

Aus dem Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung
des Instituts für Oenologie und Getränkeforschung
der Forschungsanstalt Geisenheim

**Die chemische Zusammensetzung der löslichen Kolloide im Saft
von schwarzen Johannisbeeren und deren Auswirkung auf die
Verarbeitungstechnologie**

*The Chemical Composition of Soluble Colloids in the Juice of Black Currants and
their Effect on Processing Technology*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie u. Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Diplom-Oenologe
Rainer Kressmann
aus Neckarwestheim

Gießen 2001

Betreuer: Prof. Dr. H. Dietrich

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Bottler
1. Gutachter:	Prof. Dr. H. Dietrich
2. Gutachter:	Prof. Dr. I. Bitsch
Prüfer:	Prof. Dr. C. Kunz
Prüfer:	Prof. Dr. E. Weigand
Prüfer:	Prof. Dr. K. Wucherpennig

Tag der Disputation: 09.07.2001

*In Dankbarkeit für meine lieben Eltern
und Jeannette*

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung und Problemstellung</i>	1
2	<i>Polysaccharide in Früchten und Säften</i>	4
2.1	Polysaccharide pflanzlicher Herkunft	4
2.2	Modell(e) der pflanzlichen Zellwand	5
2.3	Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand	7
2.3.1	Cellulose	7
2.3.2	Hemicellulosen	8
2.3.3	Pektinstoffe	11
2.3.4	Glycoproteine	14
2.4	Polysaccharide mikrobiellen Ursprungs	15
2.4.1	Schimmelpilze	15
2.4.2	Bakterien	17
2.4.3	Hefen	17
2.5	Die Veränderung der Polysaccharide während der Reifung von Früchten	18
3	<i>Beerenobst</i>	20
3.1	Einteilung des Beerenobstes	20
3.2	Beschreibung einzelner Beerenobstarten	21
3.2.1	Schwarze Johannisbeere	21
3.2.2	Brombeere	23
3.2.3	Heidelbeere	24
3.2.4	Preiselbeere	25
3.2.5	Schwarzer Holunder	26
3.2.6	Mahonie	26
3.3	Die Verarbeitung von Beerenobst zu Fruchtsaft	27
3.3.1	Die Rohware und ihre Inhaltsstoffe	27
3.3.2	Die Technologie der Beerenverarbeitung zu Fruchtsaft	29
4	<i>Material</i>	32
4.1	Isolierung von löslichen Polysacchariden aus verschiedenen Beerenfrüchten	32
4.1.1	Natives Pektin aus schwarzen Johannisbeeren	33
4.1.2	Natives Pektin aus Brombeeren	33
4.1.3	Enzymatisch modifiziertes Pektin aus schwarzen Johannisbeeren	33

4.1.4	Fraktionierte Isolierung von Kolloiden aus schwarzem Johannisbeersaft mittels Crossflow-Ultrafiltration	34
4.1.5	Isolierung der löslichen Kolloide aus Preisel-, Holunder-, Mahonia- und Heidelbeeren	36
4.2	Herstellung von Johannisbeersäften zur Durchführung von Filtrationsversuchen	37
4.2.1	Versuchsbeschreibung	37
4.2.2	Verarbeitungsschema zur Herstellung von Johannisbeersaft	39
4.2.3	Allgemeine Analysenparameter der Säfte	40
4.2.4	Charakterisierung der Enzympräparate	41
4.3	Fraktionierte Ernte von schwarzen Johannisbeeren	42
4.3.1	Durchführung der Ernte und Charakterisierung des Erntegutes	42
4.3.2	Aufarbeitung des Erntegutes sowie Bestimmung des 100-Beeren- gewichts, der Gesamtsäure und des Trockensubstanzgehaltes	43
5	Methoden	45
5.1	Charakterisierung der aus Früchten und Fruchtsäften gewonnenen Polysaccharide	45
5.1.1	Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelchromatographie	45
5.1.2	Fraktionierung durch Anionenaustauschchromatographie	46
5.1.3	Fotometrische Zuckerbestimmung	47
5.1.4	Stickstoffgehalt der Polysaccharide	48
5.1.5	Spaltung der Polysaccharide mittels saurer Hydrolyse	48
5.1.6	Gaschromatographische Bestimmung der Neutralzucker	50
5.1.7	Zuckerbausteinanalytik mittels Hochdruckflüssigkeits- Chromatographie (HPLC)	51
	a.) Saure Zucker	53
	b.) Neutralzucker	53
5.1.8	Bestimmung des Veresterungsgrades von sauren Zuckern	54
	a.) Methodenübersicht	54
	b.) HPLC-Methode nach Voragen et al (1986a)	55
5.1.9	Isolierung von Anthocyanen aus Früchten und Polysacchariden	57
	a.) Isolierung	57
	b.) Analytik	58
5.1.10	Aschegehalt von Polysacchariden	58
5.2	Bestimmung des Kolloidgehaltes	59
5.2.1	Gelfiltration	59
5.2.2	Alkoholfällung	60

5.3	Enzymatischer Abbau von Polysacchariden	61
5.3.1	Enzyme und Substrate	61
5.3.2	Bestimmung des Aktivitätsspektrums von 8 Handelsenzymen	62
5.3.3	Enzymatischer Abbau von Johannisbeerkolloiden mit verschiedenen Handelsenzymen	62
	a.) Freisetzung monomerer Zucker	63
	b.) Viskositätsmessung	64
5.4	Durchführung von Filtrationsversuchen	64
5.4.1	Statische Membranfiltration	65
5.4.2	Dynamische Membranfiltration (Cross-Flow- Filtration)	65
6	Ergebnisse	67
6.1	Charakterisierung von Beerenobstkolloiden	67
6.1.1	Kolloide aus schwarzen Johannisbeeren	67
6.1.1.1	Fraktionierung der Rohkolloide mittels DEAE-Anionenaustauscher Chromatographie	67
	a.) Molekulargewichtsverteilung	70
	b.) Zuckerbausteinanalytik	72
6.1.1.2	Fraktionierung der Johannisbeerkolloide mittels Ultrafiltration	74
	a.) Molekulargewichtsverteilung	75
	b.) Zuckerbausteinanalytik	76
	c.) Methylierungs- und Acetylierungsgrade	77
	d.) Anthocyan-Fingerprints	78
	e.) Aschegehalt	79
6.1.2	Kolloide aus Brombeeren	81
6.1.2.1	Fraktionierung der Rohkolloide mittels DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie	81
	a.) Molekulargewichtsverteilung	82
	b.) Zuckerbausteinanalytik	83
6.1.3	Kolloide aus Preisel-, Holunder-, Mahonia- und Heidelbeeren	84
6.1.3.1	Die Zuckerbausteinzusammensetzung der Rohkolloide	84
6.1.3.2	Anthocyanidin-Fingerprints von Pürees und Kolloiden	85
6.2	Der enzymatische Abbau von Polysacchariden	86
6.2.1	Die Bestimmung der Nebenaktivitäten von ausgewählten Enzympräparaten	86
6.2.2	Molekulargewichtsverteilung beim enzymatischen Abbau von nativen Johannisbeerkolloiden mit einem technischen Enzympräparat	89
6.2.3	Die Freisetzung monomerer Zucker beim enzymatischen Abbau von Johannisbeerkolloiden	91

6.3	Die Veränderung der Inhaltstoffe während der Reife von schwarzen Johannisbeeren	95
6.3.1	Die Entwicklung des 100 Beerengewichts, der Gesamtsäure und des Trockensubstanzgehaltes	96
6.3.2	Die Entwicklung der Farbe während der Beerenreife	97
6.3.3	Die Veränderung der kolloidalen Zusammensetzung im Verlauf der Reife von schwarzen Johannisbeeren	97
6.3.4	Zuckerbausteinanalytik der aus den Pürees isolierten Kolloide	98
6.4	Praxisnahe Herstellung von Säften aus schwarzen Johannisbeeren unter besonderer Berücksichtigung der Maische- und Saftenzymierung	101
6.4.1	Der Viskositätsverlauf während der Saftenzymierung	101
6.4.2	Der Einfluss der Maische-/Saftenzymierung auf	102
	a.) den Kolloidgehalt	102
	b.) den Methylierungs- und Acetylierungsgrad der Kolloide	104
	c.) die statische Membranfiltration	105
	d.) die dynamische Membranfiltration	109
	e.) die Zusammensetzung der Zuckerbausteine und den Proteingehalt	110
7	<i>Bewertung der eingesetzten Methoden</i>	112
7.1	Isolierung und Reinigung der Kolloide	112
7.2	Fraktionierung der Kolloide	112
7.3	Bestimmung der Zuckerbausteine	113
7.3.1	Die Hydrolyse der Polysaccharide	113
7.3.2	Chromatographische Methoden zur Zuckerbausteinbestimmung	114
7.4	Bestimmung des Veresterungsgrades	114
7.5	Enzymatischer Abbau von Polysacchariden	115
7.6	Bestimmung von Anthocyanidin-Fingerprints in Pürees und Kolloiden	115
7.7	Durchführung von Filtrationsversuchen	116
8	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	117
8.1	Die Zusammensetzung der löslichen Kolloide von Johannisbeersäften im Vergleich zu anderen Beeren- und Kernobstkolloiden	117
8.2	Der Einfluss der löslichen Kolloide in Johannisbeersäften auf die Verarbeitungstechnologie	123
8.2.1	Erntetechnik und -zeitpunkt	123
8.2.2	Enzymatischer Pektinabbau und Saftgewinnung	124
8.2.3	Klärung und Filtration	127
8.3	Der Einfluss des Reifegrades auf die Zusammensetzung der Beerenkolloide	128

9 Zusammenfassung_____ **132**

10 Literaturverzeichnis_____ **135**

0 Verzeichnis der Abkürzungen

AGP	Arabinogalactan-Protein
AIR	Alcohol Insoluble Residue
Ara	Arabinose
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethyl-Sepharose, schwacher Anionenaustauscher
DP	Polymerisationsgrad (Degree of polymerization)
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (TM Pharmacia)
Gal	Galactose
GalA	Galacturonic acid, Galacturonsäure
GC	Gas Chromatography
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronic Acid, Glucuronsäure
HPIC	High Performance Ion Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRGPs	Hydroxyprolinreiche Glycoproteine
LC	Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie
MW	Molecular Weight, Molekulargewicht
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NZ	Neutralzucker
PAD	Pulsed Amperometric Detector
PE	Pektinesterase
PED	Pulsed Electrochemical Detector, s. a. PAD
PG	Polygalacturonase
PVPP	Polyvinyl-Polypyrrolidon
RG	Rhamnogalacturonane
Rha	Rhamnose
RI-Detektor	Refraktions-Index-Detektor (Differentialrefraktometer)
SJb	Schwarze Johannisbeere
SO ₂	Schwefeldioxid
SZ	Saure Zucker
TFA	Trifluoressigsäure (Trifluoroacetic-Acid)
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
VDF	Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie
VE	Veresterungsgrad
Xyl	Xylose

1 Einleitung und Problemstellung

Beerenfrüchte gehören seit jeher zur Ernährung des Menschen. Zuerst waren es die Wildformen der Beeren, im Lauf der Zeit sind durch zufällige Mutationen oder durch gezielte Züchtung die heutigen Kultursorten entstanden. Bei Beerenobst hat neben dem Frischverzehr vor allem die Verarbeitung zu Obstsäften eine große Bedeutung. Da die meisten Beerenobstsäfte in Bezug auf Säure und Farbe extrem hohe Gehalte aufweisen, kann ein ausgewogenes Geschmackserlebnis nur durch die Herstellung eines Nektars erzielt werden.

Schwarze Johannisbeeren nehmen bei der Beerenobstverarbeitung eine herausragende Rolle ein. Auf Grund ihres hohen Vitamin C-Gehaltes, der tiefdunklen Farbe und des durch die Fruchtsäure geprägten intensiven Geschmacks, lässt sich aus den Beeren ein ernährungsphysiologisch wertvoller und erfrischender Saft gewinnen. Der Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie (VDF) weist für die Jahre 1998 bzw. 1999 eine Inlandserzeugung von ca. 30 Mio. Liter (L) schwarzen Johannisbeernektar aus.

Für die Erzeugung von Beerenobst ist nach wie vor die Kultivierung der Früchte an Büschen und Sträuchern typisch. Da die manuelle Ernte der Beeren mehr als die Hälfte des Arbeitsaufwandes bei der Beerenobsterzeugung erfordert, lag es nahe, die Handlese durch mechanische Ernteverfahren zu ersetzen (Sinn, 1991). Erntemaschinen haben jedoch den Nachteil, dass eine selektive Trennung von reifen und unreifen Beeren nur sehr eingeschränkt möglich ist. Gerade bei Johannisbeeren ist bekannt, dass der Reifegrad innerhalb eines Strauches heterogen verteilt sein kann. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass der Reifegrad einen Einfluss auf den Pektingehalt und die Verarbeitungsqualität hat (Wucherpfennig et al., 1966). Es sollte geklärt werden, inwieweit sich die für die Fruchtsaftherstellung relevanten Beereninhaltsstoffe, wie z.B. Zucker- und Säuregehalt, aber auch Pektin- und Farbstoffe während der Reife verändern. Hierzu wurden schwarze Johannisbeeren mit unterschiedlichem Reifegrad geerntet. Die löslichen Polysaccharide wurden isoliert und charakterisiert.

Die industrielle Herstellung von Fruchtsäften aus schwarzen Johannisbeeren begann in den 50er Jahren (Wucherpfennig und Bretthauer, 1962). Die steigende Nachfrage nach Süßmosten ließ die Fruchtsafthersteller nach geeigneten Verfahren zur Entsaftung von Johannisbeermaischen suchen, denn ohne geeignete Maischebehandlung konnte nur ein schwach rosa gefärbter Saft gewonnen werden. Die Lösung des Problems wurde in der Erhitzung der Maische gefunden. Durch die Wärmebehandlung werden die Zellwände der Beerenhaut für die Farbstoffe durchlässig, so dass ein direkter Übergang der Farbstoffe in den Saft möglich ist. Doch gleichzeitig mit der Farbfreisetzung kommt es zu einer Umwandlung von wasserunlöslichem Protopektin zu wasserlöslichem Pektin. Der Zellsaft (Fruchtsaft) wird vom Pektin gebunden, die Maische geliert und lässt sich nicht mehr entsaften. Die Gelierfähigkeit von Johannisbeermaischen hängt vor allem mit dem außergewöhnlich hohen Pektingehalt der Beeren zusammen, der bis zu 15g/kg ansteigen kann (Souci et al., 1981). Zum Vergleich beträgt der Pektingehalt von Äpfeln nur 6-9 g/kg (Souci et al., 1981).

Durch die hohen Kolloidgehalte ist es unerlässlich, die Maische enzymatisch zu verflüssigen (Wucherpfennig und Bretthauer, 1962). Dies geschieht durch den Zusatz von pektolytischen Enzympräparaten zur Maische (Wucherpfennig, 1984c, Wucherpfennig und Schöppl, 1991). Durch den enzymatischen Abbau des Pektins geht das Wasserbindungsvermögen verloren. Es kommt zu einer Fest-Flüssig-Trennung, wodurch kurze Presszeiten und hohe Saftausbeuten erst möglich werden.

Jedes Enzym hat in Bezug auf Temperatur und pH-Wert ein Wirkoptimum. Es ist deshalb unerlässlich, die Enzympräparate an die jeweiligen Substrate, in diesem Fall Johannisbeermaische anzupassen. Die Enzymhersteller bieten deshalb spezielle „Beerenenzyme“ an, die eine dominante Pektinesteraseaktivität besitzen, um wasserlösliches Pektin schnell abzubauen. Außerdem sind die Enzymaktivitäten dahingehend optimiert, dass sie auch bei niedrigem pH-Wert ($\approx 3,0$) und Temperaturen von 45 - 50 °C ausreichend stabil sind. In einer Reihe von Laborversuchen wurden Spezialenzyme verschiedener Hersteller hinsichtlich der Zusammensetzung ihres Aktivitätsspektrums untersucht. Durch Technikumsversuche sollte der Einfluss von Enzympräparaten auf die Zusammensetzung der löslichen Kolloide im Johannisbeersaft aufgeklärt werden.

Von der Kernobstverarbeitung ist bekannt, dass die Maischeenzymierung eine zweiseitige Angelegenheit ist, die einerseits zu einer Verbesserung der Pressleistung, andererseits aber ein weitreichender Zellaufschluss zu hohen Trubstoffgehalten und einem verstärkten Übergang kolloidal gelöster Substanzen in den Saft führt (Voragen et al., 1992, Will und Dietrich, 1992, Will und Dietrich, 1995, Zimmer, 1996). Beim Beerenobst ist dies nicht anders, wie Versuche bei der Verarbeitung von Himbeeren gezeigt haben. Will (1993) wies bei Presssäften aus maischeerhitzten und -enzymierten Himbeeren Kolloidgehalte von mehr als 9 g/L nach. Bei schwarzen Johannisbeersäften können die Kolloidgehalte auf bis zu 14 g/L ansteigen (Junker, 1994).

Da Johannisbeersäfte fast ausschließlich als klare Nektare in den Handel gelangen oder als klares Konzentrat gehandelt werden, ist die Saftklärung ein unverzichtbarer Verfahrensschritt. Unlösliche Trubteilchen lassen sich durch klassische Fest-Flüssig-Trennverfahren, wie Sedimentation oder Filtration, leicht aus dem Saft entfernen. In der Regel geht der physikalischen Klärung eine Schönung voraus. Sie dient zur Verbesserung der Filtrationsleistung und der chemischen Stabilität der Säfte.

Kolloide hingegen behindern die Sedimentationsfähigkeit der Trubteilchen und führen beim Schönen der Säfte zu Problemen (Dietrich, 1986). In komplex zusammengesetzten Suspensionen, wie z.B. Fruchtsaft, versagen mathematische Prognoseverfahren zur Ermittlung der Filtrationsfähigkeit, so dass letztlich nur durch praxisnahe Versuche realistische Ergebnisse erzielt werden können.

Hochmolekulare Kolloide neigen bei der Herstellung von Konzentrat zum Gelieren, wodurch Verdampferanlagen blockiert werden und verursachen bei der Filtration drastische Leistungsverluste (Wucherpfennig et al., 1984a, Wucherpfennig, 1986a, Wucherpfennig und Dietrich, 1986b, Wucherpfennig et al., 1987, Will et al., 1992, Will, 1993, Will und Dietrich, 1995a, Will und Dietrich, 1995b).

Die Enzymindustrie bietet auch für dieses Problemfeld eine Reihe von Spezialenzymen an, die einen vollständigen Abbau der saftlöslichen Kolloide bewirken sollen. Die Praxis sieht jedoch anders aus. Trotz Saftenzymierung sind schlechte Filtrationsleistungen und Trübungen bei Beerenobstsäften eher die Regel als die Ausnahme. Bei Kernobstsäften ist bekannt, dass trotz Saftenzymierung Bruchstücke der Pektinkette, hauptsächlich hochverzweigte Arabinogalactane und Rhamnogalacturonane, im Saft verbleiben können (Will et al., 1992). Durch ihre lineare Struktur und Molekulargewichte bis zu 1 Mio. Dalton sind sie in der Lage, Filtrationsmembranen zu verstopfen. Es wäre denkbar, dass bei der Enzymierung von schwarzen Johannisbeeren ähnliche Pektinbruchstücke entstehen, zumal diese bei artverwandtem Obst, wie z.B. Himbeeren, bereits nachgewiesen wurden (Patz, 1994, Will und Dietrich, 1994).

Es war daher ein wesentliches Ziel der Arbeit, die löslichen Kolloide von schwarzen Johannisbeeren zu isolieren und die Einflussfaktoren auf ihr quantitatives Vorkommen bei einzelnen Verarbeitungsschritten aufzuklären, um damit gezielte Lösungsansätze für technologische Probleme aufzuzeigen. Zur Bestimmung des Kolloidgehaltes und der Zuckerbausteinzusammensetzung wurden die Analysenverfahren von schwarzen Johannisbeeren auf andere Beerenobstarten übertragen.

2 Polysaccharide in Früchten und Säften

2.1 Polysaccharide pflanzlicher Herkunft

Polysaccharide sind in der Pflanzenwelt weitverbreitet. Neben der Zellwand höherer Pflanzen sind Polysaccharide in den Zellwänden von Algen und im Endosperm aus Samen von Samenpflanzen enthalten. Letztere haben zwar naturgemäß eine große Verbreitung, für die hier zu bearbeitende Fragestellung sind sie jedoch unbedeutend.

Die Zellwand höherer Pflanzen (Eukaryonten) ist sehr komplex aufgebaut. Die Arten unterscheiden sich zwar hinsichtlich ihres strukturellen Feinbaues, generell sind sie aber überwiegend (ca. 90 %) aus Polysacchariden aufgebaut. Der Rest setzt sich aus anderen Substanzklassen, wie Proteinen (Glycoprotein) und Polyphenolen (Lignin), zusammen. Am Aufbau der Polysaccharide sind im Wesentlichen neun Monosaccharide beteiligt: D-Glucose; D-Mannose; D-Galactose; L-Arabinose; D-Xylose; L-Rhamnose; L-Fucose; D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure (Tucker und Mitchell, 1993).

Die Zellwand umschließt die Cytoplasmamembran mit einer Art flexiblen Hülle, vergleichbar mit dem Mantel eines Fußballs und verleiht der Zelle dadurch eine Reihe von chemisch/physikalischen Eigenschaften. Sie wird in die Lage versetzt, in der Zelle einen hohen osmotischen Druck aufrechtzuerhalten und somit strukturelle Merkmale auszubilden. In gleicher Weise kann die Zelle externen Drücken widerstehen, die Durchlässigkeit gegenüber Molekülen verändern, das Eindringen von Mikroorganismen verhindern und bei Verletzungen mit entsprechenden Reparaturmaßnahmen, z.B. Verdickung oder „Verholzung“ reagieren (Bacic et al, 1988).

Morphologisch lässt sich die Zellwand in drei Zonen unterteilen: *Mittellamelle*, *Primärwand* und *Sekundärwand*.

Die *Mittellamelle* wird während der Cytokinese oder auch Cytoplasmateilung gebildet. Tochterzellen entwickeln sich an einer bereits vorhandenen Mittellamelle, wachsen und scheiden sich ab. Die Mittellamelle ist kolloidal, optisch inaktiv und besteht fast ausschließlich aus Pektinsubstanzen. An die Mittellamelle lagern sich zu beiden Seiten Polysaccharide, vorrangig Cellulose, an und bilden die *Primärwand*. Diese verdickt sich solange, bis das eigentliche Zellwachstum abgeschlossen ist. Der genaue Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, man vermutet jedoch, dass verschiedene Pflanzenhormone an der Steuerung beteiligt sind. Cellulose wird an der (inneren) Oberfläche der Cytoplasmamembran synthetisiert und dann durch das Plasmalemma nach außen abgegeben. Die Primärwand bestimmt das Zellwachstum und formt das strukturelle Gerüst der Pflanze (Heredia et al, 1995).

Die Zellwände sehr vieler Zellen bestehen nur aus Mittellamelle und Primärwand. Einige „Spezialisten“ bilden, sobald das Zellwachstum beendet ist, weitere Polymere und formen eine *Sekundärwand*. Sie ist eine Art Ergänzung der Primärwand und hat rein festigende Funktion. Von ihrer Anwesenheit hängt aber auch eine Reihe von strukturellen Änderungen in der Mittellamelle und der Primärwand ab. Beispielphaft sei hier die Lignifizierung erwähnt (Heredia et al, 1993).

2.2 Modell(e) der pflanzlichen Zellwand

Die pflanzliche Zellwand ist ein aus einer Vielzahl verschiedener Einzelsubstanzen kompliziert aufgebautes Gefüge. Der Bauplan, nach dem diese zusammengesetzt sind, ist bei weitem noch nicht aufgeklärt. Dies ist neben anderen auch mit ein Grund, dass es bis heute kein allgemein gültiges und anerkanntes Modell der pflanzlichen Zellwand gibt. Zuerst veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Albersheim (Keegstra et al, 1973) ein Modell über die Struktur der Zellwand von Bergahorn (*Acer pseudoplatanus* L.). Die Forscher stellten sich die Zellwand als ein großes Makromolekül vor, bei dem alle Zellwandbestandteile außer Cellulose und Xyloglucan kovalent miteinander verknüpft sind. Sie gingen von einer Netzwerkstruktur zwischen Polysacchariden und Proteinen aus. Dieses Modell besaß so lange Gültigkeit bis klar wurde, dass ein kovalent verknüpftes Makromolekül die dynamischen Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zellwand nicht erklären konnte.

Lampert und Epstein (1983) veröffentlichten ein sog. „warp and weft“-Modell, bei dem Cellulosefibrillen durch proteinreiche Polysaccharide (Extensin) miteinander vernetzt wären. Ähnlich der Struktur von Textilien sollte eine feste aber gleichzeitig flexible Matrix entstehen. Wilson und Fry (1986) konkretisierten diese Vorstellung in einem weiteren Modell, bei dem spiralförmig verdrillte und lineare Extensinmoleküle intermolekular über Isodityrosin verknüpft sind. Dieses Gerüst soll in die stark hydratisierte Matrix der anderen Zellwandbestandteile integriert sein. Es konnte zwar bis heute kein Zusammenhang zwischen Zellwachstum und Proteinsynthese nachgewiesen werden, es scheint aber sicher, dass hydroxyprolinreiche Glycoproteine (HRGPs) eine entscheidende Strukturkomponente der Zellwand darstellen (Schindler, 1993).

Die meisten Zellwandmodelle gingen von der Vorstellung aus, dass nur eine Komponente die Struktur der Zellwand bestimmt. Mit zunehmendem Wissen um die komplexen Funktionen, die mit Hilfe der Zellwand gesteuert werden, musste man aber erkennen, dass nur das Zusammenwirken einer Vielzahl von Zellwandkomponenten diese Vorgänge erklären konnten. So scheint die Hypothese der achtziger Jahre, dass nur ein geringer Teil der Makromoleküle kovalent miteinander verknüpft sind, heute allgemein anerkannt zu sein. Einen entscheidenden Schritt, um die *in-vivo*-Anordnung der Zellwandbestandteile zu untersuchen, konnte durch die Visualisierung im Elektronenmikroskop erreicht werden. McCann et al (1990) veröffentlichten hierzu detaillierte Bilder, die sie mit Hilfe der „Gefrier-Ätz-Technik“ von Zellwandbestandteilen der Zwiebel herstellten. Die auf dieser Grundlage postulierte Hypothese geht von der Vorstellung aus, dass es mehrere, voneinander unabhängige Polymer-Netzwerke gibt. So existieren bei der Zwiebel mindestens zwei Netzwerke: ein Hemicellulose-Cellulose-Netzwerk und ein Pektin-Netzwerk (Abb. 1).

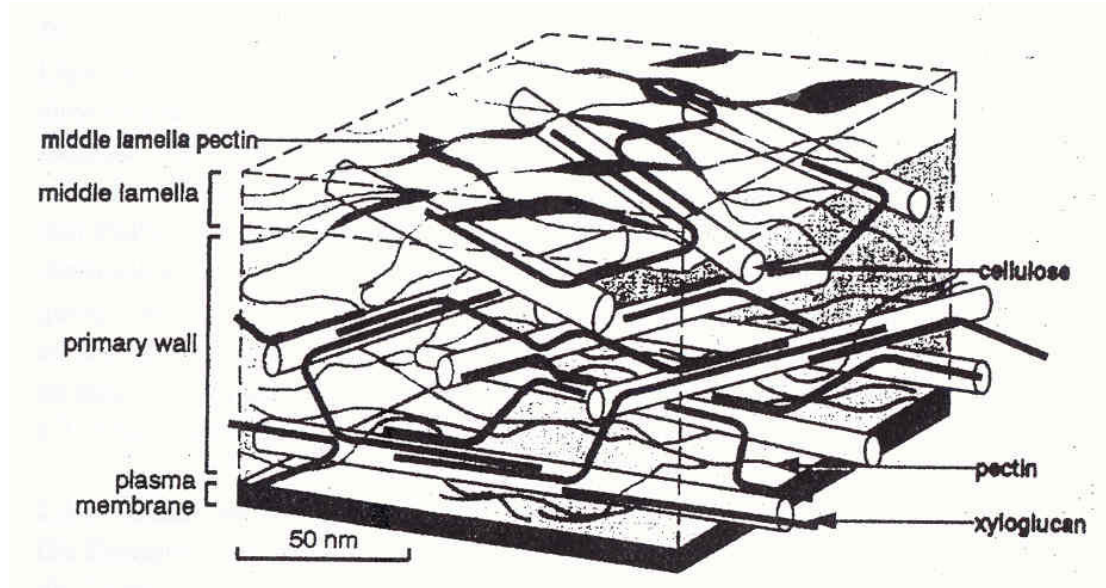


Abb. 1: „Netzwerk“-Modell der primären Zellwand nach McCann et al (1990)

Die Cellulose-Microfibrillen sind von Xyloglucan-Polymeren umwoben und verhindern ein längsseitiges Aneinanderlagern der Fibrillen. Dieses Cellulose-Netzwerk ist in eine Matrix aus Pektinsubstanzen eingebettet, welche die „Maschenweite“ also die Porosität der Zellwand festlegen. Für den Zusammenhalt der Zellen sorgen die Ca-Brücken des Mittellamellenpektins.

Der genaue Mechanismus, mit dem die Poren der Zellwand festgelegt und bei Bedarf sogar verändert werden können, ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Denkbar wäre, dass hierbei sowohl der Veresterungsgrad als auch die über Rhamnose mit der Galacturonsäurekette verknüpften, vorwiegend neutralen Seitenketten, eine wichtige Rolle spielen. Die Lehrmeinung über eine mehr oder weniger zufällige Verteilung von Estergruppen und neutralen Seitenketten innerhalb des Pektinmoleküls gerät allerdings mit der Vorstellung von einer festen Zellwand mit definierter Porenstruktur in Konflikt. Der von Roberts vorgeschlagene Begriff einer „extrazellulären Matrix“ lässt hier mehr Interpretationsspielraum zu (Roberts, 1989).

Ein weiterer hypothetischer Ansatz, um die dynamischen Prozesse in der Zellwand zu erklären, ist die Fähigkeit von sauren Pektinen Gele zu bilden. Erwiesenermaßen hängt die Viskosität von Pektin Gelen unter anderem vom Ca-Gehalt und vom pH-Wert ab. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ändert sich die Struktur von Pektin Gelen ebenfalls sehr stark. Beim Wachstum von Primärwänden spielen diese Variablen eine wichtige Rolle (Schindler, 1993).

2.3 Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand

Polysaccharide spielen beim Aufbau der pflanzlichen Zellwand neben Proteinen und Lignin eine wichtige Rolle. Eine exakte Einteilung der Zellwandbestandteile ist auf Grund ihrer heterogenen chemischen Zusammensetzung schwierig.

Aspinall, 1980 schlug deshalb eine Einteilung auf Grund der Extraktionsbedingungen vor, mit welchen die Polymergemische aus der Zellwand herausgelöst werden konnten. Zu den Pektinstoffen zählen alle Stoffe, die mit heißem Wasser, schwachen Säuren oder chelatisierenden Agentien extrahierbar sind. Hemicellulosen können mit starken Alkalien gelöst werden. Der Rest besteht meist aus Cellulose, die in starken Säuren löslich ist. Da es aber keine allgemein gültige Konvention über die Extraktionsbedingungen gibt, kommt es teilweise zu überlappenden Extraktionsfraktionen. Hier liegt auch eine Ursache für das z.T. inhomogene Datenmaterial über die Zusammensetzung der Zellwand.

2.3.1 Cellulose

Die Zellwand aller höheren Pflanzen enthält Cellulose. Sie ist verantwortlich für die Größe, die Form und die Stabilität (Reißfestigkeit) der Zellen. Die primäre Zellwand enthält zwischen 20 bis 30 % Cellulose (bezogen auf die Trockenmasse), in sekundären Zellwänden von Baumwollsamensamen wurden bis zu 94 % Cellulose (bezogen auf die Trockenmasse) gefunden (Meinert et al, 1977). Darvill et al (1980) gehen aber davon aus, dass sich sowohl ein- als auch zweikeimblättrige Pflanzen, als auch Primär- und Sekundärzellwände bzgl. des chemischen Aufbaus von Cellulose nicht unterscheiden.

Cellulose ist aus β -(1 \rightarrow 4) glycosidisch verknüpfter D-Glucose aufgebaut, die unverzweigt als Kette angeordnet ist. Diese assoziieren während der Biosynthese zu Mikrofibrillen. Die Zusammenlagerung der Celluloseketten zu diesen höheren Strukturen wird durch Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen. Hierbei entstehen Abschnitte, die über weite Strecken so regelmäßig aufgebaut sind, dass man auch von „parakristallinen Bereichen“ spricht (Schindler, 1993). Diese werden durch so genannte „Defekt- oder Störstellen“ unterbrochen, in denen keine so strenge Ordnung vorliegt. Feldmann (1987) führt dies vor allem auf eine geringere Absättigung der Nebervalenzbindungskräfte zurück. In diesen Bereichen könnten Xyloglucane über Wasserstoffbrückenbindungen fixiert sein (Aspinall, 1980). Diese dienen einerseits dem Zusammenhalt der Mikrofibrillen, andererseits werden durch diese „Distanzstücke“ für die Zelle Ausdehnungsräume geschaffen. Pektine füllen diese Freiräume aus und verleihen der Zelle die entsprechende Elastizität. Diese Struktur ist typisch für die meisten blühenden Pflanzen (Carpita, 1993).

Für die Herstellung von Fruchtsaft hat Cellulose praktisch keine Bedeutung. Cellulose ist in Fruchtsaft unlöslich und verbleibt beim Entsaften des Obstes vollständig im Trester. Lediglich bei der Herstellung von Pürees, z.B. als Grundstoff für Nektare geht Cellulose ins Produkt über.

2.3.2 Hemicellulosen

Die in der Gruppe „Hemicellulosen“ zusammengefassten Polysaccharide haben eine sehr heterogene Struktur. Ursprünglich wurden hierunter Polysaccharide verstanden, die an Cellulose gebunden sind und sich mit schwach alkalischen Lösungsmittel extrahieren ließen. Hinzu kamen Polysaccharide, die in Wasser löslich und deren chemische Struktur ähnlich der schwach alkalilöslichen waren. Man kann diese Gruppe auch als neutrale Polysaccharide bezeichnen, wobei dann auch Cellulose miteinzuschließen ist. Im Einzelnen bestehen die Hemicellulosen aus:

Arabane:

Arabane kommen meist als Seitenketten von Pektinen vor und werden deshalb oft in die Gruppe der Pektinstoffe eingegliedert. Isoliert betrachtet bestehen die Arabane aus einer linearen α -(1→5)-L-Arabinofuranose-Hauptkette. Über α -(1→2)- und/oder α -(1→3)-glycosidische Bindungen sind kurze L-Arabinofuranose-Seitenketten gebunden (Darvill et al, 1980). Schöppllein (1989) konnte aus Zuckerrüben ein Araban isolieren, das zu 61 % aus Arabinose bestand. Villetaz et al (1981) isolierten aus Traubensaft ein nahezu reines α -(1→3)(1→5)-Arabane. Die Methylierungsanalyse zeigte, dass 30 % der Arabinose aus Verzweigungspunkten stammte. Dies lässt auf eine starke Verzweigung des Arabans schließen. Die verzweigten Arabane sind Teil der Pektinmoleküle und bilden, auch zusammen mit Galactanen, Seitenketten aus. Die kurzkettigen Arabane sollen glycosidisch mit Hydroxyprolin in Glycoproteinen verknüpft sein. Untersuchungen von Schols (1990b) zeigen, dass Apfelsäfte, die aus enzymatisch verflüssigter Maische hergestellt wurden (Dekantertsaft), hochmolekulare Pektinfraktionen enthalten, die durch handelsübliche Enzympräparate nicht weiter abgebaut werden können. Diese als „modified hairy regions“ (MHR) bezeichnete Fraktion enthält 55 mol% Arabinose, die sowohl über Galactose als auch direkt an die Rhamnogalacturonan-Hauptkette glycosidisch gebunden ist.

Arabane sind aber auch typische Bestandteile von Beerenobstkolloiden. So handelt es sich bei löslichen Kolloiden aus Himbeersaft hauptsächlich um Arabinogalactane vom Typ II. Patz (1994) isolierte aus Himbeersaftkolloiden eine Polysaccharidfraktion, die neben geringen Anteilen an Rhamnose, Xylose und Glucose zu 50,5 % aus Arabinose und 20,4 % Galactose bestand. Hierbei sind die (1→3) und (1→5)-verknüpften Arabinosemoleküle über verzweigte Galactoseeinheiten an die Rhamnogalacturonanhauptkette gebunden. Das Polymer wird von einer Art „Arabinose-Pelz“ umschlossen, der die Galakturonsäurereste gegenüber pektinspaltenden Enzymen abschirmt. Ähnlich wie bei Apfelsaftkolloiden sind Handelsenzyme nicht in der Lage diese Kolloidfraktion abzubauen.

Galactane:

Aus der pflanzlichen Zellwand konnten bisher noch keine reinen Galactane isoliert werden. Werden solche Galactane in der Literatur doch beschrieben, so dürfte es sich vermutlich eher um Fragmente von Arabinogalactanen handeln, bei denen durch Säurehydrolyse α -(1→3)-ständige Arabinofuranose-Seitenketten abgespalten wurden (Aspinall, 1980). Arabinogalactane sind in der Natur weitverbreitet und bzgl. ihrer

chemischen Struktur sowie dem Arabinose/Galactose-Verhältnis heterogen zusammengesetzt (Selvendran, 1985). In der Literatur werden zwei, manchmal auch drei Arabinogalactantypen unterschieden.

Ein Arabinogalactan vom Typ I ist das bereits beschriebene und von Aspinall, 1980 aus Sojabohnen isolierte Polysaccharid. Es besteht aus einer β -(1 \rightarrow 4)-D-Galactose-Hauptkette, an die Arabinose(-ketten) über α -(1 \rightarrow 3)-glycosidische Bindungen (Aspinall, 1980) oder α -(1 \rightarrow 5)-verknüpfte Arabinofuranose Seitenketten gebunden sind (Heredia, 1995).

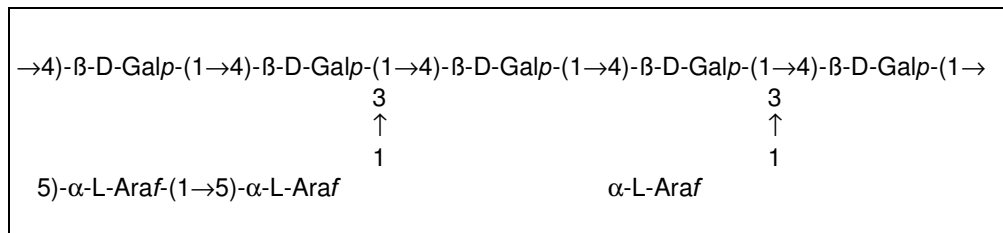


Abb. 2: Strukturvorschlag eines Arabinogalactan Typ I verändert nach Aspinall (1980)

Typ II Arabinogalactane

Polysaccharide diesen Typs sind hochverzweigt. Sie setzen sich aus einer β -(1 \rightarrow 3)-D-Galactopyranosyl-Hauptkette und verschiedenen über (1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindungen verknüpfte Seitenketten zusammen. Die Seitenketten können sowohl aus α -(1 \rightarrow 6)-verknüpfter D-Galactose, als auch aus α -(1 \rightarrow 3)-verknüpfter Arabinose unterschiedlicher Länge aufgebaut sein. Arabinogalactane diesem Typs sind in der Natur speziell bei Gehölzen weitverbreitet.

In löslichen Kolloiden von Fruchtsäften lassen sich ebenfalls Typ II Arabinogalactane nachweisen. Schöpplein et al (1991) isolierten aus enzymatisch behandeltem Himbeersaft eine Kolloidfraktion, die einen Anteil von 15 % der Gesamtkolloide ausmacht und ein Arabinose : Galactose-Verhältnis von 0,58 aufweist. Das Molekulargewicht wird mit etwa 100.000 Dalton angegeben. Will et al (1995) isolierten durch Ultrafiltration aus einem klaren Apfelsaft ein nahezu reines Arabinogalactan. Das Polysaccharid bestand zu 27 % aus Arabinose und 73 % Galactose. Durch Zusatz von 200 mg/L Arabinogalactan zu einem kolloidfreien Saft sank die Filtrationsleistung bei Mikrofiltration um 60 % und bei Ultrafiltration um 50 %.

Typ II Arabinogalactane werden außerdem in sogenannten Arabinogalactan-Proteinen (AGPs) gefunden. Es wird vermutet, dass in den Seitenketten sowohl L-Arabinofuranose, L-Arabinopyranose, D-Glucuronsäure (auch verestert) und Rhamnose vorkommen. Hydroxyprolinreiche Proteine sind sehr häufig mit Polysacchariden diesen Typs verknüpft (Heredia, 1995)

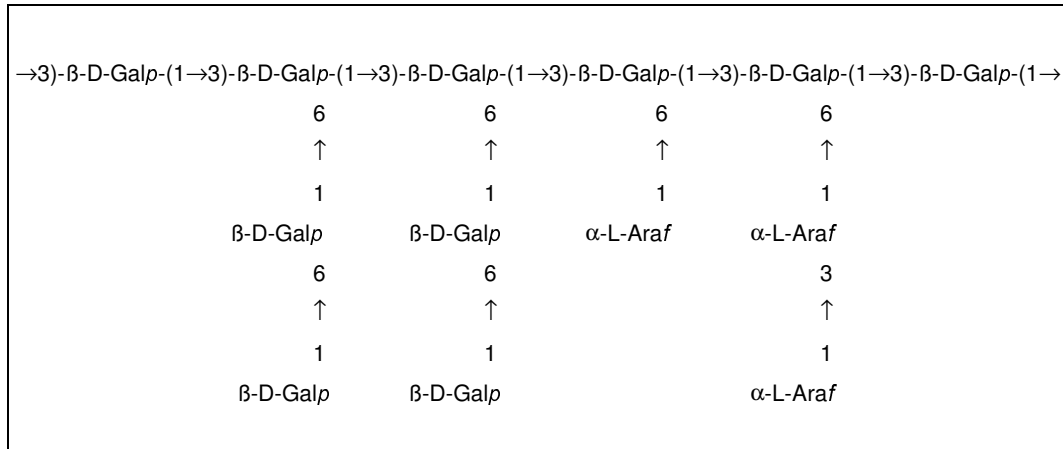


Abb. 3: Strukturvorschlag eines Arabinogalactan Typ II nach Heredia et al (1995)

Glucane:

Homogene Nichtcellulose-Glucane aus der pflanzlichen Zellwand haben bei der Früchteverarbeitung keine Bedeutung. In Cerealien sind sie weitverbreitet und gelangen z.B. beim Brauprozess als lösliche Kolloide mit ins Bier.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass Voragen (1986b) unter den Hemicellulosen von Äpfeln ein (1→3)-β-Glucan nachweisen konnte.

Im Gegensatz dazu stellen Heteroglucane eine wichtige Gruppe von Hemicellulosen dar. In der primären Zellwand kann bis zu 25 % Xyloglucan enthalten sein (Tucker et al, 1993). Xyloglucane besitzen ebenfalls eine β-(1→4)-D-Glucose Hauptkette, an die α-(1→6)-gebundene D-Xylosereste geknüpft sind. Diese sind wiederum mit D-Galactose und L-Fucose-Einheiten verknüpft (Endreß, 1990). Untersuchungen von Voragen, (1986b) zeigten, dass ein solches Fucogalactoxyloglucan mit 43,5 % der wichtigste Bestandteil der Hemicellulosen von Äpfeln ist. Die Xyloglucane scheinen in der Primärwand eine (die) herausragende Rolle als Haftsubstanz zwischen den Zellwandbestandteilen zu spielen. Einerseits halten sie durch Wasserstoffbrückenbindungen die Cellulosefibrillen zusammen und bilden andererseits Verknüpfungspunkte zwischen Cellulose und anderen Zellwandpolymeren (Darvill et al, 1980). Die kovalente Bindung von Pektinstoffen an Xyloglucan wird ebenfalls diskutiert (Voragen, 1986b).

Mannane:

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist es eher unwahrscheinlich, dass Mannane in den primären Zellwänden vorkommen. In Form von Heteropolysacchariden sind sie jedoch neben Xylanen die Hauptbestandteile der Sekundärwände. Mannane haben die Funktion

von Gerüst- und Reservestoffen und werden hauptsächlich aus den Samen von Leguminosen und den verholzten (sekundären) Zellwänden von zapfentragenden Nadelbäumen isoliert (Bacic et al, 1988). In der Lebensmittelindustrie werden sie vielfach als Verdickungs- und Stabilisierungsmittel eingesetzt.

Die Struktur dieser Polymeren besteht meist aus einer (1→4)-β-D-Mannose-Hauptkette, die im Fall von Galactomanan an C(O)6 mit einzelnen α-D-Galactopyranosylmolekülen und bei Glucomannan mit β-D-Glucopyranosylmolekülen substituiert ist.

Werden beide Substituenten, Glucose in der Hauptkette und Galactose in den Seitenketten, gefunden, so spricht man von Galactoglucomannanen. In Abb. 4 wird die Struktur für ein solches Polymer dargestellt, bei dem die Hauptkette an C(O)6 mit einzelnen α-D-Galactopyranosemolekülen substituiert ist. Die Verteilung der Substituenten ist zufällig, wobei das Verhältnis Galactose:Glucose:Mannose mit 1:1:3 angegeben wird (Bacic et al, 1988).

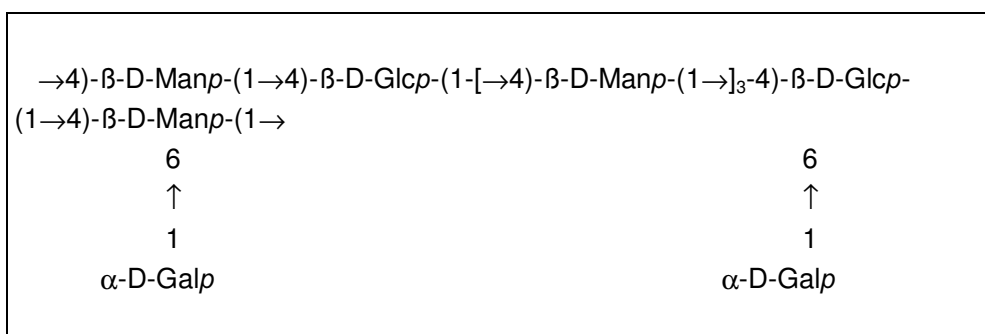


Abb. 4: Strukturvorschlag eines Galactoglucomannans verändert nach Bacic et al (1988)

Xylane:

Obwohl die Xylane auf Grund des alphabetischen Ordnungsprinzips am Schluss aufgeführt werden, stellen sie doch die größte Gruppe der Nichtcellulose-Polysaccharide in den sekundären Zellwänden von Dikotyledonen dar. In den primären Zellwänden sind sie, außer bei Monokotyledonen, in geringer Konzentration enthalten (Endreß, 1990). Alle Xylane setzen sich aus einer (1→4)-β-D-Xylopyranose-Hauptkette und am C-2- oder C-3-Atom anhaftenden Seitenketten zusammen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Seitenketten bedingt die Heterogenität der Xylane. Als mögliche Substituenten werden in der Literatur α-4-O-Methylglucuronsäure, Arabinose, Galactose, Glucose (Aspinall, 1980) und Ferulasäure erwähnt (Heredia, 1995).

2.3.3 Pektinstoffe

Unter Pektinstoffen wird eine Gruppe von verzweigten und stark hydratisierten Polysacchariden zusammengefasst, die in höheren Pflanzen hauptsächlich in der primären Zellwand oder in der Mittellamelle lokalisiert sind (Schindler, 1993). Sehr pektinhaltig sind z.B. Schalen von Citrusfrüchten und Apfeltrester, die in der Trockenmasse 20 - 40 % bzw. 10 - 20 % Pektin enthalten (Belitz und Grosch, 1992).

Der strukturelle Aufbau von Pektinen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. So manifestierte sich in den 30er Jahren das Bild einer homologen Kette aus α -(1→4)-verknüpften Galacturonsäuremolekülen, die teilweise mit Methanol verestert sind. Dieses Modell war zunächst unbestritten und fand sich bis in der jüngsten Vergangenheit in den meisten Lehrbüchern wieder.

Durch die intensive Forschung entstand im Laufe der Jahre aus einer Vielzahl von Einzelergebnissen eine völlig neue Vorstellung über den chemischen Aufbau der Pektine. De Vries et al (1981) gingen davon aus, dass es innerhalb des Pektinmoleküls sowohl homogen aufgebaute α -(1→4)-Galacturonsäureketten gibt, als auch Teilbereiche, wo durch den „Einbau“ von Rhamnosemolekülen eine Art „Zick-Zack“-Struktur entsteht, an die zusätzlich noch Seitenketten unterschiedlicher Größe und Zuckerbaustein-zusammensetzung angehängt sind. Solche Zonen bestehen hauptsächlich aus Rhamnogalacturonanen, Arabanen und Arabinogalactanen.

Es entstanden die Begriffe „Homogalacturonane“ (sog. „smooth-regions“) und „Heterogalacturonane“ (sog. „hairy-regions“). Darvill et al (1980) sprechen von Homogalacturonanen, wenn mehr als 25 unverzweigte Galacturonsäuremoleküle vorliegen und diese zusätzlich mit Methanol verestert sind. Diese unverzweigte Pektinfraktion soll nach Neukom et al (1980) hauptsächlich in der Mittellamelle lokalisiert sein, wogegen verzweigte Pektine eher in der Primärwand lokalisiert sind. Die Existenz von Homogalacturonanen wird von Bacic et al (1988) zwar nicht ausgeschlossen, wahrscheinlich handelt es sich hierbei aber um regelmäßig wiederkehrende, homologe Abschnitte innerhalb einer Rhamnogalacturonankette. Die „hairy regions“ im Pektinmolekül werden durch (meist) neutrale Seitenketten gebildet, die entweder über C(O)4 an ein Rhamnosemolekül oder über C(O)2 bzw. C(O)3 an Galacturonsäure gebunden sind.

Abbildung 5 zeigt das aktuelle und mittlerweile allgemein anerkannte Modell der primären pflanzlichen Zellwand.

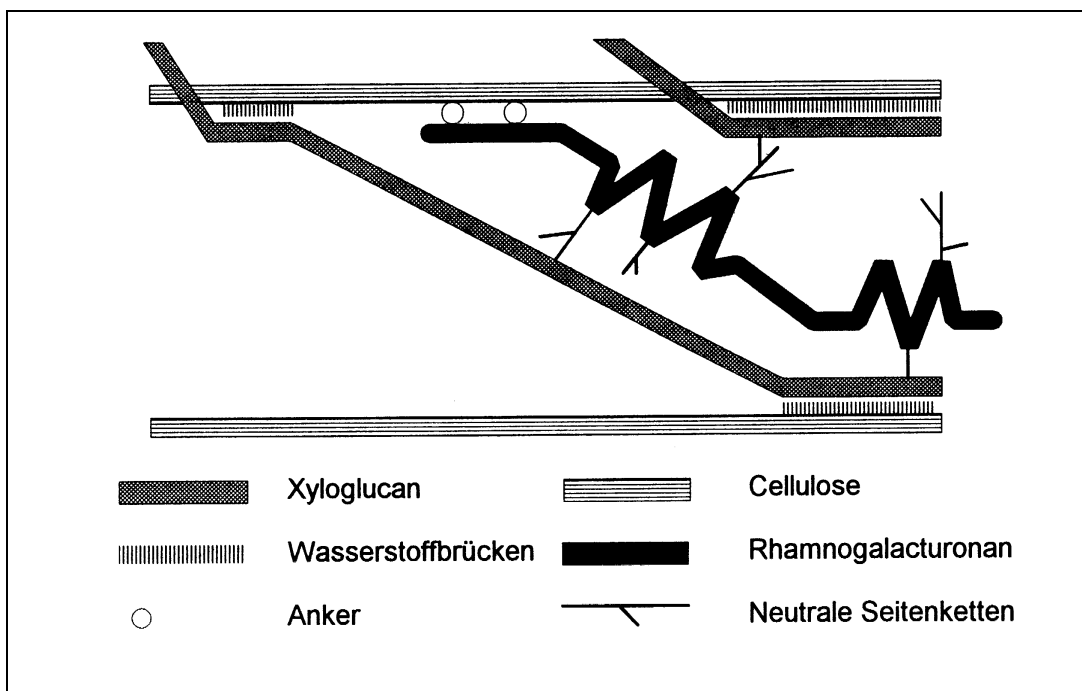


Abb. 5: Modell der primären pflanzlichen Zellwand nach Voragen et al (1992)

Pektine können am C-6-Atom der Galacturonsäure mit Methanol verestert sein. Der Veresterungsgrad (VE) gibt das prozentuale molare Verhältnis zwischen veresteter Galacturonsäure und Gesamtgalacturonsäure an. In der Literatur werden bei Früchten Veresterungsgrade zwischen 50 - 90 % angegeben (Tucker et al, 1993). Neukom (1980) geben bei Äpfeln einen durchschnittlichen VE von 72 % an. Zusätzlich können Pektine noch in geringem Umfang acetyliert sein.

Es gibt unterschiedliche Auffassungen über die Bereiche im Pektinmolekül, in denen hochveresterte Pektine lokalisiert sind. Darvill, et al (1980) gehen davon aus, dass Homogalacturonane hochverestert sind, de Vries et al (1982) fanden in den „hairy regions“ Veresterungsgrade von annähernd 100 %. Renard et al (1990) isolierten aus Apfelmittellamellen eine Polysaccharidfraktion, die zu 80 % aus Galacturonsäure bestand und zu 60 % verestert war. Tucker et al (1993) vertritt die Meinung, dass die Verteilung der Methylester im Pektinmolekül sowohl zufällig als auch geordnet sein kann und damit hochveresterte Abschnitte sowohl in verzweigten, als auch unverzweigten Bereichen entstehen können.

Neuere Untersuchungen von Massiot et al (1994) kommen bei Äpfeln zu dem Ergebnis, dass gering verzweigte Rhamnogalacturonane hochverestert (70 %) und somit typisch für Pektin aus der Mittellamelle sind. Hochverzweigte Rhamnogalacturonane repräsentieren Pektine der Primärwand, wobei die freien Carboxylgruppen über Ionen- und/ oder Esterbindungen mit Hemicellulosen oder Proteinen verknüpft sein sollen.

2.3.4 Glycoproteine

Die primäre Zellwand höherer Pflanzen besteht zwischen 5 - 10 % aus Protein (Bacic et al, 1988). Die Proteine der Zellwand lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe bilden die am Auf- und Abbau der Zellwand beteiligten Enzyme, die andere Gruppe sind die für die Architektur der Zellwand wichtigen Strukturproteine. Sie kommen ausnahmslos als Glycoproteine vor (Schindler, 1993).

Glycoproteine bestehen überwiegend aus Aminosäuren, an die über freie OH-Gruppen Glycoside kovalent gebunden sind. Die Zuckerreste bestehen sowohl aus kurzkettigen Arabinose- wie auch Galactoseresten. Bei den Aminosäuren ist der Anteil an Hydroxyprolin (bis zu 20 %) sehr hoch, weshalb man die Zellwandproteine häufig auch als hydroxyprolinreiche Glycoproteine (HRGPs) bezeichnet (Endreß, 1990; Wilson et al, 1986). In diese Gruppe fällt auch das von Lamport et al (1960) erstmals in höheren Pflanzen nachgewiesene und fantasievoll bezeichnete „Extensin“. Es besteht aus einer hydroxyprolinreichen Hauptkette, in der neben Serin auch noch Lysin nachgewiesen werden konnte. Trimere oder Tetramere Arabinoseseitenketten sind kovalent an Hydroxyprolin gebunden. Monomere Galactose ist an Serin geknüpft. Diese könnte nach Albersheim (1975) ein möglicher Anknüpfungspunkt für kovalente Bindungen zwischen Zellwandproteinen und Cellulose oder Pektinstoffen sein. Ein eindeutiger Beweis für solche Bindungen konnte aber noch nicht erbracht werden.

Über die funktionellen Eigenschaften der Zellwandproteine gibt es eine Reihe von Hypothesen. Lamport und Epstein (1983) ließen ihre Vorstellungen, Proteine würden zur Zellstruktur beitragen, in das sog. „wrap and weft“-Modell einfließen. Hierbei sollten Cellulosefibrillen über Extensinmoleküle zu einem Netzwerk „verwebt“ werden. Eine kovalente Bindung zwischen Cellulose und HRGPs schlossen die Autoren aus. Wilson et al (1986) konkretisierten diese Vorstellungen in einem eigenen Modell. Andere Autoren gehen davon aus, dass HRGPs an der Steuerung des Zellwachstums beteiligt sind, die Widerstandsfähigkeit des Zellverbandes gegenüber mechanischen Verletzungen oder Infektionen beeinflussen und eine Art „Carrier“ zwischen Zellwand und Cytoplasma für Polysaccharide darstellen (zusammengefasst aus: Wilson et al, 1986). Arabinogalactan-Proteine (AGPs) Typ II werden ebenfalls zur Gruppe der HRGPs gezählt. Sie gehören nach Aspinall (1980) zu den elementaren Bestandteilen der primären Zellwände von Dikotyledonen und bilden die Verknüpfungspunkte zwischen Pektinstoffen und Neutralpolysacchariden. In Getränken konnten ebenfalls AGPs nachgewiesen werden, so dass man von einer guten Löslichkeit der AGPs in wässrigem oder schwach saurem Milieu ausgehen kann. Pellerin et al (1993) isolierten aus einem Rotwein zwei AGPs. Die AGPs bestanden zu 87 % bzw. 74 % aus Neutralzucker, jeweils 4 % Protein und 5 % bzw. 7 % Uronsäuren. Die Molekulargewichte werden mit 176.000 Dalton und 224.000 Dalton angegeben. Die Autoren nehmen an, dass die AGPs auf Grund ihrer relativ hohen Galacturonsäuregehalte Bestandteil von Pektinstoffen sind. Waters et al (1994) isolierten ebenfalls aus Rotwein ein AGP mit einem Molekulargewicht von 210.000 Dalton. Sie stellten fest, dass durch Zusatz von AGP zu einem Wein, dessen proteininduzierte Trübungsbereitschaft sinkt.

2.4 Polysaccharide mikrobiellen Ursprungs

Reifende Früchte werden von zahlreichen Mikroorganismen befallen. Ihre schädigende Wirkung für die Fruchtsaferstellung liegt einerseits in der Fähigkeit typische, wertgebende Fruchtmerkmale/-inhaltsstoffe zu verändern, andererseits unerwünschte Nebenprodukte zu produzieren und in den Saft abzugeben. Mikrobielle Qualitätsminderungen werden von Schimmelpilzen, Bakterien und Hefen verursacht.

2.4.1 Schimmelpilze

Botrytis cinerea ist ein Grauschimmelpilz, der sowohl im Wein- als auch im Obstbau eine herausragende pflanzenbauliche Bedeutung hat. Er wächst saprophytisch auf abgestorbenen Pflanzenteilen, kann aber auch Früchte z.B. Beeren befallen. Pilze dieses Befallstyps werden als pathogene oder toxische Saprophyten bezeichnet. Man versteht hierunter Parasiten, die Substanzen ausscheiden, die in das gesunde pflanzliche Gewebe eindringen und es absterben lassen. Welche Stoffe hierbei eine Rolle spielen ist noch nicht völlig aufgeklärt. Man geht aber davon aus, dass es sich um pektinspaltende Enzyme und Laccase handelt. Auch die Bildung eines phytotoxischen Glykoproteins wird beschrieben (Dittrich, 1987).

Äußeres Zeichen für den Befall durch den Grauschimmelpilz *Botrytis cinerea* ist das Hervorbrechen von Konidienträgern mit deutlich sichtbaren grauen Konidien („Schimmelrasen“). Im Weinbau lässt sich unter günstigen Witterungsbedingungen durch „Edelfäule“ eine Erhöhung der Zuckerkonzentration und damit eine Verbesserung der Most-/Weinqualität erzielen. Im Obstbau hingegen, ist der Befall der Pflanzen und Früchte durch Schimmelpilz auf Grund einer Vielzahl von negativen Begleiterscheinungen gefürchtet.

Angeschimmelte Früchte verlieren ihre Verkaufsfähigkeit und dürfen nach der Fruchtsaftverordnung auch nicht mehr zur Herstellung von Fruchtsaft verwendet werden. *Botrytis cinerea* scheidet beim Befall der Früchte eine Reihe von pektolytischen Enzymen aus. Es kommt zu einer Art Perforation des Pflanzengewebes. Durch pektinspaltende Enzyme werden Zellverbände angegriffen, die Frucht verliert an Textur und wird „matschig“. Bei empfindlichen Beerenfrüchten (Himbeeren, Erdbeeren) kann es schon während der Blüte zu einer Pilzinfektion kommen, so dass die Frucht bereits verdirbt, während sich der Fruchtknoten fleischig verdickt.

Der Zellsaft von befallenen Früchten stellt für den Pilz ein wichtiges Substrat für seinen Stoffwechsel dar. Der Saft wird in seine Zellmasse aufgenommen und verändert. Einerseits kommt es zu einer Verarmung an Inhaltsstoffen (Zucker- und Säureabbau, Aminosäureabbau), es werden aber auch Inhaltsstoffe gebildet, die nativ in den Früchten nicht vorkommen. Bei Traubenbeeren wurden die Bildung von Glycerin, Zuckeralkoholen, Gluconsäure, Galactarsäure und Polysacchariden nachgewiesen (Dittrich, 1987).

Die Bildung von Polysacchariden durch *B. cinerea* ist seit langem bekannt. Grundlegende Arbeiten wurden von Dubourdieu (1978) und Mitarbeitern (1981) angefertigt. Hierbei wurde das Hauptaugenmerk auf ein, von *B. cinerea* gebildetes β -Glucan gerichtet. Im

bzw. Filtrierbarkeit gibt. Anhand von Modellversuchen und Weinen, von denen bekannt war, dass sie schwierig zu filtrieren waren, stellten sie fest, dass die Filtrationsprobleme (Statische Membranfiltration, Porendurchmesser 0,45 μm) bei Wein bereits bei 2 - 3 mg/L Glucan beginnen. Das Problemfeld „ β -Glucan“ wurde von zahlreichen Autoren bei Wein (Wucherpfennig et al, 1984a; 1984b; Schmitt et al, 1992) und Fruchtsaft (Schöppllein et al, 1990; 1991; Will, 1993; Patz, 1994) diskutiert.

2.4.2 Bakterien

Auf der Oberfläche von Früchten findet man eine Vielzahl von Bakterien. Durch Verletzungen der Früchte bei der mechanischen Ernte oder beim Transport tritt Zellsaft aus und bildet ein ideales Substrat für die Vermehrung von Hefen und Bakterien. Unzureichend gereinigte Transportgefäße und Verarbeitungseinrichtungen sind weitere und zugleich völlig unnötige Infektionsquellen der Früchte durch Bakterien.

Die Mikroflora der befallenen Früchte setzt sich hauptsächlich aus Milchsäurebakterien verschiedener Arten der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc*, sowie Essigsäurebakterien der Gattung *Acetobacter* und *Gluconobacter* zusammen (Dittrich, 1987).

Von Bakterien ist bekannt, dass sie hochviskose Stoffwechselprodukte in das Substrat (z.B. Wein) abgeben, die überwiegend aus Glucose, Mannose mit Ribonucleinsäure und Protein, aber auch Galactose, zusammensetzt sind (Agudelo et al, 1994, Oevelen und Verachtert, 1979). Für das „Zäh“-Werden von säurearmen Weinen soll ein von *Pediococcus* sp. produziertes (1 \rightarrow 3)- β -(1 \rightarrow 2)- β -D-Glucan mit einem Molekulargewicht von 800.000 Dalton verantwortlich sein (Llaubères et al, 1990).

2.4.3 Hefen

Kontaminationen von Früchten und Fruchtsäften mit Hefen sind nahezu unvermeidbar. Die Zellwand von Hefen der Gattung *Saccharomyces* ist reich an Polysacchariden, hauptsächlich Mannose und Glucose (Villetaz et al. 1980). Das Mannan besteht aus einem (1 \rightarrow 6)- α -D-Mannan Grundgerüst mit (1 \rightarrow 2)- α - und (1 \rightarrow 3)- α -verknüpften Seitenketten. Das β -Glucan der Hefezellwand ist sehr heterogen zusammengesetzt. Die Hauptkomponente(ca. 85%) besteht aus einem verzweigten (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan, wobei die Hauptketten durch (1 \rightarrow 6)- β -glycosidische Bindungen (3%) miteinander verknüpft sind (Manners et al, 1973).

Bei der Weinbereitung wurde nachgewiesen, dass durch die Polysaccharide, die bei der Gärung an das Substrat abgegeben werden, der Kolloidgehalt nach der Gärung um das Dreifache höher sein kann als vor der Gärung (Villetaz und Amadò, 1981).

2.5 Veränderung der Polysaccharide während der Reifung von Früchten

Während der Reife von Früchten ändert sich ständig die Zusammensetzung der Inhaltstoffe. Während der Fruchtreife werden die in den Blättern gebildeten organischen Verbindungen in gelöster Form zu den Früchten transportiert und dort zu verschiedenen Verbindungen umgebaut. Meist erfolgt dort eine Einlagerung in Form hochmolekularer Substanzen (Reservestoffe). Im weiteren Verlauf der Fruchtreife werden viele dieser unlöslichen Verbindungen wieder in lösliche Stoffe um- und abgebaut. Bei vielen Pflanzen durchläuft dieser als „Atmung“ bezeichnete Vorgang ein Maximum, das sog. *Klimakterium*. Typische klimakterische Pflanzen sind z.B. Äpfel, wogegen bei *Ribes*-Arten (Johannisbeeren) kein Klimakterium gefunden wurde (Keipert, 1981).

Die Fruchtqualität wird durch den Reifegrad entscheidend beeinflusst. Unreifes Obst ist meist grün gefärbt, hat eine sehr feste Textur und lässt sich nur schwer von der Pflanze trennen. Das typische Fruchtroma ist, wenn überhaupt, nur schwach wahrnehmbar, Säure- und Zuckergehalt sind in einem unharmonischen Verhältnis. Solche Früchte dürfen nicht zur Verarbeitung gelangen. Die Pflückreife wird erreicht nachdem das Obst seine für Art und Sorte typische Farbe erreicht hat und sich leicht vom Baum oder Strauch ernten lässt. Dieser Zeitpunkt ist auch für die Ernte optimal, da das Obst durch seine Festigkeit vor äußerlichen Beschädigungen weitgehend geschützt ist. Durch die mechanischen Ernteverfahren ist es nicht möglich, eine selektive Auslese der Früchte z.B. nach dem Reifegrad zu betreiben. Durch pflanzenbauliche und züchterische Maßnahmen wird versucht, die Früchte möglichst gleichmäßig heranreifen zu lassen.

Viele Früchte erreichen ihre optimale Genussreife erst nach einer gewissen Lagerzeit, wobei alle Reifeprozesse in diesem Zeitraum unvermindert weiterlaufen. Äußerlich kann man dies an Farbveränderungen (Farbvertiefung und Glanzverlust) sowie am Weichwerden der Früchte beobachten. Sensorisch verändert sich sowohl die Textur („Biss“) als auch der Geschmack des Obstes.

Der optimale Reifegrad der Früchte bei der Verarbeitung zu Saft liegt zwischen Pflück- und Genussreife. Überlagertes Obst wird mürbe oder teigig und führt zu Press- und Klärschwierigkeiten (Thönges et al, 1984).

Die Hauptursache für das Weichwerden von Früchten liegt in der (bio-) chemischen Veränderung der Inhaltsstoffe vor allem der Polysaccharide begründet, wobei der exakte biochemische Mechanismus bis heute nicht aufgeklärt werden konnte (Muda, 1995).

Entsprechende Untersuchungen wurden bei Erdbeeren (Huber, 1984), Mandarinen (Naohara et al, 1994), Mango (Muda et al, 1995), Kiwi (Redgwell et al, 1990), Tafeltrauben (Miceli, 1995), Tomaten (Gross et al, 1979), Birnen (Yamaki et al, 1979; Bartley et al, 1982a; Ahmed et al, 1980; Labavitch et al, 1983; Dick et al, 1989; Martin-Cabrejas et al, 1984) und Apfel (Ben-Arie et al, 1979; Stow, 1993; de Vries et al, 1984) durchgeführt.

Bartley (1976) untersuchte die quantitative Veränderung der Polysaccharide im Fruchtfleisch von Äpfeln in einem Zeitraum von 119 Tagen nach der Ernte. Er stellt neben einem Verlust von Galactose, vermutlich durch eine fruchteigene β -Galactosidase katalysiert, auch einen Rückgang von hochmolekularen Pektinen fest. Stärke wurde im Verlauf der Lagerung vollständig enzymatisch abgebaut. Diese Ergebnisse wurden von

de Vries et al (1981) im Wesentlichen bestätigt. Diese Autoren gingen von einem alkohol-unlöslichen Rückstand (AUR) aus. Sie stellten zwar eine quantitative Zunahme an leicht extrahierbaren (Natriumacetat-Puffer) Pektinen während der Reife fest, die qualitative Zuckerbausteinzusammensetzung veränderte sich jedoch kaum. Ein zwingender kausaler Zusammenhang zwischen dem Weichwerden der Früchte und dem Löslichwerden von Pektinen besteht nach Meinung von de Vries nicht. In einigen Fraktionen aus reifen Äpfeln wurden erhöhte Gehalte an freier, nicht an Galacturonan gebundener Xylose und Glucose gefunden. Dieses deutet auf Xyloglucane hin und lässt die Vermutung zu, dass der Texturverlust durch Veränderungen im Innern der Zellwände hervorgerufen wird.

Welche Rolle hierbei fruchteigene Enzyme spielen ist noch nicht abschließend geklärt. Bartley et al (1982*b*) entwarfen ein Modell, um die Wirkung der Enzyme beim Weichwerden der Früchte zu erklären. Demnach soll eine Polygalacturonase (PG), wahrscheinlich in Kombination mit einer Pektinesterase (PE) zur Mittellamelle transportiert werden. Da bei Äpfeln eine endo-PG fehlt oder zumindest nicht nachgewiesen werden konnte, kommt es durch die exo-PG nur zu einem mäßigen Abbau von Zellwandpolymeren und damit nur zu einem eingeschränkten Texturverlust. Bei allen anderen Früchten verursacht die endo-PG eine weitreichende Auflösung des Zellverbandes, ein Löslichwerden der Pektine und ein Erweichen der Früchte. Ben-Arie et al (1979) vermuten, dass noch andere Enzymkomplexe, wie z.B. Cellulasen und β -Galactosidasen, an der Reifung beteiligt sind.

Stow (1993) sieht in der Abnahme der Calciumkonzentration in der Mittellamelle einen weiteren wichtigen Ansatzpunkt, um das Weichwerden von Früchten zu erklären. Diese These stützt sich zum einen auf die Beobachtung, dass die Konzentration an löslichem Calcium im Fruchtfleisch während der Reife abnimmt und dass bei Äpfeln eine Infiltration mit Calcium zum Zeitpunkt der Ernte eine Verbesserung der Fruchtfleischfestigkeit mit sich bringt. Der Calciumverlust resultiert wahrscheinlich aus einer Auflösung der konjugierten Zonen der Pektinmoleküle und bewirkt somit einen verminderten interzellularen Zusammenhalt. Stow schließt nicht aus, dass andere Faktoren, wie die Veränderung des Turgordrucks z.B. durch Wasserverlust, eine Veränderung der Membrandurchlässigkeit oder eine andere dreidimensionale Netzwerkstruktur bei der Reifung von Früchten eine Rolle spielen.

3 Beerenobst

3.1 Einteilung des Beerenobstes

Aus der Sicht des Botanikers ist das Beerenobst eine sehr heterogen zusammengesetzte Gruppe von einzelnen Obstarten, wobei nicht alle Obstarten, die im allgemeinen Sprachgebrauch als „Beeren“ bezeichnet werden, zwangsläufig auch der botanischen Gruppe des Beerenobstes zuzuordnen sind. So werden z.B. Erdbeeren und Hagebutten fälschlicherweise als Beeren bezeichnet, obwohl sie eigentlich zu den Sammelnussfrüchten zählen. Himbeeren, Brombeeren und Holunder gehören botanisch zur Gruppe der Steinfrüchte; viele Südfrüchte und alle Zitrusarten werden aber zu den Beerenfrüchten gerechnet.

Auf Grund dieser, für den Nichtbotaniker oft verwirrenden, Systematik haben sich eigenständige Klassifizierungen entwickelt. Der Obsthandel fasst das Beeren- und Steinobst zum Weichobst zusammen. In diese Gruppe fallen alle Früchte, die auf Grund ihrer äußeren Eigenschaften als wenig haltbar und transportempfindlich gelten. Keipert (1981) schlägt vor, den Begriff „Beerenobstgehölze“ einzuführen und hierunter sowohl die angebauten Arten (Kulturformen), als auch die Wildfrüchte zusammenzufassen.

Eine botanische Einteilung des Beerenobstes gemäß der Ausbildung der Früchte ist in Abb. 7 dargestellt.

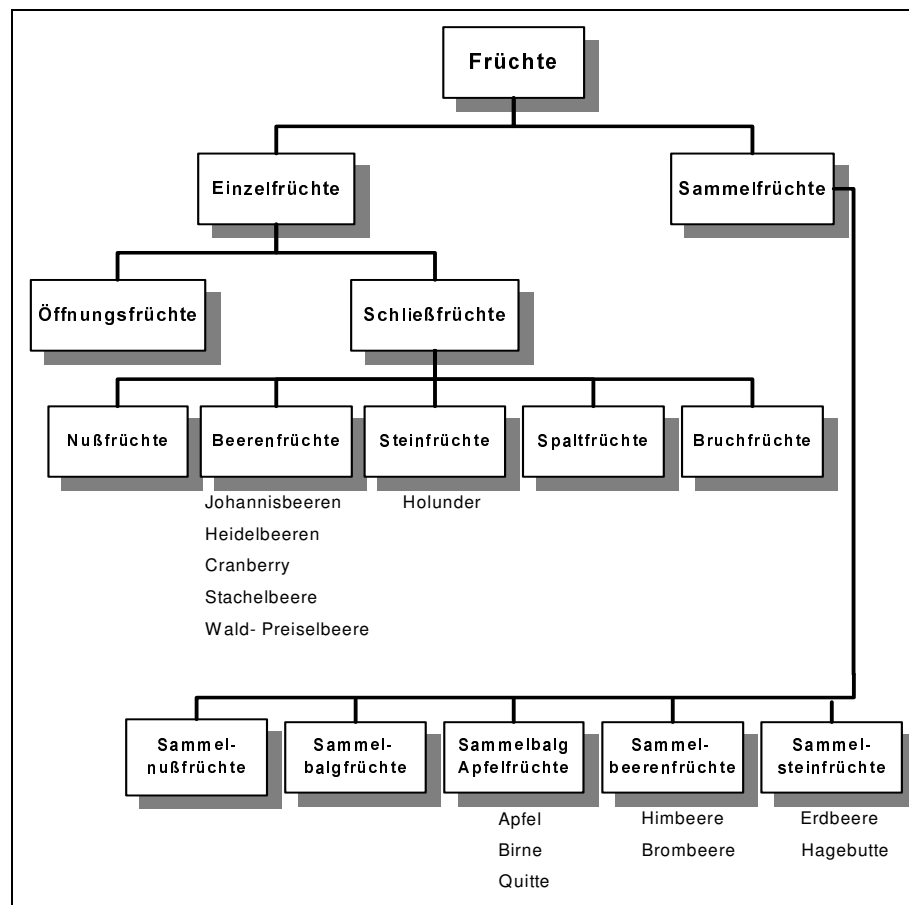


Abb. 7: Einteilung des Beerenobstes gemäß der Ausbildung von Früchten

Die meisten Beerenarten sind Einzelfrüchte und gehören zur Gruppe der Schließfrüchte, bei denen die Samen vom Perikarp fest umschlossen werden. Bei den Beerenfrüchten bleibt das Perikarp bis zur Reife fleischig verdickt, wobei Meso- und Endokarp oft stark anschwellen und zunehmend saftiger werden.

Das Perikarp der Steinfrüchte entwickelt sich anders. Aus dem Exokarp bildet sich eine feste, manchmal lederige Haut, den essbaren, saftigen Teil das Mesokarp. Das Exokarp entwickelt sich zu einem harten und meist verholzten Gehäuse, welches den Samen beinhaltet.

Wie die Einzelfrüchte gehen auch Sammelfrüchte aus einer einzelnen Blüte hervor. Die Fruchtblätter lösen sich bei der Reife nicht einzeln ab, sondern werden meist durch die Blütenachse zusammengehalten und fallen als Einheit ab. Bei den Sammelsteinfrüchten löst sich die Gesamtheit der Einzelfruchtchen von der Blütenachse (Franke, 1981).

3.2 Beschreibung einzelner Beerenobstarten

3.2.1 Schwarze Johannisbeere

Wissenschaftlicher Name: *Ribes nigrum*

Familie: Steinbrechgewächse (Saxifragaceae)

Gattung: Ribes, Untergattung: Coreosma

Nach Thönges et al (1984) ist die schwarze Johannisbeere keine durch Züchtung entstandene Sorte, sondern eine botanische Art der Johannisbeere (*Ribes nigrum*) und wächst heute noch als Wildform in den Wäldern Mittel- und Nordeuropas. Nach „Lukas Anleitung zum Obstbau (1992) entstand das heutige Sortiment der Kultursorten aus Zufallssämlingen, Mutanten und kontrollierten Neuzüchtungen.

Auf Grund ihrer heilenden Wirkung bei Gicht, Rheuma und Erkältungskrankheiten wurden schwarze Johannisbeeren schon vor etwa 400 Jahren in den Haus- und Klostergärten angebaut. Bei der Verwendung hat sich bis heute nicht viel geändert. Aus den Früchten werden Marmeladen, trinkfertiger Saft (Nektar), Fruchtwein, Likör (Cassis) hergestellt, aus den Blättern können alkoholische Auszüge extrahiert werden. Im Volksmund werden schwarze Johannisbeeren auch als „Gichtbeerlein“ oder „Wanzenbeere“ bezeichnet. Letztere Bezeichnung leitet sich von dem strengen, an Blattwanzen erinnernden Geruch ab, den die Pflanze wohl ursprünglich zur Abwehr von Schädlingen entwickelte (Thönges et al, 1984). In vielen Kultursorten wurde dieser eigenartige und penetrante Geruch, der auch von vielen Menschen als unangenehm empfunden wird, durch Auslesezüchtung abgemildert. Bei der Verarbeitung verliert sich dieser Geruch fast vollständig, so dass verarbeitete Produkte nicht mit diesem Negativimage behaftet sind. Dies wäre eine plausible Erklärung, warum schwarze Johannisbeeren zum Frischverzehr nahezu bedeutungslos sind.

Dem Hobbygärtner und dem Erwerbsobstbauer stehen heute ein Vielzahl von empfohlenen Kultursorten zur Auswahl. Die Frage nach der Anbauwürdigkeit einer Sorte ist eng mit kulturtechnischen, ökonomischen und ökologischen Anforderungen verknüpft.

Da sich diese marktorientierten Parameter laufend ändern, befindet sich auch der Sortenspiegel in einem ständigen „turn-over“. Zuchtziele, wie Ertragsleistung, Ertragssicherheit, qualitative Zusammensetzung der Inhaltsstoffe (Säure/ Zucker-Verhältnis, Vitamin C-Gehalt) und sensorische Eigenschaften haben zwar nicht an Bedeutung verloren, von einer guten Sorte wird aber heute mehr verlangt. Sie muss maschinell geerntet werden können, möglichst resistent gegen Krankheiten und Schädlinge sein und sich für die industrielle Verarbeitung eignen. Bei derart hohen Anforderungen an eine marktreife Sorte ist es nicht sehr verwunderlich, dass sich das Angebot auf einige wenige Sorten verkürzt, wobei sich in Europa „Titania“, „Ben Lomond“, „Ben Alder“, „Ben Tirran“ und „Omata“ durchzusetzen scheinen (Dietrich et al, 1994).

Schwarze Johannisbeeren wachsen am besten auf nährstoffreichen Böden in sonniger Lage, wobei eine Spätfrostgefährdung unbedingt ausgeschlossen werden muss. Sie werden als Büsche, Hecken oder Spindeln kultiviert. Für die maschinelle Ernte eignen sich besonders straffwüchsige Sorten, die als Spindeln erzogen werden. Der Ertrag setzt bereits im zweiten Jahr nach der Pflanzung ein. Johannisbeeren sind zwar selbstfruchtbar, eine Zusatzbestäubung durch Bienen fördert die Ertragssicherheit. Eine gleichmäßige Durchfärbung der Beeren im Innern des Strauchs zeigt den optimalen Erntezeitpunkt an. Bei trocken-heißem Wetter kann es zu erheblichen Ernteverlusten durch ein Verrieseln der Beeren kommen. Im Gegensatz zu vielen anderen Früchten, nimmt der Säuregehalt bis zur Vollreife stetig zu (Thönges et al, 1984). Der Flächenertrag wird von Sinn (1991) mit 50 - 100 dt/ha angegeben. Diese Mengen können nicht mehr manuell geerntet werden, zumal unter idealen Bedingungen maximal 8 - 10 kg Beeren pro Arbeitskraft und Stunde (AKh) gepflückt werden können. Durch die Verwendung von halbautomatischen Schüttelpistolen konnte die Leistung zwar verdoppelt werden, der entscheidende Durchbruch gelang aber erst mit der Erfindung einer vollautomatischen Erntemaschine. Diese Vollernter arbeiten nach dem Schwingschüttler-Prinzip und erzielen Leistungen zwischen 0,12 - 0,19 ha/h oder 500 - 750 kg/AKh. Die Ernteverluste schwanken zwischen 5 - 20 %.

Nach Schätzungen des Verbandes der Erzeuger von schwarzen Johannisbeeren werden in Europa im Mittel der Jahre ca. 140.000 to Beeren erzeugt. Davon entfallen auf

Polen	ca. 130.000 to
Deutschland	ca. 6.000 to
Andere	ca. 20.000 to

In Osteuropa entwickelt sich der Markt für schwarze Johannisbeeren besonders dynamisch. Polen steigerte die Erzeugung derart, so dass es heute einen Anteil von über einem Drittel der Welternte beisteuert. Für Deutschland ist Polen, neben anderen osteuropäischen Ländern, mit Abstand der wichtigste Handelspartner. Von insgesamt ca. 20.700 to Einfuhr im Jahr 1998 wurden ca. 17.200 to schwarze Johannisbeeren aus Polen eingeführt. Hiervon entfallen 5.200 to auf Frischware und ca. 12.000 to auf gefrostete Ware. Die Gründe für diese Entwicklung liegen alleine auf der Kostenseite. Obwohl

osteuropäische Staaten für Deutschland bei der Einfuhr von Waren als Drittländer gelten und mit einem erhöhten Einfuhrzoll (1997 10,1% bei Frischware und 16,5 % bei gefrosteter Ware) belegt werden, sind die Preise im europäischen Vergleich konkurrenzlos günstig (VDF, 1999). Die Durchschnittseinfuhrpreise für schwarze Johannisbeeren schwankten in den letzten 10 Jahren aufgrund stark unterschiedlicher Erntemengen zwischen einem Maximum in 1990 von 211,92 DM/ 100 kg und einem Minimum von 56,09 DM/ 100 kg in 1993.

Die im Inland erzeugten schwarzen Johannisbeeren werden zum Großteil selbst verbraucht (75 %) oder als Essobst (11 %) sowie Verwertungsobst (14 %) verkauft. Die deutsche Fruchtsaftindustrie verarbeitete nach eigenen Angaben 1998 6.000 to (1997: 6.300 to; 1996: 6.300 to).

3.2.2 Brombeere

Wissenschaftlicher Name: *Rubus fruticosus* L.

Familie: Rosengewächse (Rosaceae)

Gattung: Rubus

Unter der Artbezeichnung *fruticosus* wird eine große Anzahl von Brombeerarten zusammengefasst. Allein in Mitteleuropa gibt es ca. 70 wild wachsende Arten. An Uferböschungen, Rodungen oder Bahndämmen bilden sie mächtige, nahezu undurchdringbare Hecken mit wohlschmeckenden, tiefschwarz glänzenden Früchten. Hiervon sind die Feldbrombeeren oder Kratzbeeren zu unterscheiden, die der Art *caesius* zuzuordnen sind. Zwar bildet diese Art auch stachelbesetzte Ranken aus, doch die Wüchsigkeit ist nicht so stark wie bei Waldbrombeeren. Die Früchte sind blau bereift und reifen etwas früher als Waldbrombeeren. In Deutschland werden Brombeeren erst seit Mitte des letzten Jahrhunderts kultiviert.

Für den Erwerbsobstbau haben heute u.a. zwei Sorten Bedeutung. „Theodor Reimers“ (*Rubus discolor* oder syn. *Rubus procerus*) ist eine bestachelte, sehr wüchsige und ertragreiche Sorte, die sehr aromatische, leicht säuerliche, saftige aber wenig haltbare Früchte hervorbringt. Wegen der Verletzungsgefahr durch die Dornen versprach man sich von der dornlosen Sorte „Thornless Evergreen“ (*Rubus laciniatus*) eine große Ernteerleichterung. Sie ist zwar auch sehr ertragreich und bringt darüber hinaus feste Früchte. Wegen des verhaltenen Aromas und dem geringen Saftanteil ist sie für die Verarbeitung aber weniger geeignet (Thönges et al, 1984).

Brombeeren wachsen am besten auf tiefgründigen, mit Nährstoffen gut versorgten Böden ohne Staunässe. Nur in ausgesprochen sonnigen Lagen kann eine vollständige Fruchtreife erzielt werden. Die Brombeerfrüchte befinden sich an den kurzen Seitentrieben des zweijährigen Holzes. Im Erwerbsobstbau werden sie in Form von Hecken an Draht- oder Pfahlkonstruktionen kultiviert und müssen regelmäßig geschnitten werden.

Die Ernte beginnt je nach Sorte Ende August und dauert bis Mitte September. Die Früchte müssen vollreif geerntet werden, da sie in gepflücktem Zustand nicht nachreifen. Um

einem vorzeitigen mikrobiologischen Verderb durch *Botrytis cinerea* vorzubeugen, dürfen nur trockene Früchte geerntet werden. Die manuelle Pflückleistung wird mit 5 kg/AKh angegeben (Keppel et al, 1991). Die Beeren können sowohl frisch verzehrt, als auch zu Marmelade, Fruchtsäften/-nektaren und alkoholischen Getränken verarbeitet werden. Zunehmende Bedeutung gewinnt die Verarbeitung von Brombeeren zu Tiefkühlkost.

3.2.3 Heidelbeere

Wissenschaftlicher Name: *Vaccinium myrtillus* L.

Familie: Heidekrautgewächse (Ericaceae)

Gattung: *Vaccinium*

Im allgemeinen Sprachgebrauch versteht man unter „Heidelbeeren“ die in unseren Wäldern heimische diploide Wildform *Vaccinium myrtillus* L.. Sie wird auch als Wald-, Bick-, Blau- oder Schwarzbeere bezeichnet und wächst auf sauren, gut versorgten Böden in Nadel- und Laubwäldern und auf Heiden. Obwohl sie noch in vielen Gebieten der Bundesrepublik anzutreffen ist, sind die zur Verarbeitung geernteten Mengen ständig rückläufig. Dies mag zum einen an der Importkonkurrenz vor allem aus osteuropäischen Ländern liegen, zum anderen trägt hierzu auch ein verändertes Verbraucherverhalten bei. Arbeitsintensive Tätigkeiten, wie z.B. das Pflücken und Verarbeiten von Beeren, werden in einer Gesellschaft mit steigendem Einkommen und Wohlstand immer mehr aus den Haushalten ausgelagert und als Dienstleistung in Form von „Convenience-Food“ eingekauft.

Die erbsengroßen, intensiv blau gefärbten Früchte der Heidelbeeren reifen von Juli bis September an bodendeckenden Zwergsträuchern. Durch den hohen Anthocyanengehalt der Beeren färbt sich der Saft tiefblau. Hierbei ist zu beachten, dass im Gegensatz zu den weißfleischigen Kulturheidelbeeren, sowohl die Schale, als auch das Fruchtfleisch Anthocyane enthält. Auf Grund des erfrischenden, angenehm süßsauren Geschmacks werden die Beeren sowohl frisch z.B. als Kuchenbelag oder Kompott verzehrt oder zu Säften, Gelees und Fruchtzubereitungen z. B. für Joghurt verarbeitet (Thönges, 1984).

Neben den Wildformen unterscheidet man noch die Kulturheidelbeere (= highbusch blueberries) *Vaccinium corymbosum* L.. Sie ging aus Züchtungen und Kreuzungen amerikanischer Wildheidelbeeren hervor und unterscheidet sich von unseren Waldheidelbeeren vor allem durch ihre großen, zu Trauben zusammengewachsenen Früchte, die an bis zu 4 m hohen Sträuchern wachsen. Während sich der Anbau in Deutschland nur schleppend entwickelt, gab es 1981 in den USA bereits 10.000 ha Anbaufläche (Keipert, 1981).

Die Ernte der Kulturheidelbeeren beginnt Ende Juli und wird trotz einiger Versuche mit der maschinellen Ernte größtenteils noch mit der Hand durchgeführt. Wegen der unregelmäßigen Fruchtreife werden die ersten beiden Durchgänge manuell geerntet, dann mit der Maschine. Die Erträge liegen in den ersten Standjahren bei 2 to/ha, ab dem 6. Standjahr können bis zu 10 to/ha erreicht werden. Die Nutzungsdauer einer Anlage liegt

normalerweise bei 40 Jahren, gesunde Anlage können bis zu 100 Jahre alt werden (Keipert, 1981).

Überlagerte Heidelbeeren bilden einen bitteren Geschmack. Überfällige Marktware darf deshalb nicht in die industrielle Verwertung gelangen (Thönges et al, 1984).

3.2.4 Preiselbeere

Wissenschaftlicher Name: *Vaccinium vitis-idaea* L.

Familie: Heidekrautgewächse (Ericaceae)

Gattung: *Vaccinium*

Die Wildfrüchte der Art *Vaccinium vitis-idea* wachsen in den Wäldern Mittel- und Nordeuropas, sowie in den Alpen, an kleinen Sträuchern und bilden leuchtend rote Früchte. Die großfrüchtige Moosbeere oder engl. „Cranberry“ gehört zur Art *Vaccinium macrocarbon* und wird vor allem im Norden der USA und Kanada kultiviert. In Anlehnung an die „Kulturheidelbeere“ wird fälschlicherweise oft der Name „Kulturpreiselbeere“ verwandt. Mit den Preiselbeeren eng verwandt sind die auf Torf- und Moorböden Nordamerikas, Nordasiens und Europas wachsenden gemeinen Moosbeeren *Vaccinium oxycoccos*.

Für die Kultur hat nur die Cranberry Bedeutung. Vor allem die USA und Kanada gelten traditionell als wichtigste Produzenten (Keipert, 1981). Die Cranberrys benötigen wie übrigens auch die Wildformen der Preiselbeere einen sonnigen Standort auf einem humusreichen, ja fast moorigen Boden. Die Pflanzen gelten als frostempfindlich und müssen an kritischen Standorten durch entsprechende Maßnahmen geschützt werden. In den USA hat sich die Flutung der gesamten Anlage mit Wasser als wirksame Frostschutzmaßnahme bewährt. Dieses Verfahren hat noch einen weiteren Vorteil. Bei der Ernte werden die Pflanzen ebenfalls überflutet und die mechanisch vom Strauch getrennten Beeren durch Wind ans Ufer geschwemmt, wo sie mit Förderbändern in Transportgefäße gefüllt werden (Keipert, 1981). Vereinzelt werden die Beeren auch noch mit sog. Kammschaufeln abgeerntet. Die Hektarerträge liegen mit durchschnittlich 2.5 - 9 to/ha in der Größenordnung von Kulturheidelbeeren.

Trockene Früchte sind bei 3 °C etwa 3 Monate lagerfähig, wobei neben dem Frischverzehr auch noch die Herstellung von Kompott, Marmelade, Tiefkühlkost und Fruchtsaft Bedeutung hat.

3.2.5 Schwarzer Holunder

Wissenschaftlicher Name: *Sambucus nigra* L.

Familie: Geißblattgewächse (Caprifoliaceae)

Gattung: *Sambucus*

Holunderbeeren werden zu den Wildfrüchten gerechnet. Seit alters her wird der Holunder als Heilpflanze geschätzt, ja sogar verehrt. Es gibt zwar neuere Versuche durch Klonauslese Sorten zu züchten und für den erwerbsmäßigen Anbau zu kultivieren, meist wachsen die bis zu 6 m hohen Sträucher, eher zufällig verteilt, als Flurgehölz. Neben dem schwarzen Holunder gibt es noch den kanadischen Holunder (*Sambucus canadensis* L.) und den auch in unseren Breiten beheimateten roten Holunder oder Traubenholunder (*Sambucus racemosa* L.).

In windgeschützten Lagen wächst der Holunder auf ausreichend mit Wasser und Nährstoffen versorgten mittelschweren Lehmböden. Die Früchte reifen bis Ende September an sog. Trugdolden zu blauschwarz glänzenden Beeren heran und lassen sich nur sehr schwer vom Stielgerüst trennen. Es ist daher ratsam, die Früchte mit einer Schere abzuschneiden (Keipert, 1981).

In den Blättern sowie in unreifen Holunderbeeren ist das Glycosid Sambunigrin enthalten, das durch enzymatischen Abbau Blausäure abspaltet und Erbrechen sowie Magen- und Darmverstimmungen hervorruft. Erst beim Kochen wird das Glycosid zerstört. Vom Genuss unverarbeiteter oder gar unreifer Beeren ist deshalb dringend zu warnen (Thönges, 1984).

Da sich auch die Wildtypen im Geschmack und in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe unterscheiden, sollte man bei der Verarbeitung zu Saft, Fruchtw Wein oder Marmelade auf säurereiche und aromatische Früchte zurückgreifen. Bei der Gewinnung von Lebensmittelfarbstoffen aus Holunderbeeren fällt dieser Aspekt nicht ins Gewicht.

3.2.6 Mahonie

Wissenschaftlicher Name: *Mahonia aquifolium* (PURSH) NUTT.

Familie: Sauerdorngewächse (Berberidaceae)

Die Mahonie gehört zu den wirklich seltenen Obstarten. Als Zierstrauch für Hecken oder Buschgruppen sowie als bodendeckendes Gestaltungselement ist sie in Gärten oder Anlagen anzutreffen. Der immergrüne Strauch wird bis zu 1,5 m hoch und trägt dornig gezähnte, an der Oberseite glänzende Blätter. Ende August trägt der Strauch tiefdunkelblau gefärbte, zu Trauben zusammengewachsene Früchte, die bis in den Winter am Strauch hängen bleiben. Hieraus lässt sich ein intensiv gefärbter, säuerlicher Saft gewinnen. Als Zusatz zu Marmeladen, Mehrfruchtsäften oder zur Herstellung von alkoholischen Getränken lässt er sich vielfältig verwerten (Friedrich et al, 1989).

3.3 Die Verarbeitung von Beerenobst zu Fruchtsaft

3.3.1 Die Rohware und ihre Inhaltsstoffe

Bei der Verwendung der Ernte hat die Verarbeitung neben dem Frischverzehr eine wichtige marktentlastende Bedeutung. Eine Vielzahl von Früchten fällt auf Grund „abnormaler“ Größe oder Farbe durch das engmaschige Netz der Handelsklassen oder wird von extensiv bewirtschafteten Flächen (Streuobstwiesen oder Hausgärten) geerntet. Auf Grund steigender Nachfrage musste sich die Verwertungsindustrie weitere Rohwarenmärkte erschließen. Importe, meist aus osteuropäischen Ländern, und die direkte vertragliche Bindung der Erzeuger sichern ein gleichmäßiges Angebot und stabilisieren die Preise.

Die Beliebtheit von Beerenobstsäften/ -nektaren hängt in erster Linie mit der besonderen Zusammensetzung der Inhaltsstoffe zusammen. Die meisten Beerensäfte sind durch die gelösten Anthocyanidine tiefdunkelrot gefärbt. Die Fruchtsäuren, überwiegend Zitronen- und Äpfelsäure, verleihen dem Saft einen angenehm frischen Geschmack, der durch ein intensives Aroma unterstützt wird. Viele Beerensäfte enthalten darüber hinaus noch eine Reihe von ernährungsphysiologisch wertvollen Inhaltsstoffen, wie z.B. Vitamin C, freie Aminosäuren und phenolische Substanzen.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Inhaltsstoffe von schwarzen Johannisbeeren, Brombeeren, Wildheidelbeeren, Kulturpreiselbeeren und Holunderbeeren.

Tab. 1: Inhaltsstoffe von frischen Beerenfrüchten, berechnet auf 100 g essbaren Anteil (verändert nach Souci et al, 1981)

Inhaltsstoff	Einheit	Schwarze	Brombeere	Wildheidel-	Kulturpreisbeer	Schwarzer
		Johannisbeere		beere	e (Cranberry)	Holunder
Wasser	g	81,3	84,7 (82,2 - 87)	84,9 (78,8 - 86)	87,4	80,9
Kohlenhydrate	g	12,4	8,6	13,6	9,9	9,1
Roheiweiß	g	1,3	1,2	0,6	0,3	2,5
Fett	g	0,2	1	0,6	0,5	-
Rohfaser	g	4	4	-	1,7	6,8
Mineralstoffe (Asche)	g	0,8 (0,61 - 1,1)	0,51	0,3 (0,3 - 0,37)	0,2 **	0,7
Vitamin C	mg	177 (132 - 220)	17 (12 - 21)	22 (10 - 44)	12	18 (10 - 29 **)
Glucose	g	2,69	3,16	2,32	2,66	2,02 - 4,46 *
Fructose	g	3,57	3,14	3,28	0,74	2,02 - 3,65 *
Saccharose	g	0,73	0,47	0,24	0,53	0 - 0,09 *
Gesamtzucker (Σ)	g	6,99	6,96	5,84	3,93	4,08 - 8,87 *
Äpfelsäure	g	0,41 (0,35 - 0,44)	0,9 (0,86 - 0,95)	0,2 - 0,3 ***	0,26	0,13 - 0,26 *
Zitronensäure	g	2,88 (2,48 - 3,11)	0,018 (0,01 - 0,02) + 0,81 Iso-Zitronens.	0,6 ***	1,1	0,97 - 1,66 *
Pektin	g	1,19 (0,79 - 1,52)	0,63		1,2	

* Bergmann, 1978; ** Herrmann, 1978; ***Tanner et al, 1978

3.3.2. Die Technologie der Beerenverarbeitung zu Fruchtsaft

Beerenfrüchte sind durch ihr weiches Fruchtfleisch und ihre weiche Beerenhaut ein leicht verletzbares Obst und müssen bei der Verarbeitung besonders vorsichtig behandelt werden. Der allgemeine Grundsatz, dass zur Saftherstellung nur *vollreife, unverletzte, gesunde und saubere Früchte* verwendet werden dürfen, hat bei der Beerenverarbeitung eine besondere Bedeutung.

Geschmacklich ausgeprägte, optisch ansprechende und geruchlich typische Fruchtsäfte lassen sich nur aus vollreifen Früchten herstellen. Unreife Früchte enthalten noch ein unausgewogenes Verhältnis an wertgebenden Inhaltsstoffen, lassen sich schlecht entsaften, sind blass gefärbt und verkosten sich „grün-grasig“. Überreifes Beerenobst wird sehr schnell weich, verliert seine typische Farbe und sein fruchtiges Aroma. Mikroorganismen, die sich auf der Beerenhaut befinden, können durch Insektenstiche oder mechanische Verletzungen ins Fruchtfleisch eindringen und eine Reihe von wertgebenden Saftinhaltsstoffen negativ verändern. Das Beerenobst wird bereits zur Blütezeit von pilzlichen Krankheiten (*Botrytis cinerea*) und tierischen Schädlingen (Gallmilben, Motten und Läuse) befallen. Die geschädigten Pflanzenteile werden oft vom Fruchtfleisch eingeschlossen oder reifen ungenügend aus, so dass eine Auslese zum Zeitpunkt der Ernte nicht mehr möglich ist. Mit den Beeren gelangt eine Vielzahl von Verunreinigungen (Erde, Pflanzenteile und Pflanzenschutzmittelrückstände) ins Erntegut, die durch nachfolgende Reinigungsschritte nicht immer vollständig entfernt werden und den Saft sensorisch negativ verändern.

Nach den Richtlinien des Rates der Europäischen Gemeinschaft und der deutschen Fruchtsaftverordnung (FSVO) § 1 Abs. 1 darf ein Fruchtsaft nur durch mechanische Verfahren gewonnen werden. Außerdem sind durch die EWG-Verordnung und die FSVO physikalische Verfahren, wie Zentrifugieren und Filtrieren sowie thermische Behandlungen, zugelassen.

Die Herstellung von Beerensäften lässt sich in 5(4) Verfahrensschritte unterteilen:

1. Mechanisches Verfahren zur Oberflächenvergrößerung (Maischen)
2. Wärmeübertragung (Farbstoffgewinnung)
3. Mechanische Flüssigkeitsabtrennung (Pressen oder Zentrifugalentsaftung)
4. Thermische Trennverfahren (Aromagewinnung und Konzentratherstellung)
(Entfällt bei der Herstellung von Direktsaft)
5. Wärmeübertragung (Pasteurisation)

Aus einer Reihe von Früchten lässt sich aber durch ausschließlich mechanische Verfahren kein Saft gewinnen. Bei Beeren- und Steinobst muss die Maische vor dem Abpressen auf eine Mindesttemperatur von 45 °C erwärmt werden, um die Zellwände der Beerenhaut für die Farbstoffe durchlässig zu machen (Plasmolyse). Durch die Erwärmung kommt es zu einer enzymatischen oder durch Säure katalysierten Spaltung von Protopektin in wasserlösliches Pektin. Die Maische von pektinreichen Früchten, wie z.B. schwarzen Johannisbeeren, geliert und lässt sich nicht mehr entsaften (Wucherpfennig und Bretthauer, 1962). Fruchteigene Enzyme können das Pektin zwar abbauen, aus mikrobiologischer und arbeitswirtschaftlicher Sicht scheidet diese Möglichkeit aber aus. Nach der EWG-Verordnung 81/487 Art. 4 Abs. 1 und der FSVO dürfen bei der Herstellung von Fruchtsaft/ -nektar „pektolytische Enzyme“ zugesetzt werden, so dass der Pektinabbau auf 1 -2 h verkürzt wird und der Saft anschließend abgetrennt werden kann (Wucherpfennig et al, 1991).

Die eingesetzten Enzympräparate sind keine Reinenzyme, sondern enthalten neben Pektinasen noch Cellulasen und Hemicellulasen. Durch die Maischeenzymierung kommt es nicht nur zu einem selektiven Abbau von gelöstem Pektin, sondern auch zu einem unkontrollierten Abbau von Zellwandbestandteilen. Ein Großteil dieser hochmolekularen, kolloidal gelösten Substanzen gelangt bei der Fest-Flüssig-Trennung in die flüssige Phase und führt zu trubreichen, hochviskosen Säften. Voragen, et al, 1992 konnten zeigen, dass durch die Maischeenzymierung von Äpfeln der Pektingehalt im Vergleich zu direkten Presssäften um Faktor 4 -15 erhöht war. Bei Johannisbeersäften kann der Kolloidgehalt nach der Maischeenzymierung auf bis zu 14.260 mg/L ansteigen (Junker, 1994).

Der überwiegende Teil der Säfte wird als klare Produkte oder Konzentrate gehandelt. Es ist daher zwingend notwendig, die meist aus neutralen und sauren Polysacchariden oder Eiweißen bestehenden Substanzen enzymatisch abzubauen. Dies geschieht mit zugesetzten pektolytischen Enzymen, falls noch Stärke vorhanden ist, auch mit Amylasen (Wucherpfennig et al, 1991). Der Abbau der Kolloide lässt sich zwar durch den raschen Abfall der Saftviskosität verfolgen, meist verläuft er jedoch unvollständig, so dass trotz eines negativen Alkoholtests noch „Restpektine“ im Saft verbleiben (vergl. 2.3.2; 2.3.3). Unter dem Begriff „Restpektine“ werden alle hochmolekularen Polysaccharide zusammengefasst, die mit derzeit kommerziell erhältlichen Enzympräparaten nicht abgebaut werden können (Will et al, 1992a). Bei Johannisbeersäften wurden „Restpektin“-Gehalte über 7.000 mg/L nachgewiesen (Junker, 1994). Zum Vergleich fanden Wucherpfennig et al (1989) in Apfelsaft Kolloidgehalte zwischen 100 - 300 mg/L und bei Himbeersaft zwischen 2.500 - und 4.000 mg/L.

Umfangreiche Arbeiten über die Herkunft und den Aufbau der in Fruchtsäften vorkommenden Kolloide wurden von Wucherpfennig et al (1987); Schöppllein et al (1990); Schmitt et al (1992); Dietrich et al (1992); und Will et al (1992b; 1994a) veröffentlicht.

Polysaccharide werden in vielen Lebensmitteln als Stabilisatoren eingesetzt. Auf Grund ihrer chemischen und strukturellen Eigenschaften sind sie in der Lage, Trubteilchen in Schwebe zu halten und eine Sedimentation zu verlangsamen oder gar zu verhindern. Diese Wirkung ist bei trüben Säften ausdrücklich erwünscht, bei klar gehandelten Produkten wird der Klärungs- und Stabilisierungsprozess jedoch erheblich behindert. Über den Einfluss von hochmolekularen Substanzen, mikrobiologischer oder pflanzlicher Herkunft, auf die Klärung und Stabilisierung von Fruchtsäften wurde in der Literatur schon ausführlich berichtet (Wucherpennig, 1986a; Nagel, 1985; Wucherpennig et al, 1986b; Wucherpennig, 1989; Will et al, 1990a; Will et al, 1992a; Will et al, 1992b; Will, 1993; Wörner et al, 1994).

Leider wurde der Traum vieler Wissenschaftler, den Abbau von Zellwandbestandteilen mit einer Art „Verzuckerung“ abzuschließen (Voragen et al, 1981), bisher nicht erfüllt, da entsprechende Enzymaktivitäten fehlen oder im Substrat „Saft“ nicht ausreichend wirksam sind.

4 Material

4.1 Isolierung von löslichen Polysacchariden aus verschiedenen Beerenfrüchten

Die Isolierung von löslichen Kolloiden aus Pflanzenteilen und Früchten ist sehr arbeitsaufwendig. Dies hängt zum einen mit der heterogenen chemischen Struktur der Substanzen selbst zusammen, andererseits mit der stofflichen Matrix, aus der sie isoliert werden sollen. Die Extraktionsmittel und -verfahren sind sehr unspezifisch, so dass man zunächst versucht, die gesuchte Substanzklasse durch ein geeignetes Verfahren vollständig zu isolieren, um sie anschließend in einem oder mehreren Reinigungsschritten von störenden Begleitstoffen zu reinigen. Gelöste Kolloide lassen sich aus Fruchtsäften durch zwei verschiedene Verfahren isolieren:

1. *Flüssig - Flüssig - Extraktion (Solventextraktion) mit organischen Lösungsmitteln*
2. *Mechanische Flüssigkeitsabtrennung durch Ultrafiltration und Gelfiltration*

Die Wahl der geeigneten Isolationsmethode richtet sich nach dem Grundsatz „Das Ziel ist der Weg“. Viele Forschungsarbeiten, die sich mit der Strukturaufklärung der pflanzlichen Zellwand beschäftigen, gehen von einem in Alkohol unlöslichen Rückstand (AUR, häufig auch als engl. AIR bezeichnet) aus. Bei dieser Aufarbeitungsmethode werden die Pflanzenteile oder Früchte zerkleinert und mit heißem Alkohol gekocht. Der AIR wird vom Alkohol getrennt und getrocknet (Voragen et al, 1983). Der AIR enthält neben den löslichen Kolloiden eine Reihe von Gerüstsubstanzen, wie z.B. Cellulose und Lignin, die im Fruchtsaft unlöslich sind und daher im Trester verbleiben. Stehen bei der Analyse technologische Fragestellungen im Mittelpunkt des Interesses, dann sind zur Isolierung der Kolloide die Alkoholfällung oder die Ultrafiltration des Saftes besser geeignet.

Dietrich et al (1989) untersuchten eine Reihe von Methoden im Hinblick auf ihre Eignung zur Kolloidbestimmung. Die Ultrafiltration eignet sich sehr gut zur präparativen Isolierung von Kolloiden, bei großen Probenvolumina auch zur quantitativen Analyse. Bei der Alkoholfällung müssen systematische Fehler in Kauf genommen werden, die sowohl durch den Verlust von alkohollöslichen Fraktionen als auch durch miterfasste Begleitsubstanzen verursacht werden. Gelfiltrationsmethoden können sowohl zur Analyse als auch zur präparativen Kolloidgewinnung eingesetzt werden.

Während der Saison 1993 wurden aus schwarzen Johannisbeeren (Sjb) und Brombeeren (Bb) lösliche Polysaccharidfraktionen isoliert. Die Beeren wurden vom Fachgebiet Obstbau der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt. Sie waren handgepflückt, ertefrisch und nicht entrappt.

4.1.1 Natives Pektin aus schwarzen Johannisbeeren

11.500 g Beeren (Sortengemisch) wurden mit einer Steinwalzenmühle gequetscht und sofort abgepresst (Schlauchpresse, Fa. Speidel). Unmittelbar nach dem Quetschen gelierte die Maische, so dass nur wenig Saft gewonnen werden konnte. Der hochviskose Saft wurde zweimal mit Ethanol gefällt (1 Volumenteil Saft + 5 Volumenteile 96 %Vol. Ethanol) (Kauschus und Thier, 1985). Zur Reinigung und Entfernung von wasserunlöslichen Bestandteilen wurden die Kolloide nach dem ersten Fällungsschritt in Wasser aufgenommen und bei 5000 g 20 min. zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abdekantiert und erneut mit Ethanol gefällt. Die gefällten Polysaccharide wurden abzentrifugiert, gefriergetrocknet und ausgewogen. **Die Kolloidfraktion erhielt die Bezeichnung „SJ01“**

4.1.2 Natives Pektin aus Brombeeren

Die Beeren lagen ebenfalls als Sortengemisch vor. Die Aufarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie bei schwarzen Johannisbeeren. **Die Kolloidfraktion erhielt die Bezeichnung „B01“**

4.1.3 Enzymatisch modifiziertes Pektin aus schwarzen Johannisbeeren

3.350 g Beeren (Sorte: „Malling Jet“) wurden mit einer Steinwalzenmühle gequetscht und anschließend auf 80°C erwärmt (3 min). Nachdem die Maische auf 55°C abgekühlt war, wurde die Maische enzymiert (1 g/L Novozym 52) und 30 min stehen gelassen. Der Saft wurde mit einer Schlauchpresse abgepresst. Die Trester wurden mit 2,5 l Wasser (70°C) nochmals extrahiert und ausgepresst. Rohsaft und Extraktionssaft wurden vereinigt und nach dem zuvor beschriebenen Schema aufgearbeitet. Abweichend hiervon wurden die Kolloide nicht gefriergetrocknet, sondern im Trockenschrank bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bei diesem Verfahren erhärtet der Rückstand beim Trocknen zu einer festen Kruste. Zur Verbesserung der Lösungseigenschaften wurde der feste Rückstand mit einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver vermahlen und anschließend ausgewogen. **Die Kolloidfraktion erhielt die Bezeichnung „SJ02“**

Die Kolloidausbeuten der verschiedenen Pektinfraktionen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Kolloidausbeuten bei Johannisbeeren und Brombeeren nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden

	Natives Pektin aus Johannisbeeren	Natives Pektin aus Brombeere	Modifiziertes Pektin aus Johannisbeeren
Beerenfrischgewicht [g]	11500	8000	3350
Kolloidauswaage [mg]	4680	43400	10300
Kolloidausbeute [mg/kg]	407	3075	5425

4.1.4 Fraktionierte Isolierung von Kolloiden aus schwarzem Johannisbeersaft mittels Crossflow-Ultrafiltration

In der Vergangenheit wurden eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass sich die Summe der löslichen Polysaccharide in einem Fruchtsaft aus einer Vielzahl von Einzelsubstanzen zusammensetzt (Will et al, 1994b; Wucherpfennig et al, 1984a; 1987; Patz et al, 1990; Schols, 1995; Schöppllein et al, 1991). Der Bedeutung der Kolloide für die Klärung und Stabilisierung ist sowohl von ihren Ladungseigenschaften und ihrer chemischen Struktur als auch vom Molekulargewicht abhängig.

Um die Frage zu klären, welche polymeren Substanzen die Filtrationsfähigkeit von Johannisbeersäften beeinträchtigen und wie sie sich zusammensetzen, wurden die löslichen Kolloide aus einem Johannisbeersaft durch schrittweise Crossflow-Ultrafiltration über Membranen unterschiedlicher Trenngrenzen isoliert.

Bei der Ultrafiltration werden Stoffgemische durch die Triebkraft einer Druckdifferenz, an einer dünnen, porösen Grenzfläche (Membran), in das leichter diffundierbare Permeat und das schwerer diffundierbare Konzentrat (Retentat) getrennt. Hierbei lassen sich Proteine und kolloidal gelöste Substanzen, wie z. B. Polysaccharide, in einer Größenordnung von 10^{-3} - 10^{-1} μm abtrennen. Es ist schwierig, die Größe derartiger Moleküle zu bestimmen, deshalb ist es üblich, die Trenngrenzen von Ultrafiltrationsmembranen mit Molekülmassen anzugeben.

In der Literatur findet man für die Molekülmasse von polymeren Substanzen oft die Bezeichnungen *Dalton (Da)*, *Molmasse ($g \cdot \text{mol}^{-1}$)* und *Molekulargewicht (M_r)*. Alle drei Größen unterscheiden sich nur in der Dimension, ihr Zahlenwert ist gleich.

$$\text{Es gilt: } 1 \text{ Dalton (Da)} = 1 \text{ atomic mass unit (u)} = 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$$

Mit der Ultrafiltration lassen sich kolloiddisperse Systeme mit Molekülmassen von 500 - 1.000.000 Dalton trennen. Die Poren derartiger Membranen haben keinen definierten Durchmesser, sondern streuen um einen von den Herstellern angegebenen Mittelwert.

Für die Fraktionierung der Johannisbeersaftkolloide wurden folgende Membranen eingesetzt:

Tab. 3: Membrantyp, Trenngrenze, Chargen-Nr. und Wasserwert der zur Fraktionierung der Saftkolloide eingesetzten Membranen

Membrantyp	Trenngrenze	Chargen-Nr.	Wasserwert *
ROMICON PM-500	500.000 Dalton	4 PD 2241	360 L/ m ² x h
ROMICON PM-50	50.000 Dalton	4 PC 1296	144 L/ m ² x h
ROMICON PM-10	10.000 Dalton	4 PX 1192	88 L/ m ² x h
ROMICON PM-2	2.000 Dalton	4 PT 2218	72 L/ m ² x h

Temperatur (t): 15 °C; Transmembrandruck (P trans): 1.25 bar; Überströmung: 300 L/ h

Filtrationssystem:

Die ROMICON- Hohlfasermembran-Module (Filterfläche 0,1 m²) werden senkrecht in eine Haltevorrichtung eingespannt und mittels einer Seitenkanalpumpe (SCHMALENBERGER HL2 10-06, elektr. Leistung 0,4 kW) überströmt. Mit Wasser (15 °C) wurde über Regelventile am Ein- und Ausgang des Membranmoduls ein mittlerer Transmembrandruck [Δp_{tm}] von 1,25 bar und ein Retentatvolumenstrom [V_{Ret}] von 330 L/h eingestellt. Durch die höhere Viskosität des Johannisbeersaftes sinkt das Überströmungsvolumen auf 300 L/h. Die Reibungsenergie verursacht eine Erwärmung des Retentats. Mit Hilfe einer Wasserbadkühlung konnte die Temperatur im Retentatstrom auf 25 °C gehalten werden. Das Permeat läuft unter atmosphärischem Druck aus der Anlage und wird in einem graduierten Messgefäß gesammelt.

Versuchsdurchführung:

Der Johannisbeersaft wurde nach dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Verfahren hergestellt. Für den Versuch wurden 30 L pasteurisierter Presssaft über eine Zentrifuge (WESTFALIA SEPARATOR SA1) vorgeklärt und zum Schutz vor einem mikrobiologischen Verderb mit 0,02 % (w/w) Natriumazid konserviert.

Der vorgeklärte Saft wurde zuerst über die PM-500-Membran filtriert. Das anfallende Retentat wurde mit einem Zitronensäurepuffer (1 %ige technische Zitronensäure, mit NaOH auf pH 3,5 eingestellt) über die PM-500-Membran diafiltriert. Der Puffer wurde mit dest. Wasser aus dem Retentat ausgewaschen. Die Retentatfraktion wurde mit dest. Wasser aus der Anlage gespült und aufbewahrt.

Das Permeat der PM-500-Filtration wurde anschließend über die PM-50-Membran filtriert, das Retentat der PM-50-Membran wurde mit Citratpuffer und dest. Wasser diafiltriert, aus der Anlage gespült und ebenfalls aufbewahrt. In gleicher Weise wurde das PM-50-Permeat über die PM-10-Membran und das PM-10-Permeat über die PM-2-Membran filtriert. Die anfallenden Retentate wurden ebenfalls diafiltriert und aufbewahrt.

Die vier Retentatfraktionen wurden am Rotationsverdampfer weiter eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Sie wurden wie folgt gekennzeichnet:

Retentat der PM-500-Membran = „RPM-500“

Retentat der PM-50-Membran = „RPM-50“

Retentat der PM-10-Membran = „RPM-10“

Retentat der PM-2-Membran = „RPM-2“

Die getrockneten Kolloide waren rosa eingefärbt und stellten sich in den einzelnen Fraktionen unterschiedlich dar. Die Fraktionen mit überwiegend höhermolekularen Kolloiden (Retentat PM-500 & PM-50) ergaben eine voluminöse, wattige Probensubstanz mit sehr starker elektrostatischer Aufladung. Aus den beiden anderen Fraktionen konnte ein feines, dichtpackendes Pulver ohne statische Aufladung isoliert werden.

Auf die Erstellung einer quantitativen Massenbilanz wurde bei diesem Versuch bewusst verzichtet, da die Zielsetzung des Versuchs die präparative Isolierung bestimmter Kolloidfraktionen war. Für eine Quantifizierung müsste man den gleichen Versuchsablauf mit einem erheblich reduzierten Probenvolumen wählen. Die Trennung der Kolloide über ein gelchromatographisches Verfahren mit anschließender Fraktionierung des Eluates ist für diese Fragestellung besser geeignet.

4.1.5 Isolierung der löslichen Kolloide aus Preisel-, Holunder-, Mahonia- und Heidelbeeren

Die Kolloide aus Preiselbeeren wurden durch zweifache Alkoholfällung (vgl. Kap. 4.1.1) eines enzymierten und geschönten Preiselbeersaftes gewonnen. Bei den anderen Beeren wurden die Kolloide direkt ohne Enzymierung aus dem Fruchtmark isoliert.

Die Beeren wurden von anhaftenden Blättern und Stielen gesäubert, gewogen und in einem Polyethylenbeutel mit Dampf auf 80 °C erhitzt. Die heißen Beeren wurden anschließend durch ein feines Haarsieb passiert, der Rückstand wurde mit Wasser (50 °C) erschöpfend extrahiert und noch einmal durch das Haarsieb passiert. Beide Pürees wurden vereinigt und mit der fünffachen Menge 96 %igen Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (20 min, 3.000 Upm) und wieder in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde 30 min intensiv gerührt und zentrifugiert. Der wasserlösliche Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, erneut mit der fünffachen Menge Ethanol gefällt, zentrifugiert, in Wasser aufgenommen, gefriergetrocknet und ausgewogen.

Bei Holunderbeeren war die Isolierung von Kolloiden durch Alkoholfällung nicht möglich, da sich nach der Zugabe des Alkohols ein körniger, sandiger Niederschlag bildete. Wahrscheinlich handelte es sich um den gleichen körnigen Trub, den Otto und Wittenschläger, 1984 aus einem Holundersaft isolierten und der überwiegend aus

Aminosäuren (Thyrosin) bestand. Der vorliegende Niederschlag wurde nicht näher charakterisiert, da die Polysaccharidanalytik im Vordergrund stand.

Zur Isolierung der Kolloide wurde das dünnflüssige Holunderpüree in Wasser aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 3.000 Upm). Der Überstand wurde in einer AMICON-Rührzelle (Cut-Off 10.000 Dalton) mit Citratpuffer (1 %ige (w/v) technische Zitronensäure auf pH 3,5 eingestellt) und Wasser diafiltriert. Die im Retentat konzentrierten Kolloide wurden gefriergetrocknet und ausgewogen.

4.2 Herstellung von Johannisbeersäften zur Durchführung von Filtrationsversuchen

Für die Beerenobstverarbeitung werden von den Enzymherstellern spezielle Enzympräparate angeboten, die aufgrund ihrer Zusammensetzung an Haupt- und Seitenaktivitäten einen schnellen und weitreichenden Pektinabbau bewirken sollen. Ziel ist es, eine hohe Saft- und Farbausbeute zu erzielen, ohne dass die Klärung und Stabilisierung des Saftes durch die freigesetzten Kolloide gestört wird.

Für die Versuche wurden zwei Enzympräparate eingesetzt, die unter den Handelsnamen „Panzym Plus“ und „Panzym BE“ vertrieben werden. Sie wurden in wechselnden Kombinationen zur Maische und zum Saft dosiert. Die löslichen Kolloide wurden aus den Versuchssäften isoliert. Filtrationsversuche sollten den Einfluss der beiden Enzympräparate auf die Filtrationsleistung zeigen.

4.2.1 Versuchsbeschreibung:

Für die Versuchsreihe wurden insgesamt 600 kg tiefgefrorene polnische Johannisbeeren verarbeitet. Die Beeren waren gleichmäßig ausgereift und frei von Schimmelpilzbefall.

Die Gesamtmenge wurde in 6 Varianten aufgeteilt. Jeweils 100 kg Beeren wurden chargenweise mit einer Walzenmühle gequetscht. Die Beeren waren beim Mahlen noch teilweise gefroren. Die Maische wurde auf 50°C erwärmt, mit 200 mL/to Enzympräparat (Panzym Plus oder Panzym BE) versetzt, 2 Stunden stehen gelassen und mit einer Packpresse abgepresst. Eine **Variante (Nr. 5.0)** wurde während der Enzymierung gerührt, um den Einfluss mechanischer Belastung im Maischestadium zu simulieren. Der Presssaft wurde auf 50°C erwärmt, mit 15 mL/hl Enzympräparat (Panzym Plus oder Panzym BE) versetzt und 2-3 Stunden bis zum negativen Alkoholtest (1 Teil Saft + 2 Teile 96 %Vol. Ethanol) stehen gelassen.

Bei den **Varianten 1, 2, 3 und 5** wurde der Saft nach der Saftenzymierung vom Trubdepot abgezogen und ohne weitere Vorbehandlung in Flaschen gefüllt und pasteurisiert (85°C, 30 min.).

Bei der **Variante 5.1** wurde eine Extraktion der Trester durchgeführt. Hierzu wurde der Trester nach der 1. Pressung mit 20 L Wasser (50 °C) versetzt und nochmals abgepresst. Dem Extraktionssaft wurde ebenfalls 15 ml/hl Enzympräparat (Panzym BE) zugegeben und bis zum negativen Alkoholtest stehen gelassen. Presssaft und Extraktionssaft wurden getrennt abgefüllt und pasteurisiert.

Der Presssaft der **Variante Nr. 4** wurde mit 50 g/hl Bentonit sowie mit 10 g/hl Gelatine und 50 ml/hl Kieselsol (Baykisol 30) geschönt, über Nacht stehen gelassen, zentrifugiert (3.000 Upm., 20 min), in Flaschen gefüllt und pasteurisiert (85 °C, 30 min.). Um Mitreiss-Effekte durch die Schönung auszuschließen, wurde die Bestimmung des Kolloidgehaltes vor der Schönung durchgeführt.

In Abbildung 8 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

4.2.2 Verarbeitungsschema zur Herstellung von Johannisbeersaft

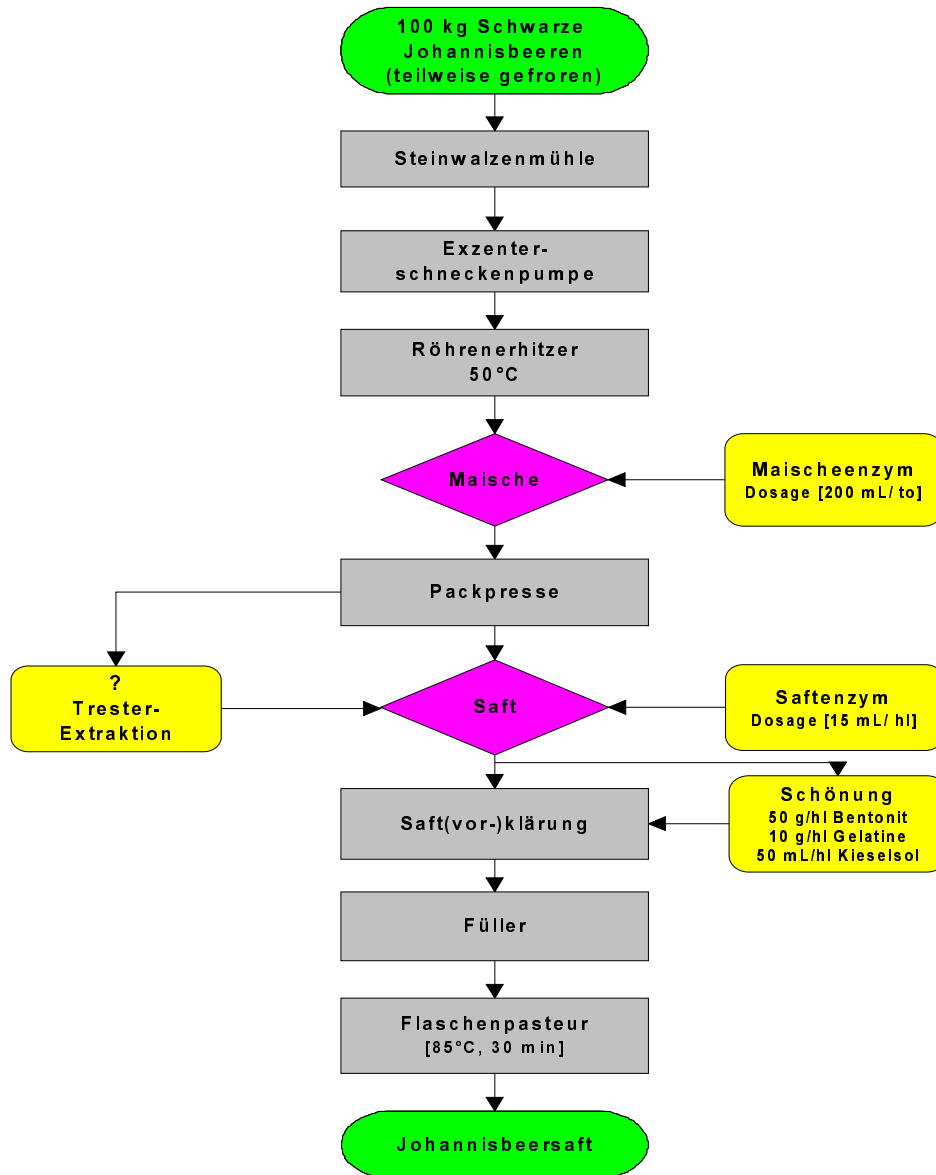


Abb. 8: Verfahrensablaufschemata zur Herstellung der Versuchssäfte. Die Verfahren „Tresterextraktion“ und „Schönung“ wurden nur bei ausgewählten Varianten durchgeführt.

Die in den einzelnen Varianten eingesetzten Enzympräparate und die abweichend vom allgemeinen Herstellungsschema durchgeführten technologischen Verfahren sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Zusammenfassung der in den Versuchsvarianten eingesetzten Enzympräparate und durchgeführten technologischen Verfahren

Variante	Enzympräparat		Trester- extraktion	Schönung
	Maische	Saft		
1	PzPlus	PzPlus	nein	nein
2	PzBE	PzBE	nein	nein
3	PzBE	PzPlus	nein	nein
4	PzPlus	PzBE	nein	ja
5	PzPlus	PzBE	nein	nein
5.1	PzPlus	PzBE	ja	nein

PzPlus = Panzym Plus, PzBE = Panzym BE

4.2.3 Allgemeine Analysenparameter der Säfte

Tab. 5: Allgemeine Analysenparameter der 6 Versuchssäfte. Ergänzend sind die in den einzelnen Varianten eingesetzten Enzympräparate und Behandlungsverfahren (vgl. 4.2) aufgeführt.

	1	2	3	4	5.0	5.1*
Maischeenzym	PzPLUS	PzBE	PzBE	PzPLUS	wie 4 + rühren	Extraktion- saft aus 5.0
Saftenzym	PzPLUS	PzBE	PzPLUS	PzBE		
Dichte 20/20	1,0687	1,0702	1,070	1,0667	1,0712	1,0574
pH-Wert	3,01	2,93	2,92	3,05	2,93	2,99
Gesamtsäure [g/L]	37,3	38,4	38,0	35,67	38,73	27,65
Trübung [TE/F]	39	61	48	27	76	20
Absorption 420 nm	9,75	11,86	13,28	11,93	14,70	11,68
Absorption 520 nm	16,66	23,62	33,16	26,45	30,20	28,97

* Nur Nachextraktionssaft

Die Analysenwerte der 6 Versuchssäfte unterscheiden sich bzgl. Dichte 20/20, pH-Wert und Gesamtsäure nur geringfügig. Alle Säfte lagen im Bereich der RSK-Werte (Richtlinien und Schwankungsbreiten von Kennzahlen) für schwarzen Johannisbeersaft (VDF 1987). Die abweichenden Werte der Variante 5.1 werden durch die Verdünnung bei der Wasserextraktion hervorgerufen.

Die Trübungs- und Absorptionswerte wurden im Überstand nach vorheriger Zentrifugation (20 min, 3000 g) bestimmt. Die Werte sind ein Maß für die Farbintensität der Säfte, die bei Buntsäften ein wichtiges Qualitätskriterium darstellt. Alle Proben waren nach dem Zentrifugieren optisch blank. Im Extraktionssaft und im geschönten Saft der Variante 4 wurden die niedrigsten Trübungswerte gemessen. Vermutlich verursachte die starke mechanische Beanspruchung der Maische (Variante 5.0) die deutlich höheren Trübungswerte, die sich auch in einer stärkeren Farbintensität niederschlugen. Die Analysenwerte zeigten keine Auffälligkeiten, die auf einen Zusammenhang mit den eingesetzten Enzympräparaten hinweisen.

4.2.4 Charakterisierung der Enzympräparate

Die beiden Enzympräparate werden durch die Firma Begerow, Langenlonsheim vertrieben und sind unter den Bezeichnungen „Panzym Plus“ und „Panzym BE“ im Handel. Beide Spezialprodukte besitzen im Vergleich zu Standardpektinasen ein sehr niedriges pH-Optimum (pH 3,5), wodurch sich die Enzympräparate gut für die Enzymierung säurereicher Beerenfrüchte eignen. Sie sind hinsichtlich ihrer Pektinesterase- (PE) annähernd gleich aufgebaut, weisen aber ein völlig unterschiedliches Spektrum an Seitenaktivitäten auf. Beide Handelsprodukte werden nachfolgend kurz charakterisiert:

Panzym BE „PzBE“:

Durch die pektinesterasebetonte Hauptaktivität ist dieses Produkt befähigt, lösliches Pektin sehr schnell abzubauen. Durch eine Vielzahl von Cellulase- und Hemicellulase-Seitenaktivitäten wird die pflanzliche Zellwand „aggressiv“ angegriffen. Es kommt zu einer raschen Freisetzung von Saft, Farbstoffen aber auch Kolloiden aus der Beerenmaische. Durch eine β -(1-3)-Glucanase-Aktivität führt „Panzym BE“ im Saft zu einem weit reichenden Kolloidabbau.

Panzym Plus „PzPLUS“:

Dieses Präparat zeichnet sich durch eine dominante Pektinesterase-Aktivität aus. Hierdurch wird im Saft gelöstes Pektin sehr schnell und weitgehend abgebaut. Durch seine geringe Protopektinase-Aktivität wirkt es nur gering mazerierend. Wird das Produkt in der Maische eingesetzt, so bleibt die feste Struktur weitgehend erhalten und der Saft kann leicht ablaufen. Durch den geringen Anteil von cellulolytischen Seitenaktivitäten kommt es somit auch nicht zu einem übermäßigen Eintrag von Zellwandfragmenten in den Saft.

4.3 Fraktionierte Ernte von schwarzen Johannisbeeren

Bei der maschinellen Ernte ist eine differenzierte Auslese von Früchten nach ihrem Reifezustand nur eingeschränkt möglich. Meist wird die Ernte durchgeführt, wenn der überwiegende Teil der Früchte optimal ausgereift ist. In manchen Jahren kommt es aber durch eine verzögerte Blüte oder ungünstige Wetterverhältnisse während der Beerenreife zu einer weiten Streuung der Reifezustände, wobei sowohl unreife als auch überreife Früchte mit ins Erntegut und somit auch zur Verarbeitung gelangen.

Durch eine gestaffelte Ernte, beginnend im Stadium der „grünen Beere“ bis zur Überreife und der anschließenden Isolierung und Charakterisierung der löslichen Kolloide, soll die Veränderung der kolloidalen Zusammensetzung von Johannisbeeren während des Reifevorgangs aufgezeigt werden.

4.3.1 Durchführung der Ernte und Charakterisierung des Erntegutes

Für die Versuche wurden in der Vegetationsperiode 1995 Johannisbeeren (Sorte „Titania“) an insgesamt zehn Terminen aus einer Intensivkultur geerntet. Die Beeren waren beim ersten Erntetermin Anfang Juni noch grün und hart, beim letzten Termin Anfang August tiefschwarz und z.T. leicht eingetrocknet. Um die mechanische Ernte möglichst praxisnah zu simulieren, wurden bei der Ernte sowohl einzelne Ruten des Strauches, als auch ganze Sträucher komplett abgeerntet, ohne den Reifezustand der Beeren zu berücksichtigen. Das Erntegut wurde im Labor aufgearbeitet.

In Tabelle 6 ist die Erntemenge und das Erntedatum sowie die Beschaffenheit des Erntegutes von allen 10 Chargen dargestellt.

Tab. 6: Erntedatum, -menge [g] und äußerer Reifezustand der fraktioniert geernteten schwarzen Johannisbeeren

Nr.	Datum	Menge [g]	Beschreibung des Reifezustands
1	30.05.1995	2.900	grüne, unreife Beeren; z.T. notreife Beeren
2	06.06.1995	3.300	grüne, unreife Beeren; glasige Beeren
3	12.06.1995	2.800	beginnende Beerenfärbung
4	17.06.1995	2.570	zunehmende Beerenfarbe
5	21.06.1995	2.400	Großteils gefärbte Beeren, einige grüne
6	26.06.1995	2.850	fast alle Beeren schwarz gefärbt
7	01.07.1995	2.375	Beeren schwarz gefärbt, weich
8	07.07.1995	2.970	Beeren schwarz gefärbt, weich
9	12.07.1995	1.325	Beeren z.T. überreif, leicht eingetrocknet
10	08.08.1995	550	Beeren überreif, stark eingetrocknet
	Summe	24.040	

4.3.2 Aufarbeitung des Erntegutes sowie Bestimmung des 100-Beerengewichts, der Gesamtsäure und des Trockensubstanzgehaltes

Aus dem Erntegut wurden zuerst die restlichen Stielgerüste und Blätter entfernt. Mit einem Haushaltsstaubsauger wurden anschließend kleinere Verunreinigungen, wie Blütenreste und andere Pflanzenteile, abgezogen. Das Erntegut wurde gewogen, portionsweise in PE-Beutel eingeschweißt und teilweise eingefroren.

Zur **Bestimmung des „100-Beeren-Gewichts“** wurden 100 Beeren zufällig aus dem Erntegut entnommen und gewogen.

Zur **Bestimmung der Gesamtsäure** (als Weinsäure berechnet) wurden 2,5 g Beerenpüree aus der ersten Püreestufe (vgl. 4.3.2) in ein Becherglas eingewogen und in ca. 50 ml Bdest. gelöst. Die Titration erfolgte mit Natronlauge analog der IFU-3-Methode auf pH-Wert 7,0. Der Gehalt an titrierbaren Säuren (Angabe als Weinsäure) wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Gesamtsäure [g/kg]} = \text{Verbrauch an ml NaOH (0,25 mol/L)} * 0,75 * 10$$

Der **Trockensubstanzgehalt** wurde mit einem auf Saccharose geeichten Refraktometer bestimmt. Hierbei entspricht der am Refraktometer abgelesene Brix-Wert (°Brix) der Menge an gelöster Trockensubstanz [Gew% TS].

Da sich aus den unreifen Beeren kein Saft gewinnen ließ, musste die Isolierung der Kolloide aus einem Püree erfolgen. Hierzu wurden die Johannisbeeren einer jeden Erntecharge in einen PE-Beutel gefüllt und mit einem Haushalts-Dampfsafter auf 80 °C erhitzt. Der Beutel verhinderte sowohl die Aufnahme von Wasserdampf, als auch den Verlust von Fruchthaltstoffen. Die heißen Beeren wurden aus dem Beutel entnommen und zweimal durch Siebe mit unterschiedlicher Maschenweite passiert (*Püree A*). Der Rückstand aus der ersten „Püree-Stufe“ wurde gewogen und mit 400 mL dest. Wasser (80 °C) vermischt, intensiv gerührt und nochmals durch das feine Sieb passiert (*Püree B*). Beide Pürees wurden vereinigt, homogenisiert und eingefroren.

Die Gesamtsäure und der Trockensubstanzgehalt wurde im *Püree A* bestimmt.

Zur **Bestimmung der Kolloidgehalte** wurde ca. 100 g Püree (Mischung A + B) abgewogen und mit der 5-fachen Menge 96 %igen Ethanol gefällt. Nach 24 h wurden die Probe zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen, der Niederschlag wurde abzentrifugiert, ein zweites Mal in der 10-fachen Wassermenge aufgenommen, 2 h intensiv gerührt und erneut zentrifugiert.

Der Überstand enthielt die in Wasser löslichen Kolloide, im Depot waren die in Wasser unlöslichen Anteile enthalten. Beide Fraktionen wurden getrennt, gefriergetrocknet und ausgewogen.

Die wasserlöslichen Kolloide erhielten die Bezeichnung „WK XX“, die wasserunlöslichen Kolloide wurden als „WUK XX“ bezeichnet (XX steht für die Erntechargen-Nr. 1 bis 10)

Bei der Berechnung des Kolloidgehaltes wurde das Extraktionswasser, welches zur Gewinnung von Püree B zugesetzt wurde, durch einen Verdünnungsfaktor (Y) korrigiert.

$$\text{Es gilt: Verdünnungsfaktor (Y) = } \frac{\text{Püree A [g]} + (\text{Püree B [g]} - 400)}{\text{Püree A [g]} + \text{Püree B [g]}}$$

$$\text{Kolloidgehalt [Gew\%]} = \frac{\text{Auswaage Kolloide [g]} \times 100}{\text{Einwaage Püree [g]} \times Y}$$

5 Methoden

5.1 Charakterisierung der aus Früchten und Fruchtsäften gewonnenen Polysaccharide

5.1.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelchromatographie

Die Kolloide wurden mit Hilfe der Gelchromatographie nach ihren Molekulargewichten getrennt. Dieses Verfahren ist ein bewährtes Standardverfahren und wurde bereits von zahlreichen Autoren (Dietrich, 1986, Wucherpfennig et al, 1987 und Schöppllein et al, 1991) bei Kolloiden erfolgreich eingesetzt. Diese Autoren wählten Sepharose Cl-6B als Trennmaterial. Einen umfassenden Überblick über die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelfiltration gibt Patz, 1994. Er vergleicht verschiedene Trennmaterialien und Säulengeometrien miteinander und prüft sie bezüglich ihrer Eignung zur Untersuchung von Fruchtsaftpolysacchariden.

In der vorliegenden Arbeit wurde Superose 6 (PHARMACIA) als Trennmaterial eingesetzt. Als Eluent wurde 200 mmol/L NaCl verwendet. Dem Elutionsmittel wurde zur mikrobiologischen Stabilisierung 0,02% NaN₃ zugesetzt. Die Proben wurden in NaCl-Puffer gelöst (3 - 5 mg/ml), 12h quellen lassen und anschließend über 0,45 µm Membranen filtriert. Die Probenaufgabe erfolgte über eine 200 µL-Probenschleife.

Geräte:

Pumpe:	Pumpe P-500 (Pharmacia), Fluss 24 ml/h
Probenaufgabe:	Ventil:V-7 (PHARMACIA) mit Probenschleife 200 µL
Säule:	PHARMACIA HR 10/30, Säulenvolumen (V_S) = 24 mL, Gelbetthöhe = 30 cm,
Gelmaterial:	Superose 6 (PHARMACIA)
Fraktionssammler:	Frac 100 (PHARMACIA), Fraktionsgröße variabel einstellbar
Detektor:	RI-Detektor (BISCHOFF 8100) mit XY-Schreiber
Datenaufzeichnung:	Aufzeichnung des RI-Signals mittels A/D-Wandler und PC

Zur Eichung der Säule dienten Dextrane (PHARMACIA) im Molekulargewichtsbereich von 10.000 Dalton bis 2.000.000 Dalton (PHARMACIA T10 - T2.000). Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgte über das Elutionsvolumen (V_E). Hierbei verhält sich V_E proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Genauer müsste man vom relativen Molekulargewicht sprechen, da nur auf eine Standardsubstanz mit bekanntem Molekulargewicht bezogen wird und die Masse nicht physikalisch bestimmt wird. Im Bereich zwischen 10.000 Dalton und 1.000.000 Dalton trennt das eingesetzte Säulenmaterial Superose 6 die Eichdextrane verlässlich.

Abb. 9 zeigt die Kalibrierung der Säule mit Eichdextranen in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen.

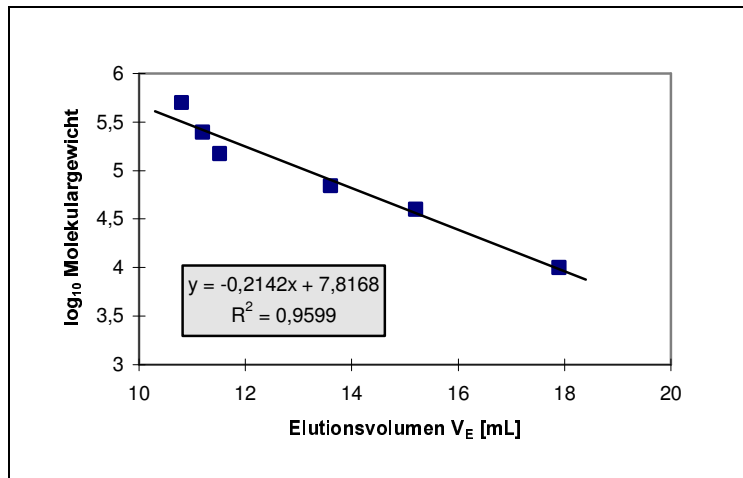


Abb. 9: Molekulargewichtsbestimmung an Superose 6 (PHARMACIA) - Kalibrierung - Dargestellt ist der \log_{10} aus dem Molekulargewicht (MW) der Eichdextrane in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (V_E).

5.1.2 Fraktionierung der Kolloide über Anionenaustauschchromatographie

Durch die zuvor beschriebenen Methoden zur Isolierung von Kolloiden aus Früchten und Fruchtsäften (vgl. Kap. 4.1) erhält man ein sehr heterogen zusammengesetztes Probenmaterial. Für weiterführende Untersuchungen muss das Probenmaterial gereinigt, bzw. in Fraktionen mit einer gleichmäßigeren stofflichen Zusammensetzung klassifiziert werden.

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie lassen sich Kolloide auf Grund ihrer Ladungseigenschaften an einem Gelmaterial trennen. Als Ionenaustauschermaterial wurde DEAE-Sepharose (Pharmacia, 1983) in Chlorid-Form eingesetzt. Dieses Trennmateriale ist ein schwacher Anionenaustauscher, der aus einem Agarosegel besteht, welches Diethylaminoethyl (DEAE) als „aktive“ Gruppen enthält.

Polysaccharidmoleküle tragen oft negative Ladungen, die hauptsächlich durch dissoziierte Uronsäuren hervorgerufen werden. Diese negativen Ladungen ermöglichen die Trennung am Austauschermaterial. Je größer der Gehalt an dissoziierten Uronsäuren, desto stärker ist die Bindung an das Säulenmaterial. Zum Ablösen der Polysaccharide vom Säulenmaterial wird ein Stufengradient eingesetzt, der Wasser und NaCl mit steigenden Ionenstärken enthält.

Geräte und Material:

Säule:	Doppelmantelsäule K 50/30 (\varnothing 50 mm, L = 240 mm) (PHARMACIA), Gelbetthöhe 120 mm, Gelvolumen (V_{Gel}) = 235 mL
Gelmaterial:	DEAE-Sepharose CL-6B (PHARMACIA)
Pumpe:	Schlauchpumpe P-1 (PHARMACIA)
Flussrate:	Probenaufgabe 150 mL/h, Elution 300 mL/h
Injektionsventil:	LV-4 (PHARMACIA)

Geräte und Material (Fortsetzung):

Elutionsmittel:	Stufengradient mit jeweils 300 mL H ₂ O, 50 mmol/L NaCl, 150 mmol/L NaCl und 500 mmol/L NaCl
Probenvolumen:	300 - 1000 mg gefriergetrocknete Kolloide in 100 mL H ₂ O
Säulentemperatur:	20 °C bzw. 65 °C
Fraktionssammler:	Frac-100 (PHARMACIA), Fraktionsgröße variabel einstellbar

Der Stufengradient wurde durch einen Konduktometer (WTW LF-95) mit 4-Elektroden-Leitfähigkeitsmesszelle (Modell:TetraCon 96) überwacht. Die Detektion der Gesamtzucker sowie der Uronsäuren erfolgte analog zu dem von Patz (1994) beschriebenen Verfahren mit Orcinol- (Svennerholm, 1956) und Phenylphenol-Reagenz (Blumenkrantz et al, 1973 und List et al 1985).

Die mit NaCl eluierten Proben wurden durch Gelfiltration über eine mit Sephadex G-25 (PHARMACIA) gepackte Säule (PHARMACIA XK 50/30, Ø 50 mm, V= 335 mL) entsalzt. Die Probensubstanz eluiert im Peak des Ausschlussvolumens, der zweite Peak enthält nur Salz und wird verworfen.

Um ausreichende Probenmengen für weitere Untersuchungen zu erhalten, wurden gleichartige Fraktionen aus mehreren Trennungsgängen vereinigt, entsalzt und anschließend gefriergetrocknet.

Gibt man mehr als 3 mg/mL natives Pektin aus schwarzen Johannisbeeren bei 20°C auf die Säule, verblockt diese innerhalb kurzer Zeit. Vermutlich ist die Viskosität der Probenlösung so groß, dass sie infolge eines Gelfiltrationseffektes am „Kopf“ der Säule hängen bleibt. Dieses lässt sich vermeiden, indem man die Probenkonzentration verringert, oder das Säulenmaterial durch eine Thermostatisiereinrichtung (Doppelmantelsäule mit 60 °C Warmwasserzirkulation) erwärmt.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die geringere Viskosität eine bessere Permeabilität der Probe in der Säule bewirkt und dadurch die Trennung verbessert wird. Gleichzeitig bleibt der Vorteil einer größeren Arbeitseffizienz durch die höhere Probenkonzentration erhalten.

5.1.3 Fotometrische Zuckerbestimmung

Die fotometrische Zuckerbestimmung wurde als eine Art „Schnellnachweis“ für Zucker in den Einzelfractionen der Ionenaustauscherchromatographie eingesetzt. Die Bestimmung der *Gesamtzucker*, d.h. der Summe aller durch Hydrolyse aus den Polysacchariden freigesetzten Zuckern, erfolgte mit der von Svennerholm et al, 1956 vorgeschlagenen „Orcinol“- Methode. Hierbei werden die hydrolysierten Zuckermonomere mit Orcinol (3,5 Dihydroxitoluol Monohydrat) umgesetzt und die Absorption bei 420 nm fotometrisch gemessen.

Zur Bestimmung der *Uronsäuren* wurden die aus den Polysacchariden hydrolysierten Zuckermonomere mit „Phenylphenol“ (= m-Hydroxidiphenyl) umgesetzt und die

Absorption bei 520 nm fotometrisch gemessen (Blumenkrantz et al, 1973 und List et al, 1985).

5.1.4 Stickstoffgehalt der Polysaccharide

Die Stickstoffgehalte der getrockneten Kolloide wurden mittels Elementaranalyse bestimmt. Hierbei wird die Probe im Heliumstrom mit Sauerstoff verbrannt, die Verbrennungsgase an Katalysatoren umgewandelt oder gebunden und nach gaschromatographischer Trennung mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor quantifiziert.

In Kolloiden ist Stickstoff hauptsächlich in Form von Aminosäuren festgelegt. Durch Multiplikation des Gesamtstickstoffgehaltes mit dem Faktor 6,25 wurde der Proteingehalt berechnet. Bei dieser Umrechnung bleibt unberücksichtigt, dass Stickstoff in anderen Bindungsformen vorliegen kann.

Die Untersuchungen wurden am Institut für organische Chemie der Johannes von Gutenberg Universität Mainz erstellt.

5.1.5 Spaltung der Polysaccharide mittels saurer Hydrolyse

Vor der qualitativen und quantitativen Bestimmung der Zuckerbausteine müssen die Polysaccharide in ihre Monomeren gespalten werden. Normalerweise geschieht dies mit Hilfe starker Säuren, aber auch die enzymatische Spaltung der Polysaccharide ist möglich. Unter den säurekatalysierten Verfahren sind die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) nach Albersheim et al (1967) oder mit methanolischer Salzsäure nach Preuß et al (1982) sowie die bei dieser Arbeit angewandte Saeman-Hydrolyse mit Schwefelsäure (Saeman et al, 1954) am weitesten verbreitet.

Die Frage nach dem geeigneten Hydrolyseverfahren stellt sich bei jeder Untersuchung neu und war Gegenstand zahlreicher Vergleichsuntersuchungen (Preuß et al, 1982; Garleb et al, 1989; Kerber, 1991 und Patz et al, 1993). Neuere Studien von Patz et al (1993) zeigen, dass die Saeman-Hydrolyse bei schwer zu hydrolysierenden Polysacchariden, zu denen auch Johannisbeerkolloide zählen, der TFA-Hydrolyse vorzuziehen ist, da die Neutralzuckerausbeuten höher sind.

Eine allgemein gültige Vorschrift über die Hydrolysebedingungen gibt es nicht, da eine Hydrolyse immer ein Kompromiss zwischen einer weitreichenden Spaltung der Polysaccharide einerseits und der Zerstörung oder Umwandlung von bereits freigesetzten Zuckermonomeren andererseits darstellt. Es ist deshalb zweckmäßig, bei Kolloiden unbekannter Zusammensetzung eine Optimierung der Hydrolysebedingungen durchzuführen.

2-stufige Saeman-Hydrolyse:*Vorhydrolyse:*

Zuerst wird bei Raumtemperatur und hoher Säurekonzentration vorhydrolysiert. Hierzu werden ca. 10 mg der zuvor 12h im Vakuum getrockneten Kolloide in ein Hydrolysegefäß (WHEATON Culture tube 20 x 64 mm mit teflonbeschichtetem Schraubverschluss) eingewogen und mit 125 µL 72 % (w/w) Schwefelsäure versetzt. Der Lösevorgang wird über einen Zeitraum von 45 min mit Vortex und Ultraschall unterstützt. Durch Zusatz von 1,35 ml stickstoffgesättigtem Wasser wird die Schwefelsäure auf ca. 1 mol/L verdünnt. Anschließend wird in der Hitze hydrolysiert.

Hydrolyseoptimierung:

Für die Haupthydrolyse stand ein Thermoblock (LIEBISCH Typ 2000 mit TLR-288) zur Verfügung, Dieser hat den Vorteil, dass die Hitze sehr schnell an das Hydrolysat geführt wird und sich die Temperatur sehr präzise regeln lässt. Für die Hydrolyseoptimierung wurden verschiedene Kolloide (Weißwein-, Johannisbeer- und Brombeerkolloide) wie oben beschrieben vorhydrolysiert. Bei der Haupthydrolyse wurden die Parameter Zeit und Temperatur variiert. Bei den Uronsäuren wurde zum Vergleich eine Variante im Trockenschrank bei 130 °C hydrolysiert. Die Neutralzucker wurden gaschromatographisch (vgl. Kap. 5.1.6), die Uronsäuren mittels HPLC (vgl. Kap. 5.1.7) bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse für Johannisbeerkolloide

Tab. 7: Prozentuale Ausbeuten (Gew%) bei der Hydrolyse von Johannisbeerkolloiden in Abhängigkeit der Hydrolysetemperatur (°C) und der Hydrolysedauer (min) (Die Maxima sind graphisch hervorgehoben)

	Hydrolyse- dauer [min]	Thermoblock-Hydrolysetemperatur				Trockenschrank 130°C
		110°C	120°C	130°C	140°C	
Uronsäuren [Gew%]	45	22	41	34	19	
	60	27	40	27	14	21
	75	31	37	25	10	
Neutralzucker [Gew%]	45	11	11	12	10	
	60	11	12	11	9	
	75	11	11	11	7	

Bei Johannisbeer- und Brombeerkolloiden wurden mit einer Temperatur von 120 °C und 60 min Hydrolysedauer, sowohl bei sauren Zuckern, als auch bei Neutralzucker die höchsten Ausbeuten erzielt. Bei Temperaturen über 130 °C werden die freigesetzten Zucker sehr schnell zerstört. Bei Temperaturen unter 120 °C verläuft die Hydrolyse unvollständig, die Ausbeute sinkt ebenfalls. Durch die Thermoblockhydrolyse konnte die

Ausbeute im Vergleich zur Trockenschrank-Hydrolyse gesteigert werden. Dies hängt vermutlich mit dem besseren Wärmeübergang zusammen. Saure Zucker reagieren gegenüber Änderungen von Hydrolysedauer und -temperatur empfindlicher, als Neutralzucker. Trotz der optimierten Hydrolysebedingungen ist die Ausbeute nur unbefriedigend. Zum Vergleich konnte bei Weisswein-Kolloiden unter optimierten Hydrolysebedingungen (120 °C, 60 min) eine Gesamtausbeute von 91% erzielt werden.

5.1.6 Gaschromatographische Bestimmung der Neutralzucker

Zur Bestimmung der Neutralzucker mittels Gaschromatographie müssen diese derivatisiert und in ihre korrespondierenden Alditolacetate überführt werden (Blankeney et al, 1983, Will und Dietrich, 1990b). Die Kolloide werden nach der in Kap. 5.1.5 beschriebenen 2-stufigen Saemann-Methode hydrolysiert.

Reduktion zu den Alditolen:

Die hydrolysierten Proben werden nach dem Abkühlen mit 400 µL Ammoniak 25 % (w/w) alkalisiert. Hiervon wird ein 100 µL Aliquot abgenommen und mit 1 ml 0,5 M Natriumborhydrid (NaBH₄) in Dimethylsulfoxid (DMSO) reduziert. Die Reaktion verläuft 1 h bei 60 °C. Einer 80 %igen (w/w) Essigsäurelösung wird myo-Inositol (1 mg/ml) als interner Standard zugegeben. Um das überschüssige NaBH₄ abzufangen, werden dem Reaktionsgemisch 100 µL Essigsäurelösung zugegeben.

Acetylierung:

Die Acetylierung erfolgt durch Zugabe von 200 µL 1-Methyl-imidazol und 2 ml Essigsäureanhydrid innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur. Überschüssiges Essigsäureanhydrid wird durch Zugabe von 5 ml Wasser zerstört. Die Alditolacetate werden durch Zugabe von 2 ml Chloroform extrahiert. Zur besseren Reinigung des Isolats wird ein weiteres Mal mit Wasser (5 ml) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Die Chloroformphase wird im Druckluftstrom bei 40 °C getrocknet und erneut in 1 ml Chloroform aufgenommen.

GC-Bedingungen:

GC:	Vega GC 6000, ICU 600 (CARLO ERBA)
Säule:	SP2330 (SUPELCO), 15 m, Filmdicke 0,2 µm, i.D. 0,25 mm
Injektion:	Split (1:10), 0,5 - 1 µL, 240 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), 250 °C
Trärgas:	Wasserstoff, 1,5 ml/min bei 210 °C (70 kPa)
Temperaturprogramm:	190 °C, 2 min --> 10 °C/min --> 220 °C, 8 min --> 30 °C/min --> 240 °C, 5 min
Integrator:	SPECTRA PHYSICS SP 4290.

Die Auswertung erfolgte quantitativ über die Peakflächen. Als interner Standard wurde myo-Inositol eingesetzt.

Die Responsefaktoren wurden durch Einwaage der Standardzucker nach o.g. Arbeitsvorschrift ermittelt. Zur Korrektur des bei der Hydrolyse angelagerten Wassers gehen die Anhydrofaktoren in die Quantifizierung ein (Will, 1990a).

5.1.7 Zuckerbausteinanalytik mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Der Einsatz der HPLC bei der Analytik von Pflanzenpolysacchariden wurde von Patz et al (1993) und Patz (1994) eingehend erforscht. Aufbauend auf theoretische Grundlagen wurden von diesen Autoren verschiedene Methoden zur Polysaccharidanalytik mittels HPLC und gepulstem elektrochemischen Detektor (PED) entwickelt, optimiert und mit bereits bewährten Verfahren der gaschromatographischen Zuckerbestimmung verglichen. Der Einsatz von HPLC-Systemen in der Routineanalytik von gelösten Zuckern in Wein (Kaufmann, 1993), Fruchtsäften (Klockow et al, 1994; Corradini et al, 1993 und Corradini et al, 1994) und Kaffee (Prodoliet et al, 1995) wird in der jüngsten Vergangenheit ebenfalls verstärkt diskutiert.

Die nachfolgend beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Zuckerbausteine in Beerenobstkolloiden mittels HPLC bauen auf diesen Arbeiten auf und wurden in Teilbereichen weiterentwickelt.

Die Bestimmung der sauren Zucker (Galacturonsäure und Glucuronsäure) und der Neutralzucker (Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose und Mannose) erfolgte nach vorheriger 2-stufiger Saeman-Hydrolyse (vgl. Kap. 5.1.5). Die Hydrolysate werden nach dem Abkühlen quantitativ in ein 50 ml-Messkölbchen überführt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und anschließend intensiv geschüttelt. Hiervon wird ein Aliquot über eine 0,2 µm-Membran in ein Autosampler-Gläschen überführt. Über eine Probenschleife und dem Mikroinjektionsventil der HPLC-Anlage werden 25 µL Probe injiziert.

Eingesetzte Geräte:

HPLC-System:

DIONEX BioLC-System mit Gradientenpumpe (LCM-2) und gepulstem elektrochemischem Detektor (PAD), Eluent Degas Module, EDM II, Gradientenmixer GM-2 vor der Pumpe, mit Inline Filter 20 µm und Gradienten Mixer GM-3 zwischen Pumpe und Injektionsventil.

Detektor:

Die Arbeitselektrode des PAD ist aus Gold, die Gegenelektrode aus Stahl gefertigt. Zusätzlich enthalten sind noch eine pH-Elektrode und eine Ag/AgCl-Referenzelektrode.

Der Detektor wird auf die Betriebsart: "Integrierende Amperometrie" eingestellt.

Detektorprogramm:

t(s)	E(V) mit Ag/AgCl-Referenzelektrode
0,00	0,10
0,50	0,10
0,51	0,60
0,59	0,60
0,60	-0,60
0,65	-0,60
Integrationsfenster von 0,30 - 0,50 s	

Säule:

Carbopac PA-100 (4x250 mm) mit Vorsäule Carbopac PA-100 (4x50 mm). Die Trennsäulen sind in einen Säulenofen (20°C) integriert.

Datenerfassung/ -auswertung:

Datenerfassung mit einer CSI-Interface-Box 256 KSer. (ERC), Peakzuordnung und Quantifizierung mit externem Standard über eine Mehrpunktkalibrierung, IBM-PC-kompatibler Rechner mit Chromatographie-Software (Apex Version 2.02, AUTOCHROM)

Herstellung der Fließmittel:

Für einen störungsfreien Betrieb der HPLC mit elektrochemischer Detektion ist die Verwendung einwandfreier Fließmittel von entscheidender Bedeutung. Auf die Herstellung der Eluenten muss deshalb besondere Sorgfalt gelegt werden. Die Eluenten müssen immer frisch angesetzt werden, um Verunreinigungen und gelöstem Sauerstoff (Carbonatbildung!!) sicher auszuschließen.

Für die Herstellung von 1000 mL des entsprechenden Eluenten benötigt man:

Eluent	50 %ige (w/w) NaOH (BAKER)	Bidest. Wasser (entgast)
A 100 mmol/L NaOH	5,2 mL	994,8 mL [g]
B 500 mmol/L NaOH	26,2 mL	973,8 mL [g]
C Wasser	-	1000 mL [g]

Das Wasser wird zunächst über eine 0,2 µm-Membran filtriert, in eine DIONEX-Pufferflasche gefüllt, 10 min mittels Vakuumpumpe entgast und anschließend 10 min über eine Fritte mit Helium begast. Die Zugabe der 50 %igen Natronlauge muss sehr rasch erfolgen, um die Bildung von Carbonat auszuschließen. Die Flasche wird mit dem

Degas Modul fest verschraubt. Nach mehrmaligem Umschwenken wird der Heliumdruck so weit reduziert, dass nur noch wenige Gasblasen aufsteigen, aber ein Kapillarsog der Pufferlösung in die Gasleitung ausgeschlossen ist. Während der Chromatographie werden die Eluenten im „Sparge“ - Modus ständig begast.

Für die Herstellung des externen Standards werden die entsprechenden Zucker in einer Konzentration von 30 - 40 mg/L (wässriger Lösung) angesetzt und im Ultraschall gelöst. Zur Stabilisierung werden 0,02 % NaN_3 zugesetzt. Die Standardlösung kann bei 4 °C ca. 2 - 3 Monate aufbewahrt werden. Vor Beginn der Probeninjektion wird die Anlage durch mehrmaliges Einspritzen der Standardlösung konditioniert und auf konstante Retentionszeiten und Signalstärken hin überprüft. Um Analysenfehler durch Veränderung der Signalstärken innerhalb einer Probensequenz auszuschließen, sollten nicht mehr als vier Proben mit ein- und demselben Standardlauf quantifiziert werden.

5.1.7 a.) Saure Zucker

Die Uronsäuren werden isokratisch mit 400 mmol/L NaOH getrennt.

Flussrate:	1 mL/min	
Eluenten:	A: 100 mmol/L NaOH B: 500 mmol/L NaOH C: Wasser	
Pumpenprogramm:	0,0 min - 15,0 min	80% Eluent B + 20% Eluent C
	15,1 min - 20,0 min	100% Eluent B
	20,1 min - 45,0 min	80% Eluent A + 20% Eluent C
Retentionszeit:	Galacturonsäure	~ 10,5 min
	Glucuronsäure	~ 13,5 min

5.1.7 b.) Neutralzucker

Die Neutralzucker werden isokratisch mit 12 mmol/L NaOH getrennt.

Flussrate:	1 mL/min	
Eluenten:	A: 100 mmol/L NaOH B: 500 mmol/L NaOH C: Wasser	
Pumpenprogramm:	0,0 min - 25,0 min	88% Eluent C + 12% Eluent A
	25,1 min - 30,0 min	100% Eluent B
	30,1 min - 35,0 min	100% Eluent C
	35,1 min - 55,0 min	88% Eluent C + 12% Eluent A
Retentionszeit:	Fucose	~ 4,5 min
	Rhamnose	~ 9,0 min
	Arabinose	~ 11,0 min
	Galactose	~ 14,0 min
	Glucose	~ 15,0 min
	Xylose	~ 17,0 min
	Mannose	~ 18,0 min
	Fructose	~ 25,0 min

5.1.8 Bestimmung des Veresterungsgrades von sauren Zuckern

Die funktionellen Eigenschaften von Pektinsubstanzen werden hauptsächlich durch das Molekulargewicht (strukturelle Zusammensetzung) und durch den Methylierungs- bzw. Acetylierungsgrad beeinflusst. Die Lösungs- und Geliereigenschaften sowie die enzymatische Abbaubarkeit der Pektine hängen weitgehend vom Veresterungsgrad (VE) ab. Als Lebensmittelzusatzstoff wird Pektin nach dem VE standardisiert. Gerade bei der Strukturaufklärung von löslichen Polysacchariden der pflanzlichen Zellwand spielt die Analytik des VE eine wichtige Rolle.

5.1.8 a.) Methodenübersicht

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung des VE entwickelt. Die wichtigsten werden nachfolgend kurz charakterisiert:

- Titrationmethode nach Deuel (1950):

Der Uronsäuregehalt und der Methylierungsgrad wird aus den, durch Titration mit Kalilauge bestimmten Neutralisations- und Verseifungsäquivalenten der Carboxylgruppen im Pektinmolekül berechnet. Eine Differenzierung zwischen Methyl- und Acetylgruppen ist nicht möglich. Acetylgruppen müssen mit anderen Methoden bestimmt werden, um das Ergebnis entsprechend zu korrigieren.

- Kolorimetrische Bestimmung der Anhydrogalacturonsäure (AHG):

Der AHG-Gehalt lässt sich entweder durch Carbazol nach Rouse et al (1955) oder mit m-Hydroxidiphenyl nach Ahmed et al (1977) bestimmen. Methanol kann nach vorheriger Verseifung und Oxidation zu Formaldehyd kolorimetrisch mit Chromotropsäure bestimmt werden (Wood, 1971).

- Gaschromatographische Bestimmung des Methanolgehaltes:

Gaschromatographisch lässt sich Methanol direkt (McFeeters et al, 1984) oder als Methylnitrit (Litchman et al, 1972 und Baron et al, 1978) bestimmen. Essigsäure kann ebenfalls gaschromatographisch nach vorheriger Verseifung bestimmt werden (Cochrane, 1975).

Die beschriebenen Methoden erfordern z.T. einen hohen Aufwand zur Probenvorbereitung, wobei durch Waschprozesse erhebliche Verluste bei niedermolekularen Pektinfraktionen auftreten können. Bei der Charakterisierung von Zellwandmaterial steht oftmals nicht genügend Probenmaterial für die Analyse zur Verfügung, so dass z.B. die „Titrations“-Methode ausscheidet. Die Entwicklung neuer Ionenaustauscherharze für die HPLC machte es möglich, die Methanol- und Acetatgehalte im Pektinmolekül gleichzeitig zu bestimmen.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die von Voragen et al (1986a) beschriebene Analysenmethode herangezogen und teilweise leicht verändert.

5.1.8 b.) HPLC-Methode nach Voragen et al (1986a)

Prinzip:

Methanol und Acetat werden durch Verseifung mit Natronlauge aus dem Pektinmolekül freigesetzt. Die Quantifizierung erfolgt durch isokratische Trennung mittels HPLC über eine Kationenaustauschersäule in Protonenform und anschließender RI-Detektion.

Geräte:

HPLC:	DIONEX BioLC-System mit Gradientenpumpe (LCM-2)
Säule:	AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm) mit Vorsäule AG50W-X4 (50 x 4,6 mm)
Säulentemperatur:	60 °C
Flussrate:	0,7 ml/min
Eluent:	5 mmol/L H ₂ SO ₄ , entgast und mit Helium begast
Autosampler:	SPECTRA PHYSICS AS4000, Injektionsvolumen 20 µL
Detektor:	BISCHOF RI 8100 (25 °C), Range = 100, Filter = 2, Probe wird durch „Sample“-Zelle geleitet
Datenerfassung/ -auswertung:	Datenerfassung mit der CSI-Interface-Box 256 KSer. (ERC), Peakzuordnung und Quantifizierung mit externem Standard, IBM-PC-kompatibler Rechner mit Chromatographie- Software (Apex Version 2.02, AUTOCHROM)

Probenaufarbeitung:

Ca. 60 mg pektinhaltige Probe wurde in ein WHEATON CULTURE C-Tube mit Schraubverschluss eingewogen. Es wurde eine Lösung von 0,4 mol/L NaOH in 50 % (v/v) Isopropanol (p.a.) hergestellt. 2 ml dieser Lösung wurden zur Probe hinzugefügt und 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch gelegentliches Umschütteln und Ultraschall wurde der Verseifungsvorgang unterstützt. Die Probe wurde zentrifugiert (10 min, 3.000 Upm), der Überstand wurde mit einer Spritzenkanüle abgezogen und über eine 0,45 µm Membran filtriert. 20 µL filtrierte Probe wurden injiziert.

In Abb. 10 ist die isokratische Trennung eines Methanol-Essigsäure-Standards an einer AMINEX HPX-87H-Säule dargestellt.

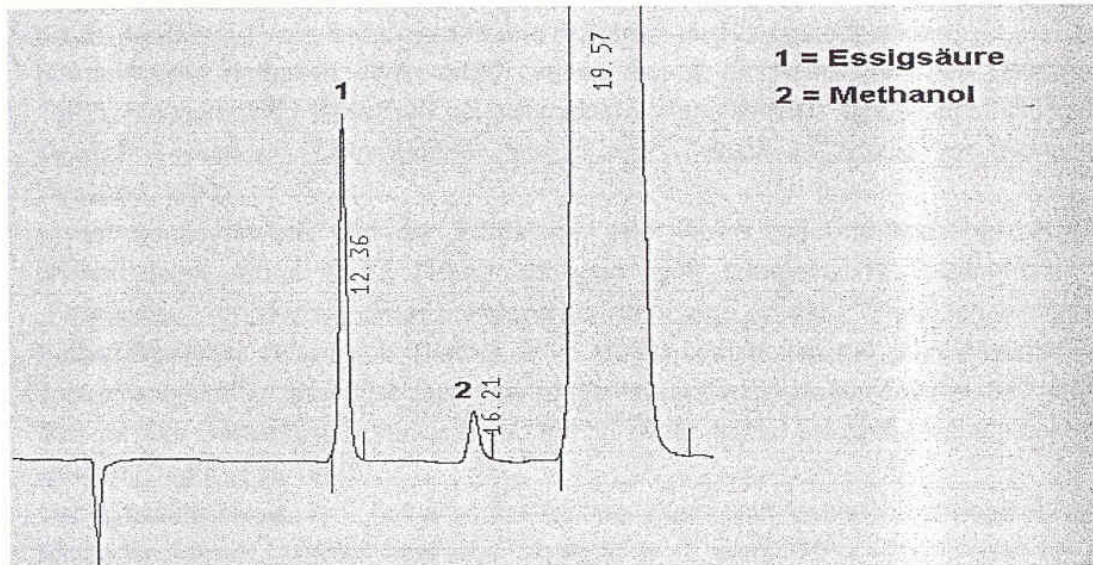


Abb. 10: Isokratische HPLC-Trennung eines Standards aus Essigsäure und Methanol an einer AMINEX HPX-87H-Säule mit RI-Detektion

Quantifizierung:

Die Quantifizierung erfolgte durch einen externen Standard. Hierzu wurden 0,1 % (v/v) Methanol (p.a.) und 0,05 % (v/v) Essigsäure (p.a.) in 50 % (v/v) Isopropanol eingesetzt. Durch Multiplikation mit der entsprechenden Dichte für Methanol (0,792 g/ml) und Essigsäure (1,05 g/ml) erhält man die Massenkonzentration (Gew-%). Die Berechnung des Veresterungsgrades kann sowohl über das Gewichtsverhältnis, als auch über das Molmassenverhältnis erfolgen. Bei der Berechnung über das Molmassenverhältnis wurde jeweils auf den wasserfreien Anteil umgerechnet. Bei der Berechnung des VE über das Gewichtsverhältnis wurde mit den entsprechenden Faktoren (15/32 bei Methanol und 42/60 bei Essigsäure) korrigiert. Der Galacturonsäureanteil wurde isokratisch mit HPLC bestimmt (vgl. Kap. 5.1.7) und geht als prozentualer Gewichtsanteil der Einwaage in die Berechnung ein. Auch hier wurde auf Anhydrogalacturonsäure (MW = 176) umgerechnet.

Die Methode zeichnet sich durch eine einfache und rasche Probenaufarbeitung aus. Durch den geringen Bedarf an Probensubstanz eignet sie sich sehr gut zur Charakterisierung von Zellwandmaterial. Nachteilig ist die, durch den RI-Detektor hervorgerufene, etwas geringe Empfindlichkeit. Die Bestimmungsgrenze liegt für Methanol bei 0,1 % (v/v) und für Essigsäure bei 0,05 % (v/v).

Ergänzend wäre noch anzumerken, dass die Berechnung des Veresterungsgrades in engem Zusammenhang mit der sorgfältigen Bestimmung des Galacturonsäuregehaltes zu sehen ist. Niedrige Galacturonsäureausbeuten können hohe Veresterungsgrade vortäuschen.

5.1.9 Isolierung von Anthocyanen aus Früchten und Polysacchariden

Beerenfrüchte enthalten einen relativ hohen Gehalt an Anthocyanidinen (Herrmann, 1992). Mengenmäßig herrschen bei schwarzen Johannisbeeren Delphinidin-3-Rutinosid, Cyanidin-3-Rutinosid, Delphinidin-3-Glucosid und Cyanidin-3-Glucosid vor (Hong und Wrolstad, 1990).

In der Routineanalytik wird die „Farbe“ mit einer Reihe von Untersuchungsmethoden charakterisiert. Strigl et al (1995) schlugen eine fotometrische Bestimmung des „Farbwertes“ vor, der als dimensionslose Kennzahl eine schnelle Charakterisierung des Farbstoffgehaltes liefern soll. Dietrich et al (1994) bestimmten die „Farbintensität“ von Johannisbeersäften als Summenparameter der Absorptionswerte bei 420 nm, 520 nm und 620 nm. Der Gesamtanthocyanidingehalt kann indirekt mit der pH-Shift-Methode bestimmt werden (Ought et al, 1988).

Der Einzelnachweis von Anthocyanen gelang zuerst mit papierchromatographischen Methoden, heute werden bei der Analytik vor allem HPLC-Trennverfahren mit fotometrischer (UV-) und amperometrischer Detektion eingesetzt .

Bei der Analytik stehen neben der Quantifizierung von Anthocyanen, vor allem die Ermittlung von Verteilungsmustern („Fingerprints“) im Mittelpunkt des Interesses. Jede Frucht besitzt ein charakteristisches Verteilungsmuster, bei dem die Peakflächen der Anthocyanidine in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen. Dadurch ist es möglich, eine Fruchtart qualitativ nachzuweisen und Fälschungen oder unerlaubten Verschnitte bei Buntsäften auf die Spur zu kommen (Schmitt, 1995).

Ziel dieses Versuches war es, Farbstoffe aus Fruchtpräparaten und getrockneten Kolloiden zu isolieren und mit Hilfe der HPLC „Anthocyan-Fingerprints“ zu erstellen. Gleichzeitig sollte die Entwicklung typischer Anthocyane während der Reife von schwarzen Johannisbeeren beobachtet werden.

a.) Isolierung

Ca. 2 g Püree wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen. Danach wurden 5 mL saures Methanol (1 % (w/w) konz. Essigsäure in Methanol) zugegeben. 200 - 400 µL Standardlösung (2 % (w/w) Callistephin-Chlorid-Stammlösung) wurden zugegeben. Die Extraktionszeit betrug 30 min und wurde durch Ultraschall und Vortex unterstützt. Anschließend wurde die Probe bei 3.000 g, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Spitzkölbchen (50 mL) überführt. Der Extraktionsvorgang wurde wiederholt und beide Überstände wurden vereinigt. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt.

Die Extraktion von Kolloiden geschah in ähnlicher Weise. 10 mg gefriergetrocknete Kolloide wurden in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die Probe wurde mit einem Tropfen konz. Essigsäure benetzt und anschließend mit 5 mL angesäuertem Methanol versetzt. Die Extraktion wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Der getrocknete Rückstand wurde in 2 mL Elutionsmittel A aufgenommen und über eine 0,45 µm-Membran filtriert.

b.) AnalytikGeräte und Materialien:

HPLC:	System MERCK-HITACHI, Gradientenpumpe L-6200
Säule:	LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) MERCK, 250 x 4 mm
Säulentemperatur:	20 °C
Flussrate:	1 ml/min
Eluent:	A: 90 % (w/w) Wasser (bidest.) + 10 % (w/w) Ameisensäure p.a. (98 - 100 %) B: 40 % (w/w) Wasser (bidest.) + 10 % (w/w) Ameisensäure p.a. (98 - 100 %) + 50 % (w/w) Acetonitril (für HPLC)
Standard:	Callistephin-Chlorid (= Pelargonidinchlorid-3-glucosid) Fa. Roth Standard-Stammlösung Einwaage 6,4 mg Callistephin-Chlorid/ ml Standardlösung 2 % (w/w) = 200 µL Standard-Stammlösung/10 mL
Autosampler:	Autosampler AS 4000 (MERCK), 10 - 40 µL (je nach Probenfärbung)
Detektor:	Dioden Array Detektor WATERS 991, Messwellenlänge 518 nm
Datenerfassung -auswertung:	Die aufgenommenen Daten der Chromatogramme und Spektren werden über einen IBM-compatiblen PC mit der Software WATERS- PDA-991 bzw. MERCK-HPLC-MANAGER ausgewertet. Identifizierung über Vergleich der Spektren und Retentionszeiten mit Standard- substanzen sowie durch Standardaddition. Die Berechnung erfolgt über das relative Peakflächenverhältnis der getrennten Substanzen.

Da die vier Anthocyanidinglycoside (s.o.) nicht als Standardsubstanzen verfügbar waren, erfolgte die Quantifizierung im Vergleich zur Peakfläche von Callistephin-Chlorid. Diese Substanz ist von Natur aus in der Probe nicht enthalten, relativ preiswert zu beziehen und ist chemisch ähnlich aufgebaut wie die Anthocyanidinglycoside. Bei der Berechnung wurde außer Acht gelassen, dass die Probensubstanzen und Standardsubstanz bei gleicher Konzentration möglicherweise unterschiedliche Signalstärken (Response) hervorrufen.

5.1.10 Aschegehalt von Polysacchariden

Der Aschegehalt wurde nach der IFU-9-Methode bestimmt. Abweichend hiervon wurden 50 mg getrocknete Kolloide in eine Platinschale eingewogen und mit Bidest. ausreichend benetzt. Die Veraschung erfolgt analog der Methodenvorschrift. Die Berechnung wurde nach folgender Formel vorgenommen:

$$\text{Aschegehalt [\%]} = \text{Auswaage Asche [g]} / \text{Einwaage Kolloide [g]} \times 100$$

5.2 Bestimmung des Kolloidgehaltes

Zur Bestimmung von kolloidal gelösten Substanzen gibt es zwei grundsätzliche Arbeitsweisen. Bei den Absolutmethoden werden die Kolloide durch Alkoholfällung oder Ultrafiltration isoliert, getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Bei den Relativmethoden werden die Polysaccharide chromatographisch getrennt und mit einem RI-Detektor erfasst. Die Quantifizierung erfolgt im Vergleich zu den Peakflächen von Standardsubstanzen, wie z.B. Wein- oder Fruchtsaftkolloide.

Einen umfassenden Überblick über die Verfahren zur Kolloidbestimmung, sowie Ergebnisse bei Weinen und Fruchtsäften geben Dietrich und Zimmer (1989), Dubourdiou et al (1986), Wucherpennig et al (1983) und Zimmer et al (1992).

5.2.1 Gelfiltration

Prinzip:

Die Kolloidgehalte der Säfte wurden durch Gelfiltration an Sephadex G25 (PHARMACIA) bestimmt. Bei dem eingesetzten Gelmaterial werden alle Kolloide erfasst, deren scheinbares Molekulargewicht über 5.000 Dalton (Ausschlussvolumen der Säule) liegt.

Die Methode zeichnet sich durch eine hervorragende Reproduzierbarkeit aus. Dietrich und Zimmer (1989) ermittelten bei einem Weißwein (Mittelwert 752 mg/L, n = 8) eine Standardabweichung $s = 9,6$ mg/L und einen Variationskoeffizient von 1,3 %.

Geräte:

Pumpe:	Pumpe P-500 (Pharmacia), Fluss 60 ml/h
Controller:	LCC-500 (PHARMACIA)
Probenaufgabe:	Ventil: MV-7 (PHARMACIA) mit Probenschleife 200 μ L, Probenkarusell
Säule:	PHARMACIA HR 10/10 (\varnothing 1 cm, Länge 10 cm, Totalvolumen 8 mL)
Gelmaterial:	Sephadex G-25 (PHARMACIA)
Fraktionssammler:	Frac 100 (PHARMACIA)
Detektor:	RI-Detektor (BISCHOFF 8100) mit XY-Schreiber
Datenaufzeichnung:	Aufzeichnung des RI-Signals mittels A/D-Wandler und PC

Durchführung:

Die Säfte wurden über eine 0,2 μ m-Membran filtriert und über eine 200 μ L-Probenschleife direkt auf die Säule aufgegeben und mit 200 mmol/L NaCl eluiert. Die relevanten Kolloide erscheinen zu Beginn des Chromatographielaufes im Ausschlussvolumen der Säule. Die Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche im Vergleich zum externen Standard. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Weinkolloide in Konzentrationen von 100 - 1000 mg/L gelöst, über 0,2 μ m membranfiltriert und über die 200 μ L Probenschleife aufgegeben.

In Abb.11 ist die Regressionsgerade für die Kalibrierung der Kolloidgehaltbestimmung dargestellt.

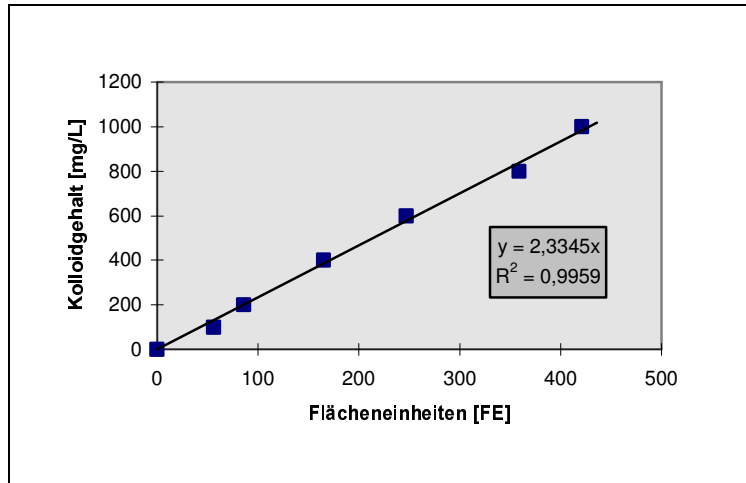


Abb. 11 Chromatographische Kolloidbestimmung über Sephadex G-25 (PHARMACIA) - Kalibrierung - Dargestellt ist die Peakfläche [FE] in Abhängigkeit der Kolloidkonzentration [mg/L]

5.2.2 Alkoholfällung

Prinzip:

Bei der Alkoholfällung wird das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten der Kolloide in organischen Lösungsmitteln ausgenutzt. Durch den Lösungsmittelüberschuss wird den Kolloiden die sie umgebende Hydrathülle entzogen. Die Kolloide agglomerieren, verlieren ihre Löslichkeit und fallen aus. Der Niederschlag wird isoliert, bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Die Kolloidkonzentration wird in g/L bzw. mg/L angegeben.

Geräte:

Glaswaren: Standzylinder 2000 mL, Rundkolben 1000 mL (vakuumfest)
 Zentrifuge: Varifuge F (HERAEUS)
 Gefriertrocknung: Lyovac GT-3 (LEYBOLD-HERAEUS)
 Waage: Plattform-Waage MP8-4 (SARTORIUS, Göttingen)

Durchführung:

In einem Standzylinder wurden 1 Volumenteil Probe und 5 Volumenteile 96 %igen Ethanol (vergällt) intensiv gemischt, 12 h stehen gelassen und zentrifugiert (10 min, 3.000 Upm). Das Pellet wurde in Bidest. vollständig gelöst und zur Abtrennung von wasserunlöslichen Bestandteilen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, erneut mit Ethanol gefällt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde gefriergetrocknet und ausgewogen. Bei sorgfältiger Durchführung der Gefriertrocknung (vollständiges Einfrieren der Probensubstanz und ausreichend hohes Vakuum) konnte auf ein Nachtrocknen der Probe im Vakuumtrockenschrank verzichtet werden.

5.3 Enzymatischer Abbau von Polysacchariden

5.3.1 Enzyme und Substrate

Für den enzymatischen Abbau der Beerenobstkolloide wurden 8 verschiedene Handels-Enzympräparate eingesetzt:

Die Enzympräparate wurden durch Gelfiltration an Sephadex G-25 (vgl. Kap. 5.2.1) von niedermolekularen Begleitsubstanzen befreit, die der Stabilisierung und Standardisierung der Produkte dienen. Das pulverisierte Produkt (*Rapidase EXColor*) wurde zuerst in Bidest. gelöst und dann auf die Säule aufgegeben, die flüssigen Enzympräparate wurden direkt aufgegeben. Als Fließmittel wurde Bidest. eingesetzt. Die Proteine wurden mit einem UV-Detektor (PHARMACIA UV-Monitor UV 2) bei 280 nm detektiert, separat aufgefangen und gefriergetrocknet. Der Proteingehalt wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Proteingehalt [Gew\%]} = \frac{\text{Auswaage getrocknetes Protein [g]} \times 100}{\text{Einwaage Enzympräparat [g]}}$$

Eine Übersicht der eingesetzten Handels-Enzympräparate und der darin enthaltenen Proteingehalte ist in Tabelle 8 dargestellt:

Tab. 8: Übersicht der Enzympräparate, die für die Abbauversuche eingesetzt wurden, sowie deren Proteingehalt [Gew-%]

Handelsname	Hersteller	Batch-Nr.	Formulierung	Proteingehalt [Gew-%]
Cytolase PLC3	Gist-brocades Seclin/ France	ohne Nr.	flüssig	2,9
Gammapect LC	Gamma-Chemie München	AO 535	flüssig	2,2
Novozym 52	Novo Ferment Dittingen/ CH	R-162	flüssig	3,6
Panzym BE	Boehringer Ingelheim	486.26	flüssig	2,1
Panzym Plus	Boehringer Ingelheim	175.03	flüssig	1,8
Rapidase Be	Gist-brocades Seclin/ France	3056	flüssig	2,6
Rapidase EXColor	Gist-brocades Seclin/ France	ohne Nr.	Pulver	8,3
Rohapect MB	Röhm Darmstadt	19/11/93	flüssig	1,0

Für die Beerenobst-Enzymierung werden Enzympräparate eingesetzt, die eine pektolytisch ausgerichtete Hauptaktivität besitzen und darüber hinaus eine Vielzahl von Seitenaktivitäten enthalten. Über die genaue Zusammensetzung schweigen sich die Hersteller jedoch aus. Durch enzymatische Abbauversuche mit Substraten bekannter chemischer Zusammensetzung kann jedoch auf das Aktivitätsspektrum eines

Enzympräparats geschlossen werden. Mit der Viskositätsmessung sollte untersucht werden, in welchem Umfang die Substanzen geeignet sind hochviskose Lösungen zu bilden.

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden folgende Substrate eingesetzt:

Tab. 9: Übersicht der Substrate, die für die Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt wurden. Ergänzend dargestellt ist die kinematische Viskosität einer 0,1 %igen (w/v) Kolloidlösung (50 mmol/L Na-acetat, pH-5,0)

Substrat	Herkunft/Quelle	Viskosität [mm ² /s]
Johannisbeer-Rohkolloide SJ01	vergl. Kap. 4.1.1	1,219
Johannisbeer-Kolloide SJ02	vergl. Kap. 4.1.3	1,235
Brombeer-Rohkolloide B01	vergl. Kap. 4.1.2	1,418
Arabinogalactan(50) Apfel	Rösch	1,058
Arabinogalactan(Lärche)	Sigma/ Deisenhofen	1,115
β -(1→4)-Galactan aus Lupinensamen	Lungesser/ Darmstadt	1,051
Apfelpektin VE 35%	Herbstreith/ Neuenbürg	1,269
Apfelpektin VE 70 %	Herbstreith/ Neuenbürg	1,421
Pektinsäure	Fluka/ Buchs CH	1,124
Rhamnogalacturonan(500) Apfel	Rösch	1,058
α -(1→5)-Araban / A-Saft-Konz.	Röhm/ Darmstadt	1,091
α -(1→3)(1→5)-Araban aus Zuckerrübenschnitzeln	Schöppllein, 1989	1,051
Xylan / Haferspelzen	Roth/ Karlsruhe	1,135
Xylan / Lärchenholz	Sigma/ Deisenhofen	1,086
Laminarin β -(1→3)(1→4)-Glucan	P-L Biochemicals/ Freiburg	1,083
Botrytis-Glucan β -(1→3)(1→6)-Glucan	Schöppllein, 1989	1,257
Dextran α -(1→6)-Glucan	Fluka/ Buchs CH	1,132
Stärke α -(1→6)(1→4)-Glucan	Merck/ Darmstadt	1,074
Pustulan aus <i>Umbilicaria papulosa</i> β -(1→6)-Glucan	Calbiochem/ Frankfurt	1,057
Carboxymethylcellulose, Na-Salz, CMC Walocel CRT 100	Wolf/ Walsrode	1,508
Hefemannan aus Bäckerhefe	Schmitt, 1983	1,051
Galactomannan Meyprogat Typ 120	Meyhall/ Schweiz	3,197
Hide Powder Azure (Protein)	Calbiochem/ Frankfurt	1,060

5.3.2 Bestimmung des Aktivitätsspektrums von 8 Handelsenzymen

Die Bestimmung des Aktivitätsspektrums der Handelsenzyme wurden in Anlehnung an eine von Schöppllein (1989) vorgeschlagene Methode durchgeführt.

Alle unter 5.3.1 beschriebenen Substrate wurden in einer Konzentration von 0,1 % (w/v) in 50 mmol/L Natriumacetat-Puffer (pH 5) gelöst und mit 0,02 % Natriumazid konserviert.

Mittels eines Wasserbades wurde die Substrattemperatur auf 35 °C gehalten. 100 µl 0,01 % (w/v) Enzymlösung werden zu 1 ml Substratlösung gegeben. Nach 10 min Enzymierungszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Kupferreagenz und 15 min Kochen im Wasserbad gestoppt.

Die enzymatischen freigesetzten reduzierenden Endgruppen wurden mit der Nelson-Somogyi-Methode (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) bestimmt. Hierbei werden die in einem bestimmten Zeitraum enzymatisch freigesetzten, reduzierenden Endgruppen der Zucker mit einem Farbreagenz umgesetzt. Die Absorption wird bei 520 nm gegen einen in gleicher Weise behandelten Blindwert fotometrisch gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich zu einer mit Glucose erstellten Eichreihe.

Die spezifische Enzymaktivität U/mg (U = engl. unit) gibt an, wieviel µmol Glucose pro Minute von einem mg Enzym freigesetzt werden.

5.3.3 Enzymatischer Abbau von Johannisbeerkolloiden mit verschiedenen Handelenzymen

Im Gegensatz zu der unter 5.3.2 beschriebenen Methode, wo die enzymatische Abbauleistung der Enzympräparate bei verschiedenen Substraten geprüft wird und somit auf die Zusammensetzung der enzymatischen Aktivitäten geschlossen werden kann, steht bei diesem Versuch die Wirkungsweise des Enzyms in einem heterogen zusammengesetzten Substrat (Fruchtsaftkolloide) im Vordergrund.

Durchführung:

8 g gefriergetrocknete Johannisbeer-Rohkolloide (SJ01) (vgl. Kap. 4.1.1) wurden in 800 mL 50 mmol/L Natriumacetatpuffer (eingestellt auf pH 3,5) gelöst.

Insgesamt standen 8 verschiedene Enzympräparate zur Verfügung (vgl. Kap.5.3.1), so dass 8 Ansätze (SCHOTT-Pufferflaschen) mit jeweils 100 mL Kolloidlösung hergestellt wurden. Im Wasserbad wurden die Kolloidlösungen auf 50 °C erwärmt, da diese Temperatur in der Praxis bei der Maische- und Saftenzymierung üblicherweise vorherrscht. Jedem der 8 Enzympräparate wurde ein Ansatz zugeordnet, in den 1 mL 0,1%ige (w/v) Lösung des jeweiligen Enzympräparates zugegeben wurde. Die Flaschen wurden verschlossen und gut durchmischt.

Aus jeder Pufferflasche wurden jeweils 5 mL Probe unmittelbar nach der Enzymzugabe (0-Variante), sowie nach 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 240 min und 24 h Inkubationszeit entnommen. Die Enzyme wurden unmittelbar nach der Probenahme durch Erhitzen im Wasserbad (10 min, 100 °C) inaktiviert.

a.) Freisetzung monomerer Zucker

Die Proben aus den enzymatischen Abbaueversuchen wurden ohne weitere Vorbehandlung (Hydrolyse) mittels HPLC auf ihren Gehalt an freien monomeren Zucker untersucht (vgl. Kap. 5.1.7). Die Quantifizierung erfolgte durch externen Standard, die Konzentration an freigesetzten Zuckern wird in mg/L angegeben. Der verbleibende noch hochmolekulare Rückstand aus dem enzymatischen Abbau wurde durch Gelfiltration an

Sephadex G-25 entsalzt (vgl. Kap. 5.2.1) und gefriergetrocknet. Die Zuckerbausteinanalytik wurde nach der unter 5.1.7 beschriebenen Methode durchgeführt.

b.) Viskositätsbestimmung

Für die Praxis hängt die Qualität eines „Beerenenzym“ entscheidend von der Fähigkeit ab, durch eine hochdosierte Pektinesterase-/ Polygalacturonase-Aktivität die Viskosität der Maische und des Saftes innerhalb kurzer Zeit (< 2 Stunden) abzusinken und damit die Pressbarkeit und die Klärung zu ermöglichen. In einem Vergleich sollten 8 Enzympräparate (vgl. Kap. 5.3.1) auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die Viskosität einer Johannisbeerkolloid-Lösung abzusinken.

Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kap. 5.3.3 „Durchführung“ beschrieben. Jeweils 5 mL Probe wurden unmittelbar nach der Enzymzugabe (0-Variante) sowie nach 60 min, 120 min und 240 min Inkubationszeit entnommen. Die Enzyme werden durch Erhitzen im Wasserbad (10 min, 100 °C) inaktiviert.

Die kinematische Viskosität der enzymatisch hydrolysierten Probelösungen wurde mit einem Kapillarviskosimeter (Fa. Schott) bei 20 °C gemessen. Die Messergebnisse werden in der Einheit der kinematischen Viskosität [v] angegeben:

$$v = C \cdot t \text{ [mm}^2\text{/s]}$$

$$\begin{aligned} \text{wobei: } v &= \text{kinematische Viskosität [mm}^2\text{/s]} \\ C &= \text{Instrumentenkonstante [mm}^2\text{/s}^2] \\ t &= \text{Messzeit [s]} \end{aligned}$$

Durch Multiplikation der kinematischen Viskosität mit der Dichte ρ [g/cm³] erhält man die dynamische Viskosität η [Pa•s]

Oft wird die kinematische Viskosität in der Einheit „Stokes“ [St] angegeben. Für die Umrechnung gilt die Beziehung 1 St = 1 cm²/s.

5.4 Durchführung von Filtrationsversuchen

Auf Grund ihrer definierten Trenncharakteristik eignen sich die Verfahren der Membranfiltration besonders gut für Filtrationsversuche. Bei der Anschwemm- oder Schichtenfiltration ist die Projektion der Laborergebnisse auf praxisübliche Größenordnungen nicht uneingeschränkt möglich, da sowohl die qualitative, als auch die quantitative Leistung der Tiefenfiltration sehr stark von der Zusammensetzung des Filtermittels aber auch von verfahrenstechnischen Parametern abhängt.

5.4.1 Statische Membranfiltration

Geräte:

Filter:	Edelstahl-Scheibenfilter EFM 5 F (SEITZ FILTER, Bad Kreuznach) mit Filterhalter für Membranscheiben (\varnothing 47 mm)
Membran:	SEITZ Typ MV, Lot. Nr. 6/287, 0,65 μ m, \varnothing 47 mm
Reservoir:	Druckfestes Vorratsgefäß (1,5 L) aus Plexiglas mit Sicherheitsventil (0,5 bar \ddot{u})
Waage:	Plattform-Waage MP8-4 (SARTORIUS, Göttingen)
Computer:	IBM-kompatibler PC zur Datenerfassung über RS-232 Schnittstelle

Durchführung:

In den Filterhalter des Scheibenfilters wurde eine Membranscheibe eingelegt und verschlossen. Bei einem Probenvolumen < 200 mL wurde der Saft direkt in den Aufgussraum über der Membranscheibe eingefüllt, das Gehäuse fest verschlossen und mit Druckluft (0,5 bar) beaufschlagt. Bei größeren Mengen gelangte die zu filtrierende Flüssigkeit aus einem druckfesten Vorratsgefäß (1,5 L) über eine Schlauchleitung direkt in den Aufgussraum. Der Filtratstrom wurde kontinuierlich über eine Waage erfasst. Die Daten wurden über eine serielle Schnittstelle an einen PC übermittelt. Das Auswerteprogramm errechnete aus der Filtratmasse $[m_F]$ in Abhängigkeit der Filtrationszeit $[t]$ eine Filtrationskurve (Patz, 1994). Bei Flüssigkeiten mit bekannter Dichte $[\rho]$ lässt sich die Änderung des spezifischen Filtratstroms $[\Delta V_F]$ und der spezifischen Filtrationsgeschwindigkeit $[\Delta v_F]$ berechnen. Alle Säfte wurden vor der Filtration zentrifugiert (20 min, 3.500 g).

5.4.2 Dynamische Membranfiltration (Cross-Flow- Filtration)

Eingesetzte Geräte:

Membran:	ROMICON- Hohlfasermembran-Module PM-500 aus Polysulfon (Filterfläche 0,1 m ²) mit einer nominalen Trenngrenze von 500.000 Dalton, Nr. 4 PD 2241
Pumpe:	Seitenkanalpumpe (SCHMALENBERGER HL2 10-06, elektr. Leistung 0,4 kW)
Anlagenparameter:	Über Regelventile am Ein- und Ausgang des Membranmoduls wurde ein mittlerer Transmembrandruck $[\Delta p_{tm}]$ von 0,8 bar und ein Retentatvolumenstrom $[V_{Ret}]$ von 500 L/h eingestellt. Zu Beginn der Filtration betrug das Retentatvolumen 5 L. Über einen Tauchkühler wurde die Retentattemperatur auf 20°C gehalten. Unter diesen Bedingungen stellte sich ein Wasserwert von 190 L/ m ² *h ein.

Der Filtratstrom (Permeatvolumen) wurde in einem graduierten Standzylinder gesammelt, das Volumen wurde in regelmäßigen Zeitabständen manuell erfasst. Alle Säfte wurden vor der Filtration zentrifugiert (20 min, 3.500 g).

6 Ergebnisse

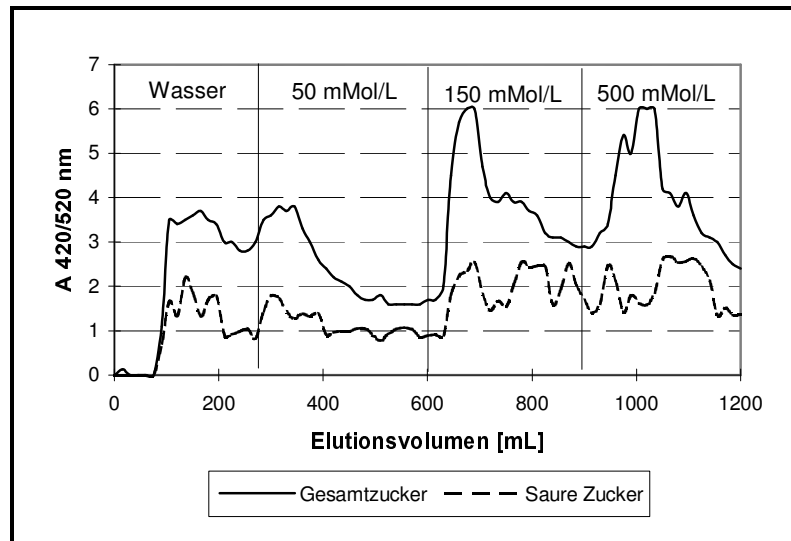
6.1 Charakterisierung von Beerenobstkolloiden

Die vorgereinigten und gefriergetrockneten Kolloide (vgl. Kap. 4.1.1. - 4.1.3) wurden durch eine fraktionierte Extraktion an einem Ionenaustauscher aufgetrennt. Durch die Gelchromatographie und die Zuckerbausteinanalytik sollte auf die Struktur der Polysaccharide geschlossen werden.

6.1.1 Kolloide aus schwarzen Johannisbeeren

6.1.1.1 Fraktionierung der Rohkolloide mittels DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Kolloide wurden an einem schwachen Anionenaustauscher DEAE-Sepharose CL-6B in Chloridform getrennt. Durch Vorversuche hat sich ein 4-stufiger Wasser/ NaCl-Gradient für die Trennung der Polysaccharide als am besten geeignet herausgestellt. Die Fraktionen wurden durch Gelfiltration (Sephadex G-25) entsalzt und gefriergetrocknet. Die Trennung von nativen Johannisbeerkolloiden (SJ01) sowie die anteilmäßigen prozentualen Ausbeuten sind in Abb. 12 dargestellt.



Temp. [°C]	Probenkonz. [Gew%]	Fraktion [%]				Ausbeute [%]
		H ₂ O	50mmol/L	150mmol/L	500mmol/L	
20	1	Säule zu !!				
60	0,5	24	17	35	24	50

Abb. 12: DEAE-Fraktionierung von nativen Johannisbeerkolloiden SJ01 mit einem Stufengradient.

Tabellarisch dargestellt ist die prozentuale Gesamtausbeute und die anteilmäßige Ausbeute der Fraktionen in Abhängigkeit von der Säulentemperatur und der Probenkonzentration.

Durch die Anionenaustauscher-Chromatographie wurde bei nativen Kolloiden aus schwarzen Johannisbeeren (SJ01) zwar eine Fraktionierung erreicht, eine vollständige Basislinientrennung war jedoch nicht möglich.

Die Tatsache, dass einige Polysaccharide hochviskose Lösungen bildeten und die Säule verblockten, erwies sich zunächst als großes Handicap. Auch durch die Halbierung der Probenkonzentration von 1 Gew% auf 0,5 Gew-% konnte keine Trennung erreicht werden. Das Erwärmen der Kolloidlösung und der Säule auf 60 °C senkte die Viskosität und verbesserte gleichzeitig die Permeabilität der Probelösung. Dies ermöglichte die Trennung zumindest der 0,5 %igen Kolloidlösung. Alle Anionenaustauscher-Trennungen wurden daraufhin bei 60 °C durchgeführt.

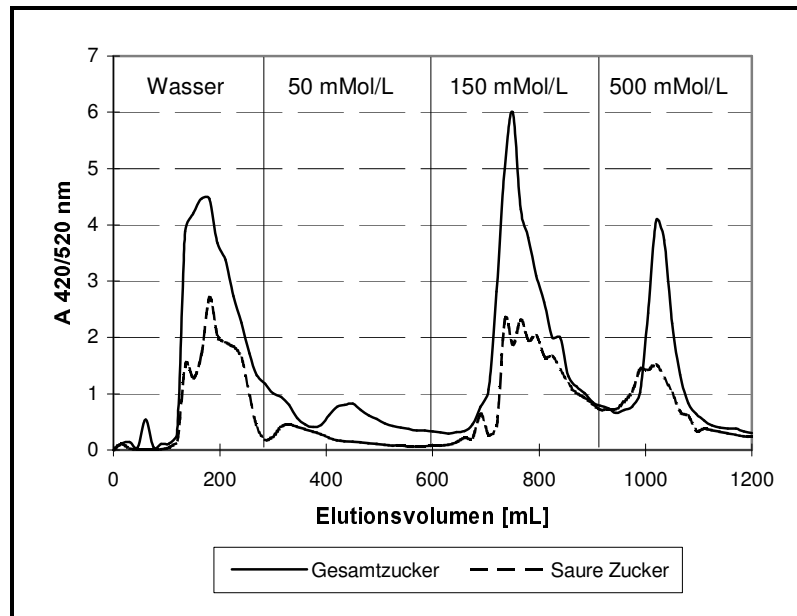
Der Hauptanteil der Kolloide wurde mit 150 mMol NaCl und der 500 mMol NaCl von der Säule gelöst. Beide Fraktionen machen zusammen 59%, also fast 2/3 der eingesetzten Kolloide aus. Zwischen den nicht an das Austauschermaterial oder nur schwach bindenden 50-mMol-Fraktion verlief die Trennung nur unzureichend. In der Summe erreichen beide Fraktionen 41% der Gesamtausbeute, wovon die Wasserfraktion mit 24% den größeren Anteil einnimmt.

In allen Fraktionen waren neben Neutralzuckern auch saure Zucker enthalten. Erwartungsgemäß hätte eine Anreicherung von Uronsäuren in den Fraktionen, die mit hoher Ionenstärke eluierten, stattfinden müssen, doch selbst in der Wasserfraktion und in der 50 mMol-Fraktion waren hohe Anteile an Uronsäuren enthalten. Wahrscheinlich ist die Bindungskapazität der DEAE-Sepharose zu gering oder die Bindungskräfte zu schwach, um alle sauren Anteile der Kolloide so fest zu binden, dass sie erst mit hohen Ionenstärken im Eluenten abgetrennt werden. Eine andere Erklärung wäre die Maskierung der Carboxylgruppen im Pektinmolekül durch Methylgruppen, so dass die Polysaccharide nur schwach mit dem Gelmaterial in Wechselwirkung treten und bereits mit niedrigen Ionenstärken eluiert werden.

Insgesamt wurden nur 50 % der eingewogenen Kolloidmenge nach der Trennung wiedergefunden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass sich das Lösungsverhalten der Kolloide durch das Gefriertrocknen verschlechtert (Schöppllein, 1989). Die Vielzahl von Aufarbeitungsschritten (Trennen; Entsalzen; Trocknen und Auswiegen), sowie phenolische Substanzen und andere Verunreinigungen der Kolloide, die am Gelmaterial haften bleiben, trugen ebenfalls zu den Ausbeuteverlusten bei.

Nach Beendigung der Trennung war das Gelmaterial dunkelbraun eingefärbt. Wahrscheinlich binden die phenolischen Verunreinigungen der Kolloide so fest an das Austauschermaterial, dass sie trotz der hohen Ionenstärke im 500-mMol-Eluent nicht vom Gelmaterial abgelöst werden. Die Säule wurde deshalb nach jedem Trenngang mit zwei Bettvolumen (BV) 1 %ige NaOH und 2 BV Wasser, gespült. Der ursprünglich weiße Originalzustand des Säulenmaterials konnte aber nicht wiederhergestellt werden. Die Trennleistung wurde durch die Verfärbung aber nicht beeinträchtigt.

In Abbildung 13 ist die Trennung von Kolloiden (SJ02) dargestellt, die durch Alkoholfällung aus dem Saft einer enzymierten Johannisbeermasse isoliert wurden.



Temp. [°C]	Probenkonz. [Gew%]	Fraktion [%]				Ausbeute [%]
		H ₂ O	50mmol/L	150mmol/L	500mmol/L	
60	0,5	27	5	47	21	52

Abb. 13: DEAE-Fraktionierung von enzymatisch veränderten Rohkolloiden aus Johannisbeeren (SJ02) mit einem Stufengradient. Tabellarisch dargestellt ist die prozentuale Gesamtausbeute und die anteilmäßige Ausbeute der Einzelfractionen

Bei den Kolloiden (SJ02), die aus enzymatisch behandelten Johannisbeeren isoliert wurden, konnte eine bessere Trennung erreicht werden.

Annähernd die Hälfte der Kolloide (47%) eluierte in der 150-mMol-Fraktion. Die nicht an das Austauscherharz bindenden Kolloide bilden mit 27% einen ähnlich großen Anteil an der Gesamtausbeute wie die stark saure Fraktion (500-mMol) mit 21%. Der Anteil der Kolloide in der 50-mMol-Fraktion war mit 5% vergleichsweise gering. Alle Fraktionen bestanden etwa zur Hälfte aus Uronsäuren.

Durch die Enzymierung werden hochmolekulare, langkettige Pektine in kleinere Bruchstücke gespalten. Denkbar wäre, dass durch die Viskositätssenkung eine Verbesserung der Permeabilität der Kolloide im Gelmaterial erreicht wurde, wodurch sich die Wechselwirkung der Polysaccharide mit den Ankergruppen des Harzes verbessert hat. Andererseits führte die Spaltung der Esterbindung durch Pektinesterasen zu freien Carboxylgruppen, die sich fester an das Gelmaterial binden.

6.1.1.1 a.) Molekulargewichtsverteilung

Nach der DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie wurden die jeweiligen Fraktionen der beiden Johannisbeerkolloide (SJ01 und SJ02) entsalzt, gefriergetrocknet und zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung in einem NaCl-Puffer resuspendiert.

In Abbildung 14 sind die Chromatogramme der Molekulargewichtsbestimmung an Superose 6 der unfraktionierten Johannisbeer-Rohkolloide (SJ01) sowie der vier Einzelfraktionen der DEAE-Trennung dargestellt.

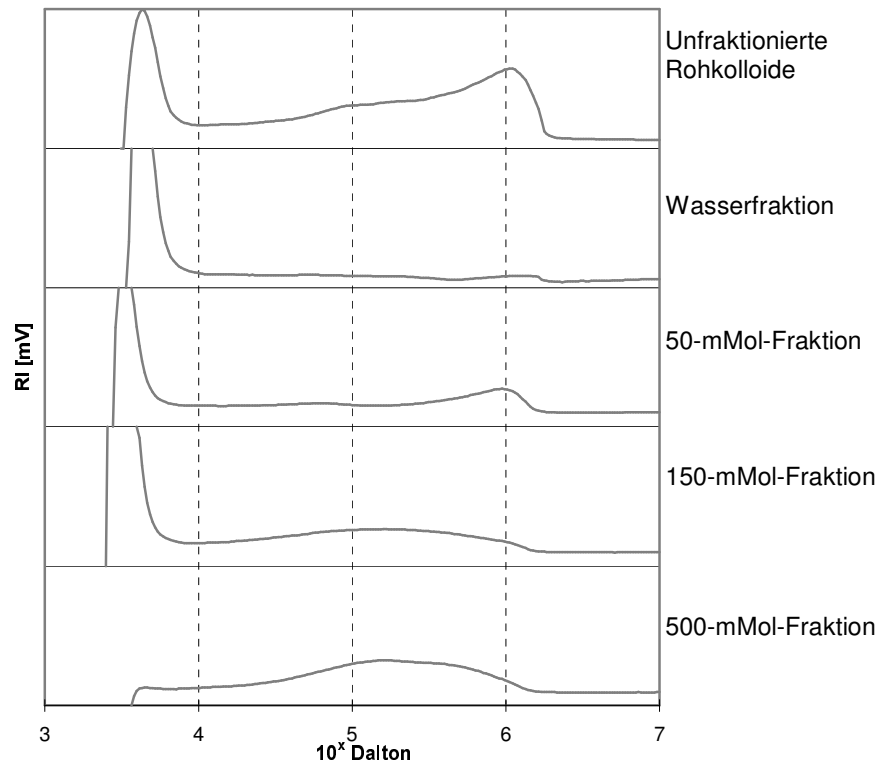


Abb. 14: Molekulargewichtsverteilung an Superose 6 (PHARMACIA) der über DEAE-Sepharose Cl-6b fraktionierten, nativen Johannisbeerkolloide (SJ01)

Die unfraktionierten Rohkolloide (SJ01) aus schwarzen Johannisbeeren ließen sich an Superose 6 nur unzureichend trennen. Neben einem „Oligosaccharid“-Peak, eluierte ein Großteil der Kolloide breit verteilt, zwischen 100.000 Dalton und dem Ausschlussvolumen der Säule > 1 Mio. Dalton.

Bei den Kolloiden, die über DEAE-Sepharose fraktioniert wurden, erschien in der Wasserfraktion ein schwach ausgeprägter und der 50 mMol NaCl-Fraktion ein deutlich abgegrenzter Peak im Bereich zwischen 1 Mio. Dalton und dem Ausschlussvolumen der Säule. Beide Fraktionen enthielten demnach sehr hochmolekulare Polysaccharide. In der 150 mmol/L- und die 500 mmol/L-Fraktion sind die Molekulargewichte zwischen 10.000 Dalton und dem Ausschlussvolumen > 1 Mio. Dalton breit verteilt. Das Maximum der Verteilung liegt im Bereich von 200.000 Dalton, also deutlich niedriger als bei der Wasserfraktion und der 150-mMol-Fraktion. Außer in der 500 mmol/L-Fraktion erschien

bei allen Fraktionen ein niedermolekularer Peak im Totalvolumen der Säule. Eine genaue Molekulargewichtsbestimmung ist bei niedermolekularen Kolloiden nicht möglich, da das Gelmaterial nur Kolloide > 10.000 Dalton verlässlich trennt.

In der Abbildung 15 sind die Chromatogramme der Molekulargewichtsbestimmung an Superose 6 der enzymatisch veränderten Johannisbeerkolloide (SJ02) sowie der drei Einzelfractionen der DEAE-Trennung dargestellt.

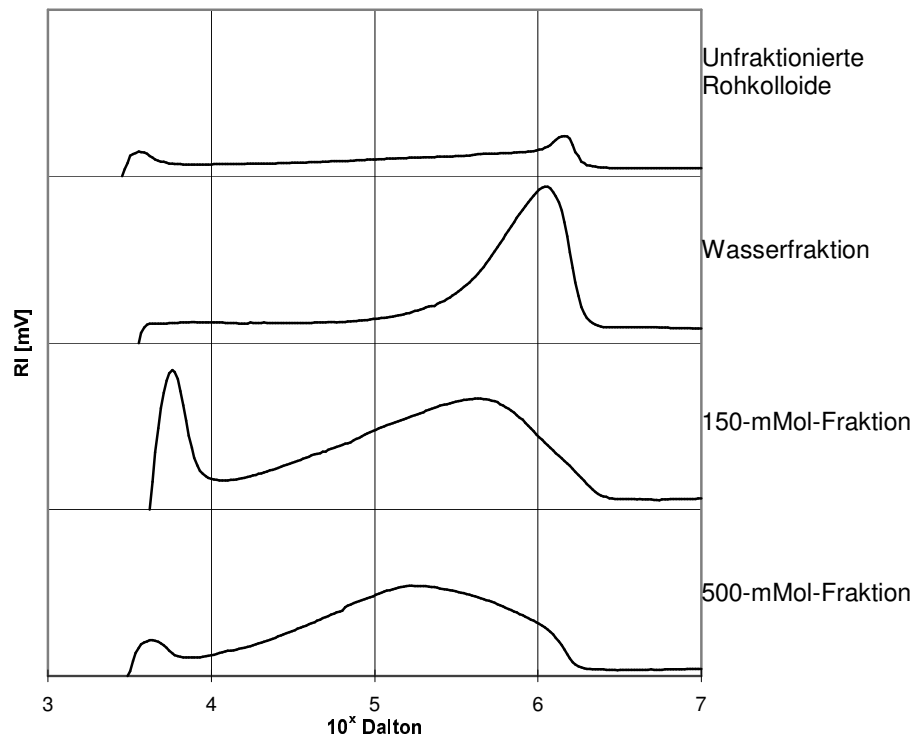


Abb. 15: Molekulargewichtsverteilung an Superose 6 (PHARMACIA) der über DEAE-Sepharose Cl-6b fraktionierten Johannisbeerkolloide (SJ02)

Bei den Kolloiden, die aus maischeenzymierten Johannisbeeren (SJ02) isoliert wurden, eluierte der größte Teil der Polysaccharide ebenfalls im hochmolekularen Bereich. Die undifferenzierte Elutionskurve der Rohkolloide weist daraufhin, dass die Trennung der Kolloide nur unzureichend verlief. Im Totalvolumen wie auch im Ausschlussvolumen der Säule eluierten Kolloide, die nicht klassifiziert werden konnten. Die Wasserfraktion eluierte in einem einzigen breit verteilten Peak, dessen Maximum im Ausschlussvolumen der Säule > 1 Mio. Dalton liegt. Die Molekulargewichte in der 150 mMol-Fraktion und der 500 mMol-Fraktion sind ebenfalls breit verteilt. Die Maxima der Verteilungen liegen im Bereich zwischen 300.000 und 400.000 Dalton und damit deutlich geringer als in der Wasserfraktion. Aufgrund des geringen Anteils der 50 mMol-Fraktion an der Gesamtausbeute der DEAE-Fraktionierung konnte keine gelchromatographische Trennung erstellt werden.

Aus den Elutionsprofilen wird deutlich, dass es sich bei Johannisbeerkolloiden um ein sehr komplexes System hochmolekularer Substanzen handeln muss, die auch durch das zugesetzte Enzympräparat (Novozym 52) nur unvollständig abgebaut werden. Bei der Fraktionierung mit einem DEAE-Anionenaustauscher reichern sich Kolloide mit einem Molekulargewicht > 1 Mio. Dalton in der Wasserfraktion und der 50 mMol-Fraktion an.

Die Ursachen für die schlechte Trennung liegen hauptsächlich in der komplexen Kolloidstruktur, bei der Gelfiltrationseffekte und Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial nicht auszuschließen sind. Durch die Vielzahl von Aufarbeitungsschritten kann es außerdem zu irreversiblen Veränderungen der nativen Kolloidstruktur kommen, die auch das Resuspendierungsverhalten der Kolloide negativ beeinflussen.

6.1.1.1 b.) Zuckerbausteinanalytik

Mit der fotometrischen Zuckerbestimmung lassen sich nur Summenparameter bestimmen, der Einzelnachweis von monomeren Zuckern ist mit dieser Methode nicht möglich. Für die Charakterisierung von Polysacchariden stellt die Zuckerbaustein-zusammensetzung eine wichtige Kenngröße dar.

Die einzelnen DEAE-Fractionen der beiden Johannisbeerkolloide (SJ01 und SJ02) wurden gesammelt, entsalzt und gefriergetrocknet. Für die Zuckerbausteinbestimmung wurden die Polysaccharide zuerst durch eine zweistufige Schwefelsäure-Hydrolyse in monomere Zucker gespalten. Die Neutralzucker wurden gaschromatographisch, die sauren Zucker mit HPLC bestimmt (vgl. Kap. 5.1.5 - 5.1.7). Bei den Rohkolloiden wurde zusätzlich der Proteingehalt bestimmt.

Die Zusammensetzung der Zuckerbausteine der beiden Johannisbeerkolloide (Sj01 & Sj02), sowie der dazugehörenden vier DEAE-Fractionen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Prozentuale Zusammensetzung der Zuckerbausteine von Rohkolloiden (**SJ01**) und enzymatisch veränderten Kolloiden (**SJ02**) sowie der einzelnen Fraktionen nach der Trennung an DEAE-Sepharose CI-6b mit einem NaCl-Stufengradienten.

Fraktion	Neutralzucker [Gew-%]					Summe	Saure Zucker		Summe	Protein
	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	[Gew-%]	GalA	GlcA	[Gew-%]	
SJ01 Rohkoll.	1	3,5	2,5	2,1	0,2	9,30	17,5	0	26,8	2,31
H ₂ O	0,1	1,1	1,2	5	0,2	7,60	11,9	0	19,5	
50 mMol/L	0,6	4	5,5	1,1	1,5	12,70	29,6	0,2	42,5	
150 mMol/L	0,7	4,5	3	0,3	0,2	8,70	34,4	0	43,1	
500 mMol/L	2,3	7,2	2,7	0,2	0,1	12,50	28,9	0	41,4	
SJ02 Rohkoll.	0,5	2,3	2,8	8,1	1,2	14,90	17,5	0,1	32,5	8,38
H ₂ O	0	2,6	1,5	0,7	0	4,80	22,8	0,1	27,7	
50 mMol/L	0	7,7	11,6	0	7	26,30	13,9	0,1	40,3	
150 mMol/L	0	1,1	0,6	0	0	1,70	28	0,1	29,8	
500 mMol/L	0	2,1	0,8	0	0	2,90	22	0,1	25,0	

Unfraktionierte Johannisbeer-Rohkolloide (SJ01) enthalten hauptsächlich Galacturonsäure (17,5 Gew%). Die Summe aller Neutralzucker macht mit 9,3 Gew% nur etwa die Hälfte des Gehaltes an Galacturonsäure aus. Mengenmäßig herrschen bei den Neutralzuckern Arabinose (3,5 Gew%), Galactose (2,5 Gew%) und Glucose (2,1 Gew%) vor. Das Arabinose/Galactose-Verhältnis lag bei 1,4. Der Anteil von Rhamnose (1 Gew%) und Xylose (0,2 Gew%) ist sehr gering. Die Summe aller nachgewiesenen Zuckerbausteine betrug nur 26,8 Gew% der eingewogenen Kolloidmenge. Der Proteingehalt lag mit 2,31 Gew% deutlich unter dem der enzymatisch behandelten Kolloidfraktion (SJ02) mit 8,38 Gew%. Der höhere Proteingehalt resultiert vermutlich aus den zugesetzten Enzymen für den enzymatischen Pektinabbau.

Im direkten Vergleich zu den Rohkolloiden (SJ01) unterscheiden sich die unfraktionierten Kolloide, die aus maischeenzymierten Johannisbeeren (SJ02) isoliert wurden, dadurch, dass der Neutralzuckergehalt mit 14,9 Gew% deutlich höher liegt, das Arabinose/Galactose-Verhältnis nur noch bei 0,8 liegt und sich der relative Glucoseanteil von 2,1 Gew% auf 8,1 Gew% fast vervierfacht hat. Durch die Enzymierung kam es zu einem Verlust an Arabinose und Rhamnose. Der relative Gehalt an Galactose, Glucose und Xylose im Polymer stieg an. Mannose und Fucose wurden weder in den Kolloidproben, noch in den fraktionierten Proben nachgewiesen.

Bei den fraktionierten Johannisbeer-Rohkolloiden (SJ01) wurden die Ergebnisse der fotometrischen Zuckerbestimmung (vgl. Abb. 12) bestätigt, wonach in allen Fraktionen nach der DEAE-Trennung Uronsäuren enthalten sein müssen. Die Gehalte bewegen sich zwischen 11,9 Gew% in der Wasserfraktion und 34,4 Gew% in der 150 mMol-Fraktion. Diese Fraktion hatte auch nach der DEAE-Trennung den größten Anteil am Gesamtkolloid. Durch den NaCl-Stufengradienten konnte keine Trennung zwischen Neutralzuckern und Uronsäuren erreicht werden. Arabinose und Galactose sind in den Einzelfraktionen die vorherrschenden Zuckerbausteine. Abweichend hiervon ist in der Wasserfraktion der Glucoseanteil mit 5 Gew% außergewöhnlich hoch. Möglicherweise rührt dies von Xyloglucanen her, die in der primären pflanzlichen Zellwand weitverbreitet sind (Voragen et al, 1986b). Aber auch ein vom Botrytispilz gebildetes β -Glucan ist als Ursache denkbar. Das Arabinose/Galactose-Verhältnis war bei den Fraktionen, die mit niedriger Ionenstärke eluiert wurden, <1 und bei hohen Ionenstärken >1 . Die Summe der nachgewiesenen Zuckerbausteine ergab im Verhältnis zur Kolloideinwaage eine minimale Ausbeute von 19,5 Gew% in der Wasserfraktion und eine maximale Ausbeute von 43,1 Gew% in der 150 mMol-Fraktion. In dieser Fraktion war zugleich der Anteil von sauren Zuckern an der Gesamtzuckerausbeute mit 80 % am höchsten.

Bei den enzymatisch veränderten Johannisbeerkolloiden (SJ02) war die Trennung an DEAE-Sepharose besser und führte zu der erwarteten Anreicherung von Uronsäuren in der 150 mMol- bzw. 500 mMol-Fraktion. Bezogen auf die Gesamtausbeute von 29,8 Gew% der 150 mMol-Fraktion repräsentieren 28 Gew% Uronsäuren 93,5 % der Ausbeute. In der 500 mMol-Fraktion entsprechen 22 Gew% saure Zucker immerhin noch 88 % der Gesamtausbeute von 25 Gew%. Die hohen Galacturonsäureanteile (82,3 %) an der Wasserfraktion könnten von hochveresterten Restpektinen herrühren.

Die Neutralzucker in den einzelnen Fraktionen bestehen hauptsächlich aus Arabinose und Galactose. In geringer Konzentration findet man in der Wasserfraktion auch Glucose (0,7 Gew%). In der 50 mMol-Fraktion wurde mit 7 Gew% ein außergewöhnlich hoher Xyloseanteil nachgewiesen. Xyloseerichte, $\alpha(1\rightarrow6)$ -gebundene Seitenketten von Xyloglucanen könnten hierfür ursächlich sein. Trotz des hohen Uronsäureanteils, bezogen auf die Gesamtausbeute, konnte in den fraktionierten Kolloiden keine Rhamnose nachgewiesen werden. Das Arabinose/Galactose-Verhältnis ist mit 0,7 in der 50 mMol-Fraktion am kleinsten und in der 500 mMol-Fraktion mit 2,6 am größten.

Insgesamt wurden bei den einzelnen Fraktionen zwischen 25 % (500 mMol-Fraktion) und 40,3 % (50 mMol-Fraktion) der eingewogenen Kolloide bei der Zuckerbausteinanalytik wiedergefunden.

6.1.1.2 Fraktionierung der Johannisbeerkolloide mittels Ultrafiltration

Aus einem maische- und saftenzymierte Johannisbeersaft (vgl. Kap. 4.2.1) wurden die Kolloide mit Hilfe der Ultrafiltration isoliert und nach ihrem Molekulargewicht fraktioniert. Hierzu wurde zuerst der Johannisbeersaft über die PM-500-Membran und dann die jeweiligen Permeate stufenweisen über die nächst engere UF-Membrane (PM-50 bis PM-

2) filtriert. Die Kolloide, die sich im Retentat der jeweiligen Membran aufkonzentrierten, wurden durch Diafiltration von niedermolekularen Bestandteilen gereinigt und gefriergetrocknet. Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung wurden die Kolloide erneut in einem NaCl-Puffer gelöst und dann auf die Säule aufgegeben.

6.1.1.2 a.) Molekulargewichtsverteilung

Die Chromatogramme der Molekulargewichtsverteilung sind in Abbildung 16 dargestellt.

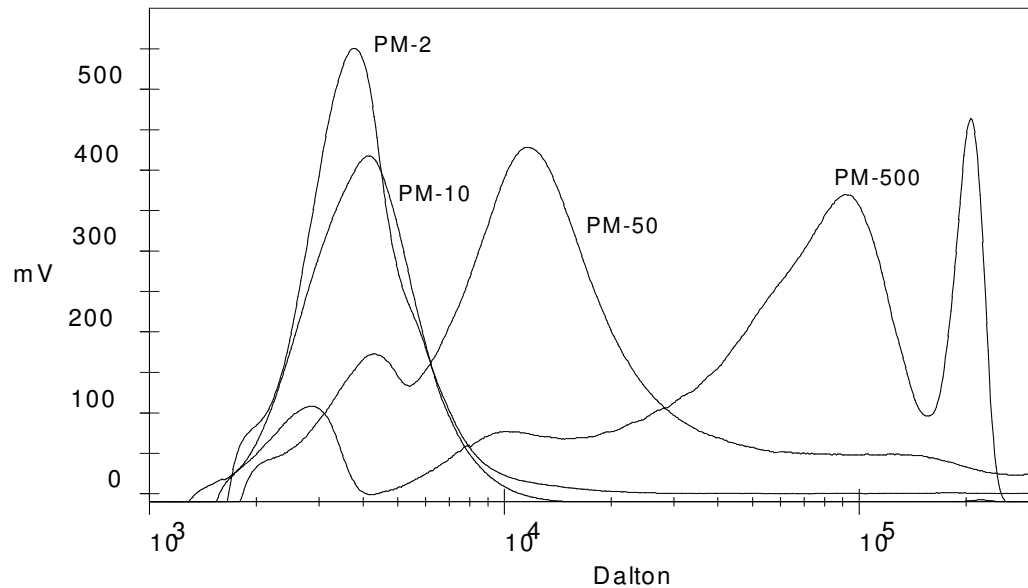


Abb. 16: Molekulargewichtsverteilung (Superose 12, PHARMACIA) der Johannisbeer-Kolloide, die nach der Ultrafiltration über eine PM-500-, PM-50-, PM-10- und PM-2-Membran aus dem Retentat isoliert wurden

Durch die stufenweise Filtration wurde eine molmassenabhängige Fraktionierung der Kolloide erreicht. Die Molekulargewichtsverteilung der Kolloide aus dem Retentat der PM-500-Fraktion hatte deutlich ausgeprägte Peaks bei 3.000 Dalton (D), 10.000 D, 95.000 D und im Ausschlussvolumen der Säule > 280.000 D. Eigentlich dürften bei einer Trenngrenze von 500.000 D nur Kolloide im Retentat verbleiben, deren Molekulargewichte über 500.000 Dalton liegen. Durch die Deckschichtbildung kommt es aber zu einer Veränderung der Membrandurchlässigkeit, so dass auch Kolloide mit niedrigeren Molekulargewichten zurückgehalten werden. Außerdem ist nicht bekannt, welchen Einfluss die Struktur der Polysaccharide auf die Trenngrenze besitzt, da die Validierung von Membranen meist mit Protein-Standards erfolgt.

Bei den Kolloiden im Retentat der PM-50-Membran deutete sich der Peak bei 95.000 D nur noch schwach an, ausgeprägt erschienen die Peaks bei 10.000 D. und 4.000 D., sowie einer kleinen Peakschulter bei 2.000 Dalton.

Die Molekulargewichte der Kolloide im Retentat der PM-10-Membran liegen im Bereich von 1.000 D. und 20.000 D. mit einem Maximum bei 4.000 D.

Im Retentat der PM-2-Fraktion sind nur noch niedermolekulare Kolloide im Bereich von 1.000 - 10.000 D. enthalten. Das Maximum der Verteilung lag bei 3.000 Dalton.

Abschließend wurde noch das Permeat der PM-2 untersucht. Die Verteilung zeigte eine zweigipflige Verteilungskurve mit Maxima bei 2.000 Dalton und bei 3.000 Dalton (nicht dargestellt). Genau genommen dürfte der Peak bei 3.000 Dalton nicht erscheinen, da die Molekulargewichte über der Ausschlussgrenze der Membran von 2.000 D. liegen.

Dadurch, dass die Trenngrenze einer Membran nur ein statistischer Mittelwert darstellt und der Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die Trenngrenze ebenfalls unbekannt ist, lässt sich dieser Widerspruch jedoch erklären.

Die Kolloide aus der PM-2 Permeatfraktion ließen sich weder mit 96 %igem Ethanol noch mit Aceton ausfällen. Sie wurden daher nicht weiter untersucht.

6.1.1.2 b.) Zuckerbausteinanalytik

Die Bestimmung der Neutralzuckerbausteine in den diafiltrierten Retentaten erfolgte gaschromatographisch, die sauren Zucker wurden über HPLC bestimmt. Zusätzlich wurde in jeder Fraktion der Proteingehalt ($N \times 6,25$) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Prozentuale Neutralzucker- und Uronsäurezusammensetzung der nach Molekulargewicht fraktionierten Kolloide sowie deren Proteinanteil (Elementaranalyse). Die Kolloide wurden aus den Retentaten nach stufenweiser Ultrafiltration mit Membranen verschiedener Trenngrenzen (**PM-2 = 2.000 Dalton, PM-10 = 10.000 Dalton, PM-50 = 50.000 Dalton, PM-500 = 500.000 Dalton**) isoliert.

Retentat	Neutralzucker [Gew-%]						Summe NZ [Gew-%]	GalA	Summe NZ + SZ Gew-%]	Protein [Gew-%]
	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man		[Gew-%] GalA		
PM-2	0,4	0,3	0,2	1,0	0,3	0,8	3,0	40,0	43,0	0,6
PM-10	1,0	1,6	0,3	2,6	0,4	0,7	6,6	18,7	25,3	1,3
PM-50	1,6	1,8	0,8	2,4	0,3	0,8	7,7	19,5	27,2	1,3
PM-500	6,8	10,6	6,7	2,9	1,1	2,2	30,3	13,0	43,3	5,6

In den einzelnen Fraktionen sind die monomeren Zuckerbausteine sehr heterogen verteilt. Die hochmolekulare Fraktion PM-500 enthält überwiegend Neutralzucker (30,3 Gew-%), wobei Arabinose, Rhamnose und Galactose die Hauptbestandteile bilden. Der Mannosegehalt ist mit 2,2 % in dieser Fraktion am höchsten, vergleichsweise niedrig mit 13,0 % ist dagegen der Galacturonsäuregehalt. Ein Rhamnose/Galacturonsäure-Verhältnis von 0,5 deutet auf das Vorhandensein von Rhamnogalacturonanen hin, wie sie bereits in Himbeerkolloiden nachgewiesen wurden (Schöppllein, 1989). Das Arabinose/Galactose-Verhältnis betrug in dieser Fraktion 1,6. Inwieweit es sich hierbei um

Arabane und/oder Arabinogalactane handelt, konnte durch die Zuckerbausteinanalytik nicht geklärt werden. Der hohe Mannosegehalt in der PM-500-Fraktion könnte von einem Glucomannan herrühren, zumal in der Fraktion gleichzeitig der Glucosegehalt erhöht ist. In einigen Fraktionen konnte vereinzelt Fucose und Glucuronsäure nachgewiesen werden, da die Gehalte aber unter 0,5 Gew-% lagen, wurde auf eine gesonderte Darstellung verzichtet.

In der niedermolekularen Fraktion PM-2 verschob sich das Verhältnis Neutralzucker zu sauren Zuckern deutlich in Richtung der Uronsäuren (40,0 Gew-%). Der Neutralzuckeranteil ging auf 3,0 Gew-% zurück. Diese Fraktion besteht zum Großteil nur aus Galacturonsäure, die Neutralzuckerbausteine erscheinen nur als Minorkomponente mit einem Anteil von $\leq 1\%$. Vermutlich handelt es sich hierbei um (noch) nicht abgebaute niedermolekulare Restpektine aus den „smooth regions“ des Pektins mit einem Polymerisationsgrad von 10 bis 15.

Bemerkenswert war, dass die beiden niedermolekularen Fraktionen PM-2 und PM-10 sehr unterschiedliche Zuckerbausteinzusammensetzungen aufwiesen, obwohl sich die Molekulargewichtsverteilungen nur wenig unterschieden. Die PM-10-Fraktion enthielt gegenüber der PM-2-Fraktion die doppelte Menge Neutralzuckern, dagegen nur etwa halb so viel Galacturonsäure.

Die Gesamtausbeute lag in den Fraktionen PM-2 (43,0 Gew-%) und PM-500 (43,3 Gew-%) deutlich höher als in den Fraktionen PM-10 (25,3 Gew-%) und PM-50 (27,2 Gew-%). In den höhermolekularen Fraktionen stieg auch der Proteingehalt und erreichte mit 5,6 Gew-% in der PM-500-Fraktion den höchsten Wert. Möglicherweise stammt das Protein aus Glycoproteinen. Zumal der hohe Gehalt in dieser Fraktion an Arabinose und Galactose für Arabinogalactan-Proteine typisch sind.

6.1.1.2 c.) Methylierungs- und Acetylierungsgrade

Tab. 12: Prozentuale Methylierungs- und Acetylierungsgrade der enzymierten und über Ultrafiltration fraktionierten Johannisbeerkolloide. Die Werte wurden auf der Basis der Galacturonsäuregehalte in Tab. 11 berechnet. Zum Vergleich sind die Werte bei nativen Johannisbeerkolloiden dargestellt.

Retentat	Methylierungsgrad [%]	Acetylierungsgrad [%]
PM-2	42	2
PM-10	52	3
PM-50	47	3
PM-500	24	8
Natives Pektin	93	12

Bei den Veresterungs- und Acetylierungsgraden gab es, mit Ausnahme der hochmolekularen Fraktion PM-500, zwischen den einzelnen Fraktionen nur geringfügige

Unterschiede. Der Vergleich mit nativen Johannisbeerkolloiden zeigt, dass durch die Enzymbehandlung der Maische und des Saftes rein rechnerisch nur etwa die Hälfte der Methylester gespalten werden. Die Pektine mit dem geringsten Veresterungs- und dem höchsten Acetylierungsgrad reichern sich in der hochmolekularen Fraktion PM-500 an. Wahrscheinlich handelt es sich hier um weitgehend entesterte Pektinbruchstücke, die noch mit hochmolekularen Neutralzuckerseitenketten verknüpft sind. Weshalb die Entmethylierung nur unvollständig verläuft, kann nur spekulativ beantwortet werden. Möglicherweise war die Pektinesterase-Aktivität im Enzympräparat nicht ausreichend, um die Methylester-Bindungen innerhalb der Reaktionszeit zu spalten.

6.1.1.2 d.) Anthocyan-Fingerprints

Kolloide von Beerenfrüchten sind nach der Gefriertrocknung oft rötlich bis braun eingefärbt. Dieses Phänomen tritt sowohl bei der Alkoholfällung, als auch bei der Ultrafiltration auf und lässt sich selbst durch mehrmaliges Waschen mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln nicht völlig beseitigen. Die Ursache der Verfärbung sind vermutlich Anthocyanidine, die sich bei der Aufarbeitung der Früchte im Saft lösen und mit Kolloiden sehr stabile Verbindungen eingehen. Durch die phenolischen Verbindungen wurde die Analytik der Polysaccharide teilweise erheblich gestört. Bei der chromatographischen Trennung der Kolloide kommt es zu einer Reihe von negativen Matrixeffekten, die sich vor allem in schlechten Ausbeuten, aber auch in einer oftmals irreversiblen Verfärbung des Gelmaterials widerspiegeln. Phenole scheinen auch auf die hydrolytische Spaltung der Polysaccharide einen Einfluss zu haben, da bei Zuckerbausteinanalytik von farblosen Kolloiden (z.B. Weißweinkolloide) wesentlich höhere Ausbeuten erzielt werden .

Für den Nachweis von anhaftenden Anthocyanen in isolierten Kolloiden wurden die vier Fraktionen aus der Ultrafiltration und Rohkolloide aus Johannisbeeren mit saurem Methanol extrahiert und über HPLC getrennt. Die prozentuale Anthocyanidin-Zusammensetzung der methanolischen Extrakte ist in Abb. 17 dargestellt.

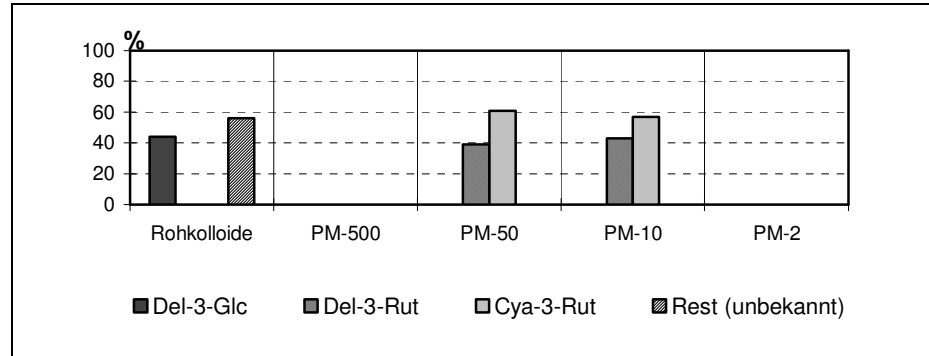


Abb. 17: Anthocyanmuster in den Extrakten aus verschiedenen Johannisbeer-kolloidfraktionen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der identifizierten Anthocyanidine sowie des unbekanntes Restes. Die Summe der Peakflächen in den Einzelproben entspricht 100 %.

Anthocyanidinglycoside konnten nur in den Extrakten der Rohkolloide und der beiden mittelmolekularen Fraktionen der Ultrafiltration nachgewiesen werden. Die Extrakte aus der hochmolekularen Fraktion PM-500 und der niedermolekularen Fraktion PM-2 waren zwar schwach rosa gefärbt, Anthocyanidine konnten mit dieser Methode nicht gemessen werden. Im Extrakt der Rohkolloide erschien neben dem Delphinidin-3-Glucosid Peak ein weiterer Peak, der mit den vorhandenen Referenzsubstanzen nicht zugeordnet werden konnte. In den Fraktionen PM-10 und PM-50 wurden die beiden Anthocyanoglycoside Delphinidin-3-Rutinosid und Cyanidin-3-Rutinosid nachgewiesen, die mengenmäßig auch im Frischobst bzw. im Fruchtsaft überwiegen.

Unklar bleibt, weshalb in den Rohkolloiden nicht die gleichen Anthocyanidine nachgewiesen wurden, als in den fraktionierten Kolloiden. Möglich ist, dass bei der Ultrafiltration durch die Diafiltration bestimmte Anthocyanidine verloren gehen oder durch chemische Ab- und Aufbaureaktionen derart verändert wurden, dass sie durch die Analytik nicht erfasst wurden. Mit dem vorhandenen Datenmaterial kann über die Bindungspartner der Anthocyanidine in den beiden Fraktionen PM-10 und PM-50 keine zuverlässige Aussage getroffen werden, da weder die Ergebnisse der Zuckerbausteinanalytik, noch der Molekulargewichtsverteilung besondere Auffälligkeiten zeigen.

6.1.1.2 e.) Aschegehalt

Aus der Literatur ist bekannt, dass niedrigveresterte Pektine als Bindungspartner für Mineralstoffe in Frage kommen (Kern et al, 1992). Die gefriergetrockneten Kolloide aus den vier Retentaten der Ultrafiltration sowie native Johannisbeer-Rohkolloide wurden im Muffelofen verascht. Die prozentualen Aschegehalte der Kolloide sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Prozentuale Aschegehalte der über Ultrafiltration fraktionierten Kolloide aus schwarzen Johannisbeeren. Zum Vergleich ist der Aschegehalt von nativen Johannisbeer-Rohkolloiden dargestellt.

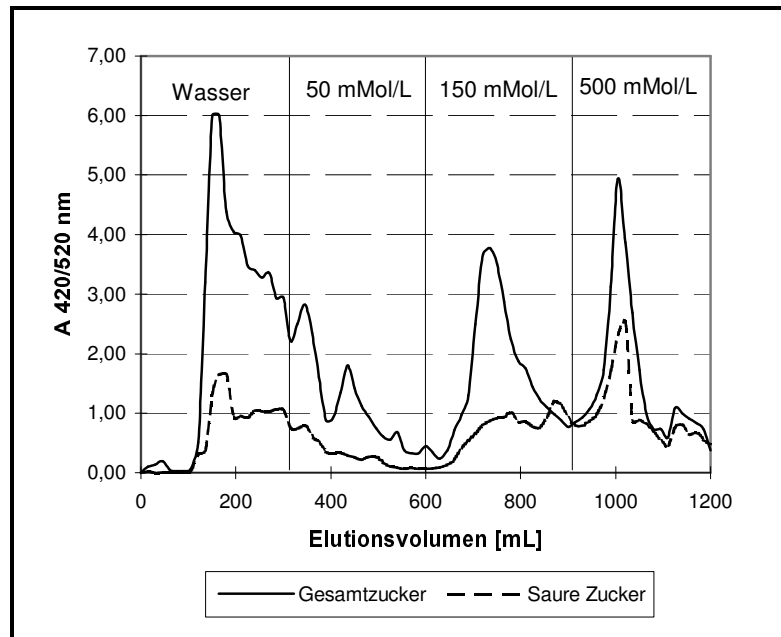
Kolloide aus	Aschegehalt [Gew%]
PM-2-Retentat	12,4
PM-10-Retentat	7,3
PM-50-Retentat	3,1
PM-500-Retentat	4,0
Nativem Pektin	16,0

In den niedermolekularen Fraktionen liegen die Aschegehalte deutlich über denen, der hochmolekularen Fraktionen. Wahrscheinlich werden durch den hohen Gehalt an Galacturonsäure in der PM-2-Fraktion viele Mineralstoffe gebunden und erklären dadurch die hohen Aschegehalte. Schmitt (1999) konnte bei ähnlichen Versuchen mit Wein zeigen, dass sich bei der Ultrafiltration mit engen Trenngrenzen (PM-2 und PM-10) im Retentat bestimmte Schwermetalle, wie z.B. Blei und Kupfer, aber auch in geringem Umfang Eisen, Zink, Calcium, Kalium und Magnesium anreichern.

6.1.2 Kolloide aus Brombeeren

6.1.2.1 Fraktionierung der Rohkolloide mittels DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der Trennung von Brombeer-Rohkolloiden (B01) an einem DEAE-Anionenaustauscher mit einem Stufengradienten.



Temp. [°C]	Probenkonz. [Gew%]	Fraktion [%]				Ausbeute [%]
		H ₂ O	50mmol/L	150mmol/L	500mmol/L	
60	0,3	55	5	4	36	80

Abb. 18: DEAE-Fraktionierung von Rohkolloiden aus Brombeeren B01 mit einem Stufengradient.

Tabellarisch dargestellt ist die prozentuale Gesamtausbeute und die anteilmäßige Ausbeute der Einzelfraktionen

Bei der Trennung von nativen Brombeerkolloiden (B01) eluiert der größte Anteil (55%) in der nicht an das Austauschermaterial bindenden Wasserfraktion. In der 50-mMol-Fraktion und in der 150-mMol-Fraktion sind nur 5% bzw. 4% der Kolloide enthalten. 36% der Polysaccharide waren in der stark sauren 500-mMol-Fraktion enthalten. Obgleich auch in der Wasserfraktion Uronsäuren nachzuweisen waren, ist der Anteil jedoch im Vergleich zu Johannisbeerkolloiden wesentlich kleiner. Größere Anteile von sauren Zuckern sind in der 150-mMol- und besonders in der 500-mMol-Fraktion zu finden.

Insgesamt 80% der eingewogenen Kolloide konnten nach der Trennung wiedergefunden werden.

6.1.2.1 a.) Molekulargewichtsverteilung

In Abbildung 19 sind die Chromatogramme der Molekulargewichtsbestimmung an Superose 6 des Brombeer-Rohkolloids (B01), sowie der vier Einzelaktionen der DEAE-Trennung dargestellt.

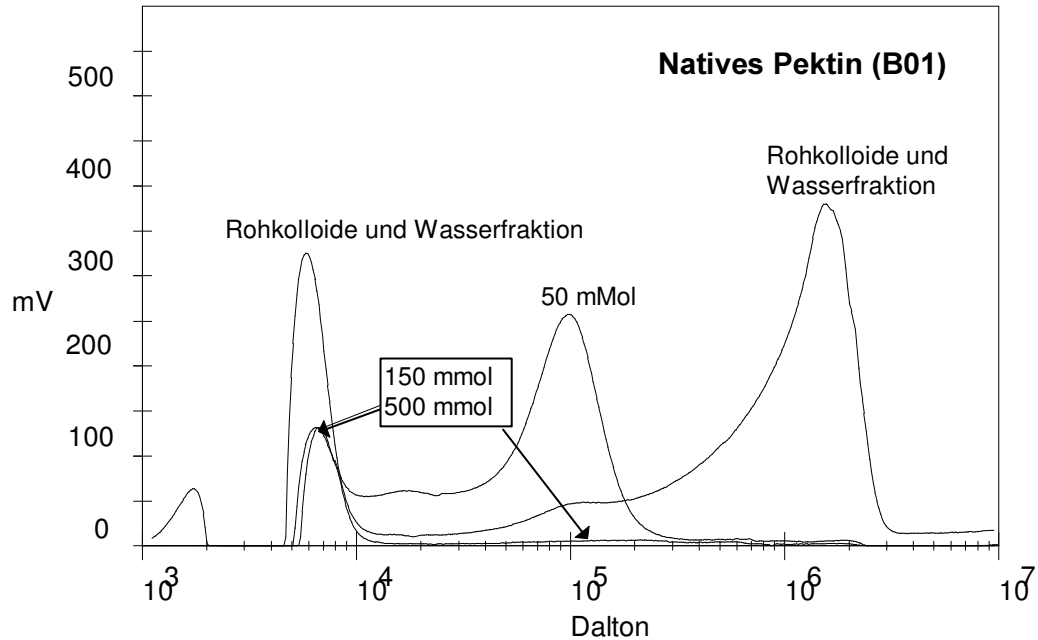


Abb. 19: Molekulargewichtsverteilung an Superose 6 (PHARMACIA) der über DEAE-Sepharose Cl-6b fraktionierten Brombeerkolloide (B01)

Bei den Brombeer-Rohkolloiden (B01) erschienen zwei deutlich abgegrenzte Peakschultern um 7.000 und im Ausschlussvolumen der Säule > 1 Mio Dalton. Ein weiteres kleineres Maximum bildete sich bei 100.000 Dalton aus. Die Peakmaxima lassen sich den einzelnen Fraktionen der DEAE-Chromatographie zuordnen. Der hochmolekulare Peak im Ausschlussvolumen der Säule > 1 Mio Dalton erscheint nur in der Wasserfraktion, der Peak bei 100.000 Dalton nur in der 50 mMol NaCl-Fraktion. In der 150 mMol- und der 500 mMol NaCl-Fraktion sind fast ausschließlich nur niedermolekulare Kolloide enthalten. Die Chromatogramme der beiden Fraktionen verlaufen annähernd deckungsgleich.

6.1.2.1 b.) Zuckerbausteinanalytik

Die Zusammensetzung der Zuckerbausteine der Brombeer-Rohkolloide (B01), sowie der dazugehörenden vier DEAE-Fractionen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: Prozentuale Zusammensetzung der Zuckerbausteine von Rohkolloiden aus Brombeeren (**B01 = natives Pektin**) und der einzelnen Fraktionen nach der Trennung an DEAE-Sepharose Cl-6b mit einem NaCl-Stufengradienten.

Fraktion	Neutralzucker [Gew-%]					Summe NZ [Gew-%]	Saure Zucker [Gew-%]		Summe NZ + SZ [Gew-%]	Protein [Gew]
	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl		GalA	GlcA		
B01 Rohkoll.	0,7	3,3	1,6	5,5	0,1	11,20	19,9	0,1	31,2	4,69
H₂O	0,8	3,1	1,9	10	0	15,80	12	0	27,8	
50 mmol/L	0,7	9,6	15,3	20,9	1,3	48,30	3,5	0,8	52,6	
150 mmol/L	1,1	7,6	6,7	0,9	0,7	17,00	4,7	0,1	21,8	
500 mmol/L	1	3,8	1,4	0	0	6,20	23,6	0,1	29,9	

Anhand der Ergebnisse sieht man, dass sich die Rohkolloide von Brombeeren und Johannisbeeren (vgl. Tab. 10) bezüglich ihrer Zuckerbausteinzusammensetzung nicht wesentlich unterscheiden. Galacturonsäure ist mit einem Anteil von 19,9 (Gew%) auch in Brombeerkolloiden mengenmäßig vorherrschend. Dies entspricht einem Anteil von 64 % an der Gesamtausbeute. Das Verhältnis Uronsäuren zu Neutralzuckern beträgt 1,8 und liegt annähernd in der gleichen Größenordnung wie bei Johannisbeeren (1,9). Im Hinblick auf die Neutralzuckerzusammensetzung ist der hohe Glucosegehalt (5,5 Gew%) im Rohkolloid auffallend.

In der 50 mMol-Fraktion ist der Glucosegehalt mit 20,9 Gew% auffallend hoch. Derart hohe Glucosegehalte könnten von einem Glucan herrühren, welches beim Befall der Beeren mit *Botrytis cinerea* vom Pilz gebildet wird, wie Patz (1994) bei Versuchen mit Himbeeren zeigen konnte. Aber auch die anderen Neutralzucker, wie z.B. Galactose (15,3 Gew%), Arabinose (9,6 Gew%) und selbst Xylose (1,3 Gew%), ergeben in der Summe eine außergewöhnlich hohe Neutralzuckerkonzentration von 48,3 Gew% in der 50 mMol-Fraktion.

In der 500 mMol-Fraktion ist die Konzentration an sauren Zuckern mit 23,6 Gew% erwartungsgemäß am höchsten. Dies entspricht einem Anteil von 79 % an der Gesamtausbeute der Fraktion.

Aufgrund der geringen Ausbeuten ist eine Interpretation der Ergebnisse sehr spekulativ, zumal das weitverbreitete Verfahren, von dem aufgeklärten Anteil der Kolloide auf die Gesamteinwaage hochzurechnen, äußerst umstritten ist.

Ausbeuteverluste haben ihre Ursache oft in unzureichenden Hydrolysebedingungen. Doch selbst bei der zuvor mit Johannisbeerkolloiden durchgeführten Hydrolyse-optimierung (vgl. Kap. 5.1.5) lag die Gesamtausbeute nur bei 52,9 %. Im Vergleich dazu betrug die

Ausbeute bei Kolloiden aus einem Weißwein über 90 % (eigene Versuche, nicht dargestellt).

Bei gefärbten Kolloiden werden anhaftende phenolische Substanzen für schlechte Ausbeuten verantwortlich gemacht. Eigene Versuche mit Brombeer- und Johannisbeerkolloiden zeigten, dass die Entfärbung der Polysaccharide mit einem Adsorberharz (AD 9204, ROHM & HAAS) lediglich zu einer Ausbeutesteigerung von 2 -3 Gew-% führte, obwohl die Kolloide nach der Behandlung mit dem Ionenaustauscher völlig farblos waren. Ob und in welcher Menge farblose Phenole an den Kolloiden anhaften, wurde nicht weiter untersucht. Es gibt auch Hinweise, dass das Verfahren zur Kolloidisolierung einen Einfluss auf die Ausbeute hat. Patz (1994) erzielte bei Himbeerkolloiden, die er durch Alkoholfällung isolierte, die niedrigsten Ausbeuten (75,8 %) bei der Zuckerbausteinanalytik; bei Kolloiden, die durch Ultrafiltration mit anschließender PVPP-Behandlung gewonnen wurden, lagen sie deutlich höher (93,8%).

6.1.3 Kolloide aus Preisel-, Holunder-, Mahonia- und Heidelbeeren

6.1.3.1 Die Zuckerbausteinzusammensetzung der Rohkolloide

In der Literatur findet man sehr wenige Hinweise über die kolloidale Zusammensetzung einheimischer Beerenobstarten. Die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Fruchtkolloide beschäftigen sich meist mit Zellwandmaterial von Äpfeln oder Citrusfrüchten. Um die Ergebnisse bei schwarzen Johannisbeeren und Brombeeren zu ergänzen, wurden die löslichen Kolloide aus Preisel-, Holunder-, Mahonia- und Heidelbeeren isoliert, zumal diese Früchte von der obstverarbeitenden Industrie immer mehr nachgefragt werden.

Die Bestimmung der Zuckerbausteine erfolgte gaschromatographisch (Neutralzucker) bzw. mit HPLC (Saure Zucker) nach vorheriger 2-stufiger Saeman-Hydrolyse.

Tab. 15: Prozentuale Gehalte an Neutralzuckern und sauren Zucker von Kolloiden aus Beerenfrüchten

Rohkolloide aus	Neutralzucker [Gew%]						Saure Zucker [Gew%]		Σ NZ [Gew%]	SZ+NZ [Gew%]
	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA	GlcA		
Holunderbeeren	2,2	3,3	3,7	3,2	1,5	0,9	31,4	0,0	14,8	46,1
Heidelbeeren	1,0	3,8	4,6	4,9	1,3	0,0	25,3	0,0	15,6	40,9
Mahoniabeeren	0,7	4,6	2,2	4,4	0,4	0,0	6,8	0,0	12,2	19,0
Preiselbeeren	1,9	1,5	2,3	0,4	0,1	0,0	36,2	0,0	6,2	42,4

Die Beerenkolloide unterscheiden sich in ihrer Zuckerbausteinzusammensetzung wenig. Der überwiegende Anteil der Kolloide besteht aus Galacturonsäure und deuten, in Verbindung mit Rhamnose, auf ein rhamnogalacturonanreiches Pektinhauptgerüst hin. Die Kolloide aus Mahoniabeeren enthalten dagegen nur 6,8 % Galacturonsäure. Neben einem, von Natur aus geringen Galacturonsäuregehalt, könnte eine unvollständige Hydrolyse eine Erklärung für diese niedrigen Werte sein, zumal die Kolloide nach der Gefriertrocknung intensiv rot gefärbt waren. Glucuronsäure kommt in den Kolloiden nur in Spuren vor.

Mit 12 - 15 Gew% ist der Neutralzuckergehalt in Mahonia-, Heidelbeer- und Holunderbeerkolloiden doppelt so hoch wie in Preiselbeeren (ca. 6 Gew%). Außer bei Mahoniabeeren ist Galactose bei den Beerenkolloiden der vorherrschende Neutralzuckerbaustein. Zusammen mit Arabinose ist Galactose ein Bestandteil von hochverzweigten Arabinogalactanen (Typ II), die typisch für Beerenobstkolloide sind. In allen Beerenkolloiden ist Xylose als Minorkomponente enthalten. Als Hauptbestandteil der Hemicellulosen sind Xyloglucane in der primären pflanzlichen Zellwand über Wasserstoffbrücken an Cellulose gebunden. Mannose konnte nur in Holunderkolloiden nachgewiesen werden.

6.1.3.2 Anthocyanidin-Fingerprints von Pürees und Kolloiden

Die Beerenobstkolloide waren mit Ausnahme der Preiselbeerkolloide, trotz mehrerer Reinigungsschritte, intensiv rot gefärbt. Die Vermutung lag nahe, dass die Färbung durch anhaftende Anthocyane verursacht wurde. Die Kolloide wurden mit saurem Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden über HPLC an einer RP-18-Säule getrennt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.

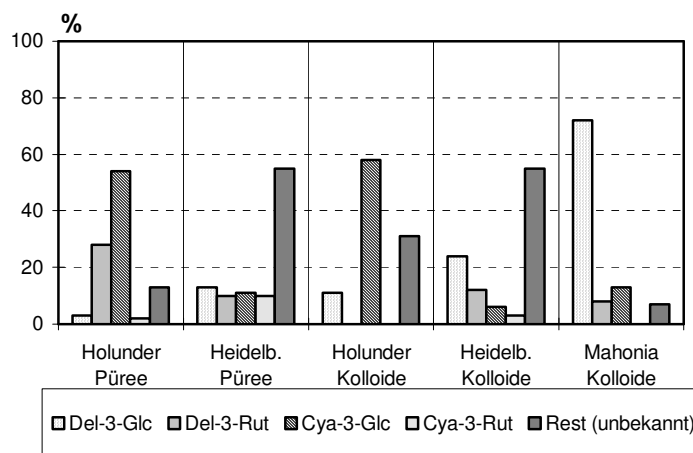


Abb. 20: Anthocyanmuster in den Pürees von Holunder- und Heidelbeeren, sowie in den Kolloiden aus Holunder-, Mahonia- und Heidelbeeren. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der identifizierten Anthocyanidine sowie des unbekanntes Restes. Die Summe der Peakflächen in den Einzelproben entspricht 100 %.

Im Holunder- und Heidelbeerpüree wurden die beiden Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidin nachgewiesen, die beide als 3-Glucoside und 3-Rutinoside vorkamen und auch für schwarze Johannisbeeren typisch sind. Zusätzlich erschienen im HPLC-Chromatogramm eine Reihe weiterer Peaks, die bei Heidelbeeren einen Anteil von 55 % und bei Holunder von 13 % an der Gesamtpeakfläche haben. Diese Peaks konnten nicht identifiziert werden, da die entsprechenden Referenzsubstanzen fehlten.

Das Cyanidin-3-Glucosid ist sowohl beim Holunderpüree (54 % Peakflächenanteil), als auch bei den Holunderkolloiden (58 % Peakflächenanteil), das vorherrschende Anthocyanidin. Die beiden 3-Rutinoside konnten mit dieser Methode in den Kolloiden nicht mehr nachwiesen werden.

Bei Heidelbeeren waren die relativen Anteile der vier identifizierten Peaks mit 10 - 13 % annähernd gleich groß. In den Kolloiden sinkt der Anteil des Cyanidin-3-Rutinosids auf 3 %, das Delphinidin-3-Glucosid steigt auf 24 %, der Anteil unbekannter Substanzen ist in den Kolloiden mit 55 % unverändert hoch.

Das Anthocyanmuster der Mahoniakolloide weicht stark von dem der schwarzen Johannisbeeren ab. In den Kolloiden sind vor allem die 3-Glucoside enthalten (zusammen 86 %). Der Rest setzt sich aus 8 % Delphinidin-3-Rutinosiden und einem Anteil (7 %) unbekannter Substanzen zusammen.

6.2 Der enzymatische Abbau von Polysacchariden

Viele Enzymhersteller bieten spezielle Beerenobstenzyme an, die auf die Zusammensetzung der Beereninhaltsstoffe und die spezielle Verarbeitungstechnologie abgestimmt sind. Die Versuche sollten die Zusammensetzung der einzelnen Enzymaktivitäten in den Handelsenzymen darstellen. In einer weiteren Versuchsserie wurde bei ausgewählten Enzympräparaten die Freisetzungskinetik von monomeren Zuckern aus Kolloiden von schwarzen Johannisbeeren aufgezeigt.

6.2.1 Die Bestimmung der Nebenaktivitäten von ausgewählten Enzympräparaten

Für die Bestimmung der Nebenaktivitäten wurden alle Substrate in der gleichen Konzentration und bei gleicher Temperatur angestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen, wurden alle acht Enzympräparate entsalzt, gefriergetrocknet und in der gleichen Konzentration eingesetzt.

In Tabelle 16 sind die spezifischen Enzymaktivitäten von acht Enzympräparaten in verschiedenen Substraten dargestellt.

Tab. 16: Vergleich bestimmter Nebenaktivitäten in verschiedenen Enzympräparaten. Die Bestimmung der freigesetzten reduzierenden Endgruppen erfolgte nach der Nelson-Somogyi-Methode (vgl. Kap. 5.3.2). Die spezifische Enzymaktivität wird in U/mg (1 unit = $\mu\text{mol Glc/ min}$) angegeben.

Substrat	Spezifische Enzymaktivität [U/mg]							
	Panzym Plus	Panzym BE	Novozym 52	Rohapect MB	Cytolase PLC3	Rapidase Be	Rapidase EX Color	Gammapect LC
SJ01	0,27	0,56	0,12	0,83	0,17	0,67	0,45	0,53
SJ02	0,56	0,65	0,0	1,09	0,2	1,15	0,72	0,62
B01	0,23	0,59	0,59	1,29	0,59	1,08	0,74	1,18
Rösch(50)Arabinogal..Apfel	0,17	0,04	0,84	1,12	0,09	0,17	0,29	0,32
Rösch(500)Rhamnog.Apfel	0,1	0,15	0,19	0,23	0,11	0,0	0,36	0,07
Pektinsäure	1,51	5,57	1,35	7,46	1,01	7,39	3,97	7,29
Apfelpektin VE 35%	0,31	1,71	0,86	5,67	0,92	4,60	1,91	4,80
Apfelpektin VE 70 %	0,15	1,35	0,34	2,67	1,48	0,68	0,83	2,24
Dextran	0,04	0,15	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Araban / A-Saft-Konz.	0,0	0,29	0,47	0,20	0,16	0,25	0,30	0,43
Xylan / Haferspelzen	0,39	0,88	0,93	1,53	1,56	0,0	0,49	1,67
Xylan / Lärchenholz	0,07	0,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Laminarin	0,04	0,55	0,17	0,02	0,14	0,1	0,0	0,22
Galactan/Lupinensamen	0,03	0,26	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Arabinogalactan(Lärche)	0,12	0,09	0,0	0,68	0,22	0,18	0,34	0,05
Zuckerrübenaraban	0,05	0,18	0,69	0,0	0,46	0,3	0,25	0,7
Hefemannan	0,08	0,03	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
CMC Walocel CRT 100	0,22	0,34	0,09	0,09	0,25	0,1	0,32	0,17
Pustulan	0,0	0,04	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Meyprogat 120	0,3	0,6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Stärke	24,9	15,1	0,26	3,45	2,10	0,21	0,95	2,8
Botrytisglucan	0,0	0,0	0,0	0,0	0,03	0,01	0,18	0,07
Hide Powder Azure	0,0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = nicht analysiert

Mit Ausnahme von „Rapidase EX Color“ handelt es sich bei den Enzympräparaten um Produkte, die von den Herstellern zur Verarbeitung von Beerenmaischn empfohlen werden. „Rapidase EX Color“ wird für die Behandlung von Rotweinen eingesetzt und soll sowohl die Farbausbeute bei der Traubenverarbeitung erhöhen, als auch den Erhalt von Farbstoffen während der Weinbereitung sichern. Da die Farberhaltung auch bei der Verarbeitung von schwarzen Johannisbeeren eine wichtige Rolle spielt, wurde das Präparat mit in die Testreihe aufgenommen.

Um eine gewisse Transparenz zu gewährleisten und die Ergebnisse mit anderen Untersuchungen vergleichbar zu machen, wurden die Versuchsbedingungen aus der

Literatur (Schöppl, 1989) übernommen. Dies kann dazu führen, dass für die Enzyme keine optimalen Substratbedingungen bzgl. pH-Wert und Temperatur vorliegen. Die Übertragung der Versuchsergebnisse auf das Substrat „Fruchtmais und -saft“ ist nur eingeschränkt zulässig, da bei den Versuchen isolierte Proteine in einer Modelllösung eingesetzt werden, und daher andere Bedingungen als in der Praxis vorliegen.

Die getesteten Präparate unterscheiden sich sowohl hinsichtlich der qualitativen als auch der quantitativen Zusammensetzung ihrer Nebenaktivitäten. 6 Produkte hatten bei niedrigveresterter „Pektinsäure“ die höchsten Aktivitätswerte. Dies dürfte hauptsächlich auf die hydrolytische Spaltung der α -(1→4)-glycosidischen Bindung der Pektinsäure durch Endo- und/oder Exo-Polygalacturonasen zurückzuführen sein. Endo-Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) spaltet nur glycosidische Bindungen, die neben freien Carboxylgruppen liegen. In der Maische führt dies zu einem raschen Viskositätsabfall und zu einer Verbesserung der Pressbarkeit. Theoretisch wäre auch der Abbau der Pektinsäure durch Endo- und Exo-Pektatlyasen denkbar. Da das pH-Optimum der Enzyme bei 8,0 - 9,5 liegt, muss man unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen (pH-5,0) von einer geringen Wirkung ausgehen, zumal im Substrat eine niedrige Calciumkonzentration vorliegt.

Mit Ausnahme von Cytolase PLC3 sinken die Aktivitätswerte der Enzympräparate mit zunehmendem Veresterungsgrad der Polygalacturonsäure (VE 35% und VE 70%). Dies hängt damit zusammen, dass Endo-Polygalacturonasen die glycosidische Bindung nur neben freien Carboxylgruppen spalten und ihre Wirkung daher bei hohen Veresterungsgraden stark eingeschränkt ist. Eine Bewertung der Pektinesteraseaktivität in den Präparaten ist mit dieser Methode nicht möglich, da nur reduzierende Endgruppen nachgewiesen werden können.

Anhand der Ergebnisse kann man auch ableiten, dass in den Enzympräparaten eine Reihe von weiteren Nebenaktivitäten enthalten sind. Hierbei sind besonders Amylasen (Stärke), Xylanasen (Haferxylan), Mannosidase (Galactomannan), Arabanasen (Apfelaraban) und vereinzelt auch β -Glucanasen (Laminarin, Botrytis-Glucan) zu erwähnen, wobei die Unterschiede bzgl. dieser Aktivitäten in den einzelnen Enzympräparaten auf eine sehr firmenspezifische Zusammensetzung hindeuten. Am Beispiel der Amylase-Aktivität wird deutlich, wie unterschiedlich die Präparate ausgerichtet werden. Zwischen dem niedrigdosierten Präparat „Rapidase Be“ und dem hochdosierten Präparat „Rohapect MB“ unterscheidet sich die Enzymaktivität beim Substrat „Stärke“ um den Faktor 16.

Die isolierten Kolloidfraktionen (SJ01, SJ02, B01) wurden von den Enzympräparaten am besten umgesetzt, die auch gegenüber pektinhaltigen Polysacchariden eine gute Wirkung zeigten. Rohapect MB und Rapidase Be zeigen bei nativen Rohkolloiden (SJ01) die beste Wirkung, während Novozym 52 und Cytolase PIC3 für dieses Substrat weniger geeignet sind. Offensichtlich ist die Konzentration von pektolytischen Enzymaktivitäten bei diesen Präparaten nicht ausreichend, um die Polysaccharide entsprechend rasch abzubauen. Bei enzymatisch behandelten Kolloiden (SJ02) ist eine Aktivitätssteigerung bei allen Präparaten, außer Novozym 52 zu sehen. Da dieses Enzym bereits zur Behandlung der

Maische und des Saftes eingesetzt wurde, ist es wahrscheinlich, dass das Aktivitätsspektrum bereits vollständig verbraucht ist und bei den Kolloiden keine weitere Reaktion hervorruft. Auch bei den enzymierten Kolloiden zeigen Rohapect MB und Rapidase Be die beste Wirkung. Bei den Brombeerkolloiden ist neben Rohapect MB und Rapidase Be auch noch Gammapect LC ausreichend aktiv.

Die Ursache für die höhere Aktivität bei enzymatisch verändertem Pektin (SJ02) gegenüber nativem Pektin (SJ01) lag wahrscheinlich in dem geringeren Veresterungsgrad dieser Kolloide, die einen schnelleren und weitreichenderen Abbau der Pektinkette durch eine Polygalacturonase zuließen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass hochdosierte, pektinasebetonte Enzympräparate wie z.B. Rohapect MB oder Rapidase Be, bei Johannisbeerkolloiden die höchste Aktivität aufweisen. Daraus kann aber nicht automatisch abgeleitet werden, dass sich diese beiden Präparate auch in der Praxis bestens bewähren, denn neben der Freisetzung monomerer Zucker sind z.B. Art und Umfang der Freisetzung von hochmolekularen Spaltprodukten aus dem Pektinmolekül („Modified Hairy Regions“) oder Endo-Pektinaseaktivitäten zur Viskositätssenkung von technologischer Bedeutung.

6.2.2 Molekulargewichtsverteilung beim enzymatischen Abbau von nativen Johannisbeerkolloiden mit einem technischen Enzympräparat

Um eine gute Pressfähigkeit der Maische zu gewährleisten und Klärschwierigkeiten vorzubeugen, ist der effiziente Abbau von hochmolekularem Pektin eine der wichtigsten Aufgaben, die ein Beerenenzym erfüllen muss. Im Folgenden wird, ausgehend von nicht enzymierten Johannisbeerkolloiden, die enzymatische Spaltung von Polymeren mit Hilfe eines Handelsenzym (Panzym BE) veranschaulicht.

Die Abbildungen 21a-c zeigen die Molekulargewichtsverteilungen der Rohkolloide (SJ01), sowie der Restpektine nach 1 bzw. 2 h Enzymierungszeit.

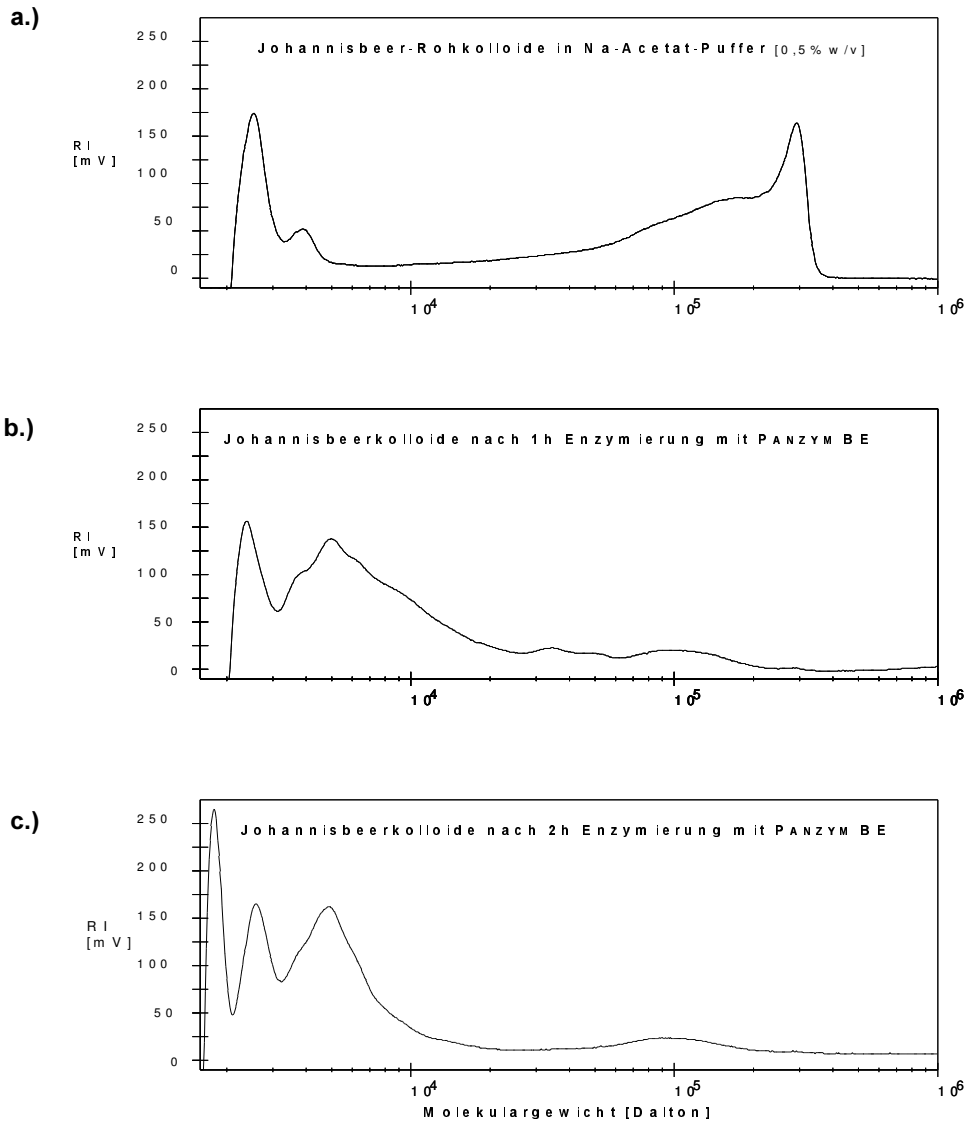


Abb. 21 a-c: Molekulargewichtsverteilung von Johannisbeerkolloiden an Superose 12

Bei den nicht enzymierten Rohkolloiden (Abb. 20a) eluieren, neben zwei niedermolekularen Peaks (2.500 und 4.000 Dalton), die meisten Kolloide im hochmolekularen Bereich von 50.000 Dalton und dem Ausschlussvolumen des Gelmaterials > 280.000 Dalton. Bei Untersuchungen mit einem alternativen Gelmaterial (PHARMACIA Superose 6) wurden Molekulargewichtsmaxima von über 1 Mio. Dalton festgestellt (vgl. Abb. 14). Abbildung 21b zeigt, dass bereits nach einer Stunde Enzymierung der hochmolekulare Peak, der im Ausschlussvolumen des Gelmaterials erscheint, fast vollständig abgebaut ist. Das PektinGrundgerüst wurde so weit zerstört, dass nur noch „Restpektine“ mit Peakmaxima im Bereich von 30.000 Dalton, 50.000 Dalton, 100.000 Dalton und 200.000 Dalton übrig bleiben. Typische Bestandteile solcher Restpektine sind hochverzweigte

Arabinogalactane vom Typ II, deren Molekulargewicht bei Äpfel, nach der Literatur (Will et al, 1992b), bei ca. 50.000 Dalton liegt, sowie Rhamnogalacturonane mit Molekulargewichten zwischen 80.000 und 1 Mio. Dalton.

Der bei den Rohkolloiden deutlich abgegrenzte Peak um 4.000 Dalton wird nach 1h Enzymierung von einer breiten Peakschulter mit einem Maximum bei 6.000 Dalton überlagert. Der niedermolekulare Peak mit einem Maximum bei 2.500 Dalton bleibt nahezu unverändert. Saftkolloide mit einem Molekulargewicht unter 10.000 Dalton verursachen im allgemeinen keine Klär- und Filtrationsschwierigkeiten und sind deshalb in dieser Hinsicht als wenig problematisch einzustufen.

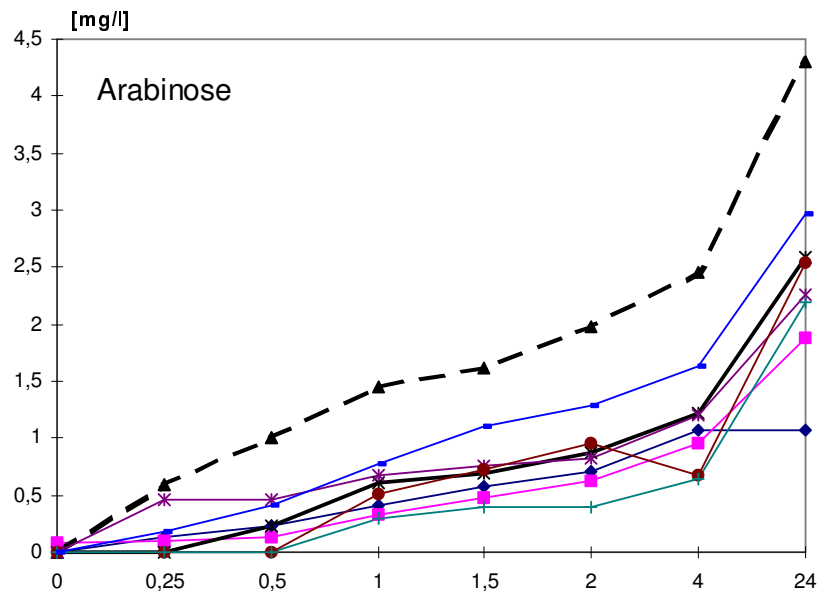
Ein Vergleich von Abb. 21c mit Abb. 21b zeigt, dass der hochmolekulare Peak mit einem Maximum von 100.000 Dalton auch nach 2 h Enzymierung nahezu unverändert bleibt. Zwar verschwinden die kleinen Peakschulter bei 300.000 Dalton und bei 20.000 bzw. 40.000 Dalton, dem Enzym fehlen aber offensichtlich entsprechende Aktivitäten, um diese Restpektine weiter abzubauen. Ergänzende Versuche haben gezeigt, dass dieser Peak auch nach 4h nicht vollständig verschwindet, so dass eine zu kurze Enzymierungszeit ausschließen ist. Neben Panzym BE war keines der 8 getesteten Enzympräparate (vgl. Kap. 5.3.1) in der Lage, diesen Peak vollständig abzubauen (Ergebnisse nicht dargestellt).

6.2.3 Die Freisetzung monomerer Zucker beim enzymatischen Abbau von Johannisbeerkolloiden

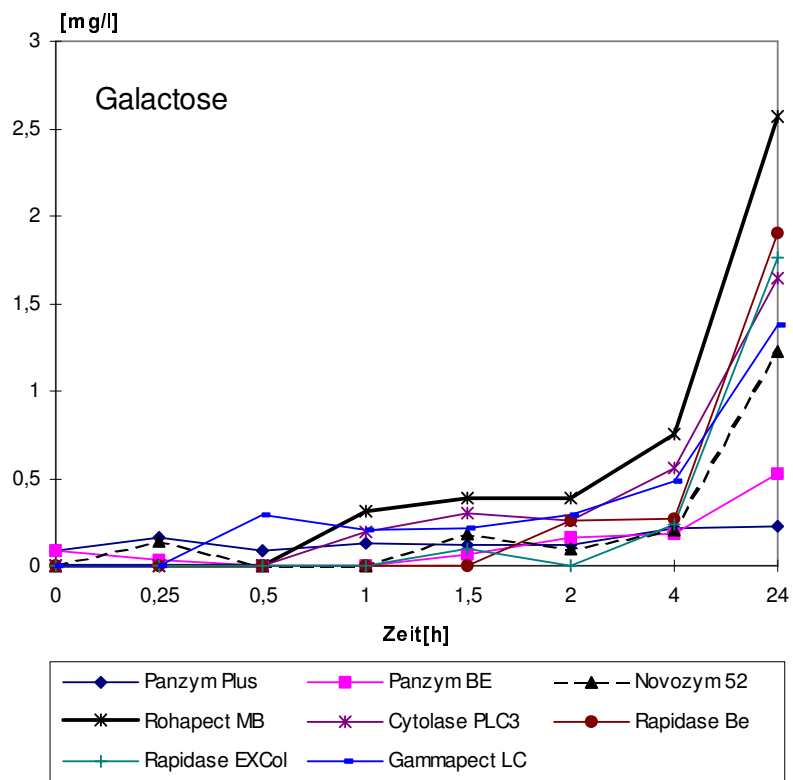
Durch die Freisetzung monomerer Zucker aus nativen Johannisbeerkolloiden sollte auf die Zusammensetzung der 8 Enzympräparate im Hinblick auf Ihre Exo-Aktivitäten geschlossen werden.

In den Abbildungen 22 a-d ist die Freisetzung von monomerer Arabinose, Galactose, Xylose und Galacturonsäure aus Johannisbeerkolloiden (SJ01) in einem Zeitraum von 24 h dargestellt.

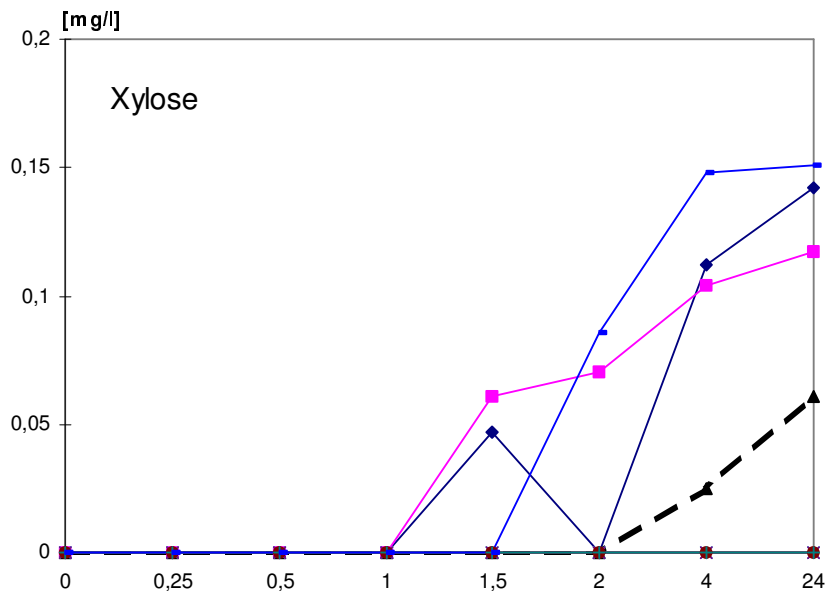
a.)



b.)



c.)



d.)

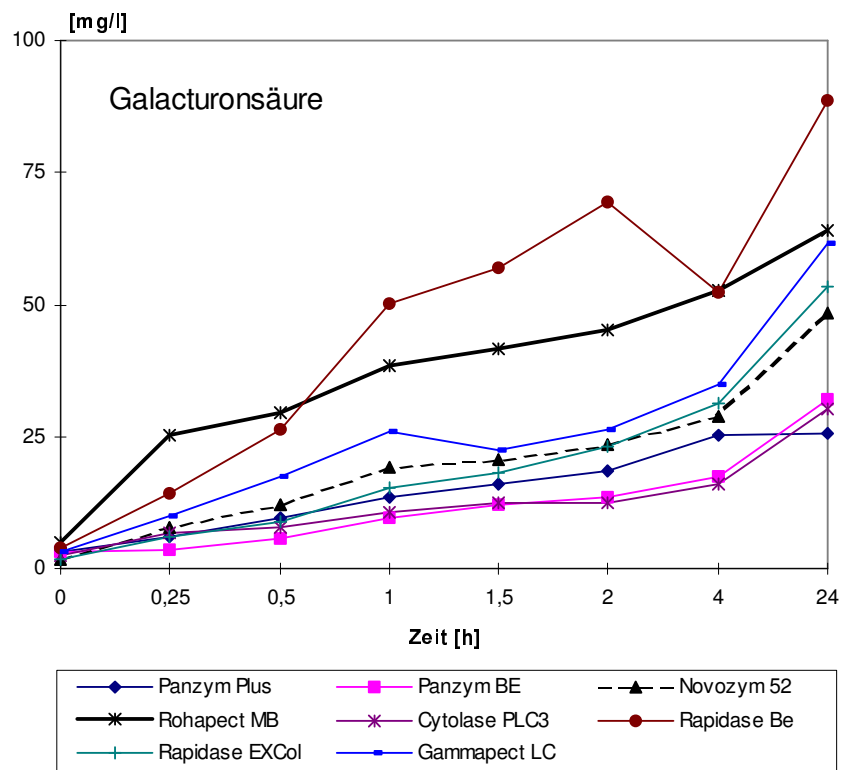


Abb.22 a-d: Enzymatischer Abbau von nativen Johannisbeerkolloiden SJ01. Dargestellt ist die Freisetzungskinetik von monomerer Arabinose, Galactose, Xylose und Galacturonsäure nach Inkubation mit 8 verschiedenen Enzympräparaten in einem Zeitraum von 24 h.

Der direkte Vergleich zeigt, dass die acht Enzympräparate monomere Zucker in unterschiedlichem Umfang aus den Johannisbeerkolloiden freisetzen. Generell ist die freigesetzte Menge bei Galacturonsäure am höchsten und bei Xylose am niedrigsten. Die Freisetzung von monomerer Rhamnose konnte bei keinem Enzym nachgewiesen werden. Auf eine gesonderte Darstellung wurde daher verzichtet. Vermutlich wurden die rhamnosehaltigen Abschnitte der Pektinkette durch (Endo-) Enzyme in Oligosaccharide gespalten, ohne dass entsprechende Exo-Enzymaktivitäten zur Freisetzung monomerer Rhamnose vorlagen.

Die eingesetzten Enzymmengen von 10 mg gefriergetrocknetem Enzymprotein pro Liter Kolloidlösung oder anders ausgedrückt, 1 mg Enzymprotein pro g Kolloideinwaage, entsprechen, einer in der Praxis durchaus üblichen Dosage von ca. 500 mg Enzympräparat pro kg Maische oder Saft.

Unter diesen Bedingungen setzen Rapidase Be und Rohapect MB bereits nach einer Stunde 50 mg/ L bzw. 38 mg/ L Galacturonsäure frei. Entsprechende Galacturonsäuremengen wurden bei Novozym 52 (48,4 mg/ L), Rapidase EXColor (53,5 mg/ L) und Gammapect LC (61,5 mg/ L) erst nach 24 h Kontaktzeit freigesetzt. Bei den drei verbleibenden Präparaten konnte auch nach 24 h nur eine Galacturonsäurefreisetzung von ca. 30 mg/L erreicht werden. Rapidase Be hingegen setzt innerhalb von 24 h 89 mg/ L Galacturonsäure frei.

Folgt man der Annahme, dass der Kolloidgehalt in unbehandelten Johannisbeermuttersäften (nicht enzymiert und geschönt) in einer Größenordnung von ca. 5 g/ L liegt und der Galacturonsäureanteil ca. 35 Gew% beträgt, dann baut selbst Rapidase Be in 2 h nur etwa 4 % und in 24 h nur 5 % des Gesamtpektins zu monomerer Galacturonsäure ab. Bei Rohapect MB sind es 2,5 bzw. 3,6 %. Die Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen im Hinblick auf die Substratspezifität der Enzympräparate. Auch hier wurden bei Rapidase Be und Rohapect MB im Bezug auf pektinhaltige Substrate und nativen Johannisbeerkolloiden (SJ01) die höchsten Exo-Aktivitäten aller eingesetzten Enzyme gemessen.

Der niedrige 4-Stunden-Wert bei Rapidase Be ist vermutlich auf einen Messfehler bei der HPLC-Untersuchung zurückzuführen, eigentlich müsste der Wert über dem 2-h-Messwert liegen.

Auch im Bezug auf den Abbau von Neutralpolysacchariden, die als Bestandteil der Seitenketten im Pektinmolekül nach dem enzymatischen Abbau in Form von sog. Restpektinen im Saft verbleiben, gab es zwischen den Präparaten erhebliche Unterschiede. Von allen Präparaten wurden neben geringen Mengen an Xylose, hauptsächlich Arabinose und Galactose freigesetzt. Während Novozym 52 (4,3 mg/ L) und Gammapect LC (3 mg/ L) die höchsten Arabinosemengen freisetzen, wurden bei Galactose die höchsten Werte von Rohapect MB (2,6 mg/ L) bzw. Rapidase Be (1,9 mg/L) erreicht.

Bezugnehmend auf den o.g. Kolloidgehalt von 5 g/ L und einem prozentualen Arabinoseanteil von 7 Gew% ergibt sich, dass selbst Novozym 52 nur etwas mehr als 1 % des Arabinosegehaltes als Monomer freigesetzt hat. In der gleichen Größenordnung lagen die von Rohapect MB freigesetzten Galactosegehalte (1 Gew%).

Im Hinblick auf Xylose lagen die nach 24 h freigesetzten Mengen um eine Zehnerpotenz unter der von Arabinose und Galactose. Monomere Glucose konnte unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Versuche, die von Will et al (1992b) bei nativem Pektin aus Apfelextraktionsaft durchgeführt wurden, führten zu ähnlichen Ergebnissen wie bei Johannisbeerkolloiden. Auch hier wurden vor allem Arabinose und Galactose freigesetzt, wobei die Abbaureaktion bei Apfelpektin deutlich schneller verläuft als bei Johannisbeerkolloiden. Die Begründung könnte zum einen in der höheren Enzymdosage liegen, zum anderen wäre eine Art Schutzwirkung durch hochveresterte saure Polysaccharide denkbar. Auch bei diesen Versuchen konnte keine monomere Rhamnose nachgewiesen werden. Sofern monomere Xylose freigesetzt wird, stammt diese nach Meinung der Autoren aus dem Xyloglucan-Anteil der Primärwand. Bei Johannisbeerkolloiden konnte Xylose nur von vier Enzympäparaten freigesetzt werden. Die Mengen waren darüber hinaus äußerst gering (100 µg/L).

6.3 Die Veränderung der Inhaltsstoffe während der Reife von schwarzen Johannisbeeren

Die Veränderung der äußeren Merkmale im Verlauf der Fruchtreife wird durch eine Vielzahl, von z. T. unkontrolliert ablaufenden biochemischen Reaktionen hervorgerufen. Durch eine fraktionierte Ernte von schwarzen Johannisbeeren zu unterschiedlichen Reifestadien sollte die Veränderung von analytischen Leitsubstanzen (Gesamtsäure und Trockensubstanzgehalt) bestimmt werden. Um die Veränderung der kolloidalen Zusammensetzung während der Reife zu untersuchen, wurden die Polysaccharide aus einigen Fraktionen isoliert und auf ihre Zuckerbausteinzusammensetzung hin untersucht.

6.3.1. Die Entwicklung des 100 Beerengewichts, der Gesamtsäure und des Trockensubstanzgehaltes

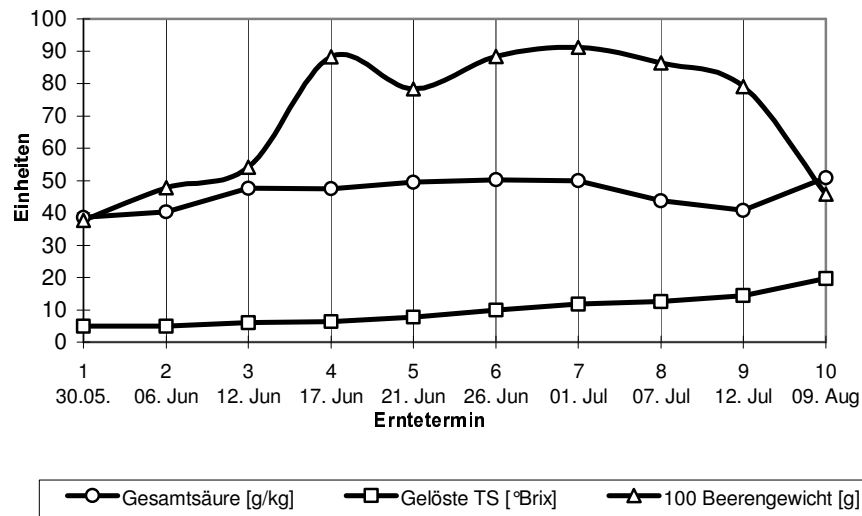


Abb. 23: Entwicklung der Gesamtsäure, der gelösten Trockensubstanz (TS) und des 100 Beerengewichts (Kurve geglättet) im Verlauf der Reife von schwarzen Johannisbeeren.

Wie die Abbildung 23 zeigt, entwickeln sich die drei Parameter im Beobachtungszeitraum sehr unterschiedlich, teilweise sogar gegenläufig. Während die gelöste Trockensubstanz fast linear steigt, erreichen die beiden anderen Größen zu verschiedenen Zeiten Maximalwerte. Die Beeren enthalten schon zu Beginn der Reife hohe Gesamtsäurewerte, die am 26. Juni mit 50,2 g/L ein erstes Maximum erreichen. Durch den biochemischen Säureabbau wird ein Teil der Gesamtsäure bis zum Ende der Reife verbraucht. Ab dem 12. Juli trocknen die Beeren soweit ein, (siehe Rückgang 100 Beerengewicht) dass es zu einer Konzentrierung der löslichen Inhaltsstoffe und damit letztendlich zum Anstieg sowohl der Gesamtsäure (50,9 g/L) als auch des Trockensubstanzgehalts (19,7 °Brix) kommt. Das Beerenwachstum wird durch die Kurve des 100 Beerengewichts beschrieben. Ähnlich wie in der Literatur (Keppel et al, 1991) bei Johannisbeeren beschrieben, durchläuft sie eine Doppel-S-Form.

Der richtige Erntezeitpunkt läge bei den hier vorliegenden Messwerten zwischen dem 26.06. und dem 01.07., da hier sowohl das Beerengewicht als auch die Gesamtsäure ein Maximum erreicht hat. Wird der Erntezeitpunkt zu lange hinausgeschoben, kommt es zu deutlichen mengenmäßigen als auch qualitativen Ertragsverlusten.

6.3.2 Die Entwicklung der Farbe während der Beerenreife

Anhand von vier typischen Anthocyanidinglycosiden wurde die Farbentwicklung der Johannisbeeren untersucht. Hierzu wurden die Beerenpürees mit saurem Methanol extrahiert und anschließend mit HPLC analysiert.

Tab.17: Gehalte von vier Anthocyanidinglycosiden in Pürees aus schwarzen Johannisbeeren zu verschiedenen Stadien der Beerenreife. Die Zahlen in Klammer geben den relativen Prozentanteil an der Gesamtsumme an.

	mg/kg				Summe
	Del-3-Glc	Del-3-Rut	Cya-3-Glc	Cya-3-Rut	
Püree-1	0	0	0	0	0
Püree-3	10 (20)	20 (40)	0	20 (40)	50 (100)
Püree-5	90 (12)	320 (41)	50 (6)	320 (41)	780 (100)
Püree-7	400 (15)	1170 (45)	150 (6)	880 (34)	2600 (100)
Püree-9	410 (15)	1190 (45)	150 (6)	920 (34)	2670 (100)
Püree-10	640 (16)	1900 (47)	220 (6)	1220 (31)	3980 (100)

Zu Beginn der Reife konnten in den Beeren (Pürees) keine Anthocyane nachgewiesen werden. Erst als sich die Beeren sichtbar dunkel färbten (Püree 5) konnten Anthocyane nachgewiesen werden. Die quantitative Rangfolge Del-3-Rut > Cya-3-Rut > Del-3-Glc > Cya-3-Glc blieb durch alle Entwicklungsstadien der Beeren bestehen.

Die relativen Anteile der Anthocyanidinglycoside verschoben sich ebenfalls nur unwesentlich. Während die beiden Delphinidin-Glycoside zunahmen, ging der Anteil des Cyanidin-3-Rutinosids zurück. Unverändert blieb der prozentuale Anteil des Cyanidin-3-Glycosides.

Zum Zeitpunkt der Ernte (Püree 7) lag der Gesamtanthocyanidgehalt bei 2.600 mg/kg. Der deutliche Anstieg des Anthocyanengehaltes in der letzten Püreecharge wurde vor allem durch den Wasserverlust der Beeren am Ende der Vegetation verursacht.

6.3.3 Die Veränderung der kolloidalen Zusammensetzung im Verlauf der Reife von schwarzen Johannisbeeren

Durch fruchteigene Enzyme kommt es während der Reife von Früchten zu einer Umwandlung von wasserunlöslichem Pektin zu wasserlöslichem Pektin. Die folgenden Versuche sollten zeigen, inwieweit dieser Vorgang bei schwarzen Johannisbeeren stattfindet.

Abb. 24 zeigt den Verlauf des Gesamtkolloidgehaltes, der wasserlöslichen Kolloide sowie des wasserunlöslichen Kolloidanteils im Püree von schwarzen Johannisbeeren während der Reife.

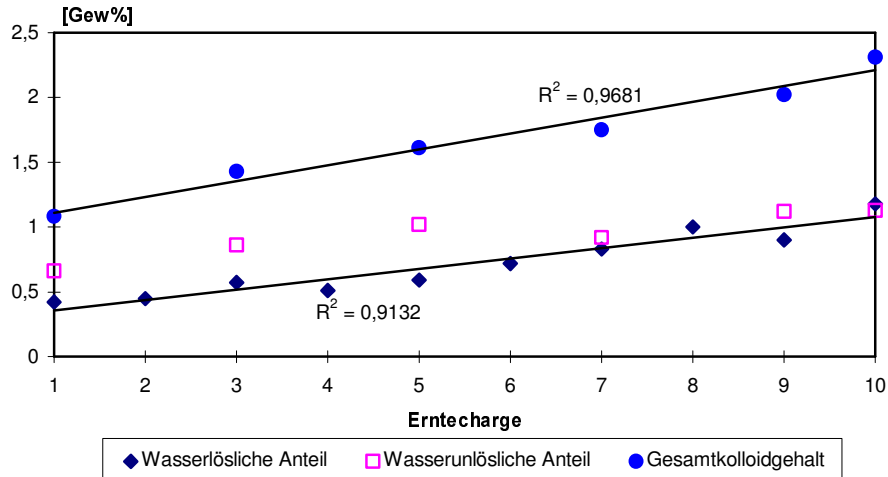


Abb. 24: Veränderung von Johannisbeerkolloiden im Verlauf der Reifeentwicklung. Dargestellt ist der Gesamtkolloidgehalt sowie der Gehalt an wasserlöslichen Kolloiden und an wasserunlöslichen Kolloidanteilen von Johannisbeerpüree. Bei der wasserlöslichen Fraktion und der Gesamtausbeute wird zusätzlich das Bestimmtheitsmaß einer linearen Trendgleichung angegeben.

Die Abbildung 24 zeigt, dass der prozentuale Gesamtkolloidgehalt vom Beginn des Betrachtungszeitraumes bis zum Ende von 1,08 Gew% auf 2,31 Gew% nahezu linear ansteigt. Zieht man zu dieser Betrachtung noch die Entwicklung des Beerengewichtes hinzu (vgl. Abb. 23), kann man davon ausgehen, dass die Neusynthese von Polysacchariden bis Anfang Juli (Charge 7) anhält. Danach steigt zwar der prozentuale Kolloidgehalt weiter an, gleichzeitig verlieren die Beeren aber überproportional an Gewicht, so dass der prozentuale Zuwachs durch Konzentrierung der Beereninhaltsstoffe und nicht durch Neusynthese verursacht wird.

Gleichzeitig mit der Neusynthese von Polysacchariden setzt ab Mitte Juni (Charge 5) ein Rückgang des Anteils von wasserunlöslichen Kolloiden ein. Der Anteil am Gesamtkolloidgehalt sinkt von 1,02 Gew% in Charge 5 auf 0,92 Gew% in Charge 7. Da sich in diesem Zeitraum das Beerenwachstum verlangsamt, der wasserlösliche Anteil und der relative Gesamtkolloidgehalt aber ansteigt, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der wasserunlöslichen Kolloide hydrolysieren und wasserlöslich werden.

Während am Reifebeginn der wasserunlösliche Anteil (0,66 Gew%) am Gesamtkolloidgehalt noch deutlich über dem der wasserlöslichen Kolloide (0,42 Gew%) liegt, gleichen sich die Gehalte am Ende fast an (1,13 Gew% bzw. 1,18 Gew%), liegen aber insgesamt deutlich höher als am Beginn.

6.3.4 Zuckerbausteinanalytik der aus den Pürees isolierten Kolloide

Mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der wasserlöslichen Kolloide und der wasserunlöslichen Anteile der Kolloide sollte durch die Zuckerbausteinanalytik aufgeklärt

werden. Hierzu wurden die Proben über HPLC nach vorheriger 2-stufiger Saeman-Hydrolyse analysiert (vgl. 5.1.7).

Die wasserlöslichen Kolloide erhielten die Bezeichnung „WK XX“, die wasserunlöslichen Kolloide wurden als „WUK XX“ bezeichnet (XX steht für die Erntechargen-Nr. 1 - 10).

Die Ergebnisse sind in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: Prozentuale Zuckerbausteinzusammensetzung der wasserlöslichen Kolloide (WK) sowie der wasserunlöslichen Kolloidanteile (WUK) in den zehn Erntefractionen und deren Proteingehalt (Elementaranalyse).

Probe	Neutralzucker [Gew%]						Summe NZ	GalA	Protein
	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Gew%		Gew%
WK-1	0,4	1,4	0,8	0,6	0,2	0,7	4,1	31,6	3,1
WK-2	0,6	1,9	1,4	1,0	0,5	0,9	6,3	36,7	2,5
WK-3	0,5	1,5	1,1	1,5	0,6	0,9	6,1	38,4	1,8
WK-4	0,8	2,2	1,7	2,7	0,5	0,5	8,4	35,9	2,5
WK-5	0,7	2,2	1,5	3,7	0,5	0,7	9,3	27,1	2,5
WK-6	1,1	4,0	2,8	0,6	0,6	0,8	9,9	34,2	2,5
WK-7	1,0	3,1	2,5	0,9	0,6	0,7	8,8	35,4	2,5
WK-8	1,4	4,2	3,9	1,4	0,4	0,5	11,9	35,1	2,5
WK-9	1,3	2,9	3,5	2,7	0,6	0,8	11,7	26,5	2,5
WK-10	2,1	3,4	3,2	3,0	0,3	0,7	12,7	25,9	2,7
VF*	5,3	2,4	4,0	5,0	1,5	1,0	3,1	0,8	0,8

WUK-1	0,8	2,8	3,9	20,7	6,2	n.n.	34,4	7,1	12,5
WUK-2	0,9	3,2	3,5	20,0	4,4	1,9	33,9	8,4	9,4
WUK-3	0,8	3,1	3,3	19,5	5,8	1,6	34,1	9,3	9,4
WUK-4	0,8	2,9	2,9	18,4	5,2	1,6	31,8	8,6	10,0
WUK-5	0,9	3,2	3,2	20,6	6,1	2,1	36,1	9,3	13,1
WUK-6	0,6	2,2	2,5	20,8	6,5	2,3	34,9	7,8	13,1
WUK-7	0,9	2,5	3,0	24,6	4,6	1,7	37,3	9,2	13,1
WUK-8	0,8	2,6	3,0	24,6	5,3	1,7	38,0	9,7	17,5
WUK-9	0,8	1,8	2,7	18,3	5,6	1,9	31,1	9,5	18,1
WUK-10	0,9	2,0	2,2	19,9	5,2	1,9	32,1	10,0	18,3
VF*	1,1	0,7	0,6	1,0	0,8	1,0	0,9	1,4	1,4

* = Veränderungsfaktor

Die Tabelle 18 zeigt, dass die wasserlöslichen Kolloide hauptsächlich aus Galacturonsäure (25,9 - 38,4 Gew%) bestehen und die wasserunlöslichen Kolloide vor

allem Neutralzucker (31,1 - 38,0 Gew%), in der Hauptsache Glucose und Xylose, enthalten.

Im Verlauf der Vegetationsperiode änderte sich die Zuckerzusammensetzung sowohl innerhalb der wasserlöslichen als auch in der wasserunlöslichen Fraktion. In der Tabelle wird dies durch einen Veränderungsfaktor(VF) dargestellt, der die relativen Änderungen der einzelnen monomeren Zucker zwischen der 1. und der 10. Erntefraktion wiedergibt ($W(U)K_{10} / W(U)_1$). Die Veränderung ist um so größer, je deutlicher sich der Wert von 1 unterscheidet. Beträge > 1 zeigen einen Zuwachs, Beträge < 1 einen Verlust von monomeren Zuckern.

In den wasserlöslichen Kolloiden wurden die größten positiven Änderungen bei Rhamnose (5,3), Glucose (5,0) und Galactose (4,0) ermittelt, wogen sich Xylose (1,5) und Mannose (1,0) nur gering bzw. nicht veränderten. Da nur der Anfangs- und Endwert in die Berechnung eingeht, bleiben Schwankungen während der Vegetationsperiode unberücksichtigt. Negative Änderungen wurden beim Proteingehalt und bei Galacturonsäure festgestellt, wobei es am Ende der Fruchtreife zu einem deutlichen Galacturonsäureverlust (ca. 10 Gew%) kam. Der Proteingehalt ging nur zu Beginn der Reife zurück und bleibt dann mit ca. 2,5 Gew%. nahezu unverändert.

Der Anstieg bzw. Verlust von monomeren Zuckerbausteinen veränderte bei den wasserlöslichen Kolloiden das Arabinose/Rhamnose-Verhältnis von 3,5 auf 1,6 und das Arabinose/Galactose-Verhältnis von 1,7 auf 1,1. Dies könnte bedeuten, dass es im Bezug auf das Arabinose/Galactose-Verhältnis während der Reife durch fruchteigene Enzyme (z.B. Arabanasen) zu einem verstärkten Abbau von Arabinogalactanen kommt. Das Arabinose/Rhamnose-Verhältnis könnte sowohl durch den Abbau von arabinosehaltigen Seitenketten im Pektinmolekül, als auch durch den Abbau von Homogalacturonanen durch fruchteigene PE/PG beeinflusst werden. Unterstellt man, dass die nach dem PE/PG-Abbau verbleibenden Restpektine überwiegend aus rhamnosehaltigen Hairy-Regions bestehen, dann ist auch eine Verschiebung des Rhamnose/Arabinose-Verhältnisses zu Gunsten von Rhamnose wahrscheinlich.

Bei den wasserunlöslichen Kolloiden waren die Veränderungen weit weniger ausgeprägt. Neben einem leichten Anstieg des Galacturonsäure- (1,4) und Proteingehaltes (1,4) wurde bei diesen Kolloiden ein Rückgang von Galactose (0,6), Arabinose (0,7) und Xylose (0,8) festgestellt. Die Gehalte von Glucose und Mannose lagen zwar deutlich über denen der wasserlöslichen Fraktion, sie veränderten sich aber nur geringfügig.

Glucose und Xylose sind typische Bausteine von Cellulose und Xyloglucanen, die als Struktur- und Gerüstsubstanzen in der primären Zellwand von Pflanzen und Früchten vorliegen. Sie sind meist wasserunlöslich und reichern sich daher in der wasserunlöslichen Kolloidfraktion an. Der chemische Bauplan dieser Polysaccharide wird schon zu Beginn der Fruchtentwicklung festgelegt und verändert sich während der Reifeentwicklung kaum. Für die Fruchtsaftherstellung wird diese Fraktion immer dann interessant, wenn es um das Thema „Totalverflüssigung“ geht. Da Xyloglucane als Bindeglied zwischen Cellulose und Arabinogalactanen fungiert, ist es denkbar, dass durch

die enzymatische Spaltung dieser Verbindung zumindest ein Teil der wasserunlöslichen Kolloide wasserlöslich werden.

Die Summe der Zuckerbausteine lag zwischen 35,7 Gew% und 47,7 Gew%. Bei den wasserlöslichen Kolloiden verbleibt selbst nach der Addition des Proteinanteils ein unerklärbarer Rest von 50 Gew%. Vermutlich kommt es durch Verunreinigungen (Phenole?) und/oder gleichzeitig ablaufende Maillard-Reaktionen zu den Ausbeuteverlusten.

6.4 Praxisnahe Herstellung von Säften aus schwarzen Johannisbeeren unter besonderer Berücksichtigung der Maische- und Saftenzymierung

Durch praxisnahe Versuche sollte der Einfluss von zwei unterschiedlich zusammengesetzten Enzympräparaten auf den Kolloidgehalt und die Filtrierbarkeit der Säfte untersucht werden.

Die Versuchsbeschreibung, sowie die analytischen Kennzahlen der Säfte wurden im Kap. 4.2 bereits dargestellt.

6.4.1 Der Viskositätsverlauf während der Saftenzymierung

Durch die thermisch mechanische Belastung der Maische sowie durch fruchteigene oder zugesetzte Enzyme kommt es zu einer starken Freisetzung von kolloidalen Substanzen in den Saft. In der Regel wird bei schwarzem Johannisbeersaft eine zweite Enzymbehandlung im Saftstadium notwendig. Das Ziel dieser Behandlung ist der Abbau von langkettigen Polysacchariden, die eine hohe Saftviskosität verursachen und damit einer Klärung entgegenwirken. Der „Pektinabbau“ lässt sich indirekt über die Bestimmung der Saftviskosität verfolgen oder, wie in der Praxis üblich, über den Alkoholtest.

Die kinematische Viskosität der Muttersäfte wurde mit einem Schott Kapillarviskosimeter AVS 400 bei einer Basistemperatur von 20°C gemessen. Der Viskositätsverlauf ist in Abbildung 25 dargestellt.

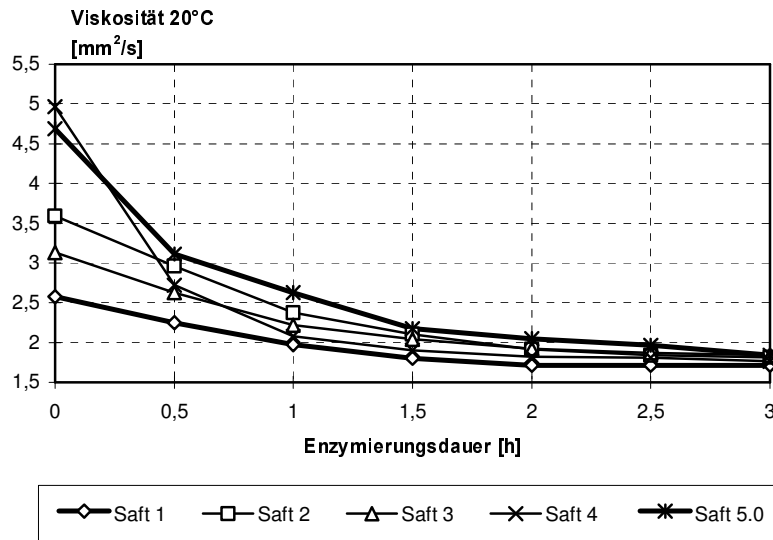


Abb. 25: Viskositätsverlauf der fünf Versuchssäfte während der Enzymierung.

Wie man in Abb. 25 sieht, haben die Säfte nach der Maischeenzymierung ($h=0$) deutlich unterschiedliche Viskositätswerte. Die Säfte 4 und 5 fallen durch ihre außergewöhnlich hohen Viskositätswerte auf. Da beide Säfte aus Maischen hervorgingen, die mit Panzym Plus behandelt wurden, könnte man einen Zusammenhang mit dem Enzympräparat vermuten. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass auch der Saft mit der niedrigsten Viskosität (Saft 1) aus einer Maische hervorging, die mit Panzym Plus behandelt wurde. Die Ursache für die hohen Viskositätswerte beim Saft 5.0 liegt vermutlich in der hohen mechanischen Belastung der Maische während der Enzymierung. Wie man später noch sieht, verursachte diese Maßnahme einen massiven Eintrag kolloidaler Substanzen in den Saft.

In den ersten 1,5 h der Enzymierung kam es zu einer drastischen Viskositätssenkung. Die Werte reduzierten sich z. B. bei den Säften 4 und 5 auf ca. die Hälfte ihres Anfangsniveaus. Offensichtlich sind die in Panzym BE enthaltenen endo-Polygalacturonase-Aktivitäten ausreichend, um langkettige Polysaccharide in kleine Fragmente zu spalten und damit die Viskosität deutlich zu reduzieren. Im weiteren Verlauf der Enzymierung verlangsamte sich die Viskositätsabnahme und die Werte stabilisieren sich nach 2,5 h Enzymierungsdauer bei allen Varianten auf annähernd gleichem Niveau.

In der Praxis sollte aus qualitativen und arbeitswirtschaftlichen Gründen innerhalb von 2,5 h ein negativer Pektintest erreicht werden. Mit Ausnahme der Säfte 3 und 5 wurde dieses Kriterium bei allen Säften eingehalten (Ergebnis nicht dargestellt). Wahrscheinlich reichte weder die Enzymdosage (150 g/to im Saft) aus, noch waren in den Enzympräparaten entsprechende Aktivitäten vorhanden, um Kolloidgehalte von bis zu 15 g/L so weit abzubauen, dass ein negativer Alkoholtest erreicht wird. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass annähernd niedrige Viskositätswerte nicht zwangsläufig zu einem negativen Alkoholtest führen.

6.4.2 Der Einfluss der Maische-/Saftenzymierung auf

a.) den Kolloidgehalt

Die Kolloidgehalte in den enzymierten Säften wurde gravimetrisch nach Alkoholfällung (vgl. 5.2.2) oder durch Gelfiltration an Sephadex G25 (vgl. 5.2.1) bestimmt. Die in Tabelle 19 dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf Muttersaft bzw. auf die in Tabelle 5 beim Extraktionssaft (Saft 5.1) angegebenen Analysenwerte.

Tab.19: Chromatographisch (Sephadex G-25) und durch Alkoholfällung bestimmte Kolloidgehalte in 6 Säften aus schwarzen Johannisbeeren nach der Saftenzymierung. Ergänzend sind die Kolloidgehalte von vier Säften dargestellt, die ohne Saftenzymierung gewonnen wurden.

Saft	Enzym		Kolloidgehalt [mg/L]	
	Maische	Saft	Gelfiltration	Alkoholfällung
1	PzPLUS	PzPLUS	2.666	11.810
2	PzBE	PzBE	7.887	16.410
3	PzBE	PzPLUS	6.252	15.260
4	PzPLUS	PzBE	7.232	13.270
5.0	PzPLUS	PzBE	10.042	15.980
5.1	PzPLUS	PzBE	5.975	11.690
3.	PzBE	o.SE	11.250	25.270
4.	PzPLUS	o.SE	7.331	26.300
5.0	PzPLUS	o.SE	14.260	29.590
5.1	PzPLUS	o.SE	5.460	9.470

o.SE. = ohne Saftenzym

Durch die Alkoholfällung wurden deutlich höhere Kolloidgehalte bestimmt als bei der Gelfiltration. Die Unterschiede wurden vor allem durch „Mitreiß-Effekte“ und niedermolekulare Kolloide hervorgerufen, die bei der Alkoholfällung auftreten bzw. ausfallen und miterfasst werden. Bei der Gelfiltration mit Sephadex G-25 werden nur Polysaccharide erfasst, deren scheinbares Molekulargewicht über 5.000 Dalton liegt, wodurch ein Teil der Kolloide diskriminiert wurden.

Die hohen Kolloidgehalte in nicht enzymatisch behandelten Säften zeigen, dass bei der Verarbeitung von Johannisbeeren große Mengen hochmolekularer Substanzen aus der Maische freigesetzt werden und in den Saft übergehen. Durch „aggressive“ Enzyme und starke mechanische Maischebehandlung können die Kolloidgehalte auf bis zu 30 g/L (Alkoholfällung) bzw. fast 15 g/L (Gelfiltration) ansteigen. Aber auch bei schonender Verarbeitung und dem Einsatz eines wenig „aggressiven“ Enzyms (PANZYM PLUS) im Maischestadium wurden, wie im Fall von Saft 4 (ohne Saftenzym), Kolloidgehalte (7,3 g/L) nachgewiesen, die um mehr als Faktor 10 höher lagen als z.B. in Trauben- oder Apfelsaft. Interessant war, dass die durch die Enzyme in den Saft eingetragenen Polysaccharide im Verlauf der Saftenzymierung zwar reduziert, aber nicht mehr vollständig abgebaut werden können. Dies trifft besonders auf „aggressive“ Maischeenzyme wie z.B. Panzym BE, zu. Die niedrigsten Kolloidgehalte (2.666 mg/L) wurden bei schonender Verarbeitung der Maische und einem Enzym (Panzym Plus) erzielt, das auf Grund seines geringen Gehaltes von Cellulase- und Hemicellulase-Aktivitäten wenig mazerierend wirkte.

Beim Extraktionssaft (Saft 5.1) liegt der Kolloidgehalt nach der Saftenzymierung höher als ohne Saftenzymierung. Dieser Widerspruch konnte nicht abschließend geklärt werden. Ein systematischer Fehler kann nahezu ausgeschlossen werden, da dieses Phänomen sowohl bei der Gelfiltration als auch bei der Alkoholfällung auftritt. Möglicherweise findet im Saft eine Freisetzung von Kolloiden aus dem Trub statt.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass zumindest vor der Saftenzymierung ein Zusammenhang zwischen der Viskosität (vgl. 6.4.1.) und dem Kolloidgehalt des Saftes besteht. Hohe Kolloidgehalte nach der Maischeenzymierung führten auch zu hohen Viskositätswerten. Nach der Saftenzymierung wurde die mengenproportionale Abhängigkeit anscheinend von Struktureigenschaften der Kolloide überlagert. Es kam zwar zu einer Angleichung der Viskositätswerte, bei den Kolloidgehalten gab es aber immer noch deutliche Unterschiede.

b.) den Methylierungs- und Acetylierungsgrad der Kolloide

Tab. 20: Einfluss der Enzymbehandlung auf den Methylierungs- (VE MeOH) und Acetylierungsgrad (VE HAC) von Säften und nativem Johannisbeerpektin: Die prozentualen Methylierungs-(Acetylierungs-)grade wurden auf der Basis der Galacturonsäuregehalte (HPLC) nach der Methode von Voragen et al (1986a) bestimmt.

Probe	%	%
	VE MeOH	VE HAC
natives Johannisbeerpektin	93	12
nach PE/PG	73	13
Saft 1 ohne Saftenzym	71	8
nach Saftenzymierung	59	10
Saft 2 ohne Saftenzym	85	9
nach Saftenzymierung	73	9
Saft 3 ohne Saftenzym	84	8
nach Saftenzymierung	59	9
Extraktionssaft ohne Saftenzym	80	13
Extraktionssaft nach Saftenzymierung	56	9

Tabelle 20 zeigt, dass natives Johannisbeerpektin sehr hoch mit Methanol verestert ist (VE MeOH = 93%) und relativ viele OH-Gruppen mit Essigsäure acetyliert sind (VE HAC = 12%). Ähnlich hohe Acetylierungsgrade wie in Johannisbeerkolloiden fanden Voragen et al, 1986a in Kartoffel- (14-15 %) und in Birnenpektin (14 %). Bei Apfelpektin liegt der Acetylierungsgrad zwischen 3 und 4 %. Durch eine Pektinesterase/Polygalacturonase (PE/PG) konnte zwar ein Teil der Esterbindungen gespalten werden, eine vollständige Entmethylierung konnte aber nicht erreicht werden (VE MeOH = 73). Dies kann daran liegen, dass es sich bei dem Enzym nicht um „Reinenzyme“ handelt, sondern um ein Enzympräparat, das weder für die Matrix „Johannisbeerpektin“ noch hinsichtlich der Substratbedingungen (Temp., pH-Wert) optimiert ist.

Die sehr hohe PE-Aktivität von PANZYM PLUS führte bei Saft 1 bereits in der Maische zu einer verstärkten Entesterung des Pektinmoleküls (VE MeOH = 71%). Eine hohe PE-Aktivität ist gerade bei Beeren wichtig, da die depolymerisierende Wirkung der Polygalacturonase (PG) nur dort einsetzen kann, wo freie Carboxylgruppen vorliegen. Im Saft wirkt die PE weiter (VE MeOH = 59%) und schafft so die Voraussetzung für die Spaltung der löslichen Pektine durch die PG und damit einen raschen Abfall der Saftviskosität (vgl. Abb. 24)

Beim Saft 2 wurde PANZYM BE in der Maische und im Saft eingesetzt. Dieses Präparat hat eine deutlich niedrigere PE-Aktivität als PANZYM PLUS. Im Vergleich zu Saft 1 (VE MeOH = 59%) wies Saft 2 nach der Saftenzymierung einen deutlich höheren Methylierungsgrad auf (VE MeOH = 73%).

Bei Saft 3 wurde die niedrigdosierte Pektinesterase (PANZYM BE) in der Maische und das hochdosierte PANZYM PLUS im Saft eingesetzt. Obwohl der Saft nach der Maischeenzymierung noch sehr hoch verestert war (VE MeOH = 84%), reicht die Wirkung von PANZYM PLUS aus, um den Methylierungsgrad der Restpektine im Saft nochmals deutlich zu senken (VE MeOH = 59%).

Beim Extraktionssaft war die Pektinesterase-Aktivität von PANZYM BE aufgrund der geringeren Kolloiddichte noch ausreichend wirksam, um den Methylierungsgrad des Saftes um 30 % zu senken.

Beiden Enzympräparaten fehlen offensichtlich die entsprechenden Acetylerase-Aktivitäten, um den Acetylierungsgrad (AG) deutlich zu senken.

c.) die statische Membranfiltration

Aus der Praxis ist bekannt, dass die Filtration von Buntsäften im Allgemeinen und Johannisbeersäften im Besonderen sehr problematisch sein kann.

Um einen Zusammenhang zwischen Enzymbehandlung und Filtrierbarkeit zu untersuchen, wurden alle Säfte zunächst zentrifugiert und anschließend über 0,65 µm-Membranen filtriert. In Abbildung 26 ist die Filtrierfähigkeit der Säfte im Vergleich zu einer Zitronensäurelösung (40 g/L Zitronensäure, mit 1 mol/L NaOH auf pH 3,0 eingestellt), dargestellt.

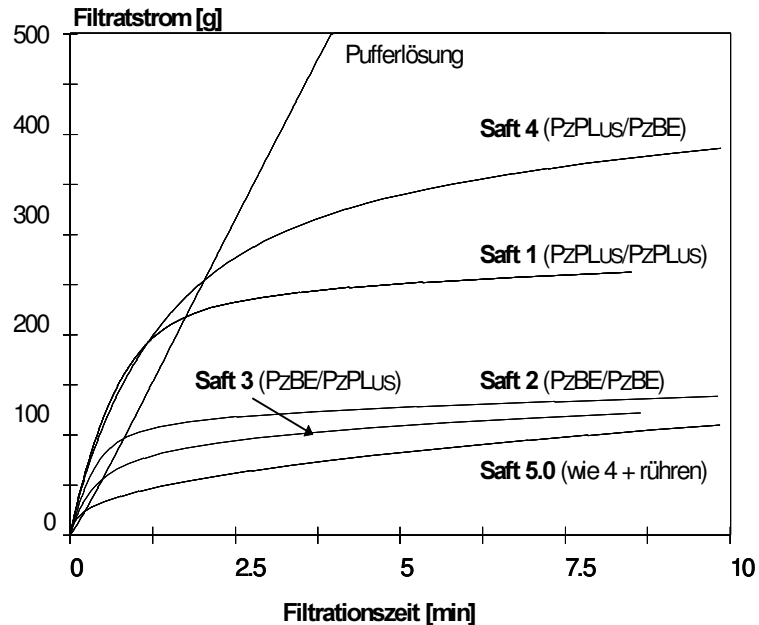


Abb. 26: Filtrationsverhalten von Johannisbeersäften nach dem Einsatz unterschiedlicher Enzympräparate in Maische und Saft. Dargestellt ist der spezifische Filtratstrom in Abhängigkeit von der Filtrationszeit. Der Filtratstrom wurde gravimetrisch bestimmt. Ergänzend ist das Filtrationsverhalten der Zitronensäure-Pufferlösung dargestellt. Die eingesetzten Enzympräparate werden in Klammern (Maische/Saft) angegeben.

Die Filtrationskurven zeigten ein für Buntsäfte typisches Filtrationsverhalten. Zu Beginn der Filtration wurde eine hohe Filtrationsleistung erreicht, die teilweise höher war als die der Zitronensäurelösung. Nach kurzer Zeit änderte sich das Filtrationsverhalten. Während sich die Pufferlösung unverändert gut filtrieren ließ, ging die Filtrationsleistung der Säfte kontinuierlich zurück und kam letztendlich zum Erliegen.

Die beiden in der Maische mit PANZYM PLUS behandelten Säfte erreichen deutlich höhere Filtrationsleistung, wie die mit PANZYM BE behandelten Säfte. Setzt man das beste Filtrationsergebnis des Saftes 1 gleich 100 %, erreichen die mit PANZYM BE behandelten Säfte 2 und 3 davon 51 % bzw. 46 %. Obwohl auch die beiden Säfte 4 und 5.0 in der Maische mit PANZYM PLUS behandelt wurden, müssen die Ergebnisse gesondert betrachtet werden.

Das schlechte Filtrationsverhalten des Saftes 5.0 (38 % von Saft 1) hing wahrscheinlich mit dem enormen Kolloideintrag (Tab. 18) durch die mechanische Belastung der Maische zusammen. Beim Saft 4 könnte sich das Schönen des Saftes positiv auf die Filtration ausgewirkt haben.

Aus der Literatur (Wucherpfennig und Dietrich, 1989) ist bekannt, dass langkettige, hochmolekulare Polysaccharide die Filtration negativ beeinflussen. Um die Ursache für

eine gute bzw. schlechte Filtrationsleistung genauer einzugrenzen, wurden die durch Ultrafiltration fraktionierten und gefriergetrockneten Kolloide (vgl. Kap. 4.1.4 und Abb. 16) in einem Citronensäure-Puffer gelöst (200 mg/L) und durch eine 0,65 μm Membran filtriert. Die Filtrationskurven der Kolloidlösungen sind in Abbildung 27 dargestellt.

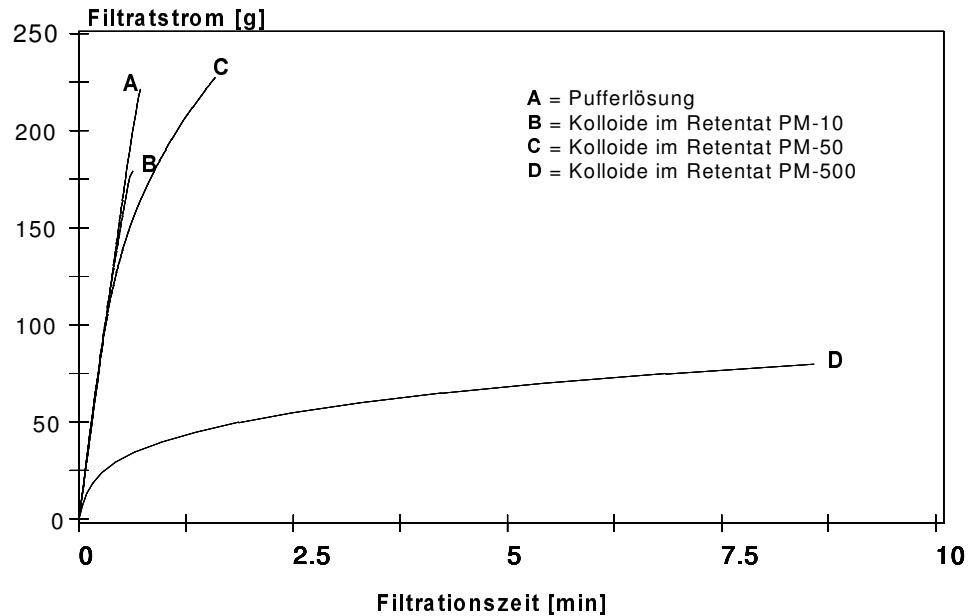


Abb. 27: Filtrationsverhalten von Johannisbeerkolloid-Lösungen bei der statischen Membranfiltration über eine 0,65 μm Membran. Dargestellt ist der spezifische Filtratstrom in Abhängigkeit von der Filtrationszeit. Der Filtratstrom wurde gravimetrisch bestimmt. Zusätzlich ist das Filtrationsverhalten der Zitronensäure-Pufferlösung dargestellt.

Niedermolekulare Kolloide (MW < 10.000 Dalton), wie sie in der PM-10-Fraktion vorliegen, haben nur einen geringen Einfluss auf die Filtrationsleistung. Die Kolloide der PM-50-Fraktion sind zwar von der Zuckerbausteinzusammensetzung ähnlich aufgebaut wie die der PM-10-Fraktion (vgl. Tab. 11), sie führen aber aufgrund der höhermolekularen Polysaccharide zu einem Rückgang der Filtrationsleistung. Der Verlauf der Filtrationskurve deutet auf eine Art „Fouling-Effekt“ hin, bei der die anfänglich gute Filtrationsleistung mit zunehmender Filtrationszeit langsam zurückgeht.

Im Gegensatz dazu führen die Kolloide der PM-500-Fraktion schon kurz nach Filtrationsbeginn zu einem drastischen Rückgang der Filtrationsleistung. Die Membran wird durch die hochmolekularen Kolloide, deren Molekulargewicht z.T. weit über 100.000 Dalton liegt, irreversibel „verblockt“. Die Kolloide der PM-500-Fraktion unterscheiden sich neben dem Molekulargewicht auch bzgl. ihrer Zuckerbausteinzusammensetzung von den anderen Kolloidfraktionen (vgl. Tab. 11). Neben einem gegenüber der PM-10-Fraktion nur etwa halb so hohen Veresterungsgrad (24%) ist vor allem der hohe Neutralzuckeranteil von 30% von Bedeutung.

Um den Einfluss der Schönung (Saft 4) auf das Filtrationsverhalten genauer zu untersuchen, wurde sowohl der Saft 1 (PANZYM PLUS) als auch der Saft 2 (PANZYM BE) nach der Saftenzymierung zusätzlich mit Aktivbentonit (50 g /hL), Gelatine (80-100 Bloom, sauer; 10 g /hL) und Kieselsol (30%; 50 mL /hL) geschönt. Nach 8 h wurde der Trub abzentrifugiert (20 min, 3.500 g) und die Säfte wie zuvor filtriert.

Abb. 28 zeigt das Filtrationsverhalten der geschönten Säfte 1 und 2 im Vergleich zur ausschließlich enzymatisch behandelten Variante. Ergänzend ist das Filtrationsverhalten des Saftes 1 dargestellt, der ohne Saftenzymierung und ohne Schönung hergestellt wurde.

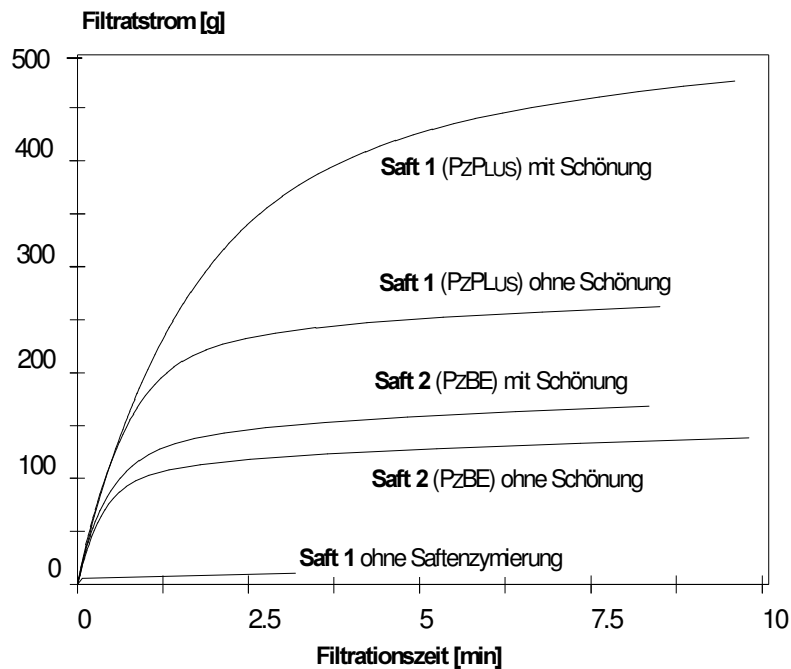


Abb. 28: Zeitlicher Verlauf des spezifischen Filtratstroms von unterschiedlich vorbehandelten Johannisbeersäften bei der statischen Membranfiltration (0,65 μm)

Bei dem mit PANZYM PLUS enzymierten Saft 1 konnte durch die Schönung nahezu eine Verdoppelung der Filtrationsleistung ($\Delta\text{Filtratstrom} / \Delta t$) erreicht werden. Bei Saft 2 wurde durch die Schönung lediglich ein Leistungsgewinn von 25 % im Vergleich zur ungeschönten Variante erzielt. Die schlechte Schönungswirkung bei Saft 2 könnte mit dem hohen Kolloidgehalt von annähernd 7.900 mg/L (vgl. Tab. 17) zusammenhängen. Einerseits könnten kolloidale Ladungsphänomene die Agglomeration der Trubteilchen verhindern, andererseits wird die Sedimentation von agglomerierten Trubteilchen durch die hohe Serumviskosität verzögert.

Ohne Saftenzymierung kam der Filtratstrom unmittelbar nach dem Filtrationsbeginn zum Erliegen.

d.) die dynamische Membranfiltration

Um die Frage zu klären, welches Filtrationsverhalten kolloidreiche Johannisbeersäfte bei der Crossflow-Filtration zeigen, wurden verschiedene Säfte mit einer Laboranlage filtriert, die mit einem ROMICON-Hohlfaserm modul (Trenngrenze 500.000 Dalton, 0,1 m² Filterfläche) bestückt war. Das Modul wurde mit 500 l/h überströmt, die transmembrane Druckdifferenz beträgt 0,8 bar. Die Anlage wurde diskontinuierlich (Batch-Betrieb) bei 20°C betrieben. In Abb. 29 ist das Filtrationsverhalten bei der dynamischen Membranfiltration von enzymierten und teilweise geschönten Johannisbeersäften dargestellt.

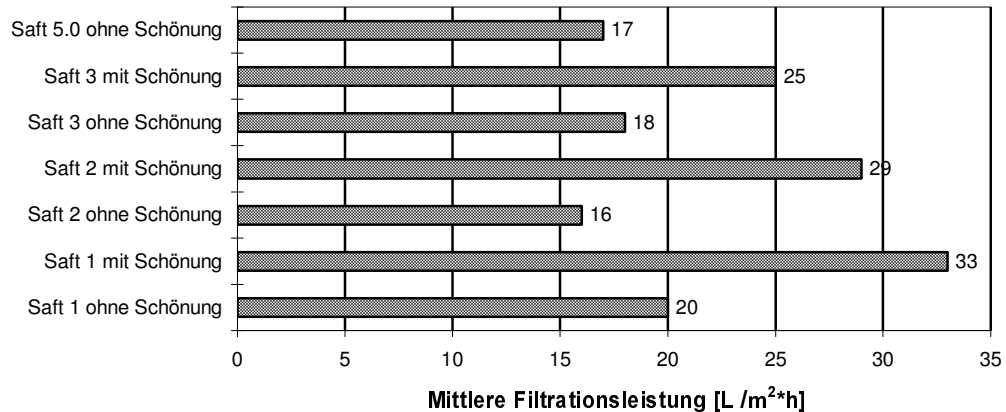


Abb. 29: Mittlere Filtrationsleistungen bei der diskontinuierlichen Crossflow-Filtration von Johannisbeersäften in Abhängigkeit von der Saftbehandlung.

Bei der dynamischen Filtration gab es im Hinblick auf das Filtrationsverhalten der Säfte keine so großen Unterschiede wie bei der statischen Filtration.

Bei der dynamischen Filtration der ungeschönten Varianten 1, 2, 3 und 5.0 beträgt der relative Unterschied zwischen der höchsten und der geringsten Filtrationsleistung nur 20 %, im Vergleich zu 62 % bei der statischen Filtration.

Die absoluten Filtrationsleistungen der ungeschönten Varianten lagen zwischen 16 und 20 L/ m²*h. Im Vergleich zu anderen Säften ist dies ein sehr geringer Wert. Unter ähnlichen Bedingungen konnte bei Apfelsaft eine Leistung von 85 L/ m²*h (Will, 1993) erreicht werden.

Auch bei der dynamischen Filtration konnte durch die Schönung eine Verbesserung der Filtrationsleistungen erzielt werden. Im Gegensatz zur statischen Filtration, wo sich die Schönung von Saft 1 wesentlich positiver auswirkte als bei Saft 2, war dies bei der dynamischen Membranfiltration umgekehrt. Im direkten Vergleich zur ungeschönten Variante konnte die Filtrationsleistung bei Saft 1 um 65 % und bei Saft 2 um 81 % gesteigert werden. Der mit PANZYM PLUS enzymierte Saft 1 ließ sich aber in allen Varianten am besten filtrieren.

Nach der Filtration wurden die Membranen mit Wasser (50°C) und 1 % (w/w) Natronlauge gereinigt (20°C). Die Spülflüssigkeit färbte sich bei der Laugenreinigung tiefschwarz. Vermutlich lagerten sich bei der Filtration phenolische Substanzen auf oder auch in der Membranmatrix ab und wurden erst bei einer alkalischen Reinigung abgelöst. Auf Grund der Tatsache, dass es erst nach der Laugenreinigung zu einer deutlichen Verbesserung der Filtrationsleistung (Wasserwert) kam, liegt die Vermutung nahe, dass die abgelösten Stoffe eine mögliche Ursache für die schlechte Filtrationsfähigkeit der Säfte sind. Die Anlagerung von Phenolen, möglicherweise auch zusammen mit anderen Inhaltsstoffen des Saftes, wie z. B. Polysaccharide oder Proteinen, an die Membranoberfläche könnte eine Erklärung dafür sein, dass die ungeschönten Säfte eine schlechtere Filtrationsleistung aufweisen als die geschönten Varianten. Es ist bekannt, dass die Gelatine/Kieselsolschönung zu einer Reduktion von phenolischen Inhaltsstoffen im Getränk führt.

e.) die Zusammensetzung der Zuckerbausteine und des Proteingehaltes

Um die Veränderungen der kolloidalen Inhaltsstoffe während der Saftenzymierung besser zu verstehen und damit auch das unterschiedliche Filtrationsverhalten der Säfte zu erklären, wurden die Kolloide durch Alkoholfällung aus den Säften isoliert und auf ihre Gehalte an monomeren Zuckerbausteinen hin untersucht.. Neben den enzymierten Säften wurde je ein nicht enzymierter Saft ausgewählt, der in der Maische mit PANZYM PLUS (Saft 4 o.SE.) bzw. mit PANZYM BE (Saft 3 o.SE.) behandelt wurde.

Die Ergebnisse der Zuckerbausteinuntersuchung korrelieren mit den in Tabelle 19 dargestellten Kolloidgehalten (Alkoholfällung). Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tab. 21: Zuckergehalte der Rohkolloide, die aus Johannisbeersäften vor und nach der Saftenzymierung isoliert wurden

Saft	Neutralzucker [mg/ L]						Summe NZ [mg/ L]	Saure Zucker [mg/ kg]		Proteingehalt [mg/ L]
	Rha	Ara	Gal	Glc	Man	Xyl		GalA	GlcA	
1	164 270	297	199	71	n.n.	n.n.	731	3943	13	199
2	279 2222	574	376	114	n.n.	n.n.	1343	7740	17	312
3	229	503	320	122	n.n.	n.n.	1174	5279	15	305
4	160	477	266	79	n.n.	n.n.	982	4591	13	213
5.0	239	687	336	95	n.n.	n.n.	1357	5929	16	239
5.1	164	409	233	59	n.n.	n.n.	855	4009	12	153
3 o.SE	227	708	404	1972	76	52	3439	5633	25	481
4 o.SE	237	814	448	2314	54	54	3921	5209	25	552

o.SE. = ohne Saftenzym

Man erkennt, dass alle Säfte nach der Saftenzymierung noch erhebliche Mengen an Neutralzuckern und Uronsäuren enthalten. Alleine die Gehalte an (Poly-)Galacturonsäure

liegen mit 4 - 6 g/L in einer Größenordnung, die bei Apfelsäften die Gesamtsäure darstellen können! Durch die im Saft eingesetzten Enzyme werden sowohl die neutralzuckerhaltigen Polysaccharide als auch die sauren Polysaccharide abgebaut. Während sich durch die Saftenzymierung der Galacturonsäuregehalt um 6,3% (Saft 3) bzw. 11,9% (Saft 4) verringert, geht der Neutralzuckergehalt um 65,8% bzw. 75% zurück. Wahrscheinlich bewirken die in den Enzympräparaten enthaltenen Polygalacturonasen, eher eine statistische Spaltung der Pektinhauptkette als eine terminale Spaltung, was letztendlich auch zu einer schnellen Absenkung der Saftviskosität führt. Der Rückgang des Neutralzuckergehaltes wird hauptsächlich durch den Verlust von Glucose verursacht. Hierbei handelt es sich vermutlich um glucosehaltige Fragmente von Gerüstsubstanzen, wie z.B. Cellulose oder Xyloglucane, die bei der Alkoholfällung des Saftes ohne Saftenzymierung miterfasst werden, nach der Saftenzymierung aber im Trubdepot zurückbleiben und nicht mehr erfasst werden.

Die Zuckerbausteinanalytik lieferte keine eindeutigen Hinweise, die auf das Filtrationsverhalten der Säfte schließen lassen.

Obwohl Saft 1 den niedrigsten Neutralzucker- (731 mg/L) als auch den geringsten Uronsäuregehalt (3956 mg/L) aufwies, war er schlechter zu filtrieren, als der Saft 4 mit 982 mg/L Neutralzucker bzw. 4604 mg/L saure Zucker. Es scheint aber dennoch einen Zusammenhang zwischen Neutralzuckergehalt und Filtrationsfähigkeit zu geben, da die schlecht filtrierbaren Säfte 5.0, 2 und 3 auch die höchsten Neutralzuckergehalte aufwiesen.

Bei den Uronsäuren führen hohe Gehalte nicht zwangsläufig zu schlechten Filtrationsergebnissen. Obwohl Saft 2 mit 7757 mg/L den höchsten Uronsäuregehalt aufwies, ließ er sich besser filtrieren als die Säfte 5.0 und 3, die mit 5945 mg/L bzw. 5294 mg/L deutlich weniger saure Zucker enthalten. Bei den Säften 1 und 4, die sich bekanntlich gut filtrieren ließen, lag der Rhamnosegehalt mit 160 mg/L bzw. 164 mg/L und der Galacturonsäuregehalt mit 3943 mg/L bzw. 4591 mg/L deutlich niedriger als bei den anderen Säften. Rhamnosemoleküle sind dafür verantwortlich, dass das lineare Pektinmolekül an dieser Stelle abknickt und Seitenketten unterschiedlicher Länge und Struktur angelagert werden können.

Da neben der Menge auch die Struktur der Polysaccharide einen entscheidenden Einfluss auf die Filtrationsfähigkeit hat, könnte man vermuten, dass ein relativ hoher Rhamnosegehalt in den Polysacchariden auf vielfach verzweigte Moleküle hindeuten, die eine große innere Oberfläche besitzen und die Filterelemente schnell verstopfen.

7 Bewertung der eingesetzten Methoden

7.1 Isolierung und Reinigung der Kolloide

Zur Isolierung von Kolloiden aus niedrigviskosen Flüssigkeiten (z.B. Säfte) hat sich die Ultrafiltration bestens bewährt. Die Vorteile liegen in einer, im Gegensatz zur Alkoholfällung, besseren Reinigung der Kolloide durch die Abtrennung niedermolekularer Substanzen. Für die Isolierung von Kolloiden aus Maischen oder Pürees eignet sich die Ultrafiltration jedoch nicht. Durch die direkte zweistufige Fällung der Kolloide wird einer technologisch orientierten Betrachtungsweise besser Rechnung getragen als z.B. bei der ebenfalls weitverbreiteten Methode über den AUR (= alkoholunlöslicher Rückstand), da saftunlösliche Bestandteile wie Samen, Fasern oder Teile der Fruchtschale vor der Fällung abgetrennt werden. Durch die drastischen Extraktionsbedingungen kann eine Veränderung der Kolloidstruktur weder bei der Herstellung des AUR, noch bei der zweistufigen Fällung ausgeschlossen werden und muss bei der qualitativen Bewertung der Polysaccharide berücksichtigt werden.

Gerade bei gefärbten Beeren wird der Übergang von niedermolekularen phenolischen Substanzen anhand der rosa gefärbten Kolloide besonders offensichtlich. Durch die zweistufige Arbeitsweise konnte die Vorreinigung der Kolloide verbessert werden, wobei zusätzliche Reinigungsschritte aber auch zu Verlusten von alkohollöslichen Polysacchariden führen, wie Villetaz (1979) bei Kolloiden eines Traubensaftes zeigen konnte.

Einige Polysaccharide scheinen durch die Alkoholfällung ihre Wasserlöslichkeit zumindest teilweise zu verlieren, wodurch ebenfalls erhebliche Ausbeuteverluste entstehen können.

Aus Holundersaft und -püree konnten die Kolloide nur durch Ultrafiltration isoliert werden, da sich bei der Alkoholfällung ein sandiger Niederschlag bildete, der die Ausbeuteberechnung verfälscht. Otto und Wittenschläger (1984) isolierten aus Holundersaft eine ähnliche Ausscheidung, die hauptsächlich aus Thyrosin bestand.

Die Kolloide ließen sich am besten mit der Gefriertrocknung trocknen. Durch die Trocknungscharakteristik wird sowohl die Bildung von wärmeinduzierten Reaktionsprodukten (Maillard-Reaktion) als auch ein Verklumpen bzw. Verkrusten der getrockneten Kolloide auf ein Minimum reduziert.

7.2 Fraktionierung der Kolloide

Die Gelfiltration ist eines der wichtigsten Verfahren bei der Aufarbeitung und Charakterisierung von Kolloiden. Mit entsprechender apparativer Ausstattung ist es möglich, innerhalb von kurzer Zeit (ca. 1h) sowohl die Menge als auch die relative Größenverteilung der in einem Saft enthaltenen Kolloide zu bestimmen. Im Vergleich zur Alkoholfällung bestimmte man durch die Gelfiltration deutlich niedrigere Kolloidgehalte. Dies liegt zum einen daran, dass unter den gewählten Bedingungen bei der Alkoholfällung niedermolekulare Kolloide miterfasst werden, während bei der Gelfiltration Kolloide < 5000 Dalton abgetrennt werden. Zum anderen kann bei der Gelfiltration ein gewisser systematischer Fehler durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Eichkolloide und der Probenkolloide nicht ausgeschlossen werden.

Schwieriger gestaltete sich die Bestimmung der relativen Molekulargewichte mit einer Pharmacia HR 10/30- Säule. Das eingesetzte Gelmaterial Superose 6 (Pharmacia) trennt zwar die Eichdextrane im Bereich zwischen 10.000 und 1.000.000 Dalton zuverlässig, bei komplex zusammengesetzten Johannisbeerkolloiden war die Auflösung jedoch unbefriedigend. Die niedrige Empfindlichkeit des RI-Detektors verlangte eine gewisse Kolloidkonzentration in der Probe, die aber dazu führte, dass die hochviskosen Kolloide infolge eines Gelfiltrationseffektes im oberen Drittel des Säulenmaterials hängen bleiben und verzögert eluierten.

Aus der Literatur (Dietrich, 1986; Wucherpfennig et al, 1987; Schöppllein, 1991) ist bekannt, dass sich die Trennung mit einer veränderten Säulengeometrie (Durchmesser 26 mm, Länge 1 m) verbessern lässt, wobei man dann allerdings wesentlich größere Probemengen (3 - 5 mL) benötigt und mit längeren Chromatographieläufen (18 h) rechnen muss.

Als problematisch hat sich auch die Probenvorbereitung erwiesen. Um das Gelmaterial vor Verschmutzung zu schützen und damit eine ausreichende Standzeit zu gewährleisten, mussten die Kolloide zuerst entfärbt werden. Hierzu werden die gelösten Polysaccharide über eine mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) gepackte Glassäule gegeben. Anthocyane und andere phenolische Substanzen werden durch die funktionellen Gruppen des Austauschermaterials adsorbiert. Bei Kolloiden, die zur Bildung von hochviskosen Lösungen neigen, kam es bei feinkörnigem Austauschermaterial zu einer Art Gelfiltrationseffekt oder zur Verblockung der Säule. Durch die Auswahl entsprechend grobkörniger Adsorberharze (AD 92041 ROHM & HAAS) konnte dieses Problem vermieden werden, wobei eine vollständige Entfärbung der Kolloide nicht in allen Fällen möglich war. Eine selektive Abtrennung einzelner Zuckerbausteine fand durch die Entfärbung nicht statt.

7.3 Bestimmung der Zuckerbausteine

7.3.1 Die Hydrolyse der Polysaccharide

Im Vorfeld der chromatographischen Zuckerbausteinanalytik müssen die Polysaccharide hydrolytisch gespalten werden. Die Ausbeute von monomeren Zuckerbausteinen mittels Schwefelsäure-Hydrolyse beschrieb eine Maximumkurve, d.h. nur bestimmte Hydrolysebedingungen (Säureart und -stärke, Hydrolysedauer und -temperatur) führten zu einer maximalen Ausbeute an Zuckermonomeren. Temperaturen unter 120 °C und kurze Hydrolysezeiten führten zu einer ungenügenden Freisetzung von Rhamnose, Xylose und Galactose. Erhöhte man die Temperatur über einen kritischen Wert von 120 °C, kam es neben einer Freisetzung von Zuckerbausteinen zu einer gleichzeitigen Zerstörung von leicht hydrolysierbaren Zuckern wie z. B. Arabinose, Xylose und Galacturonsäure. Temperaturen über 130 °C führten auch bei kurzer Hydrolysedauer, insbesondere bei Uronsäuren, zu einem überproportionalen Ausbeuteverlust. Die Hydrolyse im Thermoblock erwies sich als vorteilhaft, da die Temperatur sehr genau geregelt werden konnte und der Wärmeübergang wesentlich schneller erfolgte als im Trockenschrank.

Johannisbeerkolloide gelten als schwer hydrolysierbar. Trotz Optimierung der Hydrolysebedingungen konnte nur eine Gesamtzuckerausbeute von knapp über 50 Gew%

erreicht werden. Der Verlust entstand vermutlich durch unzureichende Hydrolysebedingungen, da nicht für jede Kolloidprobe eine Hydrolyseoptimierung durchgeführt wurde. Phenolische Verbindungen, Proteine und Mineralstoffe, die sowohl bei der Alkoholfällung als auch bei der Ultrafiltration miterfasst werden und sich trotz einiger Reinigungsschritte nicht von den Polysacchariden trennen ließen, trugen ebenfalls zu den Ausbeuteverlusten bei.

7.3.2 Chromatographische Methoden zur Zuckerbausteinbestimmung

Mit der Anionenaustauschchromatographie wurde ein weiteres, innovatives Verfahren zur Zuckerbausteinanalytik eingeführt. Als wesentlicher Fortschritt gegenüber der gaschromatographischen Bestimmung der entsprechenden Alditolacetate erweist sich die Tatsache, dass mit der HPIC und gepulstem amperometrischen Detektor, in Kombination mit einer Nachsäulenderivatisierung, die gleichzeitige Bestimmung von neutralen und sauren Zuckern mit einem Chromatographielauf möglich ist. Die Probenvorbereitung erfordert keinen zusätzlichen Derivatisierungsschritt, so dass die monomeren Zuckerbausteine direkt in der Probenlösung bestimmt werden können. Vor allem bei enzymatischen Abbauversuchen ist diese Tatsache sehr vorteilhaft und stellt eine echte Alternative zur dünnenschichtchromatographischen Zuckerbestimmung dar.

Trotz der Vorteile im Hinblick auf die Probenvorbereitung und der Erfassung von sauren Zuckern, wird die HPIC die GC als Standardverfahren zur Zuckerbausteinanalytik auf absehbare Zeit nicht ablösen, da das System noch gegenüber einer Reihe von negativen Einflussfaktoren stabilisiert werden muss. Hierbei fällt dem Fließmittel eine entscheidende Bedeutung zu. Eine sichere Trennung war nur mit absolut sauberen und sauerstofffreien Eluenten möglich, die möglichst frisch angesetzt werden sollten. Durch einen Säulenofen konnte das Problem mit schwankenden Retentionszeiten erheblich reduziert werden. Bei großen Probensequenzen kam es mit zunehmender Probenzahl zu einer Abnahme der Signalstärke des Detektors. Für die Quantifizierung war es daher notwendig, in regelmäßigen Abständen ein Standardlauf durchzuführen. Die Ursache für die Schwankungen könnte in Ladungsphänomenen zwischen Eluent und Austauschermaterial bzw. Detektor liegen.

7.4 Bestimmung des Veresterungsgrades

In der Vergangenheit wurde der Veresterungsgrad neben der unspezifischen Titrationsmethode (Deuel, 1950) häufig kolorimetrisch mit Chromotropsäure (Wood, 1971) bestimmt.

Bei der Analytik von Zellwandpolysacchariden scheitern viele klassische Methoden an der unzureichenden Verfügbarkeit von Probenmaterial. Die von Voragen et al (1986a) entwickelte HPLC-Methode erlaubt die gleichzeitige Bestimmung des Methylierungs- und des Acetylierungsgrades mit 60 mg Probenmaterial. Die Trennung von Methanol und Essigsäure ist mit der Kationenaustauschersäule in Protonenform problemlos durchzuführen. Der RI-Detektor schränkt zwar die Empfindlichkeit der Methode ein; Methanol und Acetat konnten selbst in niedrigveresterten Proben sicher quantifiziert

werden. Bei hochveresterten Pektinen konnte der Probeneinsatz sogar halbiert werden. Die Berechnung des prozentualen Veresterungsgrades steht in engem Zusammenhang mit der Bestimmung des Uronsäuregehaltes. Hohe Veresterungsgrade können durch niedrige Uronsäureausbeuten vorgetäuscht werden.

7.5 Enzymatischer Abbau von Polysacchariden

Aus einer Vielzahl von speziell auf die Beerenverarbeitung abgestimmten Enzymen wurden 8 Präparate verschiedener Hersteller zufällig ausgewählt und auf ihr Aktivitätsspektrum hin untersucht.

Alle Aktivitätstests wurden bei einheitlichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Da sich die Enzyme im Bezug auf ihre Wirkungsweise (Endo- und Exo-Enzyme) und ihr Aktivitätsoptimum (pH-Wert, Temperatur) unterscheiden, waren die gewählten Versuchsbedingungen nicht für alle Enzyme optimal. Darüber hinaus wurden die Versuche in einer Pufferlösung durchgeführt, die sich vom Substrat „Fruchtmaische“ unterscheidet. Mit der Nelson-Somogyi-Methode ist es zwar möglich, einen horizontalen Vergleich der spezifischen Nebenaktivitäten von einzelnen Handelsprodukten vorzunehmen, sie ist aber nicht geeignet, die enzymatische Abbauleistung eines Enzympräparates im Hinblick auf die, für die Praxis viel wichtigere Viskositätssenkung der Fruchtmaische durch Endo-Aktivitäten abzuschätzen. Die Methode versagt ebenfalls bei der Bestimmung der Pektinesteraseaktivität, da bei der Spaltung der Esterbindung keine reduzierenden Endgruppen entstehen.

Eine weitere sehr spezifische Methode zur Bestimmung der Exo-Aktivitäten ist die Bestimmung der Freisetzungskinetik monomerer Zucker über HPIC. Die Methode ermöglichte eine vergleichende Beurteilung der einzelnen Enzympräparate hinsichtlich der Verzuckerungsleistung im speziellen Substrat „Johannisbeerkolloide“. Die freigesetzten monomeren Zucker ließen Rückschlüsse auf das Vorhandensein oder Fehlen von Exo-Enzymaktivitäten zu. Enzymatische (Abbau-) Reaktionen können hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs abgeschätzt werden. Bei speziellen Anwendungen, wie z.B. der Stärkeverzuckerung, ist es möglich, mit der HPIC oligomere Vorstufen der Verzuckerung zu trennen und nachzuweisen.

7.6 Bestimmung von Anthocyanidin-Fingerprints in Pürees und Kolloiden

Die Farbe ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal von Buntsäften. Die individuelle Zusammensetzung der Farbstoffe ist durch die genetische Kontrolle der Anthocyan-Biosynthese frucht- und sortentypisch. Bei schwarzen Johannisbeeren sind die „Farbträger“ die beiden Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin, die als 3-Glucoside und 3-Rutinoside vorliegen.

Der qualitative Nachweis von Anthocyanen wird heute in Form von „Fingerprints“ zur Authentizitätsprüfung eingesetzt. Schwarzer und roter Johannisbeersaft lassen sich z.B. anhand der Anthocyanidin-3-Rutinoside unterscheiden. Die Quantifizierung von Anthocyanen ist schwierig. Dies liegt vor allem daran, dass monomere Anthocyanidine

durch Polymerisationsreaktionen mit zunehmendem Alter der Säfte abnehmen und die Gehalte großen Schwankungen unterworfen sind (Schmitt, 1995). Überlagerte Säfte mit abweichender Farbe enthielten keine nachweisbaren Anthocyane mehr. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der unvollständigen Extraktion von Anthocyanen aus feststoffhaltigen Probensubstanzen, wie z.B. Maischen, Trester, Pulpen und Pürees. Strigel (1995) gibt an, dass bei der schwarzen Apfelbeere durch eine zweistufige Ethanolextraktion ca. 85 % der Farbstoffe im Trester, d.h. 60 - 64 % der Gesamtfarbstoffe aus der Beere gewonnen werden können. Weiterhin hängt der Anthocyangehalt der Beeren sehr stark vom Erntezeitpunkt, dem Reifezustand, der Sorte, dem Standort und einer Reihe weiterer äußerer Einflussfaktoren ab.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Anthocyanpeaks wurde durch das Fehlen von Standardsubstanzen erschwert, so dass man die Peakflächen und Retentionszeiten auf verfügbare Standardsubstanzen (z.B. Callistephin) beziehen musste.

7.7 Durchführung von Filtrationsversuchen

Filtrationsversuche dienen dazu, die Auswirkungen von inhaltsstofflichen, physikalischen oder verfahrenstechnischen Einflüssen auf das Filtrationsverhalten eines Produktes abzuschätzen.

Die präparative Isolierung von Kolloiden aus Johannisbeersaft mittels Crossflow-Filtration dauerte auf Grund der geringen Filtrationsleistung mehrere Stunden, in Einzelfällen sogar mehrere Tage. Um eine mikrobiologische Veränderung während der Filtration zu vermeiden, musste dem Saft ein Konservierungsmittel zugesetzt werden. Die Enzymsysteme und Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen verändern die kolloidale Zusammensetzung der Säfte und verfälschen das Filtrationsergebnis. Schmitt et al (1992) konnte nachweisen, dass es bei der Vergärung von Traubensaft mit *Saccharomyces cerevisiae* neben einer Zunahme von Mannosepolymeren (Mannanproteinen) zu einer Abnahme von rhamnose-, arabinose-, galactose- und galacturonsäurehaltigen Kolloidfraktionen kommt. Eine Pasteurisation des Saftes wäre ebenfalls denkbar, wobei sich beim Erhitzen die Kolloidstruktur des Saftes verändert und eine mikrobielle Reinfektion beim Filtrieren nicht ausgeschlossen werden kann.

8 Diskussion der Ergebnisse

8.1 Die Zusammensetzung der löslichen Kolloide von Johannisbeersäften im Vergleich zu anderen Beeren- und Kernobstsaftekolloiden

Die Kolloidgehalte von schwarzen Johannisbeersäften wurden bisher nur wenig untersucht. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Johannisbeersäfte nach anderen Qualitätskriterien, wie z.B. Gesamtsäure, Vitamin C -Gehalt oder Farbe, beurteilt werden und der Polysaccharidgehalt erst in jüngster Zeit bei der Stabilitätsbewertung von Säften und Nektaren mit Hilfe des Alkoholtests Beachtung findet.

Schwarze Johannisbeeren gelten in der Praxis als problematisch zu verarbeitendes Obst. Dies hängt hauptsächlich mit den hohen Pektingehalten zusammen, die im Frischobst einen Anteil von bis zu 1,5 Gew% erreichen können (Souci et al, 1981).

Aus wirtschaftlichen Gründen ist die Herstellung von Johannisbeersaft ohne Saftenzymierung in der Praxis kaum verbreitet. Werden blanke Säfte oder Konzentrate hergestellt, ist eine Saftenzymierung sogar zwingend erforderlich. Die Maischeenzymierung führt zwangsläufig zu hohen Restpektingehalten im Saft, die mit den heute auf dem Markt befindlichen pektolytischen Enzympräparaten nicht vollständig abgebaut werden können. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Säften, die ausschließlich mit einer Maischeenzymierung hergestellt wurden, die mit der Gelfiltration gemessenen Kolloidgehalte auf über 14 g/L ansteigen. Mit der Alkoholfällung wurden auch Werte von fast 30 g/L gemessen.

Bei zweifach enzymierten Johannisbeersäften (Maische und Saft) lagen die mittels Gelfiltration bestimmten Kolloidgehalte zwischen 3 und 8 g/L. Wird die Maische mechanisch stark beansprucht, können auch Spitzenwerte von 10 g/L erreicht werden. Bei der Kolloidbestimmung durch Alkoholfällung lagen die Restkolloidgehalte zwischen 12 g/L und 16 g/L (vgl. Tab.18, S. 103).

Kolloidgehalte im „Gramm-Bereich“ werden auch noch bei Säften erreicht, deren Früchte von Natur aus sehr pektinreich sind und bei denen die Maische, ähnlich wie bei Johannisbeeren, enzymiert, erhitzt oder zumindest erwärmt wird. Hierzu zählt z.B. Brombeer- und Mahoniasaft, aber auch Zwetschgensaft und Himbeersaft, dessen Kolloidgehalt ebenfalls auf über 4 g/L ansteigen kann (Will,1994a). Dagegen sind in naturtrüben Apfelsäften im Mittel nur ca. 600 mg/L lösliche Kolloide enthalten (Zimmer, 1996). Kolloidgehalte von Apfelsäften größer 1 g/L sind entweder rohwarenbedingt oder werden durch besondere Verfahrensweisen (Totalverflüssigung, Maischeerhitzung) verursacht.

In Tabelle 22 sind die Kolloidgehalte in verschiedenen Säften zusammengefasst:

Tab. 22: Übersicht der Gehalte an löslichen Kolloiden in Säften verschiedener Herkunft (Literaturangaben)

Herkunft	Methode	n	Kolloidgehalt (mg/L)			Quelle
			max.	min.	Mittelwert	
Apfelsaft	EtOH-Fällung	37	1435	205	624,9	Zimmer, 1996
Apfelsaft	FPLC	40	1561	222	648,5	Zimmer, 1996
Apfelsaft (klar)	m-hydroxybiphenyl assay + GC	6	3800	150	1800	Schols, 1995
Aprikosensaft*	Ultrafiltration	1			796	Dietrich, 1986
Birnensaft (klar)*	Ultrafiltration	2	459	456	457,5	Dietrich, 1986
Johannisbeersaft**	Ultrafiltration	3	5300	4000	4800	Patz, 1994
Johannisbeersaft**	Ultrafiltration	1			1196,6	Dietrich, 1986
Johannisbeersaft rot**	Ultrafiltration	1			314,3	Dietrich, 1986
Himbeersaft	Ultrafiltration	3	1200	1000	1133,3	Patz, 1990
Himbeersaft*	Ultrafiltration	5	3100	2200	2560	Patz, 1990
Himbeersaft	k.A.	3	780	730	750	Will, 1993
Himbeersaft	Ultrafiltration	5	4200	1090	2764	Will, 1994a
Himbeersaft (klar)	Ultrafiltration	1			474	Schöpplein, 1989
Himbeersaft (klar)*	Ultrafiltration	1			2500	Schöpplein, 1989
Quittensaft**	Ultrafiltration	1			272	Wucherpfennig, 1986b
Sauerkirschsaft**	Ultrafiltration	1			334,3	Dietrich, 1986
Schlehensaft	Ultrafiltration	1			810	Dietrich, 1986
Stachelbeersaft**	Ultrafiltration	1			223,3	Dietrich, 1986
Traubensaft weiß	Ultrafiltration	4	404	158	299,3	Schmitt, 1992
Zwetschgensaft	Ultrafiltration	1			2690	Dietrich, 1986

* aus Konzentrat (zurückgerechnet auf Muttersaft) ** bestimmt im Nektar (umgerechnet auf Muttersaft)

Die Ursachen für die hohen Kolloidgehalte in Johannisbeersäften, wie übrigens auch für andere Beerenobstarten sind vielfältig. Schwarze Johannisbeeren enthalten von Natur aus hohe Polysaccharidgehalte, wobei mit zunehmender Reife der Gehalt an wasserlöslichen Kolloiden (vgl. Abb.24; S. 98) ansteigt. Die untersuchten Proben der Sorte „Titania“ enthielten zum Zeitpunkt der Ernte ca. 1 Gew% wasserlösliche Kolloide. Die Kolloidgehalte schwanken nach Angaben von Wucherpfennig et al (1966a,b) in Abhängigkeit von der Sorte und Zustand der Beeren sehr stark. Die Autoren fanden sortenabhängige „Reinpektinergehalte“ von 0,15 - 0,46 Gew%. Bei ähnlichen Versuchen mit Johannisbeeren der Sorten „Silvergieters“ und „Rosenthals“ ermittelten Bartholomae et al (1978) Pektingehalte bis zu 0,9 Gew%. Die unterschiedlichen Gehalte an wasserlöslichen

Kolloiden sowie an „Reinpektinen“ resultieren aus verschiedenen Bestimmungsmethoden. Es wäre noch anzumerken, dass es nach heutigem Wissensstand keine nativen „Reinpektine“ gibt, sondern vielmehr als eine rechnerische Größe der Untersuchungsmethode anzusehen ist.

Die Entsaftungstechnologie mittels Presse oder Dekanter stellt für die Polysaccharide keine Barriere dar, so dass sie in nahezu unveränderter Menge in den Saft übergehen. Darüber hinaus verursacht die etablierte Ernte- und Verarbeitungstechnik eine hohe mechanische Belastung und einen starken Energieeintrag in die Maische, wobei der weitreichende thermische und enzymatische Aufschluss des Fruchtgewebes den Übergang von Zellwandbruchstücken in den Saft zusätzlich verstärkt.

Ein weiterer Grund für die hohen Kolloidgehalte liegt auch in der bei schwarzen Johannisbeeren üblichen Nachextraktion der Maische mit Wasser. Neben Säuren, Zuckern, Mineral- und Farbstoffen werden auch lösliche Saftkolloide extrahiert. Der Kolloidgehalt des Extraktionssaftes (Saft 5.1) lag bei 7.4 g/L (umgerechnet auf $d\ 20/20 = 1,0712$) und damit zwar unter dem Kolloidgehalt von Saft 5.0 (10 g/L), aber annähernd gleich hoch wie in den Säften 2, 3, und 4 (vgl. Tab.19; S.103).

Erstaunlich ist, dass Johannisbeersäfte (Säfte 1,3,und 4) nach einer 2-stündigen Saftenzymierung einen negativen „Pektintest“ aufweisen, obwohl durch die Alkoholfällung ein Kolloidgehalt von 11,8 bis über 15 g/L ermittelt wurde. Durch die Molekulargewichtsverteilung an Superose 12 konnte gezeigt werden, dass trotz der Saftenzymierung noch „Restpektine“ mit Molekulargewichten von bis zu 100.000 Dalton übrig bleiben (vgl. Abb. 21c; S.90). Dieses Phänomen scheint auch für Säfte aus rückverdünnten Konzentraten zu gelten, wie Patz (1994) feststellte. Auch diese an sich „pektinfreien“ Säfte enthielten noch Kolloidgehalte von ca. 5 g/L.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die löslichen Kolloide aus Johannisbeersaft nach der Maische- und Saftenzymierung ca. 30 Gew% Galacturonsäure und bis zu 15 Gew% Neutralzuckern enthalten. Hierbei kommen vor allem Arabinose (< 3 Gew%), Galactose (< 3 Gew%) und Glucose (< 8 Gew%) vor. Rhamnose und Xylose war in den Rohkolloiden nur in Spuren von ca. 1 Gew% enthalten. Mannose und Fucose konnte nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren im Durchschnitt 8 Gew% Protein, bis zu 6 Gew% Mineralstoffe und ca. 5 Gew% phenolische Substanzen in Form von Farbstoffen (Anthocyanidinglycosiden), sowie ein Restwasseranteil von ca. 5 Gew% enthalten. Unaufgeklärt bleibt ein Kolloidanteil von ca. 30 Gew%.

Die Versuche konnten bestätigen, dass hohe (Poly-)galacturonsäuregehalte für Beerensäfte typisch sind. Johannisbeersäfte enthalten nach der Maischeenzymierung ca. 5 g/L Galacturonsäure, die in Form von Polygalacturonsäure in den Kolloiden enthalten ist. Will (1994a) ermittelte bei Himbeersaft nach Maischeenzymierung einen Kolloidgehalt von 2 g/L. Der Galacturonsäuregehalt der Kolloide betrug 51 Gew%, so dass theoretisch 1 g/L (Poly-)galacturonsäure in den Kolloiden enthalten ist. Durch die anschließende Saftenzymierung sank der Kolloidgehalt im Himbeersaft auf 1 g/L und der Galacturonsäuregehalt auf 250 mg/L.

Bei Johannisbeersäften konnte durch die Saftenzymierung der Gesamtkolloidgehalt zwischen 40 und 50 %Gew gesenkt werden (vgl. Saft 3, 4, und 5.0 in Tab. 19; S. 103). In den nach der Saftenzymierung, verbleibenden „Rest“-Kolloiden verringerte sich der Galacturonsäuregehalt um 7 % bzw. 12 % (vgl. Saft 3 und 4 Tab. 21, S. 110).

Auf der Seite 121 werden verschiedene Literaturangaben über die Zuckerbaustein-zusammensetzung von Apfel-, Himbeer- und Johannisbeersäften dargestellt. Die Angaben erfolgen in Gew% bezogen auf die getrocknete Einwaage. Schols (1995) rechnet die Anteile der einzelnen Zuckerbausteine auf 100 % Gesamtausbeute hoch, so dass die absoluten Zahlenwerte mit den Ergebnissen anderer Autoren nur bedingt vergleichbar sind. Die Berechnung des Rha/GalA - und des Ara/Gal -Verhältnisses wird hiervon aber nicht berührt.

Tab. 23: Zuckerbausteinzusammensetzung von löslichen Kolloiden in verschiedenen Säften (Literaturangaben)

	Gew%							Rha/GalA	Ara/Gal	Quelle
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA			
Apfel										
Presssaft mit Extraktion, enzymiert, geklärt	3	21	2	1	19	2	53	0,06	1,11	Schols, 1995
Presssaft, enzymiert, geklärt	5	21	Spuren	2	61	2	9	0,56	0,34	Schöpplein, 1989
Presssaft, enzymiert, geklärt	2	31	<1	k.A.	34	6	7	0,29	0,91	Will, 1992a
Presssaft, enzymiert, geklärt	2	18	1	2	40	8	9	0,22	0,45	Will, 1994b
Presssaft mit Maischeenzym, geklärt	4	33	2	k.A.	27	3	22	0,18	1,22	Will, 1992a
Presssaft mit Extraktion	1	12	0	k.A.	18	3	49	0,02	0,67	Will, 1990a
Presssaft mit Extraktion, Maischeenzym	4	32	4	1	15	1	52	0,08	2,13	Schols, 1995
Presssaft mit Maischeenzym	<1	15	1	siehe Xyl.	11	<1	23	n.b.	1,36	Zimmer, 1996
Presssaft mit Maischeenzym	<1	4	<1	siehe Xyl.	4	3	23	n.b.	1,00	Zimmer, 1996
Presssaft mit Extraktion, Saft aus Konz.	2	12	2	k.A.	17	4	49	0,04	0,71	Will, 1992b
Dekantersaft nach Totalverflüssigung, n=2	4	49	7	0	7	1	33	0,12	7,00	Schols, 1995
Himbeere										
Säfte aus rückverd. Konzentrat, geklärt, n=5	9	30	3	1	17	23	22	0,41	1,76	Patz, 1994
Saft, aus Konzentrat, klar	13	40	4	2	14	8	18	0,72	2,86	Schöpplein, 1991
Muttersaft, ohne Enzym, geklärt	1	10	2	k.A.	9	2	76	0,01	1,11	Will, 1994a
Muttersaft, Maischeenzym, klar	5	31	2	k.A.	10	1	51	0,10	3,10	Will, 1994a
Muttersaft, Maische-, Saftenzym, klar, n=2	6	21	3	<1	16	3	31	0,19	1,31	Patz, 1994
Muttersaft, Maische-, Saftenzym, klar	13	22	1	4	39	8	12	1,08	0,56	Schöpplein, 1991
Muttersaft, Maische-, Saftenzym, klar	8	41	3	k.A.	22	1	25	0,32	1,86	Will, 1994a
Johannisbeere										
Saft aus rückverd. Konzentrat, n=2	6	18	1	1	10	2	33	0,18	1,80	Patz, 1994
Muttersaft, Maische-, Saftenzym, n=5	2	3	n.n.	n.n.	2	1	35	0,06	1,50	Eigene Ergebnisse

Vergleicht man die Zuckerbausteinzusammensetzung der Beerenkolloide mit der von Apfelsaft, fällt zunächst auf, dass auch in den Kolloiden aus nicht enzymiertem Apfelsaft erhebliche Mengen Galacturonsäure (49 %) enthalten sind, die relativ gesehen z.T. über den Werten von Beerenkolloiden liegen. Durch die Maische- und Saftenzymierung werden die Apfelkolloide so weit abgebaut, dass der Galacturonsäuregehalt in den verbleibenden Restpektinen deutlich unter den Wert der Beerenkolloide fällt.

Das Rhamnose/Galacturonsäure-Verhältnis lässt Rückschlüsse auf die Länge der homogenen Galacturonsäureabschnitte in der Pektinhauptkette zu. Bei Himbeer- und Apfelsäften, die ohne Saftenzym hergestellt wurden, ist das Verhältnis sehr klein und deutet auf noch vorhandene längere Galacturonsäureketten hin. Sobald der Saft enzymiert wird, steigt das Rha/GalA-Verhältnis deutlich an. Eine mögliche Erklärung liegt in der depolymerisierenden Wirkung der PE/PG-Aktivitäten im Saftenzym, die zu einer verstärkten Freisetzung von Galacturonsäure führt. Die Kolloide von Johannisbeersaft enthalten nach der Saftenzymierung prozentual mehr Galacturonsäure, aber auch mehr Rhamnose, so dass sich das Rha/GalA-Verhältnis nur wenig verändert und insgesamt sehr niedrig bleibt. Absolut betrachtet sinkt durch die Saftenzymierung sowohl der Galacturonsäure- als auch der Rhamnosegehalt (siehe Tab. 21; S. 110).

Neben Galacturonsäure und Rhamnose enthalten die Apfel- und Beerenkolloide noch nennenswerte Mengen an Galactose und Arabinose. Apfelsaftkolloide enthalten mehr Galactose als Arabinose, es sei denn, die Maische wurde enzymiert, dann kehrt sich dieses Verhältnis um. Dagegen enthalten Johannisbeer- wie auch Himbeerkolloide mehr Arabinose als Galactose, so dass sich immer ein Ara/Gal-Verhältnis > 1 ergibt.

Aus den Ergebnissen der DEAE-Fraktionierung (vgl. Abb. 12 und 18) und der Zuckerbausteinanalytik (Tab. 10 und 14) lässt sich ableiten, dass native Johannisbeer- und Brombeer-Polysaccharide aus einer neutralen, mit Wasser eluierbaren Fraktion bestehen, die sich aus einem unerwartet hohen Anteil von Galacturonsäure (12 %Gew) und aus etwa gleichen Anteilen Arabinose (1,1 %Gew) sowie Galactose (1,2 %Gew) zusammensetzen. Es handelt sich vermutlich um hochveresterte homogene α -(1 \rightarrow 4)-Galacturonsäureketten, sog. „smooth-regions“, sowie um Seitenketten aus Arabanen und/oder Arabinogalactan. Neben der Wasserfraktion eluieren fast 2/3 der Kolloide mit hohen Ionenstärken, was darauf schließen lässt, dass sie auf ihrer Oberfläche geladen sind und dadurch fest an das Austauschermaterial binden. Solche Ladungen entstehen z.B. durch freie Carboxylgruppen. Durch die Molekulargewichtsverteilung an Superose 6 konnte gezeigt werden, dass diese Polysaccharide eine breite Verteilung zwischen 50.000 und 1 Mio. Dalton aufweisen. Aufgrund der Zuckerbausteinzusammensetzung (vgl. Tab. 10 und 14) kann man davon ausgehen, dass die Polysaccharide aus den für Beerenfrüchte typischen Rhamnogalacturonanen bestehen, deren Seitenketten aus hochverzweigten Arabinogalactanen (Typ II) und/ oder α -(1 \rightarrow 5)-Arabane bestehen.

Sowohl die qualitative als auch die quantitative Zusammensetzung der Beerenkolloide konnte nicht vollständig aufgeklärt werden. Bei allen Untersuchungen verblieb ein „unerklärbarer Rest“, der in Einzelfällen größer war als die Summe der aufgeklärten Zuckerbausteine und dadurch die Interpretation der Ergebnisse sehr spekulativ werden

lässt. Diesem Dilemma versucht man oft dadurch auszuweichen, dass der „unerklärbare Rest“ im Verhältnis der aufgeklärten Zuckerbausteinzusammensetzung aufgeteilt und dadurch aufgelöst wird. Dieses Verfahren ist jedoch zweifelhaft, da man davon ausgeht, dass der Rest neben Zuckern keine weiteren Stoffe enthält.

8.2 Der Einfluss der löslichen Kolloide in Johannisbeersäften auf die Verarbeitungstechnologie

8.2.1 Erntetechnik und -zeitpunkt

Früher wurden die schwarzen Johannisbeeren mit der Hand gepflückt, meist noch am gleichen Tag zum Verarbeiter transportiert und dort gekeltert. Diese Arbeitsweise gehört heute größtenteils der Vergangenheit an. Die Ursachen liegen zum einen in der Einführung der mechanischen Ernte und in der Situation auf den Rohwarenmärkten. Durch die Preisentwicklung wurden viele inländische Kleinerzeuger zur Aufgabe gezwungen, so dass sich nur noch große Erzeugerorganisationen gegen die Übermacht der Ostmärkte behaupten können. Lange Transportwege der Rohware zu den lokalen Verarbeitern waren die Folge. Um zu vermeiden, dass die Beeren verderben, hat sich das Einfrieren der erntefrischen Früchten bei Temperaturen $< -20\text{ °C}$ durchgesetzt. Die Tiefkühlagerung ermöglicht die Verschiebung des Angebots außerhalb der Erntesaison, wodurch eine ganzjährige Beerenverarbeitung möglich wird. Trotz der verminderten Enzymtätigkeit hat das Einfrieren aber dennoch Auswirkungen auf die Struktur der Beereninhaltsstoffe. Die Tatsache, dass sich eingefrorene schwarze Johannisbeeren schneller und mit weniger Enzymdosage entsaften lassen als vergleichsweise direkt verarbeitete Beeren, wurde bereits 1966a von Wucherpfennig et al dargestellt. Durch das Einfrieren kann es zu einer Veränderung der Gewebestruktur kommen, die einhergeht mit einer Veränderung der Textur oder Konsistenz. Bekannte Erscheinungen sind das Weich-, Zäh- oder Schlaffwerden von Obst und Gemüse nach dem Auftauen von Tiefkühlprodukten. Die Vermutung liegt nahe, dass Zellmembranen durch große Eiskristalle regelrecht aufgesprengt werden und so eine bessere Freisetzung des Zellsaftes ermöglicht wird. Umgekehrt sind gefrorene Beeren weniger empfindlich für den Eintrag von mechanischen Kräften, wie sie z.B. beim Quetschen und beim Fördern entstehen.

Eine Alternative zum Tiefgefrieren ist das Maischen und Kühlen der erntefrischen Beeren auf dem Feld. Der Vorteil liegt in einer weitaus einfacheren und damit kostengünstigeren Verfahrenstechnik beim Verarbeiter, da das gesamte Handling der gefrosteten Beeren entfällt und in der (wenn auch sehr verlangsamten) Wirkung fruchteigener Enzyme - Stichwort „Pektinabbau“- auf dem Transportweg. Die Befürchtung, dass es durch die lange Kontaktzeit des Saftes mit den Schalen- und Kernteilen der Beeren zu einer übermäßigen Extraktion unerwünschter phenolischer Substanzen kommt, hat sich nach mittlerweile mehrjähriger Erfahrung nicht bestätigt.

Einer der wichtigsten Faktoren - wenn nicht der entscheidende Faktor- bei der Ernte ist die Wahl des richtigen Erntezeitpunktes. Es hat sich gezeigt, dass sowohl die

Gesamtsäure als auch das Beerengewicht eine Maximumskurve durchlaufen, die ihre Scheitelpunkte etwa zum gleichen Zeitpunkt haben. In diesem nur wenige Tage dauernden Zeitraum muss die Ernte durchgeführt werden, da sonst mit qualitativen und quantitativen Einbußen zu rechnen ist (vgl. Kap. 6.3). Beispielhaft ist der Ausbeuteverlust beim Pressen von un- bzw. überreifen Johannisbeeren (Wucherpfeffner et al, 1966a).

8.2.2 Enzymatischer Pektinabbau und Saftgewinnung

In vielen Betrieben wird die Safterstellung ausschließlich nach wirtschaftlichen Gesichtspunkten beurteilt. Innovationen auf dem Gebiet der Verfahrenstechnik werden mit Einsparungen von Produktions- und Arbeitszeit gerechtfertigt, der Erfolg neuer Enzympräparate scheint (nur) dann garantiert, wenn sie zu Ausbeutesteigerungen führen oder ein Verarbeitungsverfahren überhaupt erst ermöglichen.

Ein typisches Beispiel hierfür war die Einführung der „Warm Schnellfermentierung“ in den 60er Jahren, wodurch die Herstellung von Beerenobstsäften revolutioniert wurde.

Durch die extreme inhaltsstoffliche Zusammensetzung bereiten gerade Beerenfrüchte bei der Herstellung von Fruchtsaft Probleme. Am Beispiel des Pektins wird dies besonders deutlich. Pektingehalte von bis zu 15 g/L lassen die Maische von schwarzen Johannisbeeren innerhalb kürzester Zeit gelieren, der Zellsaft (Fruchtsaft) wird in den hochmolekularen Strukturen der Polysaccharide als Hydratationswasser gebunden und lässt sich selbst bei der Anwendung höchster Pressdrücke nicht abtrennen. Wie schon erwähnt, bestehen die unter dem Begriff „Pektin“ zusammengefassten Polysaccharide in der Hauptsache aus den am Aufbau der pflanzlichen Zellwand beteiligten hochveresterten Rhamnogalacturonanen, Arabinogalactanten, Xyloglucanen, Arabanen und in geringerem Umfang auch cellulosehaltige Fragmente der Gerüstsubstanzen. Um aus solchen pektinreichen Maischen überhaupt eine vernünftige Fruchtsaftausbeute zu erzielen, muss eine kombinierte Wärme- und Enzymbehandlung durchgeführt werden.

Heute hat sich folgendes Verfahren zur Beerenverarbeitung etabliert:

1. Entrappen und Quetschen der Beeren
2. Indirekte Erwärmung der Maische (i.d.R. auf 50 °C)
3. Zusatz von abgestimmten Enzympräparaten
4. Maischestandzeit (i.d.R. < 2h)
5. Abpressen der warmen Maische

Durch die Erhitzung werden einerseits die safteigenen Enzyme inaktiviert, andererseits werden die Zellen der Beerenhaut für die Farbstoffe besser durchlässig, so dass die Farbausbeute deutlich ansteigt. Neben der verbesserten Farbausbeute hat dieses Verfahren aber auch erhebliche Nachteile. Durch die Erhitzung (bis 80 °C) werden neben den als negativ angesehenen sauerstoffübertragenden Polyphenoloxidasen auch fruchteigene pektolytische Enzyme inaktiviert, die für den Abbau hochmolekularer Pflanzeninhaltsstoffe wichtig sind. Die Säfte aus derart behandelten Maischen sind i. d. R.

sehr viskos und trubreich. Polysaccharide, wie Rhamnogalacturonane und Typ II Arabinogalactane, mit einem Molekulargewicht von 10.000 bis über 1 Mio. Dalton wirken filtrationshemmend und führen bei der Saftklärung zu erheblichen Schwierigkeiten.

Da die Forderungen nach einer vollständigen Farbstoffgewinnung und einer schnellen Entsaftung konträr zu den natürlichen Voraussetzungen der Beeren sind, kann die Lösung nur im Zusatz von mikrobiell erzeugten Enzympräparaten liegen.

Während die Verfahrenstechnik in der Vergangenheit nahezu unverändert blieb, unterliegen die Enzympräparate einem ständigen „Turn Over“. Zwar steht nach wie vor der Abbau hochmolekularer Pektine mit verschiedenen Pektinaseaktivitäten, wie Pektinesterase/Polygalacturonase, Pektin-/Pektatlyasen, im Mittelpunkt des Interesses, doch der Trend geht eindeutig in Richtung maßgeschneiderter Enzympräparate, die gezielt in die Struktur der Polysaccharide eingreifen und so die Herstellung standardisierter Halbfertigwaren ermöglichen.

Durch die Maischeerwärmung geht ein Großteil wasserlösliches und hochmolekulares Pektin der pflanzlichen Zellwand in Lösung und bindet den „freien“ Zellsaft in Form von Hydratationswasser. Es entsteht ein hochviskoses Gel. Aufgabe des Enzyms ist es, das Pektin in niedermolekulare Bruchstücke zu spalten, um eine rasche Viskositätssenkung der Maische zu bewirken und das Pressen zu ermöglichen.

Für die hohen Molekulargewichte der Kolloide sind wahrscheinlich die teilweise stark verzweigten Neutralzucker, die allgemein unter dem Begriff „Hemicellulosen“ zusammengefasst werden, verantwortlich. Hierzu zählen (Xylo-)glucane, (Galacto-)mannane und vor allem Galactane, die in Form von Typ II Arabinogalactanen häufig mit Pektinstoffen assoziiert sind. Aber auch (hoch-)verzweigte Rhamnogalacturonan-Fractionen, wie sie von Will et al (1992b) aus Apfelsaft isoliert wurden, weisen Molekulargewichte von 80.000 Dalton bis über 1 Mio Dalton auf.

Obwohl ein Großteil der hochmolekularen Kolloide bereits nach 1h abgebaut sind, zeigt die Erfahrung der Praxis, dass derart kurze Maischestandzeiten nur selten ausreichen, um ein gutes Pressergebnis zu erzielen. Unzureichend enzymatisch abgebaute Maischen haben eine typische Entsaftungscharakteristik. Der Saft läuft zunächst ohne Probleme von der Maische ab. Mit zunehmender Pressdauer steigt die Viskosität des Saftes jedoch sichtbar an und selbst bei hohem Pressdruck lässt sich die Maische nicht weiter entsaften. Die Ausbeute bleibt deutlich unter den für schwarze Johannisbeeren üblichen Werten > 85 % (v/w) zurück. Negative Auswirkungen eines zu weitreichenden oder unzureichenden Abbaus von Zellwandpolysacchariden werden nicht zwangsläufig durch ein schlechtes Pressergebnis offenkundig. Problematisch ist bei Buntsäften vor allem die Stabilisierung gegenüber Nachtrübungen im Laufe der Lagerzeit, zumal es keine verlässliche Methode gibt, um die Trübungsbereitschaft von Halb- und Fertigwaren vorauszusagen.

Bei den empfohlenen Enzymdosagen von 200 - 500 mL/ to dauert es in der Regel 2h bis der Pektinabbau in der Maische so weit fortgeschritten ist, dass der Zellsaft vollständig ablaufen kann und die Zellwände der Beerenhaut für die Farbstoffe durchlässig sind.

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass der Ablaufsaft der Presse aber immer noch Viskositätswerte von 2,5 - 5 mm²/s aufweisen und im Vergleich zu Apfelsaft (Zimmer, 1996) mehr als doppelt so hoch sind. Eine Saftenzymierung als Voraussetzung für die Stabilisierung und Filtration des Saftes ist deshalb zwingend erforderlich.

Durch Modellversuche mit nativen Johannisbeerkolloiden konnte die depolymerisierende Wirkung von acht Handelsenzympräparaten gezeigt werden. Die Ergebnisse aus den Viskositätsmessungen und der Zuckerbausteinfreisetzung haben gezeigt, dass durch die Endo-PG das Pektingerüst zwar innerhalb von einer Stunde in niedermolekulare Bruchstücke mit unterschiedlichen Strukturen und Molekularmassen zerlegt wird. In den Restpektinen waren nach 2 h Enzymierungszeit immer noch Polysaccharide mit Molekularmassen zwischen 10.000 Dalton und 100.000 Dalton enthalten (vgl. Abb. 20c), die von den Enzymen nicht weiter abgebaut werden konnten.

Eine Antwort auf die Frage, welche Enzymaktivitäten letztlich nach welchem Abbauplan in das Polysaccharidgefüge eingreifen, ist sehr spekulativ und mit vielen Fragezeichen versehen. Grundsätzlich steht die Forderung nach einem möglichst schnellen und vollständigen Pektinabbau im Mittelpunkt des Interesses. Demnach sind zur Maischeenzymierung Pektinasepräparate mit möglichst ausschließlicher pektinhydrolysierender Wirkung, wie z.B. Pektinesterase und Polygalacturonase, einzusetzen. Produkte mit cellulolytischen und hemicellulolytischen Nebenaktivitäten sind aufgrund des Eintrages von hohen Kolloidmengen in den Saft unerwünscht. Aus Gründen der Farberhaltung sind auch Pektinasepräparate mit überwiegender Pektinlyase-Aktivität oder Oxidase-Nebenaktivität hier fehl am Platz.

Die Freisetzung von Arabinose und Galactose resultiert wahrscheinlich aus dem Abbau von Arabinogalactan (Typ II ?). Ähnlich der Struktur von Himbeerpolysacchariden (Patz, 1994) könnte Arabinose vor allem in den äußeren Bereichen der Kolloide, den „Hairy Regions“ angeordnet sein. Im Hinblick auf eine β -1,6-Galactanase muss dieser Schutzmantel zuerst abgebaut werden, bevor die galactosehaltige(n) Haupt- und Seitenketten abgebaut werden.

Nach Literaturangaben (Acebes et al, 1993; Brillouet et al, 1990; Will et al, 1992b) verläuft der Abbau in zwei Stufen. Zunächst wird, durch die in den Enzympräparaten als Nebenaktivitäten enthaltenen Arabanasen bzw. Arabinosidasen, lineare und terminal gebundene Arabinose abgespalten. Zeitverzögert setzt dann die Abspaltung von Galactose aus der Haupt- bzw. Seitenkette ein. Diese Reaktion wird in der Hauptsache von exo- β -1,6- bzw. 1,3-galactanspaltenden Nebenaktivitäten katalysiert. Gelegentlich wird über den Nachweis einer endo- β -1,6-Galactanase berichtet (Acebes et al, 1993; Brillouet et al, 1990) die als Endprodukt β -1,6-Galactobiose abspaltet. Auch hier erfolgt zunächst ein weitgehender Abbau von Terminal Arabinose aus der Galactankette von Typ II-Arabinogalactanen.

Für einen weitreichenden Pektinabbau in Johannisbeersäften wäre die Verfügbarkeit einer Rhamnogalacturonase-Aktivität von großer Wichtigkeit, da rhamnosehaltige Galacturonane mit großer Wahrscheinlichkeit auch Bestandteile der Restpektine in Johannisbeersäften sind (vgl. Tab. 21, S. 110). In der Literatur wird der Einsatz eines

solchen Enzymen bei Apfelzellwandmaterial beschrieben (Schols, 1990a), ein entsprechender Hinweis auf den Einsatz in Beerenfrüchten konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Für den unvollständigen Abbau der Polysaccharide könnten, neben nicht oder nur in unzureichenden Mengen vorhandener Enzymaktivitäten, auch die Blockierung vorhandener Aktivitäten durch Beereninhaltsstoffe verantwortlich sein. Schwarze Johannisbeeren zeichnen sich durch einen hohen Gesamtphenolgehalt aus. Im Mittel enthalten Muttersäfte ca. 6 g/L Gesamtphenole, in ausgewählten Sorten sind bis zu fast 10 g/L Gesamtphenole enthalten (Dietrich et al, 2000). Es ist denkbar, dass derart hohe Polyphenolkonzentrationen die Enzyme inaktivieren oder zumindest in ihrer Struktur so verändern, dass die Wechselwirkung zwischen dem Enzymprotein und dem Substrat gestört ist. Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass phenolische Verbindungen (z.B. Anthocyane) und Mineralstoffe an Polysaccharide gebunden sind (vgl. Abb. 20, S.85 und Tab. 13, S. 80). Möglicherweise wird das Substrat durch die Bindungspartner soweit „maskiert“, dass die Katalyse am Enzymprotein nicht stattfinden kann.

8.2.3 Klärung- und Filtration

Johannisbeersäfte und -konzentrate werden fast ausschließlich als klare Produkte gehandelt oder in Verkehr gebracht. Traditionell erfolgte die Klärung nach dem enzymatischen Pektinabbau mittels Kieselgur- und Schichtenfilter nach einer Schönung mit Gelatine/Kieselsool, bei Bedarf auch mit Bentonit. Die Klärung von Buntsäften ist entweder mit qualitativen Einbußen, wie z. B. Farbverluste durch adsorbitive Schönungsmittel, verbunden oder sehr kostenintensiv, da nur sehr geringe Filtrationsleistungen erreicht werden. Leider konnte auch durch die Einführung der Crossflow-Filtration dieses Dilemma nicht beseitigt werden.

Johannisbeersäfte wurden mit verschiedenen Kombinationen von Enzympräparaten in der Maische und im Saft behandelt und sowohl statisch, als auch über Crossflow-Filtration filtriert. Die Versuchsergebnisse der statischen Membranfiltration spiegeln weitgehend die Erfahrungen der Praxis wider.

Bei ungeschönten Johannisbeersäften kommt es schon kurz nach dem Filtrationsbeginn zu einem deutlich messbaren Rückgang der Filtrationsleistung. Nach 10 min Filtrationszeit war die 0,65 µm-Membran so belegt, daß der Filtratstrom praktisch zum Erliegen kam, obwohl alle Säfte sowohl in der Maische als auch im Saft enzymiert wurden. Beim Entfernen der Membran aus dem Filterhalter konnte man auf der Membranoberseite einen gelartigen Belag erkennen, so dass die Vermutung nahe lag, dass nicht etwa ungelöste Teilchen die Membran verstopften, sondern kolloidal gelöste Substanzen des Saftes für das schlechte Filtrationsverhalten verantwortlich sind.

Ein niedriger Gesamtkolloidgehalt bedingt aber keinesfalls eine gute Filtrationsleistung, wie das Beispiel eines Saftes mit 2666 mg/L Kolloiden zeigt, der sich schlechter filtrieren ließ, als ein Saft mit einem Kolloidgehalt von 7232 mg/L. Die Vermutung, dass nicht die Menge an Kolloiden, sondern die chemische Zusammensetzung und Struktur der Polysaccharide die Filtrationseigenschaften eines Johannisbeersaftes bestimmen, wird

auch durch die Beobachtung gestützt, dass diejenigen Säfte, bei denen im Maischestadium ein mazerierendes Enzympräparat (PANZYMBE) eingesetzt wurde, deutlich schlechtere Filtrationsergebnisse erzielten, als Säfte, die mit PANZYMPPLUS behandelt wurden. Dieses Präparat besitzt nur sehr begrenzte cellulolytische und hemicellulolytische Nebenaktivitäten und soll nach Herstellerangaben nur einen sehr begrenzten Abbau der hochverzweigten Seitenketten im Pektinmolekül bewirken.

Aus der Literatur ist bekannt, dass vor allem langkettige, wenig verzweigte, β -glycosidisch gebundene Polysaccharide die Filtrationsleistung von membrangebundenen Filtrationssystemen negativ beeinflussen (Wucherpennig et al., 1984a; Meier et al., 1995; Ripperger, 1992). Zu derartigen Polysacchariden zählen z.B. β -(1 \rightarrow 6)-Glucane, β -(1 \rightarrow 4)-Xylane, Galactomanane, Rhamnogalacturonane oder Typ-II Arabinogalactane. Letztere sind vor allem Bestandteil der Restpektine aus unvollständig enzymatisch abgebauten Fruchtsaftkolloiden.

Sowohl die Zuckerbausteinverteilung als auch die Molekulargewichtsverteilung lassen den Schluß zu, dass die schlechte Filtrationsfähigkeit von Johannisbeersäften bei der Membranfiltration von Neutralpolysacchariden mit einem Molekulargewicht > 10.000 Dalton verursacht werden. Welche Substanzen dies im Einzelnen sind, müssen weitere Versuche zeigen. Forschungsarbeiten aus dem Weinbereich kamen zu dem Ergebnis, (Cameira-dos-Santos et al., 1994), dass neben reinen Polysacchariden auch Polysaccharid-Polyphenol-Verbindungen einen negativen Einfluss auf die Filtrationsleistung haben. Dies könnte auch ein Erklärungsansatz dafür sein, dass die alkalische Reinigung von Membranfiltrationsanlagen zu einer deutlichen Verbesserung der Filtrationsleistung führt.

8.3 Der Einfluss des Reifegrades auf die Zusammensetzung der Beerenkolloide

Die Reifung ist die wichtigste Veränderung der Frucht, da hiervon wichtige Qualitätskriterien entscheidend beeinflusst werden. Durch den Reifeverlauf am Baum (Strauch) werden sowohl die chemische Zusammensetzung als auch wichtige physikalische Eigenschaften der Früchte festgelegt, beispielsweise die Festigkeit oder die Farbe. Die Lager- und Transportfähigkeit ist vor allem von der Textur und der Schalenfestigkeit des Obstes abhängig. Es ist nicht ungewöhnlich, dass auch im Zusammenhang mit der Herstellung von Fruchtsaft an der Aufklärung der Reifevorgänge geforscht wird, da die Qualität des Saftes aber auch die Verarbeitungstechnologie vom Reifezustand der Früchte entscheidend beeinflusst wird.

Für die Herstellung von Fruchtsäften und -nektaren dürfen nach der EU-Richtlinie 81/487/EWG nur gesunde, nicht verdorbene Früchte in geeignetem Reifezustand verarbeitet werden. Während die Begriffe „gesund“ bzw. „nicht verdorben“ in den meisten Fällen durch das äußere Erscheinungsbild der Früchte erkennbar und auch analytisch überprüfbar sind, ist die Festlegung des geeigneten Reifezustandes ungleich schwieriger. Je nach Betrachtungsweise gibt es verschiedene Reifezustände, wie z. B. die *Pflückreife*, die *Genussreife* oder auch *überreifes Obst*, welches sehr schnell seine Textur verliert und verdirbt.

Die strukturellen Veränderungen der am Aufbau der Zellwände beteiligten Polysaccharide sind bei Äpfeln, Birnen, Tomaten und Citrusfrüchten am besten untersucht, ohne jedoch die genauen Mechanismen abschließend aufzuklären. Wahrscheinlich liegt es daran, dass die Zellwandsynthese und das Zellwachstum bis heute nur bruchstückhaft erklärt werden kann. Unklarheit besteht ebenfalls darüber, wie die biochemischen Vorgänge der intakten Zelle dargestellt werden können, da die meisten Untersuchungsmethoden destruktiv sind. Dass das Reifeverhalten von Beerenfrüchten bisher kaum untersucht wurde, könnte damit zusammenhängen, dass Beerenobst bei weitem nicht die wirtschaftliche Bedeutung hat, wie z. B. Tomaten oder Citrusfrüchte, an sich als leicht verderblich gelten und daher entweder frisch verzehrt oder verarbeitet werden. Für die Lagerung unverarbeiteter Beeren kommt nur das Einfrieren in Frage.

Da bei vielen Früchten die manuelle Ernte von der Maschinenernte abgelöst wird, ist eine Selektion hinsichtlich des Reifegrades fast unmöglich, so dass sowohl überreife als auch unreife Beeren mit ins Erntegut gelangen. Bei den Versuchen wurde daher bewusst auf eine Bonitierung des Erntegutes verzichtet, um so die maschinelle Ernte möglichst real zu simulieren. Es hat sich gezeigt, dass sich das durchschnittliche Beerengewicht bei schwarzen Johannisbeeren im Beobachtungszeitraum (70 Tage) von 0,38 g auf 0,9 g mehr als verdoppelt und dann wieder auf 0,46 g halbiert. Der Gewichtszuwachs wird durch den Aufbau von Fruchtgewebe und die Einlagerung von Wasser verursacht, der Gewichtsverlust resultiert hauptsächlich aus der Verdunstung von Wasser.

Während die Zuckerkonzentration im Verlauf der Reife fast linear von 5 °Brix auf fast 20 °Brix ansteigt, erreicht die Gesamtsäure nach 56 Tagen und 70 Tagen die Maximalwerte von über 50 g/L.

Neben der Gesamtsäure und der Zuckerkonzentration spielt die Farbe bei der Qualitätsbeurteilung von Buntsäften eine wichtige Rolle. Viele Verarbeitungsbetriebe haben in ihren Einkaufsspezifikationen Standards für „Farbwerte“ definiert. Leider konnte man sich bis heute nicht auf eine einheitliche Kennzahl einigen, so dass es momentan eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden gibt, die mehr Verwirrung hervorrufen, als dass sie aufklären. Unbestritten ist jedoch, dass das Farbmuster auf Grund der genetischen Kontrolle der Anthocyan-Biosynthese sortenspezifisch und damit für schwarze Johannisbeeren typisch ist. Solange die Beeren noch grün gefärbt waren, ließen sich keine Anthocyanidine nachweisen. Anfang Juni als sich die ersten Beeren rot färbten, konnten Anthocyanidine in den Beerenpürees nachgewiesen werden. Zuerst werden die beiden Rutinoside, ab Mitte Juni auch die beiden Anthocyanidinglycoside gebildet. Die aus der Literatur (Dietrich et al, 1994, Francis und Andersen, 1984) bekannte Rangfolge Del-3-Rut > Cya-3-Rut > Del-3-Glc > Cya-3-Glc stellt sich bereits dann ein, wenn alle 4 Glycoside nachweisbar sind. Sie wird bis zum Ende der Reifeperiode aufrechterhalten. Nach Literaturangaben enthalten schwarze Johannisbeeren 2.500 mg Anthocyane pro kg Frischfrucht (Mazza & Miniati, 1993).

Durch Alkohol-fällung wurden die Kolloide aus den 10 verschiedenen Erntechargen isoliert und in eine wasserlösliche und eine wasserunlösliche Kolloidfraktion aufgetrennt. Es hat sich gezeigt, dass sich der Gesamtkolloidgehalt im Verlauf der Reife mehr als verdoppelt und von 1,1 % zu Beginn der Reife fast linear auf 2,3 % ansteigt. Die Zunahme resultiert

zum einen aus einem nicht stetigen Anstieg von wasserunlöslichen Kolloiden und einem stetigen Anstieg von wasserlöslichen Kolloiden. Wahrscheinlich liegt der Grund für den starken Anstieg der wasserunlöslichen Kolloide zu Beginn der Reife im Beerenwachstum, da hier neben der Einlagerung von Wasser ein Aufbau von Zellwandpolysacchariden und Gerüstsubstanzen stattfindet. Die Vermutung, dass es sich bei den wasserunlöslichen Kolloiden teilweise um Gerüstsubstanzen oder zumindest an Cellulose gebundene Polysaccharide handelt, wird durch die Zuckerbausteinanalytik unterstützt. In allen *WUK*-Fraktionen (vgl. Tab. 18; S. 99) wurden weitaus höhere Gehalte an Glucose ($\approx 20\%$) und Xylose ($\approx 5\%$) gefunden als in den wasserlöslichen Fraktionen. Ebenfalls typisch für (Hemi-)Cellulosen sind die vergleichsweise geringen Gehalte ($< 10\%$) an „Pektinen“ (Galacturonsäure). Es fällt auf, dass die prozentuale Zusammensetzung der Zuckerbausteine in den *WUK*-Fraktionen fast unverändert bleibt und der Rückgang der Neutralzuckerfraktion durch den relativ starken Verlust von Galactose und Arabinose verursacht wird. Dies würde mit Ergebnissen von Martin-Cabrejas et al (1994) übereinstimmen, die einen Verlust von Arabinose während der Reife von Birnen feststellten. Die Lagerung von Weintrauben führte ebenfalls zu einem Verlust von Arabinose und Galactose, aber auch zu einem Verlust von Galacturonsäure (Micelli et al, 1995). Bei Johannisbeeren wurde dieser Verlust nur in den wasserlöslichen Kolloidfraktionen nachgewiesen, die hauptsächlich die wenig verzweigten, hochveresterten Mittellamellenpolysaccharide darstellen. De Vries et al (1984) untersuchten die strukturellen Veränderungen von Apfelpektin während der Reifung und Lagerung. Außer einer geringen Freisetzung von glucose- und xylosehaltigen Polysacchariden konnten sie keine Veränderung der Neutralzuckerzusammensetzung während der Reifung feststellen. Bei der Lagerung von Äpfeln war das anders. Hier wurde sowohl ein Abbau von Galacturonsäureketten als auch von Arabinogalactanseitenketten festgestellt. Gleichzeitig stieg auch der Anteil wasserextrahierbarer Pektine an. Dies würde sich mit den Ergebnissen bei der Reifung von schwarzen Johannisbeeren decken (vgl. Abb. 24, S.98). Für die veränderte Zusammensetzung der wasserlöslichen Fraktion im Verlauf der Beerenreife - Verlust von Galacturonsäure und Anstieg der Neutralzuckerbausteine - gibt es eine Reihe von Erklärungsansätzen, die in weiterführenden Arbeiten überprüft werden müssen:

- Entesterung von methylierter (Poly-)Galacturonsäure durch eine Pektinesterase (PE)
- Terminaler enzymatischer Abbau von Zellwandpolysacchariden durch eine Exo-Polygalacturonase (Exo-PG)
- Zufälliger enzymatischer Abbau von Zellwandpolysacchariden durch eine Endo-Polygalacturonase (Endo-PG)
- Veränderung der Ladungsphänomene in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Ionenkonzentration zwischen einzelnen wenig verzweigten und niedrigveresterten Abschnitten der Pektin (-haupt)kette in der Mittellamelle

Der Schlüssel zur Lösung der Erklärungsansätze liegt ohne Zweifel in den von Natur aus enthaltenen Enzymaktivitäten der Beerenfrüchte. Die Zusammensetzung der Enzymaktivitäten in den einzelnen Früchten ist genetisch festgelegt. So wurde z.B. bei Apfel eine Exo-D-Galacturonase nachgewiesen (Ben-Arie et al, 1979), während

Erdbeeren dieses Enzym anscheinend fehlt (Huber, 1984). Tomaten enthalten eine Endo-Polygalacturonase, dieses Enzym fehlt wahrscheinlich bei Apfel und Erdbeeren. Pectinesterase- (bei Citrusfrüchten weit verbreitet) und Cellulase-Aktivitäten scheinen bei Äpfel nur am Ende der Reife wirksam zu sein (de Vries et al, 1984). Inwieweit derartige Aktivitäten zu Beginn der Reife schon vorhanden sind, oder erst mit zunehmender Reife gebildet werden, muss noch erforscht werden.

9 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, am Beispiel von schwarzen Johannisbeeren den Einfluss eines natürlich hohen Kolloidgehaltes in den Früchten auf die Beerenverarbeitung und Safftherstellung zu untersuchen. Hierzu wurden die löslichen Kolloide von schwarzen Johannisbeeren aus verschiedenen Reife- und Verarbeitungsstufen isoliert, quantifiziert und hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung charakterisiert.

Natives Pektin aus schwarzen Johannisbeeren besteht, wie die Trennung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie gezeigt hat, aus einer schwach geladenen Fraktion, die überwiegend Neutralzuckerbausteine, wie z.B. Arabinose, Glucose und Galactose oder hochveresterte Pektine enthält und einer polaren Fraktion, in der die niedrigveresterten, galacturonsäurehaltigen Polysaccharide enthalten sind.

Das native Pektin von schwarzen Johannisbeeren enthält Kolloide, deren scheinbares Molekulargewicht weit über 1 Mio. Dalton liegen. Durch die fraktionierte Trennung der Kolloide mit Hilfe der Ultrafiltration konnte gezeigt werden, dass die hochmolekularen Pektinfraktionen (>100.000 Dalton) vor allem aus Neutralpolysacchariden (ca. 30 Gew%) aufgebaut sind, aber auch Uronsäuren (13 Gew%) enthalten. Niedermolekulare Polysaccharide (2.000 Dalton) hingegen bestehen fast ausschließlich aus Galacturonsäure (40 Gew%).

Die Johannisbeerkolloide enthalten hauptsächlich Galacturonsäure. Der Gehalt kann bis zu 26 Gew% der Gesamtzuckerausbeute betragen. Der Anteil der Neutralzuckerbausteine beträgt ca. 15 Gew%, wobei vor allem Arabinose (< 3 Gew%), Galactose (< 3 Gew%) und Glucose (< 8 Gew%) in den Polysacchariden nachgewiesen werden konnten. Rhamnose und Xylose wurde nur in Spuren < 1 Gew% gefunden. Mannose und Fucose konnte nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind in den Johannisbeerkolloiden ca. 8 Gew% Protein, ca. 6 Gew% Mineralstoffe und phenolische Substanzen, hauptsächlich Anthocyanidine, enthalten. Immerhin ein Drittel der Kolloidbestandteile konnte durch die eingesetzte Analysetechnik nicht aufgeklärt werden. Der genaue Bauplan der Polysaccharide konnte nicht aufgeklärt werden. Man kann aber davon ausgehen, dass die Kolloide aus den typischen Bestandteilen der pflanzlichen Zellwand, wie Typ II Arabinogalactan, hochverzweigte Rhamnogalacturonane, Xyloglucane und Arabane aufgebaut sind. In den Kolloiden von schwarzen Johannisbeeren wurden 3 typische Anthocyanidin-glycoside (Delphinidin-3-Glucosid, Delphinidin-3-Rutinosid, Cyanidin-3-Rutinosid) nachgewiesen. Cyanidin-3-Glucosid konnte nur im Püree, aber nicht in den Kolloiden nachgewiesen werden.

Die Johannisbeersafftherstellung durch Erwärmung der Maische auf 50°C, bei gleichzeitigem Einsatz eines Enzympräparates mit pektolytischer Leitaktivität, ist heute Stand der Technik. Bei der praxisnahen Herstellung von 5 verschiedenen Säften hat sich gezeigt, dass der Einsatz von verschiedenen Enzympräparaten weniger zu einer Veränderung von handelsüblichen Qualitätsparametern Dichte, Gesamtsäure und pH-Wert führt, als vielmehr die kolloidale Zusammensetzung verändert und damit entscheidend die „innere Qualität“ eines Saftes beeinflusst. Ziel der Enzymierung ist es,

hochverestertes Pektin (Veresterungsgrad ca. 90%) durch die Wirkung einer Pektinesterase/Polygalacturonase zu hydrolysieren und die Pressfähigkeit der Maische zu gewährleisten. Bei allen Versuchen konnte die Maische nach 2 h Standzeit abgepresst werden. Die Saftviskosität wurde innerhalb dieses Zeitraumes halbiert und betrug beim Pressen ca. 2 mm²/s.

Die Kolloidgehalte der Presssäfte lagen chromatographisch bestimmt zwischen 7 und 14 g/L und mit der Alkoholfällung etwa doppelt so hoch. Bei starker mechanischer Beanspruchung der Maische, z.B. durch Rührwerke und Pumpen, steigt der Gehalt auf über 29,5 g/L an. Trotz der hohen Kolloidgehalte war der Alkoholtest aller Säfte negativ.

Durch die Enzymierung des Presssaftes wird der Kolloidgehalt zwar mehr als halbiert, jedoch sind Restkolloidgehalte in der Größenordnung von 15 g/L eher die Regel als die Ausnahme. Generell lag der Kolloidgehalt bei Säften, die im Maischestadium mit einem stark mazerierenden Enzympräparat behandelt wurden, 2 bis 3-fach höher als bei einem Enzympräparat, das weniger cellulolytische bzw. hemicellulolytische Nebenaktivitäten besitzt.

Technische Enzympräparate für die Beerensaftherstellung enthalten neben einer viskositätssenkenden Endo-Polygalacturonase-Aktivität eine Reihe von weiteren Exo-Enzymaktivitäten, die zur Freisetzung von Arabinose, Galactose, Xylose und vor allem Galacturonsäure aus den Polysacchariden führen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die, in den Enzympräparaten enthaltenen Enzymaktivitäten nicht befähigt sind, die hochmolekularen Kolloide vollständig abzubauen. Trotz zweifacher Enzymierung verbleiben immer noch Polysaccharide mit einem Molekulargewicht von 50.000 bis 200.000 Dalton im Saft.

Falls die Verwendung eines Enzympräparates mit einem größeren Anteil an Hemicellulase-Aktivitäten angestrebt wird, darf dies nur im Saft stattfinden. In der Maische muss man sich auf ein hochdosiertes Pektinesterase/Polygalacturonase-Präparat beschränken. Obwohl „Beeren“-Enzympräparate mit einer hohen Aktivität an Pektin-esterase standardisiert werden, liegt der Veresterungsgrad nach der Maische- und Saftenzymierung immer noch deutlich über 50%.

Weder die statische Filtration noch die dynamische Crossflow-Filtration sind befähigt, kolloidreiche Säfte mit einer akzeptablen Leistung und damit wirtschaftlich und qualitätserhaltend zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass Johannisbeerkolloide mit einem Molekulargewicht von 5.000 - 20.000 Dalton bereits ab einem Kolloidgehalt von 200 mg/L deutlich filtrationshemmend wirken. Durch die Schönung des Saftes mit einer Kombination von Gelatine/ Kieselso/ Bentonit konnte die Filtrationsleistung der statischen Membranfiltration in Einzelfällen verdoppelt werden.

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Veränderung bestimmter Inhaltsstoffe bei der Reife von schwarzen Johannisbeeren gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gesamtsäure als auch der Ertrag eine mehrgipflige Funktion darstellt und sich daraus ein optimaler Erntezeitpunkt bestimmen lässt. Der Gesamtkolloidgehalt der Beeren verdoppelt sich im Lauf der Vegetationsperiode von 1,1 auf 2,3 Gew%. Der wasserlösliche Anteil am Gesamtkolloidgehalt steigt im gleichen Zeitraum von 0,4 Gew% auf 1,2 Gew%

an. Der wasserunlösliche Anteil am Gesamtkolloidgehalt unterliegt keiner eindeutigen Trendfunktion.

Bei der Zuckerbausteinzusammensetzung gab es keine besonderen Auffälligkeiten. Während der Vegetationsperiode nimmt der prozentuale Galacturonsäure- und Proteingehalt der Kolloide ab, der Neutralzuckeranteil hingegen nimmt stark zu. Durch die Zunahme des Beerengewichts nimmt der absolute Galacturonsäuregehalt der Beeren im Verlauf der Reife ebenfalls zu und kann bei der Ernte bis zu 5 g/kg betragen.

Bei den Anthocyanidinen wurden am Vegetationsbeginn erst die beiden Rutinoside nachgewiesen, dann die Glucoside. Die Anthocyanidingehalte in den Pürees stiegen während der Vegetationsperiode auf ca. 2,5 g/kg an, wobei die quantitative Rangfolge Delphinidin-3-Rutinosid > Cyanidin-3-Rutinosid > Delphinidin-3-Glucosid > Cyanidin-3-Glucosid immer erhalten blieb.

10 Literaturverzeichnis

- Acebes J.L., Zarra I. (1993)
Glycanases Associated with Cell Walls of *Cicer arietinum* L.: Arabinogalactan Degradation
Journal of Experimental Botany, **44**: 1089-1094
- Agudelo J., Suárez J. A., Olano A., Callejo M. J., Colomo M. B. (1994)
Study of the glucide fraction in ropy wines
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **199**: 26-28
- Ahmed A.E.R. und Labavitch J.M. (1977)
J. Food Biochem. **1**: 361-365
zitiert in: Schols H.A. (1995)
- Ahmed A.E.R. und Labavitch J.M. (1980)
Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit I. Cell Wall Changes in Ripening „Bartlett“ pears
Plant Physiol. **65**: 1009-1013
- Albersheim P., Nevins D.J., English P.D., Karr A. (1967)
A Method for the Analysis of Sugars in Plant Cell-Wall Polysaccharides by Gas-Liquid Chromatography
Carbohydrate Research **5**: 340-345
- Albersheim P. (1975)
The Walls of Growing Plant Cells
Scientific America **3**: 81-95
- Aspinall G. O. (1980)
Chemistry of Cell Wall Polysaccharides
In: The Biochemistry of Plants
Academic Press, Vol. 3, New York
- Belitz H.-D., Grosch W. (1992)
Lehrbuch der Lebensmittelchemie
Springer Verlag, 4. Auflage, Berlin; Heidelberg; New York
- Bacic A., Harris P.J. und Stone B.A. (1988)
Structure and Function of Plant Cell Walls
The Biochemistry of Plants **14**: 297-369
- Baron A., Calvez J. und Drilleau J.F. (1978)
Ann. Fals. Exp. Chim. **71**: 29-34
Zitiert in: Voragen A.G.J. et al. (1986a)
- Bartholomae A., Küstner M., Gierschner K. und Baumann G. (1978)
Abtrennung und quantitative Bestimmung von Pektin, Polygalacturonsäure und Monogalacturon-
säure in Säften aus Schwarzen Johannisbeeren
3. Mitteilung: Einfluß der Maischebehandlung
Die Industrielle Obst- und Gemüseverwertung **63**: 405-407

- Bartley I.M. (1976)
Changes in the Glucans of Ripening Apples
Phytochemistry **15**: 625-626
- Bartley I.M., Knee M., Casimir M.-A. (1982a)
Fruit Softening I. Changes in Cell Wall Composition and Endo-Polygalacturonase in Ripening Pears
Journal of Experimental Botany **33**: 1248-1255
- Bartley I.M., Knee M. (1982b)
The Chemistry of Textural Changes in Fruit During Storage
Food Chemistry **9**: 47-58
- Ben-Arie R., Kislev N. (1979)
Ultrastructural Changes in the Cell Walls of Ripening Apple and Pear Fruit
Plant Physiol. **64**: 197-202
- Bergmann R. (1978)
Über die Zusammensetzung selbsthergestellter schwarzer Holunderbeer-Muttersäfte
Flüssiges Obst **45**: 8-12
- Blankeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A. (1983)
A Simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis
Carbohydrate Research **113**: 291-299
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. (1973)
New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids
Analytical Biochemistry **54**: 484-489
- Brillouet J.M., Bosso C., Moutounet M. (1990)
Isolation, Purification and Characterization of an Arabinogalactan from a Red Wine
American Journal of Viticulture **41**: 29-36
- Cameira-dos-Santos P.J., Cheynier V., Brillouet, J.M., Cadot, Y., Escudier, J.L., Roesink, H.D.V., Moutounet, M. (1994)
Influence of Wine Making Technologie on the Fouling of Polymeric Mikrofiltration Membranes
Int. Symposium New Development in Filtration and Separation in the Beverage Industry, Wien
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. (1993)
Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molekular Structure with the Physical Properties of the Walls During Growth
The Plant Journal **3**: 1-30
- Cochrane G.C. (1975)
J. Chromatogr. Sci. **13**: 440-447
Zitiert in: Voragen A.G.J. et al. (1986a)

Corradini C., Cristalli A., Corradini D. (1993)
High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection of Nutritionally Significant Carbohydrates
Journal of Liquid Chromatography **16**: 3471-3485

Corradini C., Cristalli A., Corradini D. (1994)
Determination of Carbohydrates in Fruit-Based Beverages by High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)
Ital. J. Food Sci. **1**: 103-111

Darvill A., McNeil M., Albersheim P., Delmer D.P. (1980)
The Primary Cell Wall of Flowering Plants, 91-162
Zitiert in: Tolber N.E., Stumpf P.K., Conn E.E.
The Biochemistry of Plants Vol. 1, 91-162
The Plant Cell Academic Press, New York

Deuel H., Huber G. und Leuenberger R. (1950)
Über das Geliervermögen von Polygalakturonsäuremethylester
Helv. Chim. Acta **33**: 1226

Dick A.J., Labavitch J.M. (1989)
Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit
Plant Physiol. **89**: 1394-1400

Dietrich H. (1986)
Vorkommen und Zusammensetzung von in Säften gelösten Kolloiden
Internationale Fruchtsaft-Union, Sonderdruck Symposium Den Haag, 441-451

Dietrich H., Zimmer E. (1989)
Die Kolloidbestimmung von Weinen - ein Methodenvergleich
Die Wein-Wissenschaft **44**: 13-19

Dietrich H., Schmitt H., Wucherpfennig K. (1992)
Über die Veränderung der Kolloide des Mostes und des Weines im Verlauf der Weinbereitung
II. Veränderung der Ladungen und der Molekularmassenverteilung der Polysaccharide
Die Wein-Wissenschaft **47**: 87-95

Dietrich H., Krüger E., Ritter G., Rheinberger A., Langefeld B. (1994)
Beitrag zur Charakterisierung von schwarzen Johannisbeersorten im Hinblick auf die Saft- und Nektarherstellung
Seminar der Gesellschaft deutscher Chemiker über Fruchtsäfte, fruchtsafthaltige Getränke
Holzminden

Dietrich H., Krüger E., Patz C.D., Schöpplein E. (2000)
Beitrag zur Charakterisierung von schwarzen Johannisbeersorten im Hinblick auf die Saft- und Nektarherstellung
Ind. Obst-, Gemüse- und Kartoffelverarbeitung; noch unveröffentl. Manuskript

- Dittrich H. (1987)
Mikrobiologie des Weines
Ulmer Verlag, 2. Auflage, Stuttgart
- Dubourdiou D., Fournet B., Ribereau-Gayon P. (1978)
Identification du glucane secrete dans la baie de raisin par *Botrytis cinerea*
Compte rendu. Acad. Sci. Paris **286**: 229-231
- Dubourdiou D., Ribereau-Gayon P., Fournet B. (1981)
Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*
Carbohydr. Res. **93**: 294-299
- Dubourdiou D., Llaubères R.-M., Ollivier C. (1986)
Estimation rapide des constituants macromoleculaires des mouts et des vins par chromatographie liquide haute pression de tamisage moleculaire
Conn. Vigne Vin. **20**: 119-123
- Endreß H.U. (1990)
Polysaccharide in den Zellwänden höherer Pflanzen
Ind. Obst- Gemüseverw. **8**: 250-264
- Feldmann G. (1987)
Makromoleküle als Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse
Confructa Studien **31**: 62-80
- Franke W. (1981)
Nutzpflanzenkunde
Georg Thieme Verlag, 2. Auflage, Stuttgart; New York
- Francis, F.J. und Andersen O.M. (1984)
Droplet Counter Current Chromatography of Anthocyanins
J. Chromatogr. **283**: 445-448
- Friedrich G., Schuricht W. (1989)
Seltenes Kern-, Stein- und Beerenobst
Neumann Verlag, 2. Auflage, Leipzig, Radebeul
- Garleb K., Bourquin L.D., Fahey G.C. (1989)
Neutral Monosaccharide Composition of Various Fibrous Substrates: A Comparison of Hydrolytic Procedures and Use of Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detection of Monosaccharides
J. Agric. Food. Chem. **37**: 1287-1293
- Gross K. C., Wallner S.J. (1979)
Degradation of Cell Wall Polysaccharides During Tomato Fruit Ripening
Plant Physiol. **63**: 117-120
- Heredia A., Guillen R., Jimenez A., Fernandez-Bolanos J. (1993)
Review: Plant Cell Wall Structure
Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment., **32**: 113-131

Heredia A., Guillen R., Jimenez A. (1995)
Composition of Plant Cell Walls
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **200**: 24-31

Herrmann K. (1978)
Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **166**: 80-84

Herrmann K. (1992)
Über die Gehalte der hauptsächlichen Pflanzenphenole im Obst
Flüssiges Obst **59**: 66-70

Hong V., Wrolstad R.E., (1990)
Characterization of Anthocyanin Containing Colorants and Fruit Juices by
HPLC/Photodiode Array Detection
J. Agr. Food Chem. **38**: 698-708

Huber D.J. (1984)
Strawberry Fruit Softening: The Potential Roles of Polyuronides and Hemicelluloses
Journal of Food Science **49**: 1310-1315

IFU
Internationale Fruchtsaft-Union
Ringbuch „Analysen“
10, Rue de Liège F-75009 Paris

Junker R. (1994)
Einfluß von Enzymierung und Schönung auf den Kolloidgehalt bzw. die Filtrierbarkeit von
Saft aus schwarzen Johannisbeeren
Flüssiges Obst **61**: 262-265

Kaufmann A. (1993)
Übersicht und Anwendung der HPLC-Analytik von Säuren und Zucker in Wein
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **84**: 311-333

Kauschus U., Thier H.P. (1985)
Zusammensetzung der gelösten Polysaccharide von Fruchtsäften I. Orangensaft
Z. Unters. Lebensm. Forsch. **181**: 395-399

Keegstra K., Talmadge K.W., Bauer W.D., Albersheim P. (1973)
The Structure of Plant Cell Walls
Plant Physiol. **51**: 188-196

Keipert K. (1981)
Beerenobst - Angebaute Arten und Wildfrüchte
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

- Keppel H., Pieber K., Weiss J., Hiebler A. (1991)
Obstbau - Anbau und Verarbeitung
Leopold Stocker Verlag, Graz
- Kerber P. (1991)
Optimierung der Verdickungsmittelanalytik in Fruchtsäften
Diplomarbeit, Fachhochschule Wiesbaden
- Kern M., Haag R., Wucherpfennig K. (1992)
Pektinsäure: Ersatz für die Blauschönung?
Weinwirtschaft Technik, **2,3**: 22-25, 21-21
- Klockow A., Paulus A., Figueiredo V., Amado R., Widmer H:M. (1994)
Determination of Carbohydrates in Fruit Juices by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography
Journal of Chromatography A, **680**: 187-200
- Labavitch J.M., Greve L.C. (1983)
Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit
Plant Physiol. **72**: 668-673
- Lamport D.T.A., Northcote D.H. (1960)
Hydroxyproline in Primary Cell Walls of Higher Plants
Nature **188**: 665-666
- Lamport D.T.A., Epstein L. (1983)
A New Model for the Primary Cell Wall: A Concatenated Extensin-Cellulose Network
Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology **2**: 73-83
- List D., Buddruß S., Bodtke M. (1985)
Pektinbestimmung mit m-Phenylphenol
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **180**: 48-52
- Litchman M.A. und Upton R.P. (1972)
Anal. Chem. **44**: 1495-1497
Zitiert in: Voragen A.G.J. et al. (1986a)
- Llaubères R.M., Richard B., Lonvaud A., Dubourdieu D., Fournet B. (1990)
Structure of an Exucellular β -D-Glucan from *Pediococcus Sp.*, a Wine Lactic Bacteria
Carbohydr. Res. **203**: 103-105
- Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C. 1973
The structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucan from yeast cell walls
Biochem. J. **135**: 19-30
- Martin-Cabrejas M., Waldron K.W., Selvendran R.R. (1994)
Cell Wall Changes in Spanish Pear During Ripening
J. Plant Physiol. **144**: 541-548

- Massiot P., Baron A., Drilleau J.F. (1994)
Characterization and Enzymatic Hydrolysis of Cell-Wall Polysaccharides from different Tissue Zones of Apple
Carbohydrate Polymers **25**: 145-154
- Mazza G., Miniati E. (1993)
Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains
CRC Press Boca Raton, S. 97 - 102
- McCann M.C., Wells B., Roberts K. (1990)
Direct visualisation off cross-links in the primary cell wall
J. Cell Sci. **96**: 323-334
- McFeeters R.F. and Armstrong S.A. (1984)
Measurement of Pektin methylation in plant cell walls
Anal. Biochem. **139**: 212-217
- Meier, P.M., Jansen, G.P., Blazka S., Hegde R. (1995)
Investigation of Plugging Colloids on Microporous Membrane Filters
MBAA Technical Quarterly **32**: 25-33
- Meinert M.C., Delmer D.P. (1977)
Plant Physiol. **59**: 1088-1097
Zitiert in: Bacic A., Harris P.J., Stone B.A. (1988)
- Micelli A., Massignan L., Traversi D., D'Errico G., De Leo P. (1995)
Variazioni metaboliche in uva da tavola in pre and post- raccolta
Riv. Vitic. Enol., N. 1, 21-28
- Muda P., Seymour G.B., Errington N., Tucker G.A. (1995)
Compositional Changes in Cell Wall Polymers During Mango Fruit Ripening
Carbohydr. Polymers **26**: 255-260
- Nagel C. W., Schobinger U. (1985)
Untersuchungen über die Bildung von Trübungen in Apfel- und Birnensaftkonzentraten nach vorheriger Ultrafiltration
Confructa Studien **29**: 16-22
- Naohara J., Manabe M. (1994)
Molecular Mass and Solubility Changes in Pektins During Storage of Satsuma Mandarin Fruits (*Citrus unshiu* Marc.)
Journal of Food Science **59**: 578-587
- Nelson N. (1944)
A Photometric Adaption of the Somogyi Method for the Determination of Glucose
J. Biol. Chem. **153**: 375-380

- Neukom H., Amado R., Pfister M. (1980)
Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Pektinstoffe
Lebensm. Wiss. u. Technol. **13**: 1-6
- Oevelen D. v., Verachtert H. (1979)
Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*
Am. Soc. Brewing Chem., **37(1)**: 34-37
- Ough C.S., Amerine M.A. (1988)
Methods for Analysis of Musts and Wines
2: 209ff
Zitiert in: Dietrich H., Krüger E., Ritter G., Rheinberger A., Langefeld B. (1994)
- Otto K., Wittenschläger L. (1984)
Holundersaft - Über eine selten vorkommende kristalline Ausscheidung im Holundersaft
Flüssiges Obst **51**: 336-338
- Patz C.-D., Dietrich H. (1990)
Isolierung und Reinigung von Kolloiden aus Fruchtsäften
Deutsche Lebensmittel-Rundschau **86**: 210-216
- Patz C.-D., Zimmer E., Dietrich H. (1993)
Vergleichende Sacharidanalytik mit GC als Alditolacetate und HPIC
Deutsche Lebensmittel-Rundschau **89**: 1-6
- Patz C.-D. (1994)
Die Analytik von Pflanzenpolysacchariden bei der Strukturaufklärung von löslichen
Himbeerkolloiden
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Pellerin P., Waters E., Brillouet J.M. (1993)
Characterization of two Arabinogalactan-Proteins from red Wine
Carbohydrate Polymers **22**: 187-192
- Pharmacia (1983)
Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods
Rhams, Lund (Schweden)
- Preuß A. (1982)
Isolierung, Identifizierung und quantitative Bestimmung von natürlichen Dickungsmitteln in
Lebensmitteln
Dissertation, Universität Münster
- Prillinger H., Oberwinkler F., Umile C., Tlachac K., Bauer R., Dörfler C., Taufrazthofer E.
(1993)
Analysis of Cell Wall Carbohydrates (Neutral Sugars) from Ascomycetous and
Basidiomycetous Yeasts with and without Derivatization
J. Gen. Appl. Microbiol. **39**: 1-34

- Prodollet J., Bugner E., Feinberg M. (1995)
Determination of Carbohydrates in Soluble Coffee by Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection: Interlaboratory Study
Journal of AOAC International **78**: 768-782
- Redgwell R.J., Melton L.D., Brasch D.J. (1990)
Cell Wall Changes in Kiwifruit Following Post Harvest Ethylene Treatment
Phytochemistry **29**: 399-407
- Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Voragen A.G.J. (1990)
Etude Chimique et Enzymatique de la Structure de la Paroi de Pomme
Industries Alimentaires et Agricoles **5**: 341-347
- Ripperger S. (1992)
Mikrofiltration mit Membranen Grundlagen, Verfahren, Anwendungen
1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Ritter G. (1994)
Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Roberts K. (1989)
The Plant Extracellular Matrix
Curr. Op. Cell Biol. **1**: 1020-1027
- Rouse, A.H. und Atkins, C.D. (1995)
Bull. Eng. Exp. Stn. Univ. Fla. 570
Zitiert in: Voragen A.G.J. et al. (1986a)
- Saeman J.F., Bubl L.J., Harris E.E. (1954)
Quantitative Saccharification of Wood and Cellulose
Industrial and Engineering Chemistry **17.1**: 35-37
- Schindler T. (1993)
Das neue Bild der Zellwand
Biologie in unserer Zeit **23**: 113-120
- Schmitt H. (1983)
Die Kolloide des Mostes und des Weines - Untersuchung zur Abgabe kolloidaler Stoffe durch die Hefe an das Substrat
Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schmitt H., Dietrich H., Wucherpfennig K. (1992)
Über die Veränderung der Kolloide des Mostes und des Weines im Verlaufe der Weinbereitung
I. Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Polysaccharide und Proteine
Die Wein-Wissenschaft **47**: 80-86

- Schmitt, A. (1995)
Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung in Buntsäften
Lebensmittelchemie, **49**: 91
- Schöpplein E. (1989)
Biochemische und chromatographische Charakterisierung von Fruchtsaft-
Polysacchariden
unter Verwendung hochgereinigter Glycanasen
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schöpplein E., Dietrich H., Wucherpfennig K. (1991)
Isolierung und Charakterisierung von kolloidal gelösten Polysacchariden in Himbeersäften
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **193**: 1-8
- Schols H.A., Geraeds, C.C.J.M., Searle-van Leeuwen, M.F.,
Kormelink, F.J.M., Voragen A.G.J. (1990a)
Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins
Carbohydrate Research **206**: 105-115
- Schols H.A., Posthumus M.A., Voragen A.G.J. (1990b)
Structural Feature of Hairy Regions of Pektins Isolated from Apple Juice Produced by the
Liquefaction Process
Carbohydrate Research **206**: 117-129
- Schols H.A. (1991)
The Effect of the Manufacturing Method on the Characteristics of Apple Juice
Zitiert in: 't Veld W., Deelen van W., Voragen A.G.J.
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **192**: 142-148
- Schols H.A. (1995)
Structural Characterization of Pectic Hairy Regions Isolated from Apple Cell Walls
Dissertation, Agricultural University Wageningen
- Selvendran R.R. (1985)
Developments in the Chemistry and Biochemistry of Pectic and Hemicellulosic Polymers
J. Cell Sci. Suppl. **2**: 51-88
- Sinn H. (1991)
Entwicklung auf dem Sektor der mechanischen Ernte von Beerenobst
Flüssiges Obst **58**: 582-584
- Somogyi M. (1952)
Notes on Sugar Determination
J. Biol. Chem. **195**: 19-23
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. (1981)
Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen 1981/82, bearbeitet von
Scherz H., Kloos G.
Verlagsgesellschaft Stuttgart

Stow J. (1993)

Effect of Calcium Ions on Apple Fruit Softening During Storage and Ripening
Postharvest Biology and Technology **3**: 1-9

Strigl, A.W., Leitner, E., Pfannhauser, W. (1995)

Zur Bestimmung des „Farbwertes“ von Früchten und Beeren am Beispiel der Schwarzen
Apfelbeere (*Aronia melanocarpa*)
Lebensmittelchemie **49**: 103-104

Svennerholm et al, (1956)

The Quantitative Estimation of Cerebrosides in Nervous Tissue
J. Neurochem. **1**: 42-53

Tanner H., Peter U. (1978)

Chinasäure, ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung der Naturreinheit von
Heidelbeersäften und -weinen
Flüssiges Obst **45**: 82-84

Talmdage K.W., Keegstra K., Bauer W.D., Albersheim P. (1973)

The Structure of Plant Cell Walls
Plant Physiol. **51**: 158-173

Thönges H., Rinder H. (1984)

Rohwarenkunde für die Fruchtsaftindustrie
Confructa Studien **28**: 8-54

Tucker G.A., Mitchell J. (1993)

Cell walls, structure, utilization and manipulation
Plant Biotechnol., **3**, 55-103

Ullmanns (1980)

Enzyklopädie der technischen Chemie
Verlag Chemie, 4. Auflage, Weinheim

Vaart van der J. M., Caro L. H. P., Chapman J. W., Klis F. M., Verrips T. (1995)

Identification of Three Mannoproteins in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*
Journal of Bacteriology **177**: 3104-3110

VDF (1987)

RSK-Werte - Die Gesamtdarstellung
Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare
einschließlich überarbeiteter Analysenmethoden
Verlag Flüssiges Obst, 1. Auflage, Schönborn

VDF (1999)

Verband der Deutschen Fruchtsaftindustrie - Geschäftsbericht für das Geschäftsjahr
1998
Bonn

- Villetaz J.C (1979)
Untersuchung der Kolloide von Traubensaft und Weinen
Dissertation ETH Zürich
Zitiert in: Patz C.D. (1994)
- Villetaz J.C., Amado R., Neukom H. (1980)
Comparative Studies of the D-Mannans from a Rose Wine and *Saccharomyces uvarum*
Carbohydrate Research **81**: 341-344
- Villetaz J.C., Amado R. (1981)
Untersuchung der löslichen Neutral-Polysaccharidfraction von Traubensaft und Wein
Lebensm. Wiss. u. Technol. **14**: 176-181
- Voragen A.G.J., Timmers J.P.J., Linssen J.P.H., Schols H.A., Pilnik W. (1983)
Methods of Analysis for Cell-Wall Polysaccharides of Fruit and Vegetables
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **177**: 251-256
- Voragen A.G.J., Schols H.A., Pilnik W. (1986a)
Determination of the Degree of Methylation and Acetylation of Pektins by HPLC.
Food Hydrocolloids **1**: 65-70
- Voragen A.G.J., Schols H.A., Pilnik W. (1986b)
Structural Features of the Hemicellulose Polymers of Apples
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **183**: 105-110
- Voragen A.G.J., Schols H.A., Beldman G. (1992)
Maßgeschneiderte Enzyme in der Fruchtsaftindustrie
Flüssiges Obst **59**: 404-410
- Vries J.A. de, Voragen A.G.J., Rombouts F.M., Pilnik W. (1981)
Extraction and Purification of Pektins from Alcohol Insoluble Solids from Ripe and Unripe Apples
Carbohydr. Polymers **1**: 117-127
- Vries J.A. de, Rombouts F.M., Voragen A.G.J., Pilnik W. (1982)
Enzymatic Degradation of Apple Pektins
Carbohydr. Polymers **2**: 25-33
- Vries J.A. de, Voragen A.G.J., Rombouts F.M., Pilnik W. (1984)
Changes in the Structure of Apple Pectic Substances During Ripening and Storage
Carbohydrate Polymers **4**: 3-13
- Vuković R., Mrsa V. (1995)
Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall
Croatia Chemica Acta **68**: 597-605
- Waters E.J., Pellerin P., Brillouet J.M. (1994)
A Wine Arabinogalactan-Protein that Reduces Heat-Induced Wine Protein Haze
Biosci. Biotech. Biochem. **58**: 43-48

- Will F. (1990a)
Strukturaufklärung neutraler Polysaccharide aus Apfelsaft
Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Will F., Dietrich H. (1990b)
Untersuchung der Zuckerbausteine von Polysacchariden des Weines
Z. Lebensm. Unters. Forsch. **191**: 123-128
- Will F., Dietrich H. (1992a)
Einfluß der Maischeenzymierung auf den Restpektinegehalt klarer Apfelsäfte,
Auswirkungen auf den Alkoholtest
Flüssiges Obst **59**: 530-536
- Will F., Handschuh D., Dietrich H. (1992b)
Einfluß von Restpektinen auf die Cross-Flow Filtration von Apfelsaft - Ergebnisse
enzymatischer Abbauversuche
Lebensm. Wiss. u. Technologie **25**: 380-385
- Will F. (1993)
Fruchtsaftkolloide: Einfluß auf die Ultrafiltration und den Alkoholtest
Möglichkeiten zur Abreicherung in klaren Säften
Flüssiges Obst **60**: 360-364
- Will F., Dietrich H. (1994a)
Characterization of residual Pektins from raspberry juices
Carbohydrate Polymers **25**: 155-160
- Will F., Mischler M., Dörreich K. (1994b)
Pilot Scale Isolation and Separation of Apple Juice Colloids
Lebensm. Wiss. u. Technol. **27**: 292-294
- Will F., Dietrich H. (1995a)
Influence of Pectic Polysaccharides on Fruit Juice Technologie
Progress in Plant Polymeric Carbohydr., 177-180
- Will und Dietrich, 1995b
Influence of Cell Wall Polysaccharides on Fruit Juice Technology
Macromol. Symp. **99**: 103-111
- Wilson L.G., Fry J.C. (1986)
Extensin - a Major Cell Wall Glycoprotein
Plant, Cell and Environment **9**: 239-260
- Wörner K., Weinand R., Dietrich H. (1994)
Untersuchungen zur Deckschichtbildung bei der Cross Flow Filtration von Weinen
Die Wein-Wissenschaft **49**: 170-179
- Wood P.J. und Siddiqui I.R. (1971)
Anal. Biochem. **139**: 418-428
Zitiert in: Voragen A.G.J. et al. (1986a)

- Wucherpfennig K. und Bretthauer G. (1962)
Vergleichende verfahrenstechnische Untersuchungen beim Keltern von schwarzen Johannisbeeren
Flüssiges Obst **29**: 2-15
- Wucherpfennig K., Bretthauer G. und Ratzka D. (1966a)
Einfluß des Reifegrades, der Sorte und der Herkunft von schwarzen Johannisbeeren auf den Pektinabbau während der Maischefermentierung
1. Mitteilung: Reifegrad und Lagerung
Flüssiges Obst **33**: 458-465
- Wucherpfennig K., Bretthauer G. und Ratzka D. (1966b)
Einfluß des Reifegrades, der Sorte und der Herkunft von schwarzen Johannisbeeren auf den Pektinabbau während der Maischefermentierung
2. Mitteilung: Sorte und Herkunft
Flüssiges Obst **33**: 560-564
- Wucherpfennig K., Dietrich H. (1983)
Bestimmung des Kolloidgehaltes von Weinen
Lebensmitteltechnik **5**: 246-253
- Wucherpfennig K., Dietrich H., Fauth R. (1984a)
Über den Einfluß von Polysacchariden auf die Klärung und Filtrierfähigkeit von Weinen unter besonderer Berücksichtigung des Botrytisglucans
Deutsche Lebensmittel-Rundschau **80**: 38-44
- Wucherpfennig K., Dietrich H., Bänziger K. (1984b)
Einsatz der Mikro- und Ultrafiltration bei Most und Wein
Der Deutsche Weinbau **25/26**: 1140-1156
- Wucherpfennig K. (1984c)
Enzyme und Fruchtsaftherstellung
Flüssiges Obst **51**: 260-265
- Wucherpfennig K. (1986a)
In Getränken vorkommende Kolloide und ihre Bedeutung für die Filtration
Sammlung der Vorträge des H.-J. Bielig Gedenk Symposiums
- Wucherpfennig K., Dietrich H. (1986b)
Bedeutung der in Säften vorkommenden Kolloide auf die Klärung und Filtration
Internationale Fruchtsaft-Union, Wiss. Techn. Kom., Sonderdruck Symposium Den Haag
- Wucherpfennig K., Dietrich H., Kanzler K., Will F. (1987)
Herkunft, Aufbau und Molekularmassen von in Fruchtsäften und -weinen vorkommenden Kolloiden und ihre Bedeutung für die Klärung und Filtration
Confructa Studien **31**: 80-95

Wucherpfennig K., Dietrich H. (1989)

Die Bedeutung der Kolloide für die Klärung von Most und Wein

Die Wein-Wissenschaft **44**: 1-12

Wucherpfennig K., Schöpplein E. (1991)

Bedeutung fruchteigener und mikrobieller Enzyme bei der Getränkeherstellung

Flüssiges Obst **58**: 410-418

Yamaki S., Kakiuchi N. (1979)

Changes in Hemicellulose-Degrading Enzymes During Development and Ripening of Japanese Pear Fruit

Plant and Cell Physiol. **20**: 301-309

Zimmer E., Patz C.-D., Dietrich H. (1992)

Direkte Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der hochmolekularen Substanzen in Weinen und Säften

Die Wein-Wissenschaft **47**: 121-129

Zimmer E. (1996)

Zusammensetzung, physikalische Eigenschaften und Entstehung der Trubpartikel in naturtrüben Apfelsäften sowie Einfluß von Herstellungstechnologie und Rohware auf Trübung und Trübungsstabilität

Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Mein Dank gilt

vor allem Herrn Prof. Dr. H. Dietrich für die Überlassung des Themas, die fachlich und wissenschaftlich kompetente Betreuung, sowie die Beharrlichkeit und Geduld beim Fortgang der Arbeit.

Frau Prof. Dr. I. Bitsch, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Giessen, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle und materielle Förderung der Arbeit

den Firmen Gist-brocades, Gamma-Chemie, Novo Ferment, Böhringer Ingelheim und Röhm Darmstadt für die Bereitstellung der Enzympräparate. Dem Obstgut Wann, Mainz und der Firma Begerow, Langenlonsheim für die kostenlose Überlassung der schwarzen Johannisbeeren.

allen Kolleginnen und Kollegen im Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung, insbesondere Frank und Claus, Jeannette und Andreas, sowie meinen Doktorandenkollegen Guido, Oli, Carsten, Edgar, für die tatkräftige Unterstützung und die zur Freundschaft gewordene Zusammenarbeit.

Lebenslauf:

Zur Person

Name: Rainer, Michael Kressmann
Geburtstag/ -ort: 19.02.1966, in 74072 Heilbronn a./N

Schulausbildung

1972 - 1976 Grundschule in Neckarwestheim
1976 - 1982 Realschule in Lauffen
Abschluß: Mittlere Reife
1985 - 1986 Fachoberschule Heilbronn/Böckingen
Abschluß: Fachhochschulreife

Berufsausbildung

1982 - 1985 Strombergkellerei 74357 Bönningheim
Abschluß: Weinküfergeselle

1986 - 1987

Grundwehrdienst

Studium

1987 - 1991 Fachhochschule Wiesbaden
Abschluß: Diplom-Ingenieur für Getränketechnologie
1991 - 1993 Justus-Liebig-Universität Gießen
Abschluß: Diplom Oenologe

Berufstätigkeit

1991 - 1992 Ingenieur Firma Deutsche Granini, 33609 Bielefeld,
Werk Bietigheim-Bissingen
1993 - 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachgebiet Weinanalytik
und Getränkforschung der Forschungsanstalt Geisenheim
1996 -1998 Fa. Haus Rabenhorst, O. Lauffs GmbH u. Co. KG
bis Juni 1997 Abteilungsleiter „Fruchtsaftproduktion“,
ab Juli 1997 Leiter „Fruchtsaft- und Pharmaproduktion“
seit 1998 Fa. Niehoffs-Vaihinger Fruchtsäfte GmbH
Leiter Werk Lauterecken