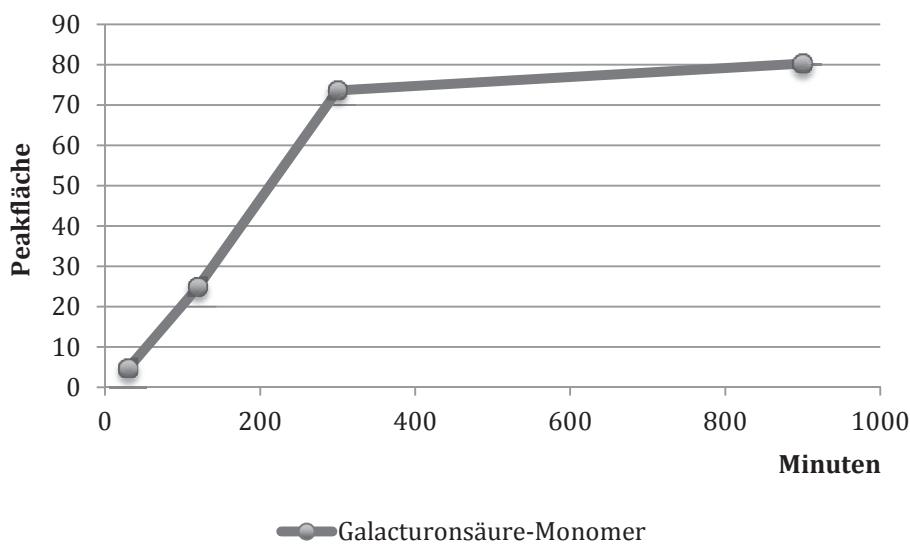


Abbildung 35: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Fructozym P-LG)

Auch der Gehalt der Oligomere ist viel geringer als in den anderen Abbauversuchen. Die größte Peakfläche nach 900 Minuten hat das Dimer mit 19,52 FE. Das Hexamer nimmt bis 120 Minuten zu und fällt danach erst steil, dann langsam wieder ab.

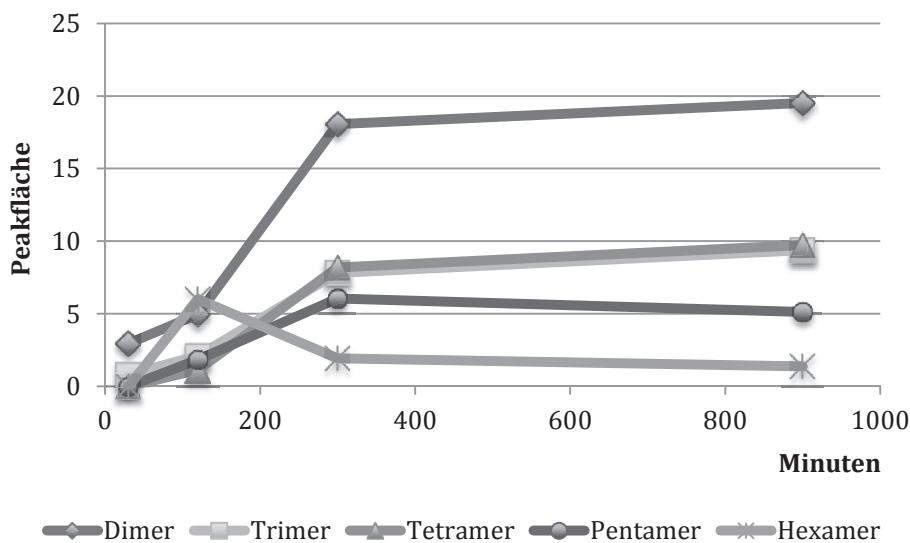


Abbildung 36: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Fructozym P-LG)

### **Fructozym P-LG – Galacturonsäure-Profil**

Nach 120 Minuten ist der Mono-Galacturonsäure-Gehalt zwar am höchsten, aber mit einer Peakfläche von 24,87 FE sehr niedrig. Das Hexamer ist das Oligomer, das nach der Mono-Galacturonsäure am meisten vorhanden ist. Auch das ist ein deutlicher Unterschied zu den vorherigen Versuchen. Danach folgen Dimer, Trimer, Pentamer und Tetramer.

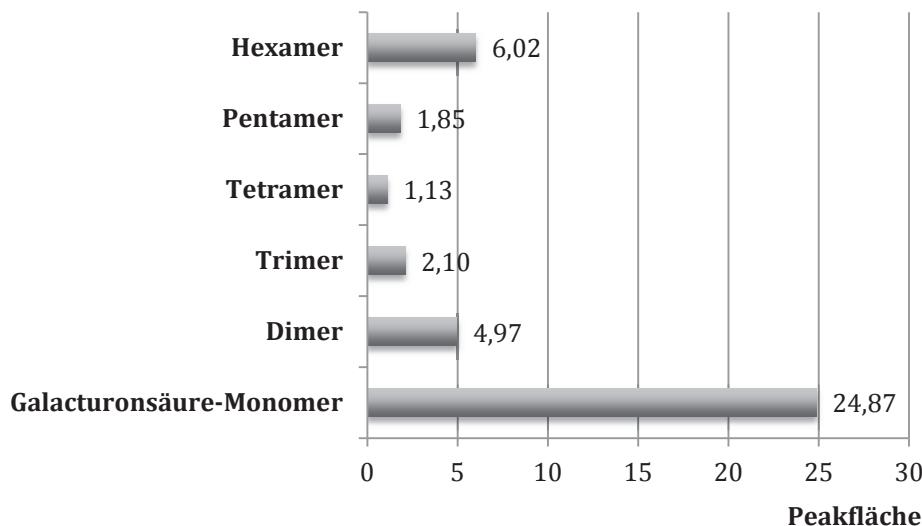


Abbildung 37: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym P-LG)

### **Zusammenfassung**

Mono-Galacturonsäure ist das primäre Abbauprodukt, da es quantitativ, unabhängig von den verwendeten Enzympräparaten, am meisten gebildet wurde. Im Verhältnis dazu war das Hexamer am wenigsten vertreten. Die Gehalte der Oligomere von Dimer bis Pentamer schwankten je nach Enzympräparat. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte nur bis zum Hexamer. Höhere Oligomere ab dem Polymerisationsgrad 7 waren entweder nicht vorhanden oder konnten nicht aufgetrennt werden.

### 5.2.3 Quantifizierung und Identifizierung der Galacturonsäure-Oligomere

Für die Ermittlung der Menge eines Stoffes in einer chromatographischen Probe wird von einer direkten Beziehung zwischen Signalgröße des Detektors (Peakfläche) und der Menge des Stoffes ausgegangen. Bei der chromatographischen Analyse der Abbauprodukte von Pektin erfolgte die Quantifizierung der Mono-, Di- und Tri-Galacturonsäure über eine Kalibration von Lösungen mit bekannter Konzentration. Aber nicht nur die Quantifizierung von Substanzen ergibt sich über einen externen Standard, sondern auch deren Identifizierung. Die Identifizierung von Mono-, Di- und Tri-Galacturonsäure war durch die vorhandenen Standardsubstanzen einwandfrei möglich. Dazu wurden die spezifischen Retentionszeiten der drei Oligomere unter identischen Trennbedingungen herangezogen. Das Retentionsverhalten ist für jede Verbindung charakteristisch. Handelt es sich bei einem Standard und einer zu identifizierenden Substanz in einer Probe um dieselbe Verbindung, zeigen beide unter den gleichen chromatographischen Trennbedingungen identische Elutionszeiten [12]. Die Retentionszeiten der Standardsubstanzen stimmten nach einem Vergleich mit denen aus den enzymatischen Abbauproben überein.

Da für die größeren Oligomere (Tetra- bis Hexamer) zunächst keine Standards vorhanden waren, musste die Identifizierung empirisch über die Retentionszeiten erfolgen. Dazu wurde eine Pektinlösung mit einer Endo-Polygalacturonase behandelt, um die Oligomere zu erhalten. Diese wurde chromatographisch aufgetrennt und die Oligomere anhand ihres Retentionsverhaltens identifiziert.

Nach der qualitativen Analyse, bei der die Oligomere mit größtmöglicher Sicherheit identifiziert worden sind, war eine Quantifizierung möglich. Die Quantifizierung der Oligomere in mg/kg erfolgte über den Slope<sup>8</sup> des Trimers.

---

<sup>8</sup> Der Slope ist das Verhältnis von eingesetzter Menge in einem Standard zur Signalintensität.

Es wurde der Slope des Trimers herangezogen, da das Trimer die Standardsubstanz mit dem höchsten Polymerisationsgrad war. Die Peakfläche des entsprechenden Oligomers wurde durch den Slope des Trimers dividiert.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit einer Diplom-Lebensmittelchemikerin von der Technischen Universität Berlin wurde für diese Arbeit ein Standard mit den Oligomeren der Galacturonsäure vom Polymerisationsgrad 1 bis 7 zur Verfügung gestellt. Dieser Standard wurde mit der in Kap. 5.1.1 beschriebenen Methode chromatographisch getrennt. In Abbildung 39 ist das zugehörige Chromatogramm wiedergegeben.

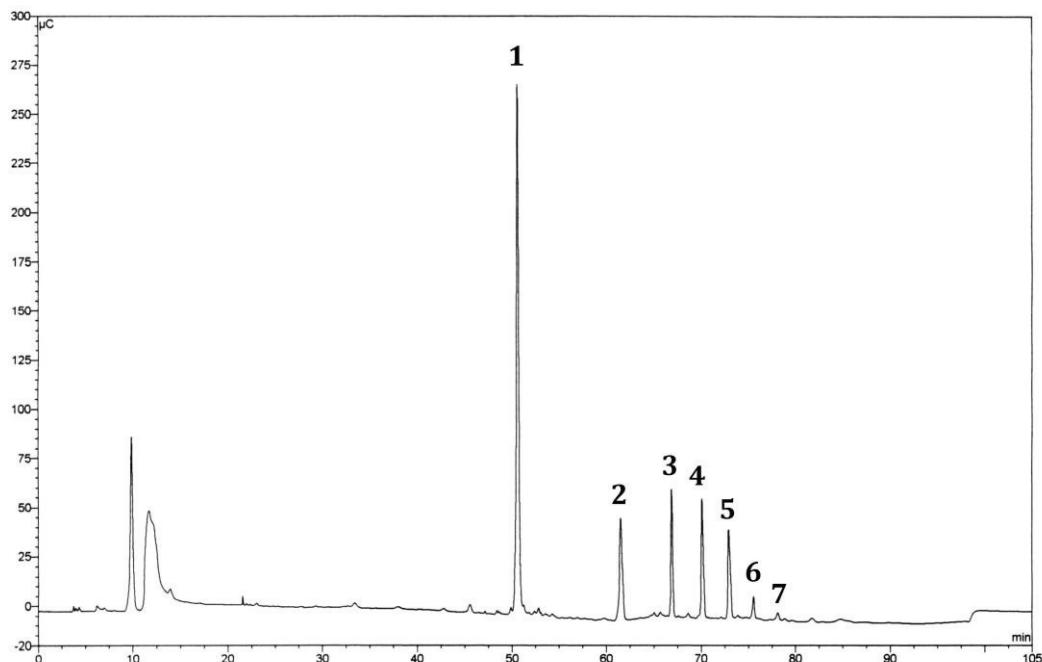


Abb. 39: Chromatogramm des Standardlaufes mit Oligomeren der Galacturonsäure (Monomer bis Heptamer)

Diese Standardlösung wurde einmalig chromatographiert und anschließend eingefroren. Die Oligomere besaßen folgende Retentionszeiten:

Mono-Galacturonsäure	~ 50,6 Minuten
Dimer	~ 61,5 Minuten
Trimer	~ 66,9 Minuten
Tetramer	~ 70,1 Minuten
Pentamer	~ 72,9 Minuten
Hexamer	~ 75,5 Minuten
Heptamer	~ 78,1 Minuten

Es zeigte sich, dass die zuvor anhand der enzymierten Pektinlösung identifizierten Oligomere mit dem Standardlösung übereinstimmten.

Auf Grund einer Änderung der Aufgabenstellung für diese Arbeit wurde das Thema nicht weiterführend bearbeitet. Eine Auswertung und Diskussion der bis dahin entstandenen Ergebnisse erfolgt in Kap. 6.

## 6 Diskussion der Ergebnisse

Im primären Teil dieser Arbeit wurden selbst gepresster Orangensaft und Orangenfrischsaft aus dem Handel auf die Aktivität ihrer pektolytischen Enzyme hin untersucht. Dazu zählten die Enzyme Pektinmethylesterase, Endo-Polygalacturonase und Pektinlyase. Es wurde untersucht, wie sich die Aktivität dieser Enzyme in beiden Säften während gekühlter Lagerung verändert. Außerdem wurde die Aktivität der Pektinmethylesterase in Mischungen aus selbst gepresstem und pasteurisiertem Saft untersucht, ob so eine mögliche Täuschung des Verbrauchers erkennbar ist.

### Pektinmethylesterase

#### Anwendung der Nachweismethode nach KIMBALL

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Pektinmethylesterase nach den Analysenvorschriften von KIMBALL [14] durchgeführt. MEURER [15] und EWEST [31] verwendeten dazu einen Autotitrator, der für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung stand. Über die titrimetrische Bestimmung wiesen die beiden Autoren die freigesetzten Carboxylgruppen nach, wobei der pH-Wert des Reaktionsgemisches mit Hilfe des Autotitators während der gesamten Analysendauer konstant gehalten wurde. Das Gerät titrierte eine 0,01 M Natriumhydroxid-Lösung über vier Minuten in das Reaktionsgemisch aus Pektinlösung und Enzymextrakt, um den gewünschten pH-Wert konstant zu halten. Der Verbrauch an Natriumhydroxid pro Minute wurde als Maß für die Aktivität der Pektinmethylesterase verwendet.

Beide Bestimmungsmethoden erfolgten unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer und bei einer Temperatur von 30 °C.

Im Gegensatz zu der Methode nach KIMBALL, wurden von MEURER und EWEST jeweils Enzymextrakte für die Bestimmung hergestellt. Das gestaltete sich für ihre Arbeiten vorteilhaft, da die Aktivität der Pektinmethylesterase in ganzen Früchten die Basis für ihre Untersuchungen bildete. MEURER isolierte

die Enzyme aus sauer fermentierten Gurken und EWEST aus dem Fruchtfleisch von verschiedenen Apfelsorten. Durch die Extraktherstellung wurden die Enzyme aufkonzentriert sowie eventuell vorhandene Störfaktoren eliminiert.

Im Vordergrund der hier vorgestellten Arbeit stand die Aktivität der Pektinmethylesterase in Orangensaft und nicht in der ganzen Frucht. Hierin war die Menge der Pektinmethylesterase ausreichend hoch, sodass die Aktivität nach den Analysenvorschriften nach KIMBALL einwandfrei bestimmt werden konnte. Deshalb war die Herstellung eines Extraktes aus der homogenisierten Frucht nicht notwendig.

KIMBALL entwickelte die Methode zur Bestimmung der Pektinmethylesterase in Orangensaft. Die Messung beruht auf der Geschwindigkeit der Säurebildung durch die Wirkung der Pektinmethylesterase. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird in Form einer Gleichung erster Ordnung ausgedrückt. Bei einer Reaktion dieser Art ist die zeitliche Konzentrationsänderung proportional zur Konzentration. Das bedeutet, dass über die Messung der Änderung der Säurekonzentration bzw. des pH-Wertes in der Analysenlösung, die Aktivität der Pektinmethylesterase abgeschätzt werden kann. Da das im Saft nativ vorkommende Pektin durch das Enzym bereits abgebaut ist, lässt sich eine pH-Absenkung durch die Säurebildung nur schwer detektieren. Um die Reaktion der Säurebildung durch das Enzym zu beschleunigen und um eine pH-Absenkung zu erzielen, die groß genug ist, um sie zu messen, wird der Saftprobe zusätzliches Pektin hinzugefügt.

Die Methode nach KIMBALL unterscheidet sich von der Methode, die MEURER und EWEST angewendet haben. Bei der in dieser Arbeit genutzten Methode nach KIMBALL wird der pH-Wert einer Saftprobe mit Hilfe von Natriumhydroxid neutralisiert. Anschließend wird ein definiertes Volumen dieser Base hinzugegeben, wodurch der pH-Wert der Probe erneut ansteigt. Es wird die Zeit gemessen, die benötigt wird, den ursprünglichen pH-Wert durch die enzymatisch gebildete Säure wiederherzustellen. Bei der von MEURER und

EWEST angewendeten Methode wird ein bestimmter pH-Wert in der Analysenlösung festgelegt, während die Menge von Natriumhydroxid gemessen wird, die benötigt wird, um diesen pH-Wert konstant zu halten.

Die Analysenvorschrift nach KIMBALL erwies sich für den Nachweis dieses Enzyms in gepresstem Orangensaft als sehr gut geeignet.

### Erstellung einer Kalibrierkurve mit *Rohapect MA Plus HC* (s. Kap. 5.1.1.2)

Die Erstellung einer Kalibrierkurve unter Zuhilfenahme der Aktivität des Enzympräparates *Rohapect MA Plus HC* von AB Enzymes ist in dieser Arbeit nicht gelungen. Grund dafür war, dass mit verschiedenen Verdünnungen dieses Präparates keine Aktivitäten gemessen werden konnten. Schon vor den Untersuchungen stellte die angemessene Verdünnung des Präparates eine Schwierigkeit dar. Das Präparat enthielt nach Herstellerangaben sowohl Pektinesterase als auch Polygalacturonase, wobei die Pektinesterase ausschlaggebend für die Verwendung dieses Präparates für den Kalibrierungsversuch war. Die Gesamtaktivität des Präparates wurde allerdings nur in PGU/ml angegeben. Diese Einheit gibt also nur die Aktivität der Polygalacturonase in einem Milliliter wieder. Die Aktivität der Pektinesterase in einem Milliliter Präparatlösung war unbekannt. Die Verdünnung erfolgte dann mit Hilfe der angegebenen Gesamtaktivität in PGU/ml.

Die Kalibrierungsversuche zeigten jedoch nur die chemische Entesterung des Pektins durch Natriumhydroxid. Möglicherweise war die Konzentration der Pektinesterase zu gering, sodass deren Wirkung von der chemischen Entesterung überlagert wurde. Hinzu kommt, dass die im Präparat enthaltene Pektinesterase aus dem Organismus *Aspergillus* gewonnen wurde. Mikrobielle Pektinmethylsterasen unterscheiden sich von pflanzlichen Pektinmethylsterasen im Abbauverhalten der Methylreste [8]. Pflanzliche Pektinmethylsterasen hinterlassen Blöcke von entesterter Galacturonsäure, die zu einer raschen pH-Absenkung in der Analysenlösung führen [8]. Natriumhydroxid und mik-

robiell gewonnene Pektinmethylsterase führen zu einer statistischen Entesterung des Pektins [8]. Das heißt, nur einzelne Carboxylgruppen werden freigesetzt, sodass eine Absenkung des pH-Wertes nur sehr langsam erfolgt und damit zu langen Zeitmessungen während der Untersuchungen führt.

### Aktivitätsveränderungen während der Lagerung

Die Aktivitätsveränderungen während der Lagerung wurden in einem selbst gepressten Orangensaft über 21 Tage bei 4 °C und in einem Orangenfrischsaft über 8 Tage bei 4 °C gemessen. Die Aktivität der Pektinmethylsterase verringerte sich in beiden Fällen bis zum Ende der Lagerversuche nicht maßgeblich. Dieses Enzym besitzt ein Temperatur-Optimum von 30 bis 40 °C. Bei diesen Temperaturen leistet die Pektinmethylsterase ihren größten Umsatz von Pektin. Bei 4 °C ist dessen Aktivität eingeschränkt, weil sich diese Temperatur weit unter dem Optimum befindet. Dennoch wird auch bei diesen Temperaturen Pektin gespalten, was zur Phasentrennung der Frischsätze im Handel führt, wie es auch bei der Lagerung des selbst gepressten Saftes beobachtet werden konnte.

Viel wahrscheinlicher aber ist die Theorie, dass durch das Absieben des Fruchtfleisches membrangebundene Pektinmethylsterase entfernt wurde. BENEN und VISSER [8] berichten von Pektinmethylsterasen, die in verschiedenen Geweben von Pflanzen gefunden wurden, die sowohl frei im Zellsaft vorliegen als auch durch ionische Wechselwirkungen mit Zellwandproteinen assoziiert werden. Beide Formen sind in der Lage Pektinketten zu demethylieren. Das Absieben des Fruchtfleisches entfernt somit möglicherweise membrangebundene Enzyme der Pektinmethylsterase und führt deshalb zu einer geringeren Aktivität. Versuche mit zentrifugiertem Orangensaft ergaben gar keine Aktivitäten.

Unabhängig von der enzymatischen Aktivität veränderten sich die sensorischen Eigenschaften von selbst gepresstem Orangensaft und Orangenfrischsaft während des Zeitraumes der Lagerung nicht. Beide Säfte besaßen nach 8

bzw. 21 Tagen Lagerung dieselbe orange Farbe wie am Tag der Öffnung bzw. Pressung. Beim Geruch waren keine Veränderungen wahrnehmbar. Der Geschmack kann nicht beurteilt werden, da die Orangensaftproben nicht sensorisch verkostet wurden.

### Aktivitätsbestimmungen in Mischungen aus selbst gepresstem Orangensaft und pasteurisiertem Direktsaft

Es wurden Mischungen aus selbst gepresstem Orangensaft und pasteurisiertem Orangendirektsaft auf das Aktivitätsverhalten der Pektinmethylesterase hin untersucht. Der Grund für diese Untersuchung wird in Kap. 5.1.1.4 erläutert und soll klären, ob es einem Safthersteller möglich ist, den Verbraucher mit solchen Mischungen zu täuschen. Dazu wurden Mischungen mit 5 %, 10 % und 15 % Direktsaft hergestellt und die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen mit der Aktivität des Enzyms in 100 % selbst gepresstem Saft verglichen. Das Fazit dieser Untersuchung war, dass keine Übereinstimmungen mit der gemessenen Aktivität in dem selbst gepressten Orangensaft und den Mischungen ermittelt werden konnten. Das bedeutet, dass die Aktivitäten in den Mischungen jeweils unterhalb der Aktivität im Originalsaft lagen. Diese Untersuchung hat bewiesen, dass Unterschiede bei den Aktivitäten der Pektinmethylesterase in Mischungen aus verschiedenen Säften nachgewiesen werden können. Grundvoraussetzung ist jedoch, dass der 100 % reine Frischsaft aus Orangen zur Verfügung steht. Die darin gemessene Aktivität der Pektinmethylesterase bildet den Richtwert beim Vergleich mit Aktivitäten aus potentiellen Mischungen aus verschiedenen Orangensaften. Da der Originalsaft bei gekauften Produkten, die unter dem Verdacht stehen, Mischungen aus Frisch- und pasteurisiertem Saft zu sein, nicht zur Verfügung steht, gestaltet sich dieser Nachweis schwierig bis unmöglich.

Die Messung der beiden Handelsproben ergab gleiche Enzymaktivitäten. Diese beiden Säfte können jedoch nur ein sehr kleines Spektrum der im Handel be-

findlichen Varietäten wiederspiegeln. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Unterschiede in z.B. Sorte, Reifegrad, Anbaugebiet usw. die Enzymaktivität maßgeblich beeinflussen. Daher ist eine Verallgemeinerung bzw. die Angabe eines festen Wertes für die Aktivität der Pektinmethylesterase in Orangenfrischsäften nicht möglich.

### **Endo-Polygalacturonase**

Grundlegend existiert ein geeignetes Nachweisverfahren für die Aktivität der Endo-Polygalacturonase, bei dem ein Kapillarviskosimeter verwendet wird. Dieses Gerät stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

Eine Aktivität der Endo-Polygalacturonase ließ sich weder im selbst gepressten noch in Orangenfrischsaft nachweisen. Ein Grund dafür ist die Unzweckmäßigkeit einer Messpipette als Ersatz für eine Kapillare. Dass keine Aktivität in den Säften nachgewiesen werden konnte, heißt jedoch nicht, dass keine Endo-Polygalacturonase vorhanden war. Es ist sehr wahrscheinlich, dass deren Aktivität zu gering war, als dass sie mit diesem Versuchsaufbau nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde die Pektinkonzentration in der Substratlösung von 0,4 auf 2 % erhöht, um überhaupt eine Viskositätsabsenkung ermitteln zu können. Jedoch benötigt ein nur in geringer Konzentration vorhandenes Enzym für die Umsetzung einer solchen Pektinmenge mehr Zeit, als für einen Bestimmungszeitraum zwischen zwei Messungen abgewartet wurde. Das bedeutet, dass zwischen diesen zwei Messungen keine Viskositätsänderung gemessen werden kann, die von geringen Enzymmengen eventuell verursacht werden.

Eine weitere Erklärung für die negativen Messergebnisse könnte sein, dass Endo-Polygalacturonase ebenfalls membrangebunden ist und durch die Zentrifugation bzw. Filtration aus dem Saft entfernt wurde. Dadurch wurde deren Konzentration im Saft zusätzlich verringert, was eine Bestimmung mit dieser Methodik noch schwieriger macht. Eine Lösung könnte die Herstellung eines

Enzymextrakte aus dem Orangensaft bieten, bei der die Enzyme aufkonzentriert und gleichzeitig die groben Partikel aus dem Saft eliminiert werden. Möglich wäre auch, dass in der Orangenfrucht gar keine Endo-Polygalacturonase produziert wird und sie deshalb nicht nachweisbar ist. Oder die Frucht enthält eine Exo-Aktivität der Polygalacturonase, die ebenfalls zu einer Viskositätssenkung führt. Dieses Enzym wird jedoch in dem angewendeten Verfahren unterdrückt.

### **Pektinlyase**

Pektinlyase konnte in keinem der beiden Säfte nachgewiesen werden, weil dieses Enzym ein von Mikroorganismen gebildetes Produkt ist. Da diese Säfte zum Zeitpunkt der Messung nicht verschimmelt waren, war keine Pektinlyase vorhanden.

### **Untersuchung der Galacturonsäure-Profile**

Für die Untersuchung von Galacturonsäure-Oligomeren nach enzymatischem Pektinabbau mittels HPAEC-PAD wurde eine geeignete Methode entwickelt. Die optimale Trennung dieser Oligomere gelang unter Verwendung einer geeigneten Chromatographie-Säule und eines angepassten Eluentprogrammes. Dionex®, ein amerikanisches Technologieunternehmen, entwickelte für die Trennung von sauren, langkettigen Kohlenhydraten wie Galacturonsäure die Reihe der CarboPac-Säulen, aus der die CarboPac PA 100 zum Einsatz kam. Diese erlaubt die Trennung und Analyse von Mono-, Oligo- und sogar Polysacchariden und ist besonders für die Oligosaccharid-Auflösung optimiert [24].

### Qualitative und quantitative Analyse der Galacturonsäure-Oligomere

Die qualitative und quantitative Analyse der Mono-, Di- und Tri-Galacturonsäure erfolgte über externe Standardsubstanzen. Die größeren gemessenen Oligomere bis zum Polymerisationsgrad 6 wurden empirisch über den Vergleich von Retentionszeiten qualitativ bestimmt und unter Zuhilfenahme des Slops des Trimers quantifiziert. Die gemessenen Oligomere sind enzymatische Abbauprodukte von Pektin, nach einer Inkubation mit fünf verschiedenen Enzympräparaten über 30 bis 900 Minuten.

Das Galacturonsäure-Monomer wurde im Verhältnis zu den anderen Oligomeren am meisten, das Galacturonsäure-Hexamer am wenigsten gebildet (mit einer Ausnahme bei dem Enzym *Fructozym P-LG*). Dieses Ergebnis lässt sich damit erklären, dass das Monomer das letzte Produkt bei dem Abbau von Pektin ist. Je länger die Inkubationsdauer für die Enzyme ist, desto mehr kann das Pektin durch die Enzyme abgebaut werden und desto mehr Mono-Galacturonsäure entsteht.

Die Verteilung der Oligomere ist von den eingesetzten Enzymen in den Präparaten abhängig, die aus verschiedenen Schimmelpilzarten gewonnen werden. Eine Endo-Polygalacturonase spaltet ein langkettiges Pektinmolekül in kleinere Bruchstücke, die aus Galacturonsäure-Oligomeren bestehen. Eine Exo-Polygalacturonase spaltet einzelne Galacturonsäure-Monomere vom Pektinmolekül ab. Da von der Pektinlyase bis dato nur endo-spaltende Enzyme bekannt sind, besitzt sie dieselbe Wirkung wie eine Endo-Polygalacturonase.

Anhand der Abbildungen in Kap. 5.2.2 ist festzustellen, dass die Angaben der Oligomere nur bis zum Hexamer erfolgten. Zum einen trennt das Programm die höheren Oligomere nicht auf, zum anderen wäre auch denkbar, dass keine höheren Oligomere in der Probe enthalten waren. Nach 900 Minuten Inkubation ist das Pektin soweit abgebaut, dass es ungewöhnlich war, überhaupt noch Oligomere bis zum Polymerisationsgrad 6 nachweisen zu können.

Das Enzympräparat *Fructozym PRESS* von Erbslöh ist nach deren Spezifikation ein pektolytisches Maischeenzym, das Pektininasen enthält. Unter dem Begriff

„Pektinasen“ werden alle Enzyme zusammengefasst, die Pektinsäure abbauen [7]. Pektinsäure stellt die entsterte Form einer Galacturonsäure-Kette im Pektinmolekül dar. Zu den Pektinasen gehören die Endo- und Exo-Polygalacturonase sowie die Pektinlyase. Schaut man sich die Abbildungen des *Fructozym PRESS* in Kap. 5.2.2 an, wird ersichtlich, dass nach 900 Minuten Inkubation der Gehalt an Mono-Galacturonsäure sehr hoch ist. Das spricht für die Anwesenheit einer Exo-Polygalacturonase im Präparat. Ein weiteres Indiz für dieses Enzym ist die Absenkung des Pentamers nach 300 Minuten sowie der über die ganze Zeit geringe Gehalt des Hexamers. Nach 300 Minuten ist das Makromolekül Pektin soweit abgebaut, dass sich nur noch Bruchstücke in der Größe von Oligomeren in der Analysenlösung befinden. Diese Oligomere bilden für die Exo-Polygalacturonase nun die einzige verbleibende Angriffsstelle, sodass zum einen immer mehr Mono-Galacturonsäure entsteht und zum anderen die Oligomere weiter zu Di- oder Tri-Galacturonsäure abgebaut werden. Auch wenn die Messergebnisse auf die Anwesenheit einer Exo-Polygalacturonase hinweisen, muss in dem Präparat auch noch ein endospaltendes Enzym enthalten sein, welches das Pektin in kleinere Untereinheiten spaltet. Eine reine Exo-Aktivität kann in einem Präparat nicht enthalten sein, da es nur Mono-Galacturonsäure bilden würde. Somit wäre es für die Maischeenzymierung ungeeignet, bei der es darauf ankommt, die Pektinlamellen der pflanzlichen Zellwand in Früchten abzubauen, um das Abfließen des Zellsaftes zu erhöhen.

Eine Endo-Polygalacturonase spaltet jedoch nur demethyliertes Pektin. Das setzt voraus, dass sich in dem Präparat noch eine Pektinmethyllesterase befindet, die zuvor die Methylreste an der Galacturonsäure abspaltet.

Diese Zusammensetzung eines pektolytischen Enzympräparates macht es zu einem Präparat für die Enzymierung einer Maische.

Die Enzympräparate *Fructozym P6-L*, *Citrolase TF CLEAR* und *Fructozym COLOR* enthalten nach den Herstellerangaben ebenfalls Pektinasen. Mit diesen Informationen und anhand der Darstellungen in Kap. 5.2.2 ergeben sich für die

Zusammensetzung der Präparate dieselben Enzyme wie für das Präparat *Fructozym PRESS*.

Einzig das Präparat *Fructozym P-LG* zeigt ein anderes Abbauverhalten und damit ein anderes Galacturonsäure-Profil als die anderen Präparate. Dieses Präparat enthält laut Herstellerangaben Pektinase zur Fruchtsaftklärung mit besonders geringer Freisetzung von Mono-Galacturonsäure. Diese Angabe spiegelt sich auch in den Untersuchungsergebnissen wieder. Im Gegensatz zu den anderen Präparaten bildete dieses nur einen Bruchteil an Mono-Galacturonsäure. Auch die anderen Oligomere wurden kaum gebildet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Präparat keinen oder nur einen gerin- gen Anteil an endo-spaltenden Enzymen aufweist. Wenn es sich dabei um eine Endo-Polygalacturonase handelt, enthält das Präparat auch noch eine Pektinmethyllesterase. Handelt es sich jedoch um eine endo-spaltende Pektinlyase, ist die Anwesenheit einer Pektinmethyllesterase nicht notwendig.

### **Enzymaktivierung in Frischsäften ohne Pasteurisation**

Noch immer steht die Frage, warum ein pasteurisierter Orangensaft qualitativ minderwertiger sein soll als ein Orangenfrischsaft, der nicht wärmebehandelt wurde. Betrachtet man in diesem Zusammenhang einen frisch gepressten Apfelsaft, wäre dieser unpasteurisiert, unmöglich zu verkaufen. Das „Fruchtwasser“ des Apfels ist direkt nach dem Pressen grün und grasig in Geruch und Geschmack und besitzt ein schaumiges Aussehen. Erst durch die Behandlung des Apfelsaftes entwickeln sich die typische Farbe und das Aroma.

Da die Pasteurisation des Orangensaftes für den Kunden Veränderungen im Geschmack verursachen [2], wird in der Fruchtsafttechnologie nach anderen Möglichkeiten gesucht, Mikroorganismen ohne Hitzeeinwirkung abzutöten und Enzyme ohne Hitzeeinwirkung zu inaktivieren. SCHILLING et. al [32] berichteten über die steigende Nachfrage nach minimal verarbeiteten Lebens-

mitteln und über den steigenden Bedarf von nichtthermischen Verarbeitungsmethoden zur Herstellung von Fruchtsäften. Sie vergleichen den Prozess des PEF (engl.: Pulsed Electric Field = gepulstes elektrisches Feld) mit der thermischen Behandlung eines Apfelsaftes unter der Berücksichtigung der Saftqualität und Enzymaktivierung. Die Wirkung der elektrischen Impulse auf die Enzyme zeigt sich dabei durch eine irreversible Verformung der Struktur der Enzyme. Diese Verformung ist abhängig von der elektrischen Feldstärke, Impulsdauer und Behandlungstemperatur. SCHILLING et al. [32] untersuchten diese Verfahren anhand von Peroxidasen, die für die Bräunung im Apfelsaft verantwortlich sind. Sie zeigten in den Untersuchungsergebnissen, dass diese Enzyme nur durch einen Synergieeffekt aus Hitze und PEF vollständig inaktiviert werden konnten. Daher ist auch von einer Inaktivierung der Pektinmethyltransferase nur dann auszugehen, wenn die Behandlungstemperatur während des PEF zwischen 55 und 65 °C liegt [32]. Folglich kommt auch das Verfahren des PEF in der Praxis nicht ohne mäßige Hitze aus. Im Vergleich dazu liegen die Temperaturen bei der Pasteurisation von Orangensaften zwischen 82 und 90 °C [1].

## 7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit pektolytischen Enzymaktivitäten in selbst gepressten Orangensaften und Orangenfrischsaften sowie der Untersuchung von Galacturonsäure-Oligomeren mittels HPAEC-PAD.

Ein Ziel dabei war es, die Änderung der Enzymaktivitäten von Pektinmethyl-esterase, Endo-Polygalacturonase und Pektinlyase in selbst gepressten Orangensaften und Orangenfrischsaften während Lagerung bei 4 °C zu bestimmen. Die Aktivität der Pektinmethyl-esterase im selbst gepressten Orangensaft sowie im gekauften Frischsaft zeigte keine Veränderung.

Die Bestimmung der Endo-Polygalacturonase wurde mit einer Messpipette durchgeführt, da ein Kapillarviskosimeter nicht zur Verfügung stand. Es konnte keine Aktivität festgestellt werden. Die Anwesenheit von Endo-Polygalacturonase in Orangensaften kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Pektinlyase konnte in keinem der beiden Säfte nachgewiesen werden, weil dieses Enzym ein von Mikroorganismen gebildetes Produkt ist. Da diese Säfte zum Zeitpunkt der Messung nicht verschimmelt waren, war keine Pektinlyase vorhanden.

Ein weiteres Ziel bestand darin, herauszufinden, ob eine Täuschung des Verbrauchers durch Mischungen aus selbst gepresstem Orangensaft und pasteurisiertem Orangendirektsaft möglich ist. Dazu wurden drei verschiedene Mischungen hergestellt und auf die Aktivität der Pektinmethyl-esterase untersucht. In allen drei Mischungen war die gemessene Aktivität niedriger als im Originalsaft. Da jedoch unterschiedliche Frischsafte bereits verschiedene Enzymaktivitäten aufweisen, kann eine Täuschung des Verbrauchers ohne die Untersuchung des Originalsaftes jedoch nicht sicher erkannt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine geeignete Methode für die Bestimmung von Oligomeren der Galacturonsäure erarbeitet. Die Oligomere entste-

hen beim Abbau von Pektin durch die Einwirkung von Enzymen. Eine zuvor bestehende Methode für die Bestimmung von Zuckern und Mono-Galacturonsäure wurde durch die Anpassung der Eluentzusammensetzung und die Verlängerung des Trennprogrammes für die Bestimmung der Oligomere optimiert. Anhand von Galacturonsäure-Profilen nach Abbau von Pektin durch fünf Enzympräparate wurde die Eignung des neuen Trennprogrammes zur Auf trennung der Oligomere bis hin zum Hexamer der Galacturonsäure nachgewiesen.

## 8 Ausblick

Weiterer Forschungsbedarf ergibt sich bei der Erstellung einer Kalibrierkurve für die Aktivitätsbestimmung der Pektinmethylesterase. AB Enzymes führt ein Präparat, das eine reine Pektinmethylesterase enthält. Mit diesem Präparat sollte der Versuch einer Kalibrierung erneut durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wird über Pektinmethylesterase berichtet, die membrangebunden sind und eventuell durch das Absieben von Fruchtfleisch aus Orangensaft entfernt wurden. In diesem Zusammenhang wäre es lohnenswert Pektinmethylesterase-Bestimmungen mit ungesiebtem Orangensaft oder Enzymextrakten durchzuführen.

Hinsichtlich der möglichen Täuschung des Verbrauchers durch Mischungen aus Frisch- und pasteurisierten Säften wären Untersuchungen weiterer Frischsäfte und selbst gepresster Säfte unterschiedlicher Varietät, Reifegrade, Herkunft und Verarbeitung wichtig.

Auf Grund des Fehlens eines Kapillarviskosimeters konnte das Enzym Endo-Polygalacturonase in den Orangensaften nicht nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt bietet also weiteren Forschungsbedarf, z.B. durch die Herstellung eines Enzymextraktes aus dem Orangensaft und der anschließenden Untersuchung mit einem Kapillarviskosimeter.

## Verzeichnisse

### Literaturverzeichnis

- [1] Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V.:  
<http://www.fruchtsaft.net>. 12.11.2013
- [2] **Millies, K. D.**: Neue Erkenntnisse zur Technologie, zur Qualität und Deklaration von Frischsäften. Flüssiges Obst. Heft 8, 1990
- [3] **Kressmann, R.**: Die chemische Zusammensetzung der löslichen Kolloide im Saft von schwarzen Johannisbeeren und deren Auswirkung auf die Verarbeitungstechnologie. Justus-Liebig-Universität. Giesen: Dissertation, 2001
- [4] **Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E.**: Biologie der Pflanzen. 4. Aufl. de Gruyter, 2006
- [5] **Schobinger, U.**: Frucht- und Gemüsesäfte. 3. Aufl. Stuttgart (Hohenheim), Ulmer Verlag, 2001
- [6] **Pektowin: Gospodarcza, O.W.**: Niederveresterte amidierte Pektine: Einführung. [www.pektowin.com.pl/images/nisko5.gif](http://www.pektowin.com.pl/images/nisko5.gif). 23.10.2013
- [7] **Baltes, W.**: Lebensmittelchemie. 6. Aufl. Berlin (Heidelberg), Springer Verlag, 2007
- [8] **Benen, J.A.E.; Visser, J.**: Pectic Esterases. Handbook of Food Enzymology. Chapter 68, 2002
- [9] **Benen, J.A.E.; Visser, J.**: Polygalacturonases. Handbook of Food Enzymology. Chapter 69, 2002
- [10] **Benen, J.A.E.; Visser, J.**: Pectate and Pectin Lyases. Handbook of Food Enzymology. Chapter 80, 2002
- [11] **Belcheva, D.**: Theoretische und experimentelle Studie der Gradienten-Gegenstromchromatographie unter linearen Bedingungen. Otto-von-Guericke-Universität. Magdeburg: Dissertation, 2004
- [12] **Weiβ, J.**: Ionenchromatographie. 2. erw. Aufl. Weinheim, VCH, 1991

- [13] **Strasser, M.**: Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysensysteme. Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Basel: Dissertation, 2002
- [14] **Kimball, D.A.**: Citrus Processing: Quality Control and Technology. New York, AVI Book, 1991
- [15] **Meurer, P.**: Einfluss pflanzeneigener Enzyme und anderer Faktoren auf die Textur fermentierter Gurken. Fakultät für Allgemeine und Angewandte Naturwissenschaften, Hohenheim: Dissertation, 1991
- [16] **MacMillan, J.D.; Vaughn R.H.**: Purification and properties of a poly-galacturonic acid-*trans*-eliminase produced by *Clostridium multifermentes*. Biochemistry, Vol. 3, 564-572, 1964
- [17] **Walter, J.**: Determination of low pectin lyase activities in fresh and pasteurized cucumbers. University of Applied Sciences, Neubrandenburg: Master Project, 2012
- [18] Dionex Corporation: Product Manual for MA 1, PA 1, PA 10, PA 100. Mai 2010 <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4375-Man-031824-08-CarboPac-Combined-May10.pdf>. 24.11.2013
- [19] **Uremovic, A.; Glawischnig, T.D.; Schuseil, J.; Saake, B.; Borchmann, A.; Herrmann, A.; Puls, J.**: Chromatographische Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der Holzzucker. Holz als Roh- und Werkstoff, Vol. 5, 347-354, 1994
- [20] **Sakai, T.**: Degradation of pectins. In: Winkelmann, G.: Microbial degradation of natural products. Weinheim, VCH, 1992
- [21] **Versteeg, C.**: Pectinesterases in the orange fruit – their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. Wageningen University. Wageningen: PhD thesis, 1979
- [22] **Bergmann, J.F.**: pH-statische Pektinesterase-Bestimmung in Süßkirschen. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, Vol. 157, 23-27, 1975

- [23] **Hotchkiss, A.T.; El-Bahtmy, K.; Fishman, M.L.**: Analysis of Pectin Structure by HPAEC-PAD. *Plant Cell Wall Analysis*, Vol. 17, 129-146, 1996
- [24] Dionex Corporation: Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)  
[http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20\\_LPN032857-04.pdf](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20_LPN032857-04.pdf)  
25.11.2013, Oktober 2004
- [25] **Whitehurst, R.J.; Law, B.A.**: Enzymes in Food Technology. Sheffield, Sheffield Academic Press, 2002
- [26] **Gomori, G.**: Methods of Enzymology: Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. New York, Academic Press, 1955
- [27] **Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.**: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. Aufl. Berlin, Springer Verlag, 2001
- [28] **Coenen, G.J.**: Structural characterization of native pectins. Wageningen University, Wageningen: Dissertation, 2007
- [29] **Lee, Y.C.**: Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 27, 137-149, 1996
- [30] **Krause, M.; Bock, W.**: Zur Bestimmung und Charakterisierung der Pektinstoffe in Obst und Gemüse. *Ernährungsforschung*, Vol. 18, 111-123, 1973
- [31] **Ewest, S.**: Bestimmung der Aktivität von pectolytischen Enzymen im Apfel. Hochschule Neubrandenburg. Neubrandenburg: Diplomarbeit, 2009
- [32] **Schilling, S.; Schmid, S.; Jäger, H.; Ludwig, M.; Dietrich, H.; Toepfl, S.; Knorr, D.; Neidhart, S.; Schieber, A.; Carle, R.**: Comparative Study of Pulsed Electric Field and Thermal Processing of Apple Juice with Particular Consideration of Juice Quality and Enzyme Deactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, 4545-4554, 2008
- [33] **Attaway, J.A.; Carter, R.D.; Fellers, P.J.**: Die Herstellung und Behandlung von fisch geprefstem, nicht pasteurisiertem Orangesaft. Flüssiges Obst, Heft 10, 606-612, 1989

- [34] **Ruttloff, H.**: Entwicklungstrends der Anwendung von Enzymen bei der Lebensmittelproduktion. *Die Nahrung*, Vol. 22, 883-906, 1978
- [35] **Sauer, E.; Sanzenbacher, K.**: Pektin als Schutzkolloid. *Kolloid-Zeitschrift*, Band 79, Heft 1, 1937
- [36] International Federation of Fruit Juice Producers: Determination of Galacturonic acid using High Performance Anion Exchange Chromatography. No. 78, Sept. 2004
- [37] **Hübschmann, U.; Links, E.**: Einführung in das chemische Rechnen. 8. Aufl. Handwerk und Technik, Hamburg, 2000

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Herstellungsprozess von der Orange bis zum Saft	13
Abbildung 2: Struktur des Pektinmoleküls	16
Abbildung 3: D-Galacturonsäuremolekül in Haworth-Schreibweise	17
Abbildung 4: Angriffspunkt der Pektinmethylesterase	19
Abbildung 5: Angriffspunkte der Endo-Polygalacturonase	20
Abbildung 6: Spaltungsreaktion der Pektinlyase	21
Abbildung 7: Modell einer HPLC-Anlage	23
Abbildung 8: Modell zum Versuchsaufbau der Pektinmethylesterase-Bestimmung	28
Abbildung 9: Chromatogramm eines Standards in einer Carbopac PA 100-Säule mit PAD-Detektion	36
Abbildung 10: Aktivitätsbestimmungen der PME in selbst gepresstem Orangensaft und Orangenfrischsaft; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	40
Abbildung 11: Zeitmessungen von fünf Verdünnungen des Handelspräparates; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	41
Abbildung 12: Zeitmessungen von zwei Verdünnungen des Handelspräparates mit letztem Verdünnungsschritt im Saft, Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	42
Abbildung 13: Zeitmessungen in selbst gepresstem Orangensaft, Enzympräparat und Wasser im Vergleich; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	44
Abbildung 14: Aktivitätsveränderungen der Pektinmethylesterase in selbst gepresstem Orangensaft innerhalb von 21 Tagen; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	46
Abbildung 15: Vergleich der Aktivitäten von gelagertem gepresstem Orangensaft und einer gelagerten Orange; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	47

Abbildung 16: Aktivitätsveränderungen der Pektinmethyllesterase in Orangenfrischsaft innerhalb von 8 Tagen; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	48
Abbildung 17: Aktivitätsbestimmungen in Mischungen aus selbst gepresstem Orangensaft (= s.g. Saft) und Orangendirektsaft	50
Abbildung 18: Vergleich der Enzymaktivitäten von frisch gepresstem Saft mit zwei Frischsäften aus dem Handel; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	51
Abbildung 19: Ablaufzeiten des ersten Enzymversuches; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	53
Abbildung 20: Ablaufzeiten des zweiten Enzymversuches; Fehlerbalken = Standardabweichung der 3-fach Messungen	54
Abbildung 21: Extinktionsänderung von selbst gepresstem Orangensaft und Substratlösung über einen Zeitraum von 3 Minuten, der Orangenfrischsaft ist auf der Sekundärachse wiedergegeben	56
Abbildung 22: Chromatogramm eines Standardlaufes in 105 Minuten mit Eluent B = 1 N Natriumhydroxid und C = 0,5 N Natriumacetat; 1 = Mono-Galacturonsäure, 2 = Di-Galacturonsäure, 3 = Tri-Galacturonsäure	59
Abbildung 23: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure über einen Zeitraum von 900 Minuten Inkubation (Fructozym PRESS)	61
Abbildung 24: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer im Laufe von 900 Minuten (Fructozym PRESS)	62
Abbildung 25: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym PRESS)	63
Abbildung 26: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Fructozym P6-L)	64
Abbildung 27: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Fructozym P6-L)	65
Abbildung 28: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym P6-L)	66

Abbildung 29: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Citrolase TF CLEAR)	67
Abbildung 30: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Citrolase TF CLEAR)	68
Abbildung 31: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Citrolase TF CLEAR)	69
Abbildung 32: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Fructozym COLOR)	70
Abbildung 33: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Fructozym COLOR)	70
Abbildung 34: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym COLOR)	71
Abbildung 35: Anstieg der Peakfläche der Mono-Galacturonsäure im Laufe von 900 Minuten Inkubation (Fructozym P-LG)	72
Abbildung 36: Anstieg der Peakflächen vom Dimer bis zum Hexamer über einen Zeitraum von 900 Minuten (Fructozym P-LG)	72
Abbildung 37: Verteilung der Galacturonsäure-Oligomere nach 120 Minuten Inkubation anhand der Peakflächen (Fructozym P-LG)	73

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht der Enzympräparate, die für die Abbauversuche eingesetzt wurden	31
Tabelle 2: Übersicht der Dosagen der fünf Enzympräparate	32
Tabelle 3: Angaben für die Herstellung der Eluenten	35
Tabelle 4: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft	107
Tabelle 5: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft von Kaisers	107
Tabelle 6: Zeitmessung der Enzymlösung (1.000.000 PGU/10 ml)	107
Tabelle 7: Zeitmessung der Enzymlösung (100.000 PGU/10 ml)	108
Tabelle 8: Zeitmessung der Enzymlösung (1000 PGU/10 ml)	108
Tabelle 9: Zeitmessung der Enzymlösung (100 PGU/10 ml)	108
Tabelle 10: Zeitmessung der Enzymlösung (10 PGU/10 ml)	109
Tabelle 11: Zeitmessung der Enzymlösung (10.000 PGU/10 ml)	109
Tabelle 12: Zeitmessung der Enzymlösung (10 PGU/10 ml)	109
Tabelle 13: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 0)	110
Tabelle 14: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 2)	110
Tabelle 15: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 5)	110
Tabelle 16: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 8)	111
Tabelle 17: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 12)	111
Tabelle 18: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 16)	111
Tabelle 19: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 21)	112
Tabelle 20: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 21 bei RT)	112

Tabelle 21: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 0)	112
Tabelle 22: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 1)	113
Tabelle 23: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 2)	113
Tabelle 24: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 3)	113
Tabelle 25: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 4)	114
Tabelle 26: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 7)	114
Tabelle 27: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 8)	114
Tabelle 28: Aktivitätsbestimmung in Mischung Direktsaft/selbst gepresster Saft (5%/95%)	115
Tabelle 29: Aktivitätsbestimmung in Mischung Direktsaft/selbst gepresster Saft (10%/90%)	115
Tabelle 30: Aktivitätsbestimmung in Mischung Direktsaft/selbst gepresster Saft (15%/85%)	115
Tabelle 31: Blindwerte der Pektin-/Wasserlösung	116
Tabelle 32: Ablaufzeiten der Pektinlösung und selbst gepresstem Orangensaft im ersten Versuch	116
Tabelle 33: Ablaufzeiten der Pektinlösung und Enzimlösung	117
Tabelle 34: Ablaufzeiten der Pektinlösung und Enzimlösung	117
Tabelle 35: Ablaufzeiten von Pektinlösung und Orangenfrischsaft nach Inkubation	117
Tabelle 36: Ablaufzeiten von Pektinlösung und selbst gepresstem Orangensaft nach Inkubation	118

Tabelle 37: Referenzmessung gegen Substratlösung mit entionisiertem Wasser	118
Tabelle 38: Extinktionsmessung von selbst gepresstem Orangensaft und Substratlösung über einen Zeitraum von 3 Minuten	118
Tabelle 39: Extinktionsmessung von Orangenfrischsaft und Substratlösung über einen Zeitraum von 3 Minuten	119
Tabelle 40: Peakflächen von Galacturonsäure-Oligomeren nach 30, 120, 300 und 900 Minuten enzymatischem Pektinabbau	119

## Anhang

### A Rezepturen und Durchführung der Aktivitätstests

#### Bestimmung der Pektinmethylesterase

##### Pektinlösung 1 %

1000 ml

- 15,3 g Natriumchlorid (BAKER)
- 1000 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O
- 10 g Citruspektin (Sigma-Aldrich)

Natriumchlorid in 1000 ml Becherglas geben und mit 800 mL entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen. Becherglas auf einen beheizbaren Magnetrührer stellen, Natriumchlorid lösen und Temperatur auf 60 °C einstellen. 10 g Citruspektin abwiegen und vorsichtig in die NaCl-Lösung streuen. Pektin vollständig lösen und anschließend auf 20 °C temperieren. Mit 0,05 N und 2,0 N Natronlauge auf pH 5,70 einstellen. Lösung in einen 1000 ml Messkolben quantitativ überführen und mit entionisiertem H<sub>2</sub>O bis zur Marke auffüllen.

##### Vorbereitung des Saftes

jeweils 50 ml

- frisch gepresster Orangensaft
- wärmeunbehandelter Frischsaft aus dem Handel
- pasteurisierter Orangendirektsaft

Säfte, die Fruchtfleisch enthalten, werden vor dem Test gesiebt.

##### Aktivitätstest

- 40 ml Pektinlösung
- 10 ml Orangensaft

Wasser in ein 250 ml Becherglas füllen und mit einem Magnetrührer auf 30 °C temperieren. Ein 100 ml Becherglas hineinstellen (inkl. Rührfisch) und

40 ml Pektinlösung (30 °C) hinein pipettieren. Die pH-Elektrode in die Pektinlösung tauchen und 10 ml Saft in das Becherglas pipettieren. Den pH-Wert zügig auf pH 7,70 einstellen. Anschließend sofort 0,1 mL Natronlauge (0,05 N) zugeben und gleichzeitig die Stoppuhr starten. Messung der Zeit, die benötigt wird, um die Natronlauge zu neutralisieren und der pH-Wert wieder bei 7,70 liegt. Es wird jeweils eine 3-fach Bestimmung durchgeführt.

Die Enzymaktivität wird als Pektinmethylesterase-Einheit (PEU/min) angegeben [14]:

$$\frac{\text{PEU}}{\text{min}} = \frac{0,05 \text{ M NaOH} \cdot 0,10 \text{ mL NaOH}}{10 \text{ mL Probe} \cdot \text{Zeit in min}}$$

### **Bestimmung der Endo-Polygalacturonase**

#### Pektinlösung 2 %

200 mL, 0,15 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,50

- 3,842 g Citronensäure (Sigma-Aldrich)
- 14,34 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (MERCK)
- 4 g Citruspektin
- 400 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O

Citronensäure (A) und di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (B) exakt abwiegen und jeweils in 100 ml entionisiertem H<sub>2</sub>O lösen. 41,25 ml von A und 56,96 ml von B in 250 ml ein Becherglas pipettieren und bis 150 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen. Das Becherglas auf einen Magnetrührer stellen und unter Rühren auf 60 °C erhitzen. Citruspektin abwiegen und vorsichtig in die Pufferlösung streuen. Das Pektin vollständig lösen und anschließend auf 20 °C temperieren. Den pH-Wert überprüfen und ggf. mit A oder B einstellen. Die Lösung quantitativ in einen 200 ml Messkolben überführen und mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.

Vorbereitung des Saftes

jeweils 10 ml

- frisch gepresster Orangensaft
- wärmeunbehandelter Frischsaft aus dem Handel
- pasteurisierter Orangendirektsaft

Säfte, die Fruchtfleisch enthalten, werden vor dem Test gesiebt.

Aktivitätstest

- 10 ml Pektinlösung
- 2 ml Saft

Die Pektinlösung wird zuvor auf 30 °C temperiert. Im Becherglas werden 1000 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O auf einem Magnetrührer auf 30 °C temperiert. 10 ml Pektinlösung und 2 ml Saft werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und danach sofort die Stoppuhr (3 Minuten) gestartet. Das Reaktionsgefäß wird mit Hilfe einer Stativklemme mit Muffe in das Becherglas gehängt. Nach 3 Minuten wird die erste Probe entnommen und vermessen (t<sub>1</sub>). Die Stoppuhr wird auf eine Stunde neu gestartet. 1 ml Probenlösung wird aufgezogen und mit einer zweiten Stoppuhr die Zeit gemessen, die die Flüssigkeit benötigt um herauszulaufen. Der Auslauf wird verworfen. Nach einer Stunde erfolgt die zweite Messung (t<sub>2</sub>). Der Blindwert (t<sub>0</sub>) wird mit der Pektinlösung und entionisiertem H<sub>2</sub>O ermittelt, im selben Verhältnis wie die Saft/Pektin-Probe (5 ml + 1 ml).

Für die Berechnung ergibt sich der Kehrwert der spezifischen Viskosität aus den verschiedenen Ablaufzeiten [15]:

$$\Delta \frac{1}{\eta_{\text{spez}}} = \frac{t_0}{t_2 - t_0} - \frac{t_0}{t_1 - t_0}$$

t<sub>0</sub> Ablaufzeit des Blindwertes

t<sub>1</sub> Ablaufzeit der Saft/Pektin-Probe nach 3 Minuten

---

$t_2$  Ablaufzeit der Saft/Pektin-Probe nach einer Stunde

Eine Einheit Endo-Polygalacturonase entspricht der Menge Enzym, die den Kehrwert der spezifischen Viskosität einer Pektinlösung in 60 Minuten um 0,001 Einheiten senkt [15]:

$$\frac{U_{\text{Endo-PG}}}{\text{min}} = \frac{\Delta \frac{1}{\eta_{\text{spez}}}}{0,001 \cdot 60 \text{ Minuten}}$$

### **Bestimmung der Pektinlyase**

#### Pektinlösung 0,2 %

100 mL Acetat-Puffer, pH 5,80

- 1,155 ml Eisessig
- 1,64 g Natrium-Acetat (MERCK)
- 0,5 g Natriumpolygalacturonat (Sigma-Aldrich)
- 300 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O

Eisessig (A) in 100 ml Messkolben pipettieren sowie Natrium-Acetat (B) in einen zweiten 100 ml Messkolben geben und jeweils mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen. 5,0 ml von A und 46,8 ml von B in ein 125 ml Becherglas pipettieren und auf einen Magnetrührer stellen. Natriumpolygalacturonat exakt einwiegen und im Acetat-Puffer lösen. Anschließend pH-Wert überprüfen und ggf. mit A oder B korrigieren. Lösung in 100 ml Messkolben quantitativ überführen und mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen. Dann wird die Lösung über eine G3-Fritte abgenutscht, um eine klare Flüssigkeit zu erhalten.

#### Vorbereitung des Saftes

jeweils 5 ml

- frisch gepresster Orangensaft
- wärmeunbehandelter Frischsaft aus dem Handel
- pasteurisierter Orangendirektsaft

Säfte, die Fruchtfleisch enthalten, werden zuvor gesiebt. Anschließend wird der Saft über eine Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Sephadex® G-25 columns) unter Vakuum aufgereinigt.

#### Aktivitätstest

- 2,5 ml Natriumpolygalacturonat-Lösung
- 0,1 ml Saft

Natriumpolygalacturonat-Lösung auf 30 °C temperieren. In einer Quarzglas-Küvette 2,5 ml Substratlösung und 0,1 ml Saft mischen und mehrere Messungen im 1-Minuten-Takt bei 235 nm durchführen. Die Messung erfolgte gegen Substratlösung mit 0,1 ml entionisiertem Wasser.

Die Berechnung einer Pektinlyase-Einheit (PLU/min) für die Extinktionsänderung innerhalb einer Minute im linearen Bereich [17]:

$$\frac{\text{PLU}}{\text{mL}} = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{total}}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{\text{ES}}} \cdot VF$$

$\Delta E$  Extinktionsänderung in einer Minute [1/Minute]

$V_{\text{total}}$  absolutes Volumen [mL]

$\varepsilon$  molarer Extinktionskoeffizient [5200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]

$d$  Durchmesser der Küvette [cm]

$V_{\text{ES}}$  Volumen der Enzymlösung [mL]

$VF$  Verdünnungsfaktor (0,1 ml Saft + 2,5 ml Substratlösung  $\cong 26$ )

## **HPAEC-Untersuchung**

### Herstellung der Fließmittel

- 104 ml Natriumhydroxid (50 %ig)
- 82,0 g Natrium-Acetat
- Reinstwasser (18,2 MΩ/cm)

Ein 5 l-Eluentgefäß und zwei 2 l-Eluentgefäße jeweils mit Reinstwasser füllen. Anschließend das Wasser für 15 Minuten entgasen. Danach 104 ml Natriumhydroxid in das zweite Gefäß pipettieren und 82 g Natrium-Acetat in das dritte Gefäß füllen. Beide Gefäße verschließen und vorsichtig schütteln. Alle Eluenten noch einmal für 15 Minuten entgasen. Anschließend die Anlage vollständig mit allen Fließmitteln spülen.

### Herstellung der Stammlösungen

jeweils 100 ml

- 0,0109 g Galacturonsäure Monohydrat ( $\geq 97\%$ )
- 0,0073 g Di-Galacturonsäure ( $\geq 85\%$ )
- 0,268 g Tri-Galacturonsäure ( $\geq 90\%$ )

Alle Substanzen exakt abwiegen und mit Reinstwasser jeweils in 100 ml Messkolben quantitativ überführen. Im Ultraschallbad auflösen und auffüllen. Alle drei Stammlösungen jeweils in 100 ml Weithalsflaschen überführen, etikettieren und tiefgefroren lagern.

### Herstellung der Standardlösung

10 ml

- 2 ml Galacturonsäure-Lösung
- 5 ml Di-Galacturonsäure-Lösung
- 1 ml Tri-Galacturonsäure-Lösung

In einen 10 ml Messkolben die entsprechenden Volumina aus den drei Stammlösungen pipettieren und mit Reinstwasser auffüllen. Nach gründli-

chem Schütteln in Vials abfüllen, verschließen und bis zum Gebrauch tiefgefroren lagern.

## B Ergebnisse

### Bestimmung der Pektinmethylesterase-Aktivität

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70

40 ml Pektinlösung/10 ml selbst gepresster  
Orangensaft (gesiebt)

Tabelle 4: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,08E-03	1,63E-03	1,40E-03
Mittelwert	1,37E-03		
Standardabweichung	2,76E-04		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70

40 ml Pektinlösung/10 ml selbst gepresster  
Orangensaft (gesiebt)

Tabelle 5: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft von Kaisers

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,95E-03	1,98E-03	1,83E-03
Mittelwert	1,92E-03		
Standardabweichung	6,20E-05		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70

40 ml Pektinlösung/10 ml Enzymlösung  
1000.000 PGU/10 ml (in Wasser)

Tabelle 6: Zeitmessung der Enzymlösung (1.000.000 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	15,19	-	-
Mittelwert	-		
Standardabweichung	-		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Enzymlösung  
 100.000 PGU/10 ml (in Wasser)

Tabelle 7: Zeitmessung der Enzymlösung (100.000 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	11,86	11,17	11,59
Mittelwert	11,54		
Standardabweichung	0,2816		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Enzymlösung  
 1000 PGU/10 ml (in Wasser)

Tabelle 8: Zeitmessung der Enzymlösung (1000 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	12,87	12,44	13,18
Mittelwert	12,82		
Standardabweichung	0,2976		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Enzymlösung  
 100 PGU/10 ml (in Wasser)

Tabelle 9: Zeitmessung der Enzymlösung (100 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	11,94	11,78	11,56
Mittelwert	11,75		
Standardabweichung	0,1556		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Enzimlösung  
 10 PGU/10 ml (in Wasser)

Tabelle 10: Zeitmessung der Enzimlösung (10 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	12,96	13,28	12,83
Mittelwert	13,02		
Standardabweichung	0,1884		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Enzimlösung  
 10.000 PGU/10 ml (letzter Verdünnungsschritt im Saft)

Tabelle 11: Zeitmessung der Enzimlösung (10.000 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	7,24	5,77	5,15
Mittelwert	6,05		
Standardabweichung	0,8764		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 7,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Enzimlösung  
 10 PGU/10 ml (letzter Verdünnungsschritt im Saft)

Tabelle 12: Zeitmessung der Enzimlösung (10 PGU/10 ml)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Zeitmessung [min]	5,76	7,67	8,40
Mittelwert	7,27		
Standardabweichung	1,1125		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 0/Messung 1

Tabelle 13: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 0)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,85E-03	2,00E-03	1,96E-03
Mittelwert		1,94E-03	
Standardabweichung		6,30E-05	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 2/Messung 2

Tabelle 14: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 2)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,39E-03	1,38E-03	1,39E-03
Mittelwert		1,39E-03	
Standardabweichung		5,00E-06	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 5/Messung 3

Tabelle 15: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 5)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,22E-03	1,10E-03	1,35E-03
Mittelwert		1,22E-03	
Standardabweichung		1,03E-04	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 8/Messung 4

Tabelle 16: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 8)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,42E-03	1,53E-03	1,53E-03
Mittelwert		1,49E-03	
Standardabweichung		5,10E-05	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 12/Messung 5

Tabelle 17: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 12)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,33E-03	1,32E-03	1,31E-03
Mittelwert		1,32E-03	
Standardabweichung		1,00E-05	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 16/Messung 6

Tabelle 18: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 16)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,71E-03	1,63E-03	1,44E-03
Mittelwert		1,59E-03	
Standardabweichung		1,13E-04	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 21/Messung 7

Tabelle 19: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 21)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,12E-03	1,01E-03	1,21E-03
Mittelwert	1,11E-03		
Standardabweichung	8,40E-05		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 21 Tage gelagerte Orange *Valencia* bei RT

Tabelle 20: Aktivitätsbestimmung in selbst gepresstem Orangensaft (Lagerversuch Tag 21 bei RT)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	2,27E-03	2,17E-03	2,25E-03
Mittelwert	2,23E-03		
Standardabweichung	4,30E-05		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 0/Messung 1

Tabelle 21: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 0)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,14E-03	1,49E-03	1,16E-03
Mittelwert	1,27E-03		
Standardabweichung	1,60E-04		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 1/Messung 2

Tabelle 22: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 1)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	5,80E-04	1,27E-03	1,23E-03
Mittelwert		1,03E-03	
Standardabweichung		3,15E-04	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 2/Messung 3

Tabelle 23: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 2)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	9,90E-04	1,26E-03	/
Mittelwert		1,12E-03	
Standardabweichung		1,37E-04	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 3/Messung 4

Tabelle 24: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 3)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	2,02E-03	2,36E-03	2,46E-03
Mittelwert		2,28E-03	
Standardabweichung		1,91E-04	

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 4/Messung 5

Tabelle 25: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 4)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,15E-03	1,15E-03	1,62E-03
Mittelwert	1,31E-03		
Standardabweichung	2,22E-04		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 7/Messung 6

Tabelle 26: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 7)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,15E-03	1,26E-03	9,60E-04
Mittelwert	1,12E-03		
Standardabweichung	1,25E-04		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 Tag 8/Messung 7

Tabelle 27: Aktivitätsbestimmung in Orangenfrischsaft (Lagerversuch Tag 8)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,75E-03	1,74E-03	1,68E-03
Mittelwert	1,72E-03		
Standardabweichung	3,00E-05		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 5 % Direktsaft, 95 % selbst gepresster Saft

Tabelle 28: Aktivitätsbestimmung in Mischung Direktsaft/selbst gepresster Saft (5%/95%)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,95E-03	1,79E-03	1,67E-03
Mittelwert	1,80E-03		
Standardabweichung	1,14E-04		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 10 % Direktsaft, 90 % selbst gepresster Saft

Tabelle 29: Aktivitätsbestimmung in Mischung Direktsaft/selbst gepresster Saft (10%/90%)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,46E-03	1,57E-03	1,43E-03
Mittelwert	1,49E-03		
Standardabweichung	6,20E-05		

Versuchsbedingungen: Pektinlösung 1 %ig, pH 5,70  
 40 ml Pektinlösung/10 ml Orangensaft (gesiebt)  
 15 % Direktsaft, 85 % selbst gepresster Saft

Tabelle 30: Aktivitätsbestimmung in Mischung Direktsaft/selbst gepresster Saft (15%/85%)

	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Aktivität [PEU/min]	1,28E-03	1,28E-03	1,30E-03
Mittelwert	1,29E-03		
Standardabweichung	6,00E-06		

## Bestimmung der Endo-Polygalacturonase-Aktivität

Tabelle 31: Blindwerte der Pektin-/Wasserlösung

Blindwertversuch	1	27,0
	2	26,5
	3	26,5
	4	26,7
	5	26,85
	MW	26,71
	Stabw	0,22

### 1. Versuch

Bedingungen: Pektinlösung 2%ig, in Citrat-Phosphat-Puffer  
Orangensaft Valencia Late, zentrifugiert

Tabelle 32: Ablaufzeiten der Pektinlösung und selbst gepresstem Orangensaft im ersten Versuch

Messung nach	Messung 1	Messung 2
	Ablaufzeit [s]	Ablaufzeit [s]
3 min	26,55	26,3
1 h	26,05	26,6
2 h	26,2	26,5
3 h	27,0	26,4
4 h	27,1	26,7
5 h	26,3	27,4

Enzymversuch a

Bedingungen: Pektinlösung 2%ig, in Citrat-Phosphat-Puffer  
 Enzimlösung 100.000 PGU · 3 ml<sup>-1</sup> (in Wasser)

Tabelle 33: Ablaufzeiten der Pektinlösung und Enzimlösung

Messung nach	Messung 1 Ablaufzeit [s]	Messung 2 Ablaufzeit [s]	Messung 3 Ablaufzeit [s]	Mittelwert $\bar{x}$	Stabw s
3 min	18,8	18,7	18,3	18,6	0,22
1 h	4,45	4,25	4,7	4,47	0,18

Enzymversuch b

Bedingungen: Pektinlösung 2 %ig, in Citrat-Phosphat-Puffer  
 Enzimlösung 1000 PGU · 3 ml<sup>-1</sup> (in Wasser)

Tabelle 34: Ablaufzeiten der Pektinlösung und Enzimlösung

Messung nach	Messung 1 Ablaufzeit [s]	Messung 2 Ablaufzeit [s]	Messung 3 Ablaufzeit [s]	Mittelwert $\bar{x}$	Stabw s
3 min	25,2	25,5	26,8	25,83	0,69
1 h	21,9	20,9	21,2	21,33	0,42

Versuch mit Orangenfrischsaft

Bedingungen: Pektinlösung 2 %ig, in Citrat-Phosphat-Puffer  
 Orangenfrischsaft, filtriert

Tabelle 35: Ablaufzeiten von Pektinlösung und Orangenfrischsaft nach Inkubation

Messung nach	Messung 1 Ablaufzeit [s]	Messung 2 Ablaufzeit [s]	Messung 3 Ablaufzeit [s]	Mittelwert $\bar{x}$	Stabw s
3 min	22,6	23,1	22,9	22,87	0,21
1 h	20,9	21,6	21,3	21,27	0,29

**Versuch mit selbst gepresstem Orangensaft**

Bedingungen: Pektinlösung 2 %ig, in Citrat-Phosphat-Puffer  
 Selbst gepresster Orangensaft, filtriert

Tabelle 36: Ablaufzeiten von Pektinlösung und selbst gepresstem Orangensaft nach Inkubation

Messung nach	Messung 1 Ablaufzeit [s]	Messung 2 Ablaufzeit [s]	Messung 3 Ablaufzeit [s]	Mittelwert $\bar{x}$	Stabw s
3 min	26,5	26,3	26,4	26,4	0,1
1 h	26,4	26,2	26,3	26,3	0,1

**Bestimmung der Pektinlyase-Aktivität mittels UV-Test**

Tabelle 37: Referenzmessung gegen Substratlösung mit entionisiertem Wasser

		Extinktion
Referenzmessung	0,069	
	0,069	
	0,069	

Tabelle 38: Extinktionsmessung von selbst gepresstem Orangensaft und Substratlösung über einen Zeitraum von 3 Minuten

	Zeit [min]	Extinktion
selbst gepresster Orangensaft	0,5	0,187
	1	0,187
	1,5	0,186
	2	0,186
	2,5	0,184
	3	0,184

Tabelle 39: Extinktionsmessung von Orangenfrischsaft und Substratlösung über einen Zeitraum von 3 Minuten

	Zeit [min]	Extinktion
Orangenfrischsaft	0,5	0,081
	1	0,080
	1,5	0,081
	2	0,080
	2,5	0,081
	3	0,082

### Ergebnisse der Oligo-Galacturonsäure Bestimmung

Tabelle 40: Peakflächen von Galacturonsäure-Oligomeren nach 30, 120, 300 und 900 Minuten enzymatischem Pektinabbau

Fructozym PRESS	Peakfläche nach			
	30 Min.	120 Min.	300 Min.	900 Min.
Galacturonsäure Monomer	240,04	446,08	903,78	1569,46
Dimer	22,83	37,20	55,90	51,24
Trimer	25,45	43,89	101,68	137,14
Tetramer	21,75	43,97	113,67	151,28
Pentamer	15,82	36,57	77,52	12,59
Hexamer	1,78	3,00	3,02	2,90

Fructozym P6-L	Peakfläche nach			
	30 Min.	120 Min.	300 Min.	900 Min.
Galacturonsäure Monomer	101,17	153,94	243,90	527,34
Dimer	16,23	18,92	22,65	44,19
Trimer	7,70	14,20	22,67	64,29
Tetramer	8,23	12,67	22,19	78,18
Pentamer	7,77	9,90	17,75	57,58
Hexamer	0,11	0,86	7,60	23,62

<b>Citrolase TF CLEAR</b>	Peakfläche nach			
	30 Min.	120 Min.	300 Min.	900 Min.
Galacturonsäure Monomer	145,77	283,44	560,41	917,73
Dimer	22,40	36,57	54,39	68,78
Trimer	15,08	35,34	70,13	111,67
Tetramer	14,79	32,51	79,30	125,85
Pentamer	8,32	23,90	63,63	51,87
Hexamer	0,76	2,09	24,24	15,81

<b>Fructozym COLOR</b>	Peakfläche nach			
	30 Min.	120 Min.	300 Min.	900 Min.
Galacturonsäure Monomer	154,42	333,82	609,09	1106,35
Dimer	27,06	46,36	72,60	77,89
Trimer	24,24	50,45	90,79	143,33
Tetramer	16,02	48,57	98,06	146,45
Pentamer	11,78	39,31	82,49	33,35
Hexamer	1,46	2,39	25,36	3,97

<b>Fructozym P-LG</b>	Peakfläche nach			
	30 Min.	120 Min.	300 Min.	900 Min.
Galacturonsäure Monomer	4,70	24,87	73,60	80,27
Dimer	2,95	4,97	18,06	19,52
Trimer	0,80	2,10	7,81	9,37
Tetramer	0,00	1,13	8,19	9,74
Pentamer	0,00	1,85	6,06	5,13
Hexamer	0,00	6,02	1,94	1,38

## Eigenständigkeitserklärung

Studiengang: Master Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

Fachgebiet: Enzymatik

Name: Juliane Walter

Matrikelnummer: 444007

Thema: Enzymnachweis in Fruchtsäften

### Eidesstattliche Erklärung zur Masterarbeit

Ich versichere, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig und ohne unerlaubter Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher nicht veröffentlicht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift