

# **Untersuchungen zum enzymatisch-physikalischen Aufschluss von Apfeltrester**

vorgelegt von  
Diplom-Ingenieur  
Sebastian Schalow

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften  
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Lothar W. Kroh
Gutachter:	Prof. Dr. sc. techn. Bernhard Senge
Gutachter:	Prof. Dr. sc. nat. Herbert Kunzek
Gutachter:	Prof. Dr.-Ing. habil. Robert Kabbert

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13.01.2009

Berlin 2009

D 83



## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre an Eides Statt, die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbständig unter ausschließlicher Nutzung der angegebenen Quellen angefertigt zu haben.

Berlin, 20.01.2009

Sebastian Schalow

## DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Senge sowie Herrn Prof. Dr. Kunzek und Herrn Prof. Dr. Kabbert für die Betreuung dieser Arbeit und die damit verbundenen zahlreichen Hilfestellungen und anregenden Diskussionen während der Bearbeitung der Thematik.

Ich danke Herrn Dr. Köhler, Frau Dr. Röhrich und dem Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin für die Finanzierung des Forschungsstipendiums und die freie Hand bei der inhaltlichen Bearbeitung des Forschungs- und Entwicklungsprojektes „Innovatives Verfahren zur Verwertung von Obstrestern“ (Projekträger Euro-norm GmbH, finanziert durch das BMWi).

Ein besonderer Dank gebührt meinen lieben Kollegen am IASP, insbesondere Frau Tschuikowa, Frau Fitzner und Herrn Brudnachowski, für ihre ständige Unterstützung bei kleineren und größeren labortechnischen und computertechnischen Problemen. Sie haben einen sehr großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Gleiches gilt für die Dahlemer Kollegen an der TU Berlin, insbesondere Frau Kern, die immer mit Rat und Tat zu helfen wusste und der ich für die gaschromatographischen Untersuchungen danke. Desweiteren danke ich Frau Kliegel für die HPLC-Untersuchungen und ihre Ratschläge bei analytischen Fragestellungen. Frau Dr. Einhorn-Stoll danke ich für die vielen nützlichen Hinweise bei der statistischen Auswertung und für die Hinweise bei der Literaturrecherche. Ich bedanke mich darüberhinaus für die Überlassung des Sensorikraumes als Refugium für das Anfertigen der vorliegenden Arbeit.

Für die vielen Ratschläge und Diskussionrunden, die mir stets sehr hilfreich waren und Spaß bereitet haben, danke ich Herrn Prof. Dr. Westphal, Herrn Dr. Lippert und Herrn Dr. Dongowski.

Herrn Walzel von der Uni Potsdam danke ich für die Einarbeitung in die Methode der Ballaststoffbestimmung.

Herrn Dr. Schöber von der fermtec GmbH danke ich für die gaschromatographischen Untersuchungen der Destillate. Herrn Kullmann danke ich für sein offenes Ohr, die vielen Ratschläge in brennereitechnischen Angelegenheiten und die netten schweißtreibenden Nachmittage und Abende in der Obstbrennerei Kullmann in Reppinichen/Potsdam-Mittelmark.

Frau Novasch, Herrn Marchev, Herrn Slavov und Herrn Meyer danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Enzymaktivitätsbestimmungen und den Vergärungsversuchen.

Für die zahlreichen Auskünfte und Ratschläge und die Bereitstellung von Pektinmustern sowie für die Literaturhinweise danke ich Herrn Dr. Endreß, Herrn Dr. Schawaller (Herbstreith & Fox) und Herrn Dr. Schieber (Uni Hohenheim).

Für die Bereitstellung der Apfelnasstrester bedanke ich mich bei der Kelterei Wilke in Fredersdorf sowie bei der Süßmost- und Weinkelerei Schulz in Diesdorf. Für die Bereitstellung der zahlreichen Enzymmuster danke ich Frau Dr. Grassin (DSM), Herrn Dr. Dörreich (Novozymes), Herrn Urlaub (AB-Enzymes) und Herrn Dr. Gerhardt (Biopract).

Herrn Nissen von der Zelmi (TU Berlin) danke ich für die REM-Untersuchungen.

Gerd-Rainer Drescher danke ich für die mentale Unterstützung und seine hilfreichen Worte, die mich so oft auf den richtigen Weg zurückgebracht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in all den Jahren in besseren und schlechteren Situationen unterstützt und mir ständigen Rückhalt in allen Lagen gegeben hat.

## KURZFASSUNG

Apfeltrester fallen in großen Mengen als Reststoffe bei der industriellen Fruchtsaftproduktion an und können im Sinne einer rückstandsarmen Verarbeitung zur Wertstoffgewinnung eingesetzt werden. Neben der Pektinherstellung können Apfeltrester u. a. für die Alkoholerzeugung genutzt werden. Im Gegensatz zur Produktion von technischem Alkohol werden bei der Trinkalkoholherstellung jedoch höhere Anforderungen an die chemische Zusammensetzung und die sensorischen Eigenschaften der erzeugten Destillate gestellt. Apfeltrester besitzen eine Trockensubstanz von ca. 25 %, die sich zum größten Teil aus löslichen Restzuckern sowie unlöslichen Polysacchariden, darunter Cellulose, Hemicellulosen und Pektin, zusammensetzt. Die zusätzliche Nutzung von Glucose als Grundbaustein der Cellulose und potentiell vergärbare Zucker kann zu einer signifikanten Erhöhung der Alkoholausbeute führen, wenn geeignete Aufschlussverfahren zum Abbau der Zellwandpolysaccharide zur Anwendung kommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden physikalische und enzymatische Verfahrensschritte im Laborverfahren in mehreren Stufen kombiniert, um ein Maximum an Zellwandaufschluss, insbesondere der Cellulose, zu erreichen und damit die Basis für eine signifikante Alkoholausbeutesteigerung zu schaffen. Für den enzymatischen Aufschluss wurden kommerzielle, zellwandabbauende Enzympräparate, darunter Cellulasen, Cellobiasen und kombinierte pektinolytische und hemicellulolytische Präparate, eingesetzt. Die Enzyme wurden anhand der Freisetzung reduzierender Zucker, Glucose, weiterer Neutralzuckerbausteine sowie Galacturonsäure hinsichtlich ihrer Haupt- und Nebenaktivitäten gegenüber Modellsubstraten, komplexen Apfeltresterfaserpräparaten und nativen sowie säurehydrolysierten Apfelnasstrestern charakterisiert. Die Freisetzung reduzierender Zucker und Glucose aus Apfeltresterfasern durch Cellulasen wurde durch die partielle Degradation des Pektin-Hemicellulose-Netzwerkes stark begünstigt. Durch die geeignete Kombination von Pektinase und Cellulase wurden hinsichtlich der Zuckerfreisetzung in Abhängigkeit der Faserart und des eingesetzten Pektinasepräparates überadditive Wechselwirkungseffekte erzielt. Aus nativen Apfelnasstrestern konnten mit Hilfe eines komplexen Enzym-Mixes aus Cellulase, Pektinase und Cellobiase nach mechanischem Standardaufschluss und 48-stündiger Enzymeinwirkung bis zu 90 % der gesamten im Material verfügbaren Glucose freigesetzt werden, was einem Hydrolysegrad (Freisetzung unlöslicher Glucose) von 79 % entsprach. Die Anwendung zusätzlicher physikalischer Vorbehandlungsmaßnahmen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung reduzierender Zucker und Glucose, was im Fall der Hochdruckhomogenisierung auf den zusätzlichen Zerkeinerungseffekt (Partikelgrößenreduktion) und im Fall der Autoklavenbehandlung auf den veränderten physikalischen Zustand des Zellgewebes und der verbesserten Zugänglichkeit der Enzyme zu den Zellwandpolymeren zurückgeführt wurde. Die Erhöhung des Tresteranteils in den Versuchsansätzen führte zu einer verzögerten Viskositätsabnahme und - bezogen auf die Trockensubstanz - zu einer reduzierten Glucosefreisetzung. Durch die simultane Verflüssigung, Verzuckerung und Vergärung nativer Apfelnasstrester konnten nach mechanisch-enzymatischem Voraufschluss Alkoholausbeuten von über 81 % erzielt werden, was einem Hydrolysegrad von über 55 % entsprach. Die erzeugten Destillate wiesen typische Gärungsnebenproduktprofile auf, enthielten jedoch große Mengen an Methanol. Die Verwendung säurehydrolysierter Trester führte zu einer weiteren Erhöhung der Hydrolysegrade. Die Methanolgehalte in den resultierenden Destillaten waren jedoch stark erhöht.

In den vergorenen und abdestillierten Trestern reichern sich unterschiedliche Mengen an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen sowie Polyphenole an, die durch geeignete Aufarbeitungsschritte als funktionelle Lebensmittelkomponenten genutzt werden könnten.

## ABSTRACT

Apple pomace is generated to a great extent as a waste material in industrial fruit juice production and can be utilised as a potential recyclable. Amongst others, e. g. pectin recovery, apple pomace can be used for alcohol production. Unlike technical alcohol, the production of potable spirits needs to consider requirements regarding chemical composition and sensory parameters of the distillates.

Apple pomace averages about 25 % of dry substance, which is mainly composed of residual soluble sugars and insoluble polysaccharides, like cellulose, hemicelluloses and pectin. The additional utilisation of glucose as the cellulosic basic module and a potential fermentable sugar can lead to a significant increase of alcohol yield if suitable disintegration steps are used for decomposing cell wall polymers.

In this context, physical and enzymatical procedures have been combined in laboratory scale to reach a maximum in cell wall decomposition, particularly with regard to cellulose, and with that significantly increase alcohol yield. Commercial cell wall degrading enzymes, like cellulases, cellobiases and combined pectinolytic and hemicellulolytic enzymes were used for enzymatic degradation. They were systematically characterised regarding their main and side activities towards model substrates, complex apple pomace fibre preparations as well as towards native and acid-hydrolysed wet apple pomace.

The release of total reducing sugars and glucose from fibre preparations by cellulases was favoured by the partial degradation of the pectin-hemicellulose network. The combination of pectinases and cellulases led to synergistic interactions regarding sugar release depending on type of fibre preparation and type of pectinase applied. A complex mixture of cellulase, cellobiase and pectinase was able to reach a release of up to 90 % of total glucose from native apple pomace which corresponded to a degree of hydrolysis of 79 % after mechanical pretreatment and 48 h of enzyme treatment.

The application of additional physical treatments significantly affected the release of total reducing sugars and glucose, presumably due to additional particle size reduction in the case of high pressure homogenisation as well as due to the altered physical state and the improved accessibility of enzymes by autoclaving treatment. Increasing the amount of apple pomace in the test batches led to a delayed decrease in pomace viscosity and reduced glucose release.

Simultaneous liquefaction, saccharification and fermentation of native apple pomace led to more than 81 % of alcohol yield after mechanical pretreatment which came up to a degree of hydrolysis of more than 55 %. The resulting distillates exhibited typical aroma profiles but methanol contents were rather high. Utilising acid-hydrolysed apple pomace yielded in even increased degrees of hydrolysis but also even higher methanol contents were found in the resulting distillates compared with those from native pomace.

Different amounts of soluble and insoluble dietary fibre as well as total polyphenolics were enriched in fermented and distilled apple pomace which could be potentially finished to functional food constituents.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>III</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>IV</b>
<b>KURZFASSUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE UND INDIZES.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 AUFGABEN- UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>3 THEORETISCHE ASPEKTE.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Apfeltrester.....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Apfeltrester als Reststoff der Fruchtsaftgewinnung.....	3
3.1.2 Zusammensetzung .....	4
3.1.3 Verwertungsmöglichkeiten.....	6
3.1.3.1 Pektin .....	7
3.1.3.2 Zellwandmaterialien, Ballaststoffpräparate.....	8
3.1.3.3 Polyphenole.....	8
3.1.3.4 Ethanol .....	9
3.1.3.5 Weitere Anwendungen.....	10
<b>3.2 Struktur pflanzlicher Zellwände und Zellwandabbau.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Zellwandstruktur .....	11
3.2.2 Zellwandabbau durch physikalische Verfahren .....	14
3.2.2.1 Konventionelle mechanische und thermische Verfahren.....	14
3.2.2.2 Ultraschall, gepulste elektrische Felder, hohe statische Drücke und überkritische Fluide.....	15
3.2.2.3 Autoklavieren .....	16
3.2.2.4 Hochdruckhomogenisieren .....	17
3.2.3 Zellwandabbau durch chemische Verfahren .....	17

3.2.4	Zellwandabbau durch enzymatische Verfahren.....	19
3.2.4.1	Zellwandabbauende Enzyme (Pektinasen, Hemicellulasen und Cellulasen).....	19
3.2.4.2	Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung .....	21
3.2.5	Enzymeinsatz bei der Verarbeitung von Obst und Gemüse und anderer pflanzlicher Materialien .....	22
<b>3.3</b>	<b>Verarbeitung von Obst zu Trinkalkohol (Obstbrennerei) .....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Vorbereitung und Vergärung von Kernobstmaischen.....	24
3.3.2	Destillation/Rektifikation vergorener Obstmaischen .....	26
3.3.3	Besonderheiten bei der Verarbeitung von Kernobstrestern .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>28</b>
4.1.1	Apfeltrester .....	28
4.1.1.1	Apfeltrester frisch (Apfelnasstrester) .....	28
4.1.1.2	Apfeltresterfasern (als Vergleichsubstrate) .....	28
4.1.1.3	Apfeltrester getrocknet.....	29
4.1.1.4	Apfeltrester säurehydrolysiert .....	29
4.1.1.5	Apfeltrester vergoren .....	30
4.1.1.6	Apfeltrester vergoren und abdestilliert.....	30
4.1.2	Modellsubstrate .....	30
4.1.2.1	Cellulosen.....	30
4.1.2.2	Hemicellulosen .....	30
4.1.2.3	Pektine .....	30
4.1.3	Enzyme.....	30
4.1.3.1	Cellulasen.....	30
4.1.3.2	Pektinasen und kombinierte Präparate .....	31
4.1.4	Hefen.....	32
<b>4.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
4.2.1	Enzymaktivitätsbestimmungen.....	32
4.2.1.1	Versuche mit Modellsubstraten .....	32
4.2.1.2	Versuche mit Apfeltresterfasern.....	34
4.2.2	Physikalischer Aufschluss von Apfeltrester .....	34
4.2.2.1	Standardaufschluss .....	34
4.2.2.2	Ultraschallbehandlung .....	35
4.2.2.3	Autoklavieren.....	35
4.2.2.4	Hochdruckhomogenisierung .....	35
4.2.3	Partikelgrößenbestimmung physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester .....	36

4.2.3.1	Siebfraktionierung.....	36
4.2.3.2	Scanning und Bildanalyse.....	37
4.2.3.3	Laserpartikelanalyse.....	37
4.2.3.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	38
4.2.4	Enzymierung physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester.....	38
4.2.4.1	Materialvorbereitung.....	38
4.2.4.2	Versuchsdurchführung.....	38
4.2.4.3	Enzymdosierung.....	38
4.2.4.4	Bestimmung reduzierender Zucker und Glucose.....	39
4.2.4.5	Bestimmung weiterer Zuckerbausteine mittels HPLC.....	40
4.2.4.6	Rheologische Untersuchungen.....	41
4.2.4.7	Nachweis der Saccharose-Inversion.....	41
4.2.5	Enzymierungsversuche mit variierendem Tresteranteil im Ansatz.....	42
4.2.5.1	Versuchsdurchführung.....	42
4.2.5.2	Zuckerbestimmung und rheologische Untersuchungen.....	42
4.2.6	Vergärungsversuche mit Apfeltrester.....	43
4.2.6.1	Materialvorbereitung.....	43
4.2.6.2	Vergärung der Ansätze.....	44
4.2.6.3	Destillation der Ansätze, Ausbeuteberechnung, Methanol und Gärungsnebenprodukte.....	45
4.2.7	Aufarbeitung von Brennereischlempen.....	48
4.2.7.1	Materialvorbehandlung.....	48
4.2.7.2	Fraktionierung durch Nasssieben.....	48
4.2.8	Materialcharakterisierung.....	49
4.2.8.1	Bestimmung der Trockensubstanz.....	49
4.2.8.2	Bestimmung von unlöslicher und löslicher Trockensubstanz.....	49
4.2.8.3	Bestimmung der Neutralzucker mittels GC.....	49
4.2.8.4	Bestimmung löslicher Zucker (gesamt).....	50
4.2.8.5	Bestimmung löslicher Zucker (frei verfügbar).....	51
4.2.8.6	Bestimmung von Stärke.....	51
4.2.8.7	Bestimmung von Protein.....	51
4.2.8.8	Bestimmung von Asche.....	52
4.2.8.9	Bestimmung des Galacturonangehaltes.....	52
4.2.8.10	Bestimmung des Veresterungsgrades.....	53
4.2.8.11	Bestimmung von Ballaststoffen.....	53
4.2.8.12	Bestimmung von Polyphenolen.....	54
4.2.9	Statistik.....	55
4.2.9.1	Durchschnittliche absolute Mittelwertabweichung.....	55
4.2.9.2	Multifaktorielle Varianzanalyse.....	55

<b>5</b>	<b>AKTIVITÄTEN ZELLWANDABBAUENDER ENZYME GEGENÜBER MODELLSUBSTRATEN UND APFELTRESTERFASERN .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Enzymaktivitäten gegenüber Modells substraten .....</b>	<b>56</b>
5.1.1	Enzymaktivitäten anhand der freigesetzten, reduzierenden Endgruppen .....	56
5.1.1.1	Cellulolytische Aktivitäten .....	56
5.1.1.2	Hemicellulolytische Aktivitäten .....	57
5.1.1.3	Pektinolytische Aktivitäten .....	57
5.1.2	Enzymaktivitäten anhand der Viskositätsabnahme .....	58
<b>5.2</b>	<b>Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern .....</b>	<b>61</b>
5.2.1	Zusammensetzung von Apfeltresterfasern .....	61
5.2.2	Enzymaktivitäten anhand der freigesetzten, reduzierenden Endgruppen und der Freisetzung von Glucose .....	62
<b>5.3</b>	<b>Zusammenfassende Wertung .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>ENZYMATISCH-PHYSIKALISCHER AUFSCHLUSS ZUR VERFLÜSSIGUNG UND VERZUCKERUNG VON APFELTRESTERN.....</b>	<b>67</b>
<b>6.1</b>	<b>Zusammensetzung von Apfeltrestern .....</b>	<b>67</b>
<b>6.2</b>	<b>Enzymatische Verflüssigung und Verzuckerung nach mechanischem Standardaufschluss .....</b>	<b>69</b>
6.2.1	Ermittlung der optimalen Enzymvariante .....	69
6.2.2	Einfluss der mechanischen Vorzerkleinerung und der Enzymkonzentration auf die Zuckerfreisetzung .....	75
<b>6.3</b>	<b>Einfluss zusätzlicher physikalischer Aufschlussvarianten auf die Verflüssigung und Verzuckerung .....</b>	<b>77</b>
6.3.1	Partikelgröße und Partikelstruktur physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester .....	77
6.3.1.1	Partikelgrößenverteilungen physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester .....	77
6.3.1.2	Laserpartikelanalyse (LPA) .....	78
6.3.1.3	Rasterelektronenmikroskopie .....	79
6.3.2	Zuckerfreisetzung nach physikalischem Voraufschluss .....	80
<b>6.4</b>	<b>Versuche zur Optimierung des mechanisch-enzymatischen Aufschlusses .....</b>	<b>84</b>
6.4.1	Kombination von mechanischen und enzymatischen Prozessschritten im mehrstufigen Laborverfahren .....	84
6.4.2	Einfluss der Tresterverdünnung auf die Zuckerfreisetzung und die Viskosität während der Verflüssigung und Verzuckerung .....	85
<b>6.5</b>	<b>Zusammenfassende Wertung .....</b>	<b>88</b>

<b>7</b>	<b>SIMULTANE VERFLÜSSIGUNG, VERZUCKERUNG UND VERGÄRUNG VON APFELNASSTRESTER IM LABORMAßSTAB.....</b>	<b>89</b>
7.1	<b>Vergärungsversuche mit nativen Apfeltrestern .....</b>	<b>89</b>
7.1.1	Einfluss des Enzymeinsatzes.....	89
7.1.2	Einfluss der Enzymkonzentration und der Trestervorbehandlung .....	90
7.1.3	Einfluss des Enzymzugabezeitpunktes und der Enzymkombination .....	92
7.1.4	Gärungsnebenprodukte in Labordestillaten aus nativen Apfeltrestern.....	94
7.2	<b>Vergärungsversuche mit säurehydrolysierten Apfeltrestern.....</b>	<b>95</b>
7.2.1	Zusammensetzung säurehydrolysierter Apfeltrester .....	95
7.2.2	Einfluss der Hydrolysebedingungen auf die wichtigsten Vergärungsparameter .....	96
7.3	<b>Zusammenfassende Wertung .....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>BALLASTSTOFFE UND POLYPHENOLE IN NATIVEN, VERGORENEN UND ABDESTILLIERTEN APFELTRESTERN.....</b>	<b>99</b>
8.1	<b>Ballaststoffe, Neutralzuckerzusammensetzung und Polyphenolgehalte in den Laborsubstraten.....</b>	<b>99</b>
8.1.1	Ballaststoffe und Neutralzuckerzusammensetzung.....	99
8.1.2	Polyphenole.....	101
8.2	<b>Möglichkeiten zur Isolierung von Ballaststoffen und Polyphenolen aus abdestillierten Apfeltrestern (Brennereischlempen).....</b>	<b>102</b>
8.2.1	Hintergrund und Zielstellung .....	102
8.2.2	Nassfraktionierung von Apfeltresterschlempen .....	102
8.2.3	Ballaststoffe und Polyphenole in den Schlempefraktionen .....	103
8.3	<b>Zusammenfassende Wertung .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>WEITERFÜHRENDE ARBEITEN.....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>108</b>
<b>11</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>112</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>127</b>
12.1	Proteingehalte in kommerziellen Enzympräparaten .....	127
12.2	Vergleich der Glucosegehalte ermittelt über enzymatische TFA-Hydrolyse und zweistufige schwefelsaure Hydrolyse.....	128

<b>12.3 Ergänzungen zum enzymatisch-physikalischen Aufschluss von Apfelnasstrestern.....</b>	<b>129</b>
12.3.1 Nachweis der Saccharose-Inversion während der Aufarbeitung der enzymierten Apfeltrester .....	129
12.3.2 HPLC-Chromatogramme - Zuckerstandards .....	130
12.3.3 Zuckerfreisetzung aus Apfelnasstrestern .....	131
<b>12.4 Zerkleinerungsversuche mit Apfeltrester .....</b>	<b>133</b>
12.4.1 Mikroskopische Aufnahmen hochdruckhomogenisierter Apfeltrester .....	133
12.4.2 REM-Aufnahmen zerkleinerter Apfeltrester .....	134
12.4.3 Relative Partikelgrößenhäufigkeiten nach physikalischem Voraufschluss .....	135
<b>12.5 pH-Werte während der Vergärung von Apfeltrester.....</b>	<b>136</b>
<b>12.6 Statistische Auswertungen (ANOVA) .....</b>	<b>137</b>
12.6.1 Statistik – Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern.....	137
12.6.2 Statistik – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester .....	140
12.6.2.1 Standardaufschluss .....	140
12.6.2.2 Physikalische Vorbehandlung .....	143
<b>PRÄSENTATIONEN UND VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>145</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>146</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Schema der Fruchtsaftherstellung aus Kernobst, vereinfacht nach [31] .....	3
Abb. 2:	Massenströme von der Apfelernte bis zum Apfelnasstreter (% FS) [2] .....	4
Abb. 3:	Zellwandmodell nach [38].....	11
Abb. 4:	Zellwandmodell nach [111].....	11
Abb. 5:	Schematischer Aufbau von Zellwandpektinen nach [115].....	12
Abb. 6:	Schema zur Herstellung von ZM, vereinfacht nach [127].....	14
Abb. 7:	Extraktionsschema für Zellwandpolysaccharide nach [10, 45].....	18
Abb. 8:	Wirkungsmechanismen pektinolytischer Enzyme leicht modifiziert nach [100] .....	20
Abb. 9:	Prinzip der Gegenstromdestillation (Rektifikation) [210] .....	26
Abb. 10:	Herstellungsschema für Apfeltresterfasern.....	28
Abb. 11:	Kinetik der Viskositätsabnahme – Modell 1. Ordnung (Microcal Origin 6.0).....	33
Abb. 12:	Zerkleinerte Apfeltresterpartikel nach Scannen und automatischer Partikeldetektion.....	37
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Freisetzung löslicher und unlöslicher (gebundener) Glucose aus Apfelnasrestern. (a) vor Enzymeinwirkung, (b) nach Enzymeinwirkung .....	39
Abb. 14:	Schema der Trester/Wasser-Verhältnisse (Massenverhältnisse).....	42
Abb. 15:	Versuchsapparatur für Vergärungsversuche .....	44
Abb. 16:	Schematische Darstellung der Anteile vergärbare Zucker im Gäransatz vor (a) und nach (b) der alkoholischen Vergärung .....	46
Abb. 17:	Cellulolytische Aktivitäten .....	56
Abb. 18:	Hemicellulolytische Aktivitäten .....	57
Abb. 19:	Pektinolytische Aktivitäten .....	57
Abb. 20:	Viskositätsabnahme in CMC-Lösungen durch Cellulasen.....	59
Abb. 21:	Viskositätsabnahme in Pektin-Lösungen (HV-Pektin) durch Pektinasen und kombinierte Präparate .....	60
Abb. 22:	Aktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern – Enzyme einzeln .....	62
Abb. 23:	Glucosefreisetzung aus Apfeltresterfasern – Enzyme einzeln .....	62
Abb. 24:	Relative Glucosefreisetzung [%] aus Apfeltresterfasern nach enzymatischer Behandlung.....	63
Abb. 25:	Aktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern – Enzyme kombiniert .....	63
Abb. 26:	Glucosefreisetzung aus Apfeltresterfasern – Enzyme kombiniert .....	63
Abb. 27:	Frei verfügbare Zucker in Apfeltrestern der Chargen 2004 und 2005 .....	68
Abb. 28:	Freisetzung reduzierender Zucker nach 0, 4 und 24 h.....	69
Abb. 29:	Freisetzung von Glucose nach 0, 4 und 24 h.....	70
Abb. 30:	Freisetzung von Cellobiose nach 0, 4 und 24 h.....	71
Abb. 31:	Freisetzung von Galacturonsäure nach 0, 4 und 24 h .....	72
Abb. 32:	pH-Wert-Verlauf während des enzymatischen Abbaus von Apfeltrester .....	73
Abb. 33:	Freisetzung von Arabinose nach 0, 4 und 24 h.....	73
Abb. 34:	Viskositätsverlauf während des enzymatischen Abbaus von Apfeltrester (Enzymkombination II).....	74
Abb. 35:	Freisetzung von Glucose nach Grob- und Feinaufschluss von Apfeltrester in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (PEC/CFD/NZ).....	76
Abb. 36:	Relative Massenhäufigkeitsverteilungen von Apfeltresterpartikeln (0 – 1 mm ermittelt über LPA, 1 - >5 mm ermittelt über Bildanalyse).....	77

Abb. 37:	Volumensummenverteilungen von Apfeltresterpartikeln < 1 mm .....	78
Abb. 38:	REM-Aufnahme zerkleinerter Apfeltrester (Standard).....	79
Abb. 39:	REM-Aufnahme zerkleinerter Apfeltrester (US) .....	79
Abb. 40:	REM-Aufnahme zerkleinerter Apfeltrester (AK) .....	80
Abb. 41:	REM-Aufnahme zerkleinerter Apfeltrester (HOM 12D) .....	80
Abb. 42:	Freisetzung reduzierender Zucker nach physikalischem Voraufschluss .....	80
Abb. 43:	Freisetzung von Glucose nach physikalischem Voraufschluss .....	81
Abb. 44:	Schema des mechanisch-enzymatischen Aufschlusses von Apfeltrestern verschiedener Verdünnungsstufen .....	84
Abb. 45:	Freisetzung reduzierender Zucker aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Feuchtsubstanz .....	85
Abb. 46:	Freisetzung reduzierender Zucker aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Trockensubstanz .....	85
Abb. 47:	Freisetzung von Glucose aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Feuchtsubstanz.....	85
Abb. 48:	Freisetzung von Glucose aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Trockensubstanz.....	85
Abb. 49:	Viskositätsabnahme in Apfeltrestern verschiedener Verdünnungsstufen.....	86
Abb. 50:	Apfeltrester nativ (a), nach Grobaufschluss (b), nach Feinaufschluss (c) und nach Feinstaufschluss (d).....	87
Abb. 51:	Alkoholausbeute nach der Vergärung von Apfeltrestern unterschiedlicher Verdünnung mit und ohne Enzymeinsatz .....	89
Abb. 52:	Zuckerkonzentration in Apfeltrestern während der Vergärung mit und ohne Enzym .....	90
Abb. 53:	Alkoholausbeute in Abhängigkeit der Trestervorbehandlung und der Enzymkonzentration.....	91
Abb. 54:	Glucosekonzentration und gebildetes Gasvolumen (kumulativ) in Abhängigkeit der Trestervorbehandlung und der Enzymkonzentration .....	91
Abb. 55:	Vergärungsparameter in Abhängigkeit von Enzymvariante und Zugabezeitpunkt.....	92
Abb. 56:	Glucosekonzentration und gebildetes Gasvolumen (kumulativ) in Abhängigkeit von Enzymvariante und Zugabezeitpunkt.....	93
Abb. 57:	Glucosekonzentration und gebildetes Gasvolumen (kumulativ) in nativen und säurehydrolysierten Apfeltrestern .....	96
Abb. 58:	Vergärungsparameter für native und säurehydrolysierte Apfeltrester .....	97
Abb. 59:	Ballaststoffgehalte in nativen, vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern .....	99
Abb. 60:	Neutralzuckerzusammensetzung in nativen, vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern.....	100
Abb. 61:	Polyphenolgehalte in nativen, vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern .....	101
Abb. 62:	Schlempfraktionen nach Nasssiebung ohne Ultraturrax-Behandlung (bezogen auf Trockensubstanz).....	102
Abb. 63:	Schlempfraktionen nach Nasssiebung mit Ultraturrax-Behandlung (bezogen auf Trockensubstanz).....	103
Abb. 64:	Ballaststoffe und Polyphenole in verschiedenen Schlempfraktionen .....	103
Abb. 65:	Proteingehalte von Enzymlösungen (n = 4) .....	127
Abb. 66:	Invertzuckergehalte von Apfeltrester vor und nach Enzyminaktivierung (n = 4) ...	129
Abb. 67:	HPLC-Chromatogramm der Zuckerstandards .....	130

Abb. 68:	HPLC-Chromatogramm der Zuckerstandards und Peak-Überlappung durch Fructose .....	130
Abb. 69:	Freisetzung (summiert) verschiedener Zucker in Abhängigkeit der Zeit und der Enzymkombination .....	131
Abb. 70:	Freisetzung verschiedener Zucker aus Apfeltrester nach Standard-Aufschluss und nach 12 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator .....	131
Abb. 71:	Freisetzung reduzierender Zucker nach Grob- und Feinaufschluss von Apfeltrester in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (PEC/CFD/NZ) .....	132
Abb. 72:	Mikroskop-Aufnahme – Apfeltrester nach 4 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator.....	133
Abb. 73:	Mikroskop-Aufnahme – Apfeltrester nach 8 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator.....	133
Abb. 74:	Mikroskop-Aufnahme – Apfeltrester nach 12 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator.....	133
Abb. 75:	REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Standardaufschluss .....	134
Abb. 76:	REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Ultraschallbehandlung .....	134
Abb. 77:	REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Autoklavenbehandlung .....	134
Abb. 78:	REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Hochdruckhomogenisieren (12 D) .....	134
Abb. 79:	Partikelgrößenhäufigkeiten (einzeln) nach Aufschlussvarianten* .....	135
Abb. 80:	pH-Wert-Verläufe während der Vergärung von nativen und säurehydrolysierten Apfeltrestern.....	136
Abb. 81:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Faserart auf die Aktivität (n = 96) .....	138
Abb. 82:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzymkombination auf die Aktivität (n = 96).....	138
Abb. 83:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzympräparate auf die Aktivität (n = 96).....	138
Abb. 84:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzympräparate auf die Aktivität (n = 96).....	138
Abb. 85:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf die Aktivität (n = 96)..	138
Abb. 86:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzympräparate und der Enzymkombination auf die Aktivität (n = 96).....	138
Abb. 87:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Faserart auf den Glucosegehalt (n = 96) .....	139
Abb. 88:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzymkombination auf den Glucosegehalt (n = 96) .....	139
Abb. 89:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzympräparate auf den Glucosegehalt (n = 96).....	139
Abb. 90:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzympräparate auf den Glucosegehalt (n = 96) .....	139
Abb. 91:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf den Glucosegehalt (n = 96) .....	139
Abb. 92:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzympräparate und Enzymkombination auf den Glucosegehalt (n = 96) .....	139
Abb. 93:	Mittelwertdiagramm – Einfluss des Enzyms auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144).....	141
Abb. 94:	Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Enzymkombination auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144) .....	141
Abb. 95:	Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144) .....	141

Abb. 96: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144) .....	141
Abb. 97: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144) .....	141
Abb. 98: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzymkombination und Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144) .....	141
Abb. 99: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Enzyms auf den Gehalt an Glucose (n = 144) .....	142
Abb. 100: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Enzymkombination auf den Gehalt an Glucose (n = 144) .....	142
Abb. 101: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf den Gehalt an Glucose (n = 144) .....	142
Abb. 102: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 144) .....	142
Abb. 103: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 144) .....	142
Abb. 104: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzymkombination und Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 144) .....	142
Abb. 105: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Aufschlusses auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 72) .....	144
Abb. 106: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Aufschlusses auf den Gehalt an Glucose (n = 72) .....	144
Abb. 107: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 72) .....	144
Abb. 108: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 72) .....	144
Abb. 109: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Aufschlusses und der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 72) .....	144
Abb. 110: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Aufschlusses und der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 72) .....	144

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Zusammensetzung von Apfeltrester (% TS) [37] .....	5
Tab. 2:	Literaturdaten verschiedener Tresterinhaltsstoffe .....	6
Tab. 3:	Stoffliche Verwertung von Apfeltrester [37].....	7
Tab. 4:	Zusammensetzung von Fasern aus Äpfeln und Apfeltresterfasern .....	8
Tab. 5:	Zusammensetzung von Apfeltresterdestillaten (als Literaturzitat, s. unten) .....	9
Tab. 6:	Anwendungsmöglichkeiten von Ultraschall in der Lebensmittelverarbeitung .....	15
Tab. 7:	Die 4 Stufen des enzymatischen Abbaus von Apfelgewebe [196] .....	22
Tab. 8:	Freisetzung löslicher und reduzierender Zucker aus Maishülsen und –kolben .....	23
Tab. 9:	Kommerzielle cellulolytische Enzympräparate.....	31
Tab. 10:	Kommerzielle pektinolytische und kombinierte Präparate.....	31
Tab. 11:	Abkürzungen der Enzym-Produktenamen .....	32
Tab. 12:	Klasseneinteilung bei der Partikeldetektion .....	37
Tab. 13:	Enzymkombinationen und Dosierungen .....	39
Tab. 14:	Versuchsserien und Varianten der Vergärungsversuche.....	43
Tab. 15:	Parameter der Viskositätsabnahme in Pektin*- und CMC**-Lösungen, ermittelt aus den kinetischen Modellen 1. Ordnung.....	60
Tab. 16:	Zusammensetzung getrockneter, gereinigter Apfeltresterfasern.....	61
Tab. 17:	Zusammensetzung von nativen Apfeltrestern (Apfelnasstrester).....	67
Tab. 18:	Prozentuale Glucosezunahme während der Enzymierung nach Grob- und Feinaufschluss .....	76
Tab. 19:	Freisetzung von „Glucose gesamt“ und „Glucose unlöslich“ aus Apfeltrester .....	76
Tab. 20:	Spezifische Einergieeinträge für verschiedene Trester-Aufschlussvarianten .....	82
Tab. 21:	Prozentuale Viskositätsabnahme und Glucosezunahme nach 24 bzw. 48 h bezogen auf den Ausgangszustand (0 h) .....	87
Tab. 22:	Gärungsnebenprodukte in Labordestillaten aus nativen Apfeltrestern .....	94
Tab. 23:	Zusammensetzung säurehydrolysierter Apfeltrester (Varianten „Rapid Set“ und „Slow Set“) .....	95
Tab. 24:	Gärungsnebenprodukte in Labordestillaten aus säurehydrolysierten Apfeltrestern.....	98
Tab. 25:	Lösliche Ballaststoffe in Fasermaterialien (Auszug aus [47] verglichen mit Apfeltresterschlempe) .....	104
Tab. 26:	Glucosegehalte nach enzymatischer TFA-Hydrolyse und zweistufiger schwefelsaurer Hydrolyse .....	128
Tab. 27:	Partikelgrößenklassen-Häufigkeiten (einzeln und summiert) nach Aufschlussvarianten (Basisdaten) .....	135
Tab. 28:	Beschreibungen zu den aufgeführten Vergärungsvarianten .....	136
Tab. 29:	Versuchsplan – Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern .....	137
Tab. 30:	Signifikanzniveaus der Haupt- und Wechselwirkungseffekte – Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern .....	137
Tab. 31:	Versuchsplan – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Standardaufschluss) .....	140
Tab. 32:	Signifikanzniveaus der Haupt- und Wechselwirkungseffekte – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Standard-Aufschluss).....	140
Tab. 33:	Versuchsplan – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Aufschluss) .....	143
Tab. 34:	Signifikanzniveaus der Haupt- und Wechselwirkungseffekte – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Aufschluss) .....	143

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE UND INDIZES

### Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
A.	<i>Aspergillus</i>
AF	Apfeltresterfasern
AK	Autoklav
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ara	Arabinose
AT	Apfeltrester
BmonV	Bundesmonopolverwaltung
CB	Cellobiose
CBH	Cellobiohydrolase
CDTA	Cyclohexandiamin-tetraessigsäure
CMC	Carboxymethylcellulose
D	Durchläufe
DCM	Dichlormethan
dest. Wasser	destilliertes Wasser
EAF	Entpektinisierte Apfeltresterfasern
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EG	Endoglucanase
FPA	Filter Paper Assay
Fru, F	Fructose
FS	Feuchtsubstanz
GalA	Galacturonsäure
Gal, G	Galactose
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
Glc	Glucose
HG	Homogalacturonan
HHP	High hydrostatic pressure (hoher statischer Druck)
HOM	Hochdruckhomogenisator
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRGP	Hydroxyprolinreiche Glycoproteine
HV	Hochverestert
LSD	Least significant difference
Man, M	Mannose

max.	maximal
MCC	Mikrokristalline Cellulose
n.	nach
PE	Pektinesterase
PEF	Pulsed electric fields (gepulste elektrische Felder)
PG	Polygalacturonase
PL	Pektinlyase
PME	Pektinmethylesterase
Por.	Porosität
r. A.	reiner Alkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RG	Rhamnogalacturonan
Rha, R	Rhamnose
S.	<i>Saccharomyces</i>
SSF	Solid state fermentation (Festbett-Fermentation)
T	Trester
<i>T.</i>	<i>Trichoderma</i>
TFA	Trifluoressigsäure
US	Ultraschall
UT	Ultraturrax
V.	Vorerhitzung
Var.	Variante
W	Wasser
Xyl	Xylose
ZM	Zellstrukturiertes Material

## Symbole

Symbol	Bezeichnung	Einheit
<i>AAB</i>	Alkoholausbeute	%
<i>AG</i>	Aschegehalt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
<i>c</i>	spezifische Wärmekapazität	$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
$c_{\text{H}_2\text{O}}$	spezifische Wärmekapazität von Wasser	$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
<i>C</i>	Konzentration	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$C_{\text{GalA}}$	Konzentration Galacturonsäure (Eichgerade)	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$C_{\text{G}\ddot{\text{A}}}$	Konzentration Gallussäure-Äquivalente (Eichgerade)	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$C_{\text{Me}}$	Konzentration Methanol (Eichgerade)	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
<i>d</i>	Durchmesser	m
$d_p$	Partikeldurchmesser	m

$d_{\bar{x}}$	durchschnittliche absolute Mittelwertabweichung	....
$D_{GS}$	Dicke der Grenzschicht	m
$E$	Einwaage	kg, g
$EA$	Enzymaktivität	$\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ , $\text{kat}\cdot\text{L}^{-1}$
$f$	Frequenz	Hz
$F_{<1}$	Anteil der Siebfraction „kleiner 1 mm“	%
$F_{>1}$	Anteil der Siebfraction „größer 1 mm“	%
$FG$	Fermentationsgrad	%
$FRS_{GlcG}$	Freisetzungsgrad Glucose gesamt	%
$FRS_{GlcU}$	Freisetzungsgrad Glucose unlöslich	%
$GG$	Galacturonangehalt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Glc_E$	Glucosegehalt im Trester nach Enzyminkubation (löslich), enzymatisch bestimmt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Glc_G$	Glucosegehalt im Trester vor Enzyminkubation (gesamt) enzymatisch und gaschromatographisch bestimmt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Glc_L$	Glucosegehalt im Trester vor Enzyminkubation (löslich) enzymatisch bestimmt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$Glc_U$	Glucosegehalt im Trester vor Enzyminkubation (unlöslich) gaschromatographisch bestimmt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$HYD$	Hydrolysegrad	%
$i$	Laufzahl von 1 bis n	-
$k$	Geschwindigkeitskonstante	$\text{s}^{-1}$
$k_0$	Geschwindigkeitskonstante zum Zeitpunkt $t = 0$	$\text{s}^{-1}$
$LBS$	lösliche Ballaststoffe	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$LTS$	lösliche Trockensubstanz	%
$m$	Masse	kg
$m_{FT}$	Masse Filtertuch	kg, g
$m_{nT}$	Masse nach Trocknung	kg, g
$m_{vT}$	Masse vor Trocknung	kg, g
$m_{Sieb}$	Masse Prüfsieb	kg, g
$m_{UTS,>1}$	Masse unlöslicher Trockensubstanz in $F_{>1}$	kg, g
$m_{UTS,AT}$	Masse unlöslicher Trockensubstanz im Apfeltrester	kg, g
$n$	Anzahl der Einzelmesswerte	-
$n_u$	Umdrehungen pro Minute	$\text{min}^{-1}$
$p$	Druck	Pa
$P$	Leistung	W
$PPG$	Polyphenolgehalt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$PRG$	Proteingehalt	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$p\text{-Wert}$	Irrtumswahrscheinlichkeit	-
$Q_s$	spezifischer Energieeintrag	$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$
$RA_{dest}$	Menge an abdestilliertem reinem Alkohol	kg, g

$RA_{max}$	maximale Menge an reinem Alkohol; (theoretisch bei 100%iger Umsetzung aller vergärbaren Zucker)	kg, g
$s$	Standardabweichung	....
$t$	Zeit	s
$T$	Temperatur	°C
$TS$	Trockensubstanz	%
$UBS$	unlösliche Ballaststoffe	$g \cdot g^{-1}$
$UTS$	unlösliche Trockensubstanz	%
$UTS_{>1}$	unlösliche Trockensubstanz in der Siebfraction „größer 1 mm“	%
$V$	Volumen	$m^3, L$
$\dot{V}$	Volumenstrom	$m^3 \cdot s^{-1}$
$V_{BW}$	Volumen verbrauchter $H_2SO_4$ (Blindwert – Titration Proteinbestimmung)	$m^3, L$
$V_{Pr}$	Volumen verbrauchter $H_2SO_4$ (Probe – Titration Proteinbestimmung)	$m^3, L$
$VF$	Verdünnungsfaktor	-
$VG$	Veresterungsgrad	%
$VUZ_B$	vergärbare Zucker (unlöslich) bei Fermentationsbeginn	kg, g
$VZ_B$	vergärbare Zucker (gesamt) bei Fermentationsbeginn	kg, g
$VZ_E$	vergärbare Zucker (gesamt) bei Fermentationsende	kg, g
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert	....
$x_i$	Messwert der i-ten Messung	....
$Y_{P/S}$	substratbezogene Alkoholausbeute	$g \cdot g^{-1}$
$\gamma$	Schwingungsamplitude	$\mu m$
$\gamma_{max}$	maximale Schwingungsamplitude	$\mu m$
$\eta$	Viskosität / Wirkungsgrad	Pa·s / -
$\eta_0$	Anfangsviskosität abzüglich $\eta_{eq}$	Pa·s
$\eta_{eq}$	Gleichgewichtsviskosität	Pa·s
$\eta_{e-a}$	Wirkungsgrad elektrisch-akustisch	-
$\eta_{e-m}$	Wirkungsgrad elektrisch-mechanisch	-
$\eta(t)$	dynamische Viskosität zum Zeitpunkt (berechnet nach Kinetikmodell 1. Ordnung)	Pa·s
$\lambda$	Wellenlänge	nm
$\sigma$	elektrische Leitfähigkeit	$\mu S \cdot cm^{-1}$

## Indizes

<b>Index</b>	<b>Bedeutung</b>
0	Zeitpunkt $t = 0$
<1	kleiner 1 mm
>1	größer 1 mm
AT	Apfeltrester
B	Beginn
Bw	Blindwert
dest	destilliert
E	Ende
e-a	elektrisch-akustisch
e-m	elektrisch-mechanisch
eq	Gleichgewicht
FT	Filtertuch
GÄ	Gallussäure-Äquivalent
GalA	Galacturonsäure
GlcG	Glucose gesamt
GlcU	Glucose unlöslich
GS	Grenzschicht
H <sub>2</sub> O	Wasser
i	Laufzahl
max	maximal
Me	Methanol
nT	nach Trocknung
P	Partikel
Pr	Probe
P/S	Produkt/Substrat
s	spezifisch
Sieb	Prüfsieb
UTS	unlösliche Trockensubstanz
vT	vor Trocknung
$\bar{x}$	Mittelwert

# 1 EINLEITUNG

In Deutschland werden jährlich 400 bis 750 Mio. Liter Apfelsaft aus Äpfeln deutscher Herkunft hergestellt [1]. Dabei fallen zwischen 100.000 und 200.000 Tonnen Apfeltrester an. Die Palette an Verwertungsmöglichkeiten von Apfeltrestern als Reststoffe der obstverarbeitenden Industrie ist breit und erstreckt sich sowohl über den Food- als auch Non-Food-Bereich [2]. Seit Jahren werden Anstrengungen unternommen, diese Reststoffe im Sinne der Wertstoffgewinnung einer möglichst rückstandsarmen Weiterbehandlung zuzuführen. Je nach Zielsetzung werden dabei stoffliche und/oder energetische Verwertungsmöglichkeiten in Betracht gezogen, bei denen zahlreiche Einflussfaktoren, wie Transportmöglichkeiten und –kosten, Anfallzeitraum und Verwertungs Kapazität sowie Haltbarmachungsmöglichkeiten und der Anfall verbleibender Reststoffe und deren Entsorgung, berücksichtigt werden müssen. Traditionell werden Apfeltrester zur Kompostherstellung oder als Futtermittel in frischer, getrockneter oder siliierter Form in der Tierernährung (Rinder/Schweine) genutzt [3-6]. Die Entsorgung von Trestern auf Deponien ist zunehmend mit Kosten verbunden und wird daher als nicht sinnvoll angesehen. Vielmehr stehen heutzutage Verfahren im Vordergrund, die zur Wertstoffgewinnung aus Apfeltrestern beitragen. Der wichtigste Wertstoff dabei ist Pektin, welches als Zellwandpolysaccharid nach der Saftgewinnung in Abhängigkeit von der angewandten Technologie zum großen Teil im Trester verbleibt und durch geeignete Extraktionsverfahren gewonnen wird [7-10]. Weitere Extraktionsprozesse bieten die Möglichkeit neben Pektin phenolische Komponenten (u. a. Catechine, Quercetine, Chlorogensäure) als sekundäre Pflanzenstoffe mit gesundheitsfördernder Wirkung aus den Trestern zu gewinnen oder diese als Quelle für Ballaststoffpräparate zu nutzen [11-13]. Im Sinne der Biokonversion können Apfeltrester auch für Fermentationsprozesse, wie z. B. der Erzeugung von Biogas oder Ethanol genutzt werden [14]. Innovative Verfahren zur Nutzung lignocellulosereicher Rohstoffe und Abfallbiomassen für die Herstellung von Bio-Ethanol sind heutzutage von immenser Bedeutung [15-17]. Für eine maximale Wertschöpfung (Alkoholausbeute) werden dabei für den Biomasse-Aufschluss physikalische (Hitze, Druck), chemische (Säuren, Laugen) und enzymatische Verfahrensoptionen (polysaccharidabbauende Enzyme) miteinander kombiniert [18, 19]. Prinzipiell bieten sich solche Verfahren auch für den Aufschluss von Apfeltrestern an, müssen sich jedoch stark an der zu erzielenden Produktqualität orientieren (Bio-Ethanol oder Trinkalkohol). Die Nutzung zellwandabbauender Enzyme für die Verflüssigung und Verzuckerung von Maischen ist seit Jahrzehnten Stand der Technik in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie [20, 21]. Zum Einsatz kommen kommerzielle, meist flüssige Enzympräparate mikrobieller Herkunft. Diese Präparate enthalten je nach Verwendungszweck (Maischeenzymierung, Klärung, Mazeration, Totalverflüssigung) die entsprechenden Aktivitäten für den Pektin- (Pektinasen), Hemicellulose- (Hemicellulasen) und Celluloseabbau (Cellulasen) [22, 23]. Ein vollständiger Zellwandabbau kann idealerweise nur durch den gleichzeitigen Einsatz aller Teilaktivitäten unter der Ausnutzung überadditiver Wechselwirkungseffekte (Synergismus) gelingen und führt zum höchstmöglichen Maß an Verzuckerung, d. h. der Freisetzung von monomeren Zuckerbausteinen aus Polysacchariden. In Abhängigkeit von Sorte, Herkunft und Reifegrad der verarbeiteten Äpfel und der Saffherstellungstechnologie enthalten Apfeltrester neben löslichen Restzuckern, Pektin und Hemicellulosen Cellulose als weitere Hauptkomponente der Apfeltrestertrockensubstanz. Die Nutzung der Cellulose als zusätzlichen „Glucoselieferanten“ kann somit zur zusätzlichen Freisetzung an vergärbaren Zuckern führen und zur Erhöhung der Alkoholausbeuten dienen. Dadurch würde eine weitere sinnvolle Verwertungsmöglichkeit von Apfeltrestern im Sinne der rückstandsarmen Verarbeitung industrieller Abfallbiomassen geschaffen werden.

## 2 AUFGABEN- UND ZIELSTELLUNG

Verfahren zum Aufschluss cellulosehaltiger Abfallbiomassen (Getreidestroh, Bagasse) für die Herstellung von Bio-Ethanol basieren in den meisten Fällen auf der Anwendung drastischer Milieubedingungen mit hohen Temperaturen ( $T > 120\text{ °C}$ ), erhöhten Drücken ( $p = 3 - 24\text{ bar}$ ), gekoppelt mit Säurebehandlungen (z. B.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gefolgt von der Neutralisation mit Laugen (z. B.  $\text{NaOH}$ ) und einer simultanen Verzuckerung und Vergärung der vorbehandelten Biomasse [19, 24, 25]. Die Anwendung von Cellulasen und Pektinasen zur Apfeltresterverflüssigung ist bislang hinsichtlich der Charakterisierung der gewonnenen Extraktionssäfte und der ernährungsphysiologischen Wirkung der freigesetzten Ballaststoffe untersucht worden [26-28]. Untersuchungen zur simultanen Verzuckerung und Vergärung von Apfeltrestern in Abhängigkeit verschiedener Milieubedingungen sind in der 1990er Jahren von indischen Arbeitsgruppen durchgeführt worden [14, 29, 30]. Arbeiten, die den Aufschluss und die Vergärung von Apfelnasstrestern zu Alkohol unter Einsatz von Enzymen in Kombination mit mechanischen Verfahren näher beleuchtet haben, sind jedoch nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsprojektes, welches zum Ziel hatte, eine Applikationstechnologie für die Erzeugung von Trinkalkohol aus Apfelnasstrestern (Apfeltresterbrand) zu entwickeln, mit dem es möglich ist, die Ausbeute an Trinkalkohol signifikant zu erhöhen. Dabei sollte eine Prozessführung für den vollständigen und produktschonenden Aufschluss der Trester auf Basis der optimierten Kombination von verschiedenen Enzymaktivitäten (cellulolytische, hemicellulolytische, pektinolytische) und physikalischen Aufschlussverfahren entwickelt werden. Neben der Ausbeuteerhöhung lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung von qualitativ hochwertigen Bränden in Bezug auf die sensorischen Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung (u. a. Methanol). Ziel der Arbeit waren Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung eines Verfahrens zur Verflüssigung, Verzuckerung und Vergärung von Apfeltrestern unter Anwendung zellwandabbauender Enzyme in Kombination mit geeigneten mechanischen Prozessschritten zur maximalen Freisetzung vergärbare Zucker und zur Erhöhung der Alkoholausbeute im Labormaßstab. Ausgewählte kommerzielle Enzympräparate für die Obstverarbeitung wurden anhand ihrer Aktivitäten gegenüber Modells substraten, gereinigten Apfeltresterfasern und Apfelnasstrestern charakterisiert. Die Enzyme wurden einzeln und in Mehrfachkombinationen untersucht, um Varianten mit besonders hohen synergistischen Wechselwirkungen herauszuarbeiten. Der Einfluss der Anwendung zusätzlicher mechanischer und thermischer Vorbehandlungen wurde anhand der Freisetzung vergärbare Zucker (Glucose) aus den Trestern ermittelt und die Korrelation zur erzielten Partikelgröße überprüft. Zur Optimierung des Verfahrens wurde versucht, die Substratverdünnung durch die mehrstufige Kombination von enzymatischem und mechanischem Aufschluss schrittweise zu minimieren, um somit den Ausgangsgehalt vergärbare Zucker im Ansatz zu erhöhen. In Vergärungsversuchen wurden die Alkoholausbeute und der Hydrolysegrad unterschiedlicher Ansatzvarianten unter Anwendung verschiedener Enzymkombinationen und Milieubedingungen ermittelt und die Destillatqualität anhand der Gärungsnebenproduktprofile und des Methanolgehaltes bestimmt. Als Ausgangsmaterialien dienten native und säurehydrolysierte Apfeltrester. Abschließend wurde der Gehalt an Gesamtpolyphenolen sowie löslichen und unlöslichen Ballaststoffen in den Trestern an verschiedenen Verfahrensstufen ermittelt und Möglichkeiten zur Gewinnung dieser Stoffe aus den abdestillierten Rückständen des Gesamtverfahrens (Brennereischlempen) überprüft. Im Vordergrund der durchgeführten Arbeiten stand somit die Ermittlung von Ausbeutebilanzen. Ökonomische Abschätzungen zur erarbeiteten Applikationstechnologie wurden für die großtechnische Versuchsanlage durchgeführt, zählten jedoch nicht zur Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.

### 3 THEORETISCHE ASPEKTE

#### 3.1 Apfeltrester

##### 3.1.1 Apfeltrester als Reststoff der Fruchtsaftgewinnung

Apfeltrester sind die mehr oder weniger festen Rückstände (Presskuchen) nach dem Abpressen des Saftes bei der Apfelsaftherstellung [2]. Sie bestehen zum größten Teil aus den Schalenbestandteilen und dem entsafteten Fruchtfleisch sowie Kernen und Stielen. Abb. 1 zeigt ein vereinfachtes Verfahrensschema zur Fruchtsaftherstellung aus Kernobst [31].

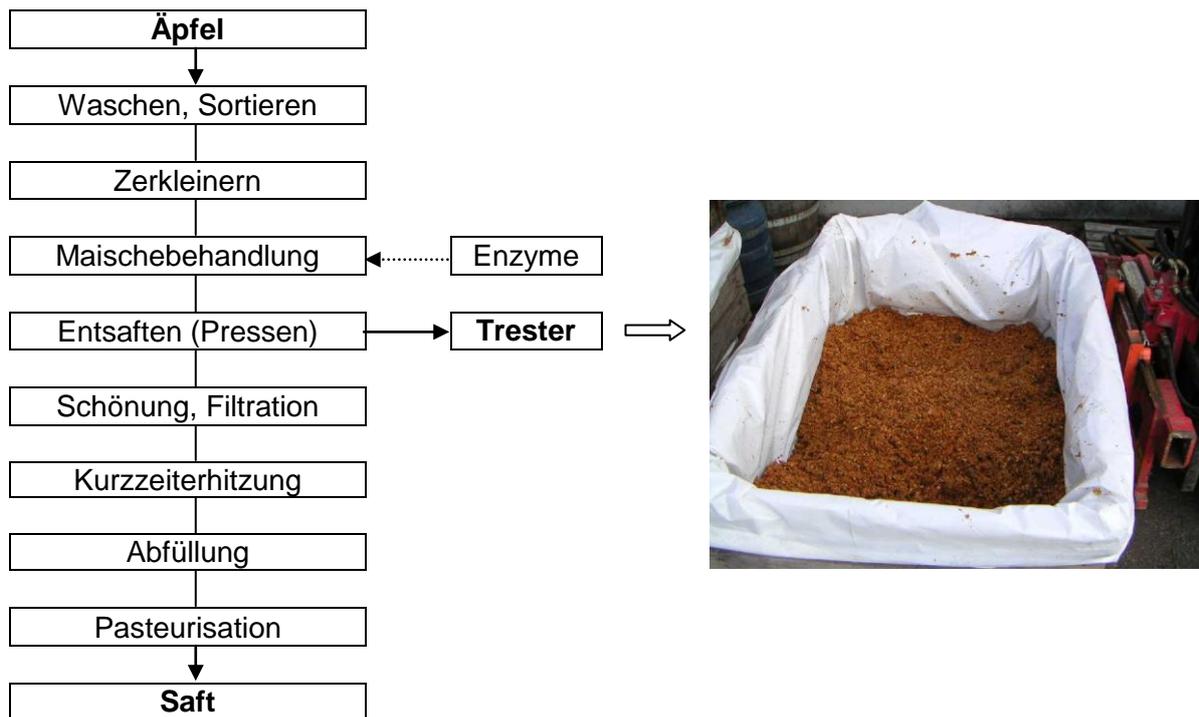


Abb. 1: Schema der Fruchtsaftherstellung aus Kernobst, vereinfacht nach [31]

Die erntefrischen oder gelagerten Äpfel werden zunächst sortiert und gewaschen und anschließend durch mechanische Obstmühlen, z. B. Rätz- oder Hammermühlen, zerkleinert [31]. Die Zerkleinerung des Mahlgutes in Hammermühlen erfolgt zum größten Teil durch die Schlagwirkung beweglicher Stahlhämmer, die am Rotor angebracht sind. Eine weitere Zerkleinerung erfolgt im Bereich zwischen Rotor und Mahlwand, bis das Mahlgut soweit zerkleinert ist, dass es durch ein Lochsieb (Seiher) im äußeren Umfang der Maschine passt.

Insbesondere bei der Herstellung von Säften aus Lageräpfeln wird die Fruchtmaische häufig einer Enzymbehandlung mit pektinolytischen Enzymen unterzogen, da während der Lagerung der Äpfel zunehmend unlösliches Protopektin in lösliches Pektin umgewandelt wird, was zu einer Erhöhung der Maischeviskosität führt und die Drainage des Saftes erschwert [32]. Durch den Einsatz kommerzieller, pektinolytischer Enzympräparate, die darüber hinaus häufig noch Begleitaktivitäten zum Hemicelluloseabbau aufweisen [23], kann die Presskapazität verbessert und damit die Saftausbeute wesentlich erhöht werden [21, 32, 33]. Das Entsaften der Maische erfolgt heutzutage meist durch hydraulische Horizontal-Korbpressen oder kontinuierlich arbeitende Dekanter oder Bandpressen [31, 34]. Mit dem Schritt des Entsaftens fallen die

Apfeltrester als Rückstände der Verarbeitung an. Die weiteren Stufen zur Saftaufbereitung (Schönung, Klärung, Konzentrierung, Pasteurisation) hängen von der Zielqualität der herzustellenden Säfte (Fruchtsaft, Direktsaft, Saft aus Konzentrat) ab [31].

In Abhängigkeit des Zustandes der Rohware (Sorte, Herkunft, Reifegrad, Lagerung), der Effektivität des Herstellungsprozesses, der eingesetzten Pressen, sowie dem Temperatur- und Zeitregime und der Maischebehandlung mit verflüssigenden Enzymen werden bei der Saftextraktion Ausbeuten von etwa 70 - 90 % erreicht [31, 35]. Die Pressausbeuten werden in der Regel als Volumenausbeuten in Liter pro 100 kg Frucht angegeben. Man kann davon ausgehen, dass bei der Verarbeitung von 100 kg Äpfeln durchschnittlich 20 - 25 kg Trester mit einer Trockensubstanz von ca. 20 - 30 % anfallen [36, 37].

### 3.1.2 Zusammensetzung

Kennedy et al. veröffentlichten 1999 eine umfassende Zusammenstellung von Literaturdaten zur Verwertung, Zusammensetzung und Untersuchung von Apfeltrestern [2]. In Abb. 2 sind die wesentlichen Massenströme ausgehend von der Apfelernte bis zum Apfelnasstrester skizziert.

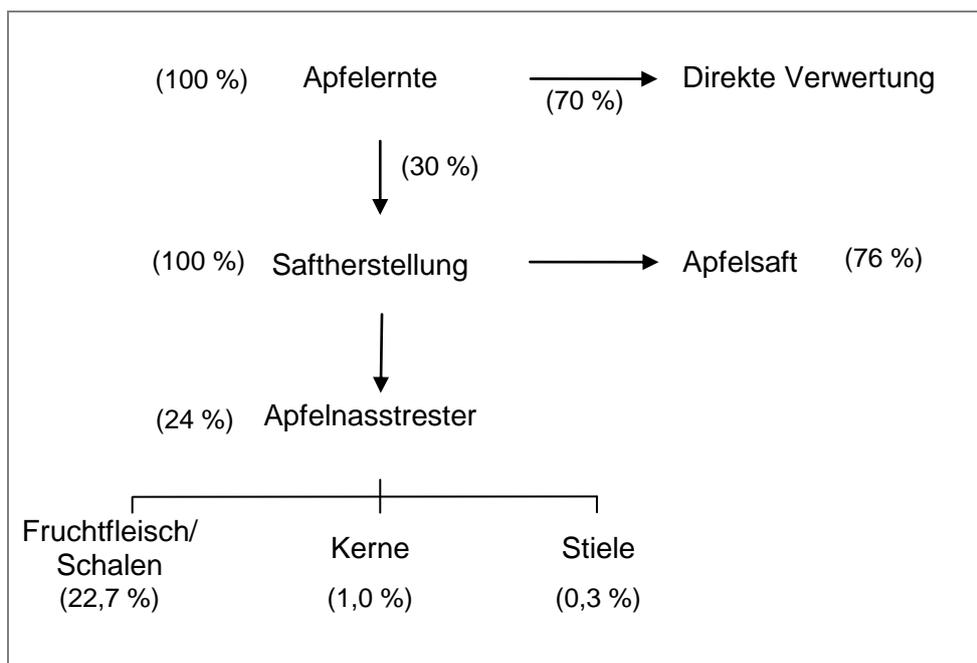


Abb. 2: Massenströme von der Apfelernte bis zum Apfelnasstrester (% FS) [2]

Mit ca. 70 % geht der größte Teil der Apfelernte der direkten Verwertung als Frischware zu. Für die Safterstellung werden etwa 30 % genutzt. Bezogen auf die gesamte Feuchtsubstanz bestehen die Apfelnasstrester zu über 90 % aus Fruchtfleisch und Schalenteilen.

Die Literaturdaten für die Zusammensetzung der Apfeltrester Trockensubstanz schwanken in weiten Bereichen. Neben der Abhängigkeit von Sorte, Herkunft und Reifegrad der Äpfel und den Extraktionsbedingungen bei der Verarbeitung hängen die angegebenen Werte jedoch auch stark von der verwendeten Untersuchungsmethode zur Bestimmung der jeweiligen Inhaltsstoffe ab. Zudem sind die Bezugsgrößen der untersuchten Inhaltsstoffe teilweise nicht

eindeutig deklariert, so dass häufig unklar ist, ob sich die Angaben auf die Feuchtmasse (70 - 80 % Wasser) oder die Trockenmasse (0 % Wasser) beziehen.

Man kann davon ausgehen, dass sich die mengenbezogen größten Fraktionen in der Apfeltrestertrockensubstanz in etwa wie folgt verteilen (Tab. 1) [37].

**Tab. 1: Zusammensetzung von Apfeltrester (% TS) [37]**

<b>Zucker</b>	Saccharose	5,5 %	<b>35 – 40 %</b> (summiert)
	Glucose	10 %	
	Fructose	20 - 25 %	
<b>Polysaccharide</b>	Stärke	2 - 15 %	<b>45 – 50 %</b> (summiert)
	Cellulose	12 - 16 %	
	Hemicellulosen	4 - 5 %	
	Pektin	10 - 13 %	
	(Lignin	8 - 10 %)	
<b>Proteine</b>		4,5 %	<b>10 – 15 %</b> (summiert)
<b>Fette, Wachse</b>		6 - 7 %	
<b>Asche</b>		2,5 %	

Die Polysaccharide machen dabei den größten Anteil mit durchschnittlich 50 - 55 % aus, wobei bei dieser Aufstellung Lignin als Polysaccharid mit aufgeführt wird. Richtigerweise handelt es sich bei Lignin jedoch um ein aus C6-C3-Alkoholen aufgebautes phenolisches Polymer, welches in der pflanzlichen Zellwand mit verschiedenen Hemicellulosen (Xyloglucan, Arabinoxylan) verknüpft ist und die Zellwandstruktur und -stabilität mit beeinflusst (siehe Kap. 3.2.1) [38]. Brett et al. geben an, dass die phenolischen Verbindungen unter den wichtigsten Komponenten der pflanzlichen Zellwände von Früchten und Gemüse mit nur 5 % den geringsten Anteil ausmachen. Das würde bedeuten, dass der Lignin-Anteil in Apfeltrestern bei ca. 1 % TS liegen müsste. Tatsächlich findet man in den Literaturangaben häufig jedoch weitaus höhere Werte. Nawirska et al. fanden in Apfeltrester Lignin-Gehalte von 20,4 % TS [39]. In Untersuchungen zur Biokonversion von Apfeltrestern wurden sogar Werte von 23,5 % TS angegeben [6], die Cellulose- und Pektin-Gehalte lagen hingegen bei 7,2 bzw. 5,5 % TS. Eine Möglichkeit für derartig hohe Werte kann jedoch auch methodenabhängig sein, da Lignin häufig gravimetrisch nach mehrstufigen Säurebehandlungen bestimmt wird [40]. Möglicherweise werden dabei auch andere schwer hydrolysierbare Zellwandbestandteile mitefassen.

Die Pektingehalte von Apfeltrestern liegen in den meisten Fällen im Bereich von 10 - 13 % [37, 41]. Teilweise findet man Pektingehalte, die auch unter 10 % liegen [6]. Arrigoni et al. fanden in Apfeltrester 17,8 % Pektin [42]. Cohn et al. geben für Apfelnasstrestern mit einer Trockensubstanz von 20 - 30 % Pektingehalte von 1,5 - 2,5 % FS und einen Kohlenhydrat(Zucker)-Gehalt von 10 - 20 % FS an, was in etwa den in Tab. 1 dargestellten Werten entspricht [36].

Die Zucker Saccharose, Glucose und Fructose bilden mit 35 - 40 % die zweitgrößte Fraktion in der Trestertrockensubstanz. Der Gesamtgehalt an löslichen Restzuckern hängt maßgeblich von der Effektivität der Saftextraktion und der damit im Trester verbleibenden Menge an Restsaft ab. Fructose macht dabei mit 20 - 25 % generell den größten Anteil aus und ist ca. zwei- bis dreimal mehr enthalten als Saccharose bzw. Glucose. Dies entspricht im Wesentlichen dem Zuckerverhältnis in frischen Äpfeln [43].

In Tab. 2 sind weitere Literaturdaten verschiedener Tresterinhaltsstoffe nochmals zusammengefasst [4, 13, 41, 42].

**Tab. 2: Literaturdaten verschiedener Tresterinhaltsstoffe**

		Apfeltresterinhaltsstoffe [g/100 g TS] [Quelle]			
		[42]	[41]	[4]	[13]
Ballaststoffe	unlöslich	55,5	*	*	36,5
	löslich	10,5	*	*	14,6
	gesamt	65,9		*	51,1
Zucker	Saccharose	*	2,1	50,0**	*
	Glucose	*	7,4		*
	Fructose	*	18,1		*
Pektin		17,8	10,8	*	*
Protein		4,4	3,4	6,0	2,4
Fette		2,3	*	4,1	3,1
Asche		1,7	1,5	1,9	0,6

\*nicht bestimmt, \*\*Gesamtzucker

In vielen Fällen werden als weitere Kennwerte für Obst- und Gemüseprodukte, so auch für Apfeltrester, die Gehalte an Ballaststoffen angegeben [44]. Dabei handelt es sich vor allem um lösliche und unlösliche Nicht-Stärke-Polysaccharide (Cellulose, Hemicellulose, Pektin) sowie resistente Stärke und Lignin [45-47]. Neben Vitaminen, Antioxidantien und Mineralstoffen zählen die Ballaststoffe zu den sogenannten „health ingredients“ in funktionellen Lebensmitteln, denen man einen zusätzlichen Nutzen zuschreibt und die hinsichtlich der Vorbeugung von Krankheiten einen medizinischen oder gesundheitlichen Zweck erfüllen können [48-52].

Eine weitere wichtige Gruppe der Tresterinhaltsstoffe stellen die polyphenolischen Verbindungen dar, die vorwiegend in den Schalen lokalisiert sind und die bei der Saftgewinnung nur in geringem Maße extrahiert werden [53]. Sie machen mengenbezogen nur einen geringen Anteil der Trestertrockensubstanz aus, sind jedoch aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung ebenso als Ingredienzen von funktionellen Lebensmitteln von großem Interesse [54]. Nähere Erläuterungen zur Gewinnung von Polyphenolen aus Trestern sind in Kap. 3.1.3.3 aufgeführt.

### 3.1.3 Verwertungsmöglichkeiten

Bei der Fruchtsaftproduktion fallen jährlich große Mengen an Apfelnasrestern an [1]. Da die Trester bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden mikrobiellen Veränderungen unterliegen, stellt deren Entsorgung bzw. Weiterverwertung ein generelles Problem dar. Nach Cohn et al. kommen als grundsätzliche Lösungsansätze die Verfütterung der Trester an Tiere, die Silierung von Nasrestern, sowie die Trocknung der Trester für die Pektinproduktion oder die Tierversütterung in Frage [36]. Die Nutzung als Tierfutter ist wohl das älteste Verwertungskonzept für Apfeltrester, wird aber bis heute kontrovers diskutiert [3, 55]. Durch Silierung kann der Futterwert von Apfeltrestern zwar verbessert werden [5], allerdings eignen sich Apfeltrester aufgrund des hohen Rohfasergehaltes eher als Futter für Wiederkäuer als für Schweine. Die Kompostierung von Nasrestern ist aufgrund der hohen Wassergehalte nicht ohne weitere

Aufarbeitung möglich [37]. Die wesentlichen Verwertungsmöglichkeiten von Apfeltrester sind in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tab. 3: Stoffliche Verwertung von Apfeltrester [37]**

<b>Biokonversion</b>	<b>Fermentation</b>	<b>Futtermittel</b>	<b>Wertstoffe</b>
Kompost	Alkohol	direkt (nass)	Pektin
Bodenverbesserung	Biogas	getrocknet	Ballaststoffe
	Enzyme	siliert	Aromen
			Polyphenole

In den letzten Jahren gehen die Trends zur Nutzung von Reststoffen der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie jedoch eindeutig in Richtung der Gewinnung von Wertstoffen durch geeignete Extraktionsverfahren. In diesem Zusammenhang veröffentlichte Endreß eine Studie zur kompletten Verwertung aller im Rahmen der Pektinproduktion anfallenden Zwischen- und Endprodukte (Kap. 3.1.3.1) [56]. Die Gewinnung von hochwertigen Produkten, wie Aromen, Apfelnölen oder Polyphenolen als wertgebende Inhaltsstoffe für den Einsatz in Lebensmitteln ist zwar von großem Interesse. Diese Stoffe kommen jedoch in den Treestern in nur geringen Mengen vor, so dass nach deren Extraktion immer noch verhältnismäßig große Restmengen verbleiben [2]. Die fortlaufenden Anstrengungen in Forschung und Entwicklung machen deutlich, dass die ideale Nutzung bzw. Verwertung von Apfeltrestern noch gefunden werden muss.

### 3.1.3.1 Pektin

Pektin ist aus industrieller Sicht wohl der bedeutendste Inhaltsstoff in Apfeltrestern. Pektine zählen neben der Cellulose und den Hemicellulosen zu den wichtigsten Polysacchariden in pflanzlichen Zellwänden (Kap. 3.2.1) [38, 57, 58]. Sie werden im wässrigen Milieu unter sauren Bedingungen (pH 1 - 3, meist Salpetersäure) und erhöhten Temperaturen (50 - 90 °C) aus den Treestern extrahiert und anschließend aus den Filtraten mit hochprozentigem Alkohol (Iso-Propanol) gefällt. Nach mehreren Waschschrinen wird das Pektin schonend getrocknet, gemahlen und standardisiert [7, 9, 10]. Für die industrielle Herstellung von Pektin werden ausschließlich getrocknete Trester verwendet. Die Extraktionsbedingungen richten sich im Wesentlichen nach der Zielqualität der herzustellenden Pektine [59-61]. Durch geeignete chemische Verfahren lassen sich Pektine mit unterschiedlichen Veresterungsgraden, Geliereigenschaften und Viskositätsbereichen herstellen [62-67]. Für die Herstellung von niederveresterten Pektinen kommen industriell heutzutage nur noch saure Extraktionsverfahren in Frage, da unter basischen Bedingungen Pektinverluste durch die Depolymerisation aufgrund von  $\beta$ -Eliminierungsvorgängen insbesondere bei erhöhten Temperaturen zu groß sind [9, 68-71]. Große Unternehmen verknüpfen die Pektinherstellung heutzutage mit der stufenweisen Extraktion weiterer Lebensmittelinhaltsstoffe, wie Zucker, Aroma- und Farbstoffen für die Herstellung von Süßungsmitteln, Aromakonzentraten oder Apfelethanol [56]. Als feste Reststoffe fallen hierbei noch die entpektinisierten Trester an, die der Tierfütterung zugeführt werden.

### 3.1.3.2 Zellwandmaterialien, Ballaststoffpräparate

Eine weitere Möglichkeit, die Rückstände der Apfelverarbeitung einer sinnvollen Verwertung zuzuführen, ist die Herstellung faserreicher Ballaststoffpräparate, die in der Literatur häufig als Zellwandmaterialien bezeichnet werden und eine Form der alkoholunlöslichen Substanz darstellen [72-74]. Dabei werden die physiko-chemischen Eigenschaften in starkem Maße von den wesentlichen Aufarbeitungsschritten (physikalische, chemische, enzymatische Vorbehandlungen) beeinflusst [75, 76]. Durch gezielte Extraktionsverfahren lassen sich Präparate erzeugen, die nach Rehydratisierung ein hohes Wasserbindevermögen und viskoelastische Eigenschaften aufweisen [77-79] und sie für die Verwendung als Quell- und Dickungsmittel in Lebensmitteln interessant machen. Zahlreiche Untersuchungen in den 1990er Jahren haben jedoch gezeigt, dass sich Apfeltrester für die Herstellung solcher Präparate schlechter eignen als frische Äpfel [80, 81], da die Hohlraumstruktur der Zellen durch vorangegangene mechanische und enzymatische Einflüsse nur noch teilweise erhalten bleibt. Tab. 4 zeigt die Zusammensetzung verschiedener Faserpräparate aus Äpfeln und Apfeltrester.

**Tab. 4: Zusammensetzung von Fasern aus Äpfeln und Apfeltresterfasern**

g/100 g TS	Apfelfasern (Parenchym) <sup>a</sup>	Fasern aus Apfeltrester <sup>b</sup>	Fasern aus Apfeltrester <sup>c</sup>	Fasern aus entpektinisierten Apfeltrestern <sup>b</sup>
Rhamnose	1,6	1,0	0,3 - 1,5	0,7
Fucose	1,1	0,5	0,6 - 1,2	0,5
Arabinose	7,4	8,0	5,1 - 14,3	1,5
Xylose	7,4	5,5	5,8 - 6,6	7,0
Mannose	2,0	1,8	1,0 - 3,4	2,5
Galactose	6,0	5,0	3,0 - 7,0	4,8
Glucose	33,4	27,9	25,2 - 33,3	30,6
Galacturonan	26,8	25,2	18,7 - 28,2	13,7
Protein	6,7	5,7	9,0 - 11,0	8,2
Asche	-	2,0	1,5 - 2,0	2,7

a-[Massiot et al. 1997], b-[Renard et al. 1991], c-[Grohmann et al. 1994]

Die Zusammensetzung solcher Zellwandmaterialien aus Früchten und Gemüse wird insbesondere durch den Gehalt an neutralen und sauren Zuckerbausteinen der wichtigsten Zellwandpolysaccharide (Cellulose, Hemicellulosen, Pektin) beschrieben [82, 83]. Die verwendeten Untersuchungsmethoden beruhen in den meisten Fällen auf der kombinierten, sauren-enzymatischen Hydrolyse der Zellwände mit anschließender Derivatisierung und Quantifizierung der Zuckerbausteine mittels gaschromatographischer Methoden [84-87].

### 3.1.3.3 Polyphenole

Polyphenole sind wichtige sekundäre Pflanzenstoffe in Äpfeln [88]. Die wichtigsten phenolischen Verbindungen in Äpfeln sind Quercetine, Catechine, Phloridzin und Chlorogensäure, die starke antioxidative Wirkung besitzen [89-91] und daher häufig im Zusammenhang mit der Vorbeugung von Herzkrankheiten durch den Verzehr von frischem Obst und Gemüse in Verbindung gebracht werden [92]. Desweiteren beeinflussen Polyphenole maßgeblich die organoleptischen Eigenschaften von Lebensmitteln, wie Bittergeschmack und Adstringenz und werden bei mechanischer Beschädigung der Zellen (z. B. Zerkleinerung) durch pflanzeneigene Enzymsysteme (Polyphenoloxidasen) abgebaut, was in zerkleinertem Obst zu einer

Braunfärbung führt (enzymatische Bräunungsreaktion) [88, 93, 94]. Frische Äpfel enthalten etwa 6 - 7 g Polyphenole je kg frisches Parenchymgewebe [95]. Da auch die Polyphenolgehalte stark sortenabhängig sind, schwanken die Literaturangaben teilweise enorm. Kennedy et al. geben in Abhängigkeit der Untersuchungsmethode Polyphenolgehalte im Bereich von 0,22 - 0,99 g/100 g Apfeltrestertrockensubstanz an [2]. Schieber et al. entwickelten ein Verfahren zur kombinierten Gewinnung von Pektin und Polyphenolen aus Apfeltrestern mittels Adsorberharzen, wobei in der Summe in den erhaltenen Lyophilisaten 118 mg/g phenolische Bestandteile gefunden werden konnten [12].

### 3.1.3.4 Ethanol

In den 1980er und 1990er Jahren beschäftigten sich verschiedene internationale Arbeitsgruppen mit der Festbettfermentation (engl.: solid state fermentation (SSF)) von Apfeltrestern [29, 96, 97]. Diese Untersuchungen basierten auf der Nutzung (Vergärung) der im Trester verbliebenen Restzucker. Gupta et al. verwendeten für die Vergärung von Apfelnasstrestern verschiedene Hefestämme (*Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*) und ermittelten nach 48-stündiger Vergärung bei 28 °C und pH 4,5 Fermentationsgrade (g Ethanol praktisch/g Ethanol theoretisch) von 15,6 - 43,8 % [29]. Durch die Supplementierung mit Ammoniumphosphaten und der Verwendung von Spurenelementen (insbesondere Zink) konnten die Alkoholausbeuten mit Hilfe von *Saccharomyces*-Hefen auf über 70 % gesteigert werden. Joshi et al. schlugen den Zusatz von SO<sub>2</sub> als Alternative zur Hitzesterilisation von Apfeltrester vor [30]. Für verschiedene Hefen wurden optimale Einsatzmengen von 150 - 200 ppm SO<sub>2</sub> ermittelt.

Sandhu et al. verglichen die Vergärung von rehydratisierten getrockneten Apfeltrestern unter natürlichen Bedingungen (kein Hefezusatz) mit der Vergärung unter Einsatz von Reinzuchthefen (*S. cerevisiae*) [14]. Ohne Zusatz von Hefen wurden dabei um 50 % geringere Alkoholausbeuten erzielt. Unter dem Aspekt der möglichen Trinkalkoholerzeugung aus Apfeltrester ermittelten Joshi et al. die Zusammensetzung der aus der Vergärung von rehydratisierten getrockneten Apfeltrester erzeugten Destillate [4]. Tab. 5 zeigt die Gehalte der untersuchten Destillatkomponenten im Vergleich zu weiteren Literaturdaten [96, 98].

**Tab. 5: Zusammensetzung von Apfeltresterdestillaten (als Literaturzitat, s. unten)**

Komponente	Einheit a	Gehalt a	Einheit b/c	Gehalt b	Gehalt c
Ethanol	% v/v	38	g/kg	43	41
Methanol	µL/L	3898	g/kg	0,33	0,29
n-Propanol	µL/L	18	g/kg	-	0,03
i-Butanol	µL/L	25	g/kg	0,12	0,10
i-Amylalkohol	µL/L	280	g/kg	0,09	0,11
Ester gesamt	mg/L	137	-	-	-
Aldehyde	mg/L	224	-	-	-

a-[Joshi et al. 1996], b-[Hang et al. 1981], c-[Hang et al. 1982]

Neben Ethanol als Hauptkomponente finden sich häufig hohe Gehalte an Methanol in den Destillaten, die nicht als Gärungsnebenprodukt der Hefen entstehen, sondern durch die Abspaltung von Methanol aus dem Zellwandpektin durch native Pektinesterasen [99, 100]. Die höheren Alkohole machen dabei einen wesentlich geringeren Anteil aus.

Hang et al. erzielten bei Vergärungsversuchen praktische Alkoholausbeuten im Bereich von 29 bis über 40 g pro kg Apfeltrester und Fermentationsgrade von 70 bis 94 % in Abhängigkeit von der Anfangszuckerkonzentration und den Herstellungsbedingungen [96]. Mit zunehmender Temperatur (15...30 °C) nahmen auch die Alkoholausbeuten nach 24 h Fermentationszeit zu. Ngadi et al. konnten im Rahmen kinetischer Untersuchungen das Zellwachstum, die Ethanolproduktion und den Glucoseabbau bei der Vergärung von Apfelsastrestern in horizontalen Batch-Reaktoren mit Hilfe mathematischer Funktionen beschreiben [97]. In Abhängigkeit der Fermentationsbedingungen (Mischgeschwindigkeit, Tresterfeuchtegehalt) dauerten die Gär-Anlaufphasen bis zu 12 Stunden. Die Gesamt-Fermentationszeiten betragen zwischen 40 und 60 Stunden, wobei die Alkoholausbeuten bezogen auf den Glucosegehalt ( $Y_{P/S}$ ) im Bereich von 0,33 bis 0,37 g/g lagen.

Aus Papayaresten, die nach der Papaingewinnung aus Papayafrüchten (*Carica papaya*) in großen Mengen in Nigeria anfallen, konnten afrikanische Wissenschaftler unter Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus niger* nach 48-stündiger simultaner Verzuckerung und Vergärung Alkoholausbeuten von bis zu 5,2 % (bezogen auf die Ansatzmasse) erreichen [101].

#### 3.1.3.5 Weitere Anwendungen

Neben den bereits genannten Verwertungsmöglichkeiten können Apfeltrester für eine Reihe weiterer biochemischer und biotechnologischer Verfahren genutzt werden. Bushan et al. verwendeten Apfeltresterextrakte für die Herstellung von Bäckerhefen in aeroben fed-batch-Verfahren [102]. Mit Hilfe von *Aspergillus niger* konnten Apfeltrester als Substrat für die mikrobielle Produktion von Zitronensäure eingesetzt werden [103]. Polygalacturonasen und Pektinesterasen wurden unter verschiedenen Fermentationsbedingungen ebenfalls unter Verwendung von *Aspergillus niger* aus Apfeltrestern gewonnen [104-106]. Zheng et al. nutzten Apfeltrester als Substrat für die Gewinnung von Polygalacturonase mit Hilfe von *Lentinus edodes* [107].

## 3.2 Struktur pflanzlicher Zellwände und Zellwandabbau

### 3.2.1 Zellwandstruktur

Pflanzliche Zellwände stellen die wichtigsten Strukturelemente von Pflanzen und zahlreichen pflanzlichen Lebensmitteln dar. Sie beeinflussen maßgeblich eine ganze Reihe von Qualitätsmerkmalen, von der organoleptischen Textur bis hin zu den Eigenschaften von Ballaststoffen [108, 109]. Seit längerem geht man davon aus, dass die pflanzliche Zellwand nicht lediglich als Barriere zwischen Zellinnerem und seiner Umgebung dient, sondern vielmehr als Kommunikationsraum betrachtet werden kann und ihr im Sinne einer dynamischen Betrachtungsweise Funktionen des Zellwachstums sowie der Wasseraufnahme zugeordnet werden [110]. Sie steht in enger Verbindung mit dem Protoplasten und dient als Transportzone sowie als Signalgeber bei Abwehrreaktionen. Nach heutiger Meinung reichen ältere Zellwandmodelle zur detaillierten Charakterisierung der Zellwandstruktur nicht mehr aus, da diese die Wechselbeziehungen zwischen Zellwandkomponenten, der Funktionalität und der daraus resultierenden Qualität nur unzureichend aufklären können. Dennoch lassen sich anhand solcher Modelle die grundlegenden Strukturen der Zellwandpolymere und deren Verknüpfungen untereinander gut beschreiben und sollen daher in den folgenden Abschnitten kurz erläutert werden.

Im Wesentlichen bestehen pflanzliche Zellwände aus drei verschiedenen Lagen. Dies sind die Mittellamelle, die Primärwand sowie die Sekundärwand [38]. Die Mittellamelle verbindet die Einzelzellen miteinander, wobei die Primärwände zweier benachbarter Zellen, an beiden Seiten an die Mittellamelle angrenzen. Die Sekundärwand schließt sich an die Primärwand an und grenzt in der anderen Richtung an den Zellinnenraum. Die wichtigsten Zellwandkomponenten sind Cellulose, Pektin, die Hemicellulosen, Proteine und phenolische Verbindungen. Den größten Anteil in den Zellwänden von Früchten und Gemüse machen dabei die Pektine mit 40 % und die Cellulose mit 35 % aus, gefolgt von den Hemicellulosen mit 15 %. Proteine und phenolische Verbindungen machen mit jeweils 5 % den geringsten Anteil aus [38]. In Abb. 3 und Abb. 4 sind zwei Zellwandmodelle mit den Interaktionen zwischen den Zellwandkomponenten dargestellt.

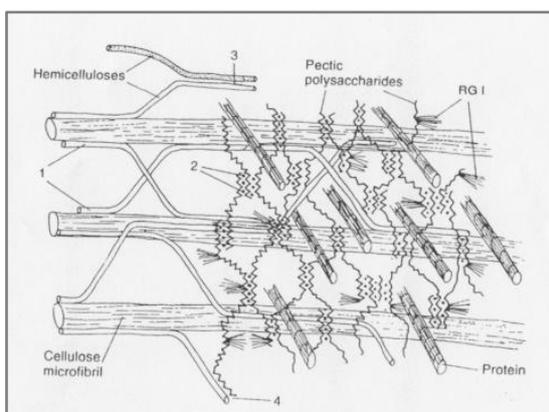


Abb. 3: Zellwandmodell nach [38]

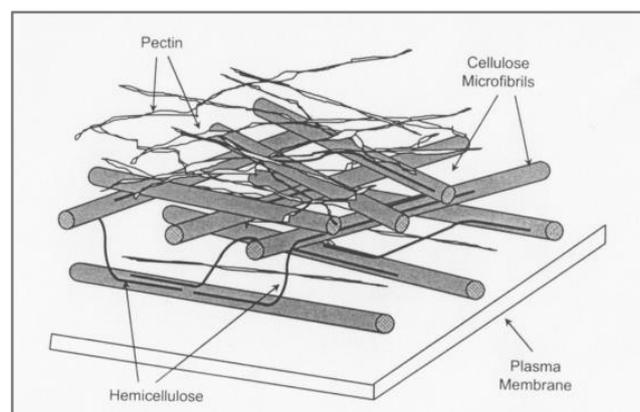


Abb. 4: Zellwandmodell nach [111]

In den meisten Fällen wird in der Literatur von der Einbettung der hauptsächlich kristallinen Cellulosefibrillen in einer amorphen Matrix, bestehend aus einer Vielzahl von Komponenten unterschiedlicher Stoffgruppen, hauptsächlich pektischer Polysaccharide, gesprochen [57, 112, 113].

Die Cellulose ist Hauptbestandteil der Sekundärwand und besteht aus  $\beta$ -1,4 glykosidisch verknüpften Glucose-Bausteinen mit einem Polymerisationsgrad von 2000 – 10000 [108]. An die Cellulosefibrillen sind über Wasserstoffbrückenbindungen Xyloglucan-Ketten geknüpft, die stabilisierende Verbindungen zu benachbarten Fibrillen ausbilden oder mit anderen pektischen Polysacchariden verknüpft sind. Dies können z. B. Arabinogalactane als Verbindungsglied zwischen dem Cellulose-Xyloglucan-Netzwerk und dem Rhamnogalacturonan der Pektinmatrix sein. Die pektischen Polysaccharide sind nach der Cellulose die zweitwichtigsten Polymere der Zellwand und kommen hauptsächlich in der Primärwand und der Mittellamelle vor. Die drei Hauptvertreter dieser Gruppe sind das Homogalacturonan, das Rhamnogalacturonan I und das Rhamnogalacturonan II [114, 115]. Das Homogalacturonan (HG) besteht aus unverzweigten Ketten von  $\alpha$ -1,4 glykosidisch verknüpften Galacturonsäure-Bausteinen, von denen 70 - 80 % mit Methanol verestert vorliegen. Da diese keine Seitenketten aufweisen, bezeichnet man die Bereiche, in denen sie vorkommen als „smooth regions“. Sie sind Hauptbestandteil des unlöslichen Protopektins der Mittellamelle. Die in der Literatur häufig beschriebenen „junctions zones“ [112], bei denen sich Pektinketten unter Ausbildung sogenannter egg-box-Strukturen zusammenlagern, sind nur in entesterten Bereichen des Pektins bei gleichzeitiger Anwesenheit von zweiwertigen Ca-Ionen möglich [63]. Solche Strukturen kommen in der nativen Zellwand praktisch nicht vor, da deren Ausbildung durch den hohen Veresterungsgrad nicht möglich ist. Schols et al. konnten darüber hinaus Verknüpfungen der Galacturonsäure-Bausteine mit Xylose nachweisen, die zur Ausbildung des Xylogalacturonans führen [116]. Abb. 5 zeigt den schematischen Aufbau der verschiedenen Pektinpolymere.

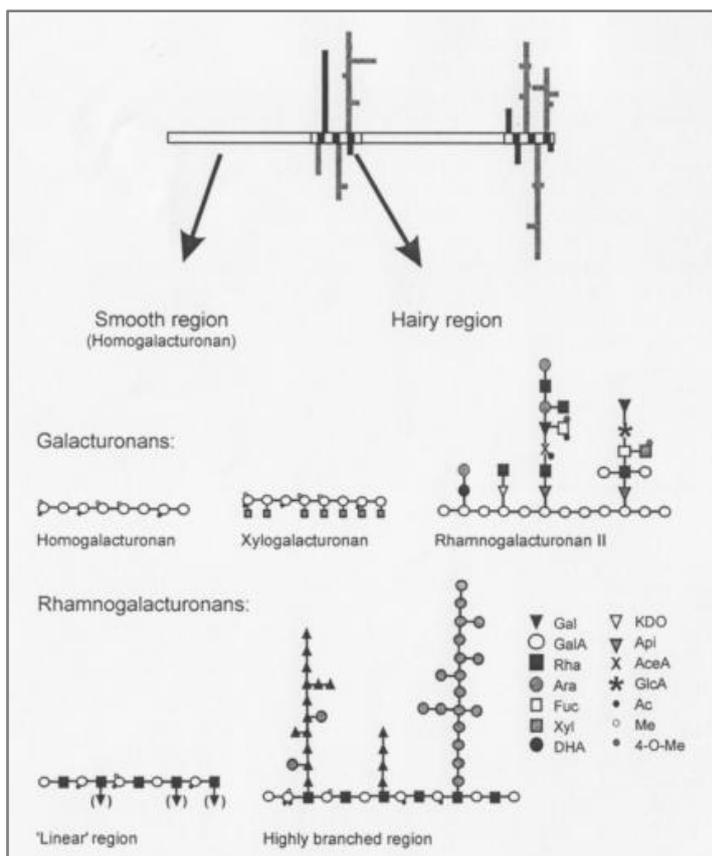


Abb. 5: Schematischer Aufbau von Zellwandpektinen nach [115]

Rhamnogalacturonan I (RG I) ist ein pektisches Polysaccharid, dessen Anteil von der Mittellamelle zur Primärwand zunimmt und dessen Rückgrat aus Galacturonsäure-Bausteinen und  $\alpha$ -1,2 verküpften L-Rhamnose-Bausteinen besteht, wobei erstere zum Teil mit Methanol und Essigsäure verestert vorliegen. Die Seitenketten des RG I bestehen zumeist aus Arabinose- sowie Galactose-Bausteinen. Diese verzweigten Bereiche des RG I werden auch als „hairy regions“ bezeichnet. Rhamnogalacturonan II stellt lediglich eine Minor Komponente in der pflanzlichen Zellwand dar und besitzt eine komplexe Struktur aus Galacturonsäure und verschiedenen Neutralzuckerbausteinen (Rhamnose, Galactose, Fucose, Apiose) [38]. Weitere pektische Polysaccharide sind die Arabinane, die Galactane und das Arabinogalactan mit einer Hauptkette aus  $\beta$ -1,4 glykosidisch verknüpften Galactose-Bausteinen und kurzen Seitenketten aus  $\alpha$ -1,5 verknüpfter Arabinose. Die Hemicellulosen kommen vorwiegend in der Primär- und Sekundärwand vor. Aufgrund ihrer häufig starken Verbindung zur Cellulose, können Hemicellulosen erst durch starke Alkali (NaOH, KOH) solubilisiert werden [117]. Der wichtigste Vertreter der Hemicellulosen ist das Xyloglucan. Das Rückgrat besteht aus  $\beta$ -1,4 glykosidisch verknüpften Glucose-Bausteinen, an die Seitenketten aus  $\alpha$ -1,4 verbundenen Xylose-Bausteinen geknüpft sind. Weiterhin können vom Xyloglucan Verknüpfungen mit Neutralzuckern (Galactose, Fucose) ausgehen. Weitere Hemicellulosen sind das Xylan, welches aus einer Hauptkette aus  $\beta$ -1,4 verknüpften Xyloseresten besteht, sowie die Glucomannane, Mannane, Galactomannane und die Glucomannane.

Neben dem Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk und dem Pektin-Netzwerk werden innerhalb der Zellwand zwei weitere Netzwerke, das Extensin-Netzwerk und das Lignin-Netzwerk, ausgebildet [38]. Das Strukturprotein Extensin ist ein Glycoprotein, welches die eher seltene Aminosäure Hydroxyprolin enthält und daher zur Gruppe der hydroxyprolinreichen Glycoproteine (HRGP) zählt. Neben Hydroxyprolin kommen auch Serin, Threonin und Tyrosin vor, wobei letzteres intra- möglicherweise auch intermolekulare Verknüpfungen eingehen kann und somit eine wichtige Rolle beim Aufbau der Zellwand spielt. Weitere Zellwandproteine sind neben anderen Strukturproteinen die löslichen Arabinogalactan-Proteine und Enzyme, die im Rahmen des Pflanzenwachstums und der Pflanzenentwicklung sowie –alterung eine wesentliche Rolle beim Umbau, Abbau und Wiederaufbau der Zellwand spielen [108].

Die bedeutendsten phenolischen Komponenten pflanzlicher Zellwände stellen das Lignin und die Ferulasäure dar. Lignin ist ein hydrophobes Polymer, welches aus verschiedenen aromatischen Alkoholen (u. a. Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapyl-Alkohol) unter Beteiligung von Peroxidase aufgebaut wird [118]. Dieses dreidimensionale Netzwerk durchzieht sowohl die Mittellamelle als auch die Primär- und Sekundärwand und spielt eine wichtige Rolle beim Alterungsprozess der Zellen, kommt jedoch in den Zellwänden von Früchten und Gemüse nur in geringen Mengen vor. Einfache phenolische Verbindungen wie die Ferulasäure finden sich in pflanzlichen Zellwänden häufig verestert mit den Arabinose- und Galactose-Bausteinen im Pektin und können z. B. in Zuckerrübenpektinen eine wichtige Rolle bei intermolekularen Verknüpfungen (cross-linking) der Zellwandpolymere spielen [119-122]. Die mechanische Festigkeit nicht-lignifizierter Zellwände ist vorrangig der Struktur der Cellulosefibrillen zuzuschreiben und ergibt sich durch die unterschiedliche Ausrichtung der Fibrillenschichten zueinander [38]. Aufgrund des Übergewichtes an Uronsäureresten weist die Zellwand normalerweise eine negative Ladung auf, die jedoch teilweise durch positiv geladene Proteine wieder aufgehoben wird. Der pH-Wert der Zellwand liegt zwischen 6 und 4. Die Primärwände weisen hydrophilen Charakter auf.

### 3.2.2 Zellwandabbau durch physikalische Verfahren

#### 3.2.2.1 Konventionelle mechanische und thermische Verfahren

Unter den mechanischen Verfahren, die für den Aufschluss von Früchten und Gemüse in Frage kommen, ist die Zerkleinerung mittels Obstmühlen die wohl bekannteste und traditionell am häufigsten angewandte [31]. Zur Anwendung bei Kernobst kommen in der Regel Rätz- oder Hammermühlen, bei denen das Mahlgut mittels rotierender Schlagflügel an einer Mahlwand zerkleinert wird und durch ein Sieb/Seiher mit definierter Lochgröße bzw. Spaltbreite befördert wird.

Die wesentlichen Vorteile der durch die Zerkleinerung hervorgerufenen Partikelgrößenreduktion sind nach [123]:

- die Erhöhung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses des Mahlgutes, was nachfolgende technologische Prozesse (Trocknung, Erhitzung, Kühlung, Extraktion) begünstigen kann und
- die Erzielung eines einheitlichen Partikelgrößenbereiches (unter Anwendung von geeigneten Sieben)

Mechanische Zerkleinerungsverfahren finden sich auch als wesentliche Prozessschritte in Laborverfahren zur Herstellung von zellstrukturierten Materialien (ZM) und Ballaststoffen und führen je nach Intensität und Anzahl der mechanischen Operationen (u. a. Ultraturrax-Anwendung) und durch die Kombination mit einfachen thermischen Verfahren (z. B. Blanchieren) zur Erzeugung von Gewebepartikel und/oder Einzelzellmaterialien mit unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen (Abb. 6) [72, 124-127].



Abb. 6: Schema zur Herstellung von ZM, vereinfacht nach [127]

Die wichtigsten thermischen Verfahren, die die Struktur pflanzlicher Zellwände maßgeblich beeinflussen, sind das Blanchieren, das Kochen und die Hitzesterilisation [128-131]. Ziel des Blanchierens ist vorrangig die Inaktivierung nativer, zellwandabbauender Enzyme, die jedoch erst bei Temperaturen oberhalb von 70 °C stattfindet [132]. Schonendere Blanchierverfahren ( $T < 60$  °C) können die Aktivität von Pektinmethylesterasen begünstigen und im Beisein zweiwertiger Kationen zur Gewebeverfestigung führen [133, 134]. Beim Kochen hingegen kommt es in jedem Fall zur Gewebeerweichung durch die Zerstörung der Zellmembranen [109]. Zusätzlich tritt die Erweichung als Folge der  $\beta$ -eliminativen Spaltung der Pektinketten ein [45,

130], was durch die Anwesenheit ein- und zweiwertiger Kationen zusätzlich begünstigt wird [135]. Stolle-Smits et al. konnten nachweisen, dass bei der Hitzesterilisation grüner Bohnen, neben dem Abbau des Mittellamellenpektins und der damit verbundenen Zellseparation, auch Teilbereiche des Rhamnogalacturonans durch das Aufbrechen kovalenter Bindungen solubiliert werden [131].

### 3.2.2.2 Ultraschall, gepulste elektrische Felder, hohe statische Drücke und überkritische Fluide

Der Einsatz von Ultraschall in der Lebensmittelindustrie ist seit vielen Jahren ein Thema in der Forschung und Entwicklung [136]. Als Ultraschall bezeichnet man mechanische Schwingungen im Frequenzbereich von 20 kHz bis 10 MHz. Tab. 6 gibt einige Anwendungsmöglichkeiten von Ultraschall in der Lebensmittelverarbeitung wieder.

**Tab. 6: Anwendungsmöglichkeiten von Ultraschall in der Lebensmittelverarbeitung**

<b>Mechanische Effekte</b>	Entgasung Schaumzerstörung Aromaextraktion Mischen und Homogenisieren
<b>Chemische und biochemische Effekte</b>	Bakterizide Wirkung Veränderung von Enzymaktivitäten Oxidationsprozesse Sterilisation

Unabhängig von der jeweiligen Bauart bestehen Ultraschallsysteme in der Regel aus drei grundlegenden Komponenten. Der Generator transformiert die aufgenommene Netzspannung in eine hochfrequente Spannung. Der Ultraschallwandler wandelt die vom Generator gelieferte elektrische Energie in mechanische Schwingungen gleicher Frequenz um. Im Fall von Ultraschallsonden werden die mechanischen Schwingungen anschließend durch sogenannte Booster-Hörner verstärkt und an das zu beschallende Medium abgegeben.

Hochfrequenter Ultraschall ist in der Lage biologische Zellen durch Zerstörung der Zellwände zu schädigen [137]. Bereits in den 1970er Jahren wurde der Einfluss einer Ultraschallbehandlung auf die Saftextraktion aus Obstmaischen in Abhängigkeit verschiedener Prozessparameter (Flüssigkeitsgehalt, Schallintensität und –dauer) untersucht [138]. Entezari et al. konnten zeigen, dass eine Ultraschallbehandlung zur verbesserten Extraktion von Dattelsirup aus Rückständen der Dattelverarbeitung beiträgt und gleichzeitig die Keimgehalte in den erzeugten Produkten im Vergleich zu klassischen Methoden minimiert werden konnten [139]. Nielsen et al. entwickelten eine Methode zum Einsatz niedrigfrequenten Ultraschalls für Texturbestimmungen in gekochten Karotten [140].

Gepulste elektrische Felder (PEF) als Membranpermeabilisierungstechnik stellen eine Alternative zu energie- und zeitintensiven konventionellen thermischen oder mechanischen Aufschlusstechniken dar [141]. Das Prinzip beruht auf der Wirkung externer elektrischer Felder, die in biologischen Zellmembranen ein kritisches elektrisches Potential erzeugen, was zu lokalen strukturellen Änderungen der Membran führt. In Abhängigkeit der Behandlungszeit und –temperatur, der Pulsform und –energie sowie der elektrischen Feldstärke kann die Permeabilisierung reversibel oder irreversibel sein [142]. Schilling et al. verglichen die Anwendung gepulster elektrischer Felder mit der enzymatischen Mazeration von Apfelmaischen (vor dem

Abpressen) bei der Safftherstellung und konnten sowohl in den trüben als auch geklärten Säften deutlich höhere Gehalte an phenolischen Bestandteilen nach PEF-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten und mazerierten Vergleichssäften nachweisen [143]. Ein erhöhender Effekt auf die Pektinausbeute bei der anschließenden Tresterextraktion konnte durch die PEF-Behandlung hingegen nicht beobachtet werden. Die Extraktion von Anthocyanen aus Weintrestern mittels Ultraschall, PEF und hydrostatischer Hochdruckbehandlung (HHP) wurde von Corrales et al. untersucht [144]. Dabei konnten nach einstündiger Behandlung bei 70 °C durch PEF- und HHP-Behandlung bis zu 50 % höhere Gesamtpolyphenolgehalte in den Extrakten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollvarianten nachgewiesen werden.

Die Anwendung hoher statischer Drücke (50 – 1000 MPa) zählt ebenfalls zu den nicht-thermischen Lebensmittelverarbeitungstechniken, die im industriellen Bereich als Batch- oder semi-kontinuierliche Prozesse zum Einsatz kommen [145]. Ein Hauptanwendungszweck im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit und –stabilität ist die Inaktivierung von Mikroorganismen durch HHP. Desweiteren können hohe statische Drücke die funktionellen Eigenschaften von Lebensmitteln maßgeblich beeinflussen und dienen daher auch als Werkzeug für die Entwicklung neuartiger minimal verarbeiteter Lebensmittel. Die Hochdruckbehandlung kann alternativ zu thermischen Verfahren (z. B. Blanchieren) auch für die Inaktivierung von nativen pektinabbauenden Enzymen (Pektinesterasen, Polygalacturonasen) eingesetzt werden [146].

Nach Rastogi et al. sind die wesentlichen Vorteile dieser Technologie die folgenden [146]:

- Lebensmittelverarbeitung bei Raumtemperatur (oder darunter).
- unmittelbare Druckübertragung im System, unabhängig von der Größe und Geometrie.
- mikrobielle Abtötung unter praktischem Ausschluss von Hitzeschäden und der Anwendung chemischer Konservierungsstoffe und Zusätze.
- Herstellung von Ingredienzen mit neuartigen funktionellen Eigenschaften.

Die Anwendung überkritischer Fluide als Alternative zu organischen Lösungsmitteln wird bereits seit den 1970er Jahren diskutiert. Im industriellen Maßstab haben sich diese Techniken bislang jedoch noch nicht durchgesetzt [147]. Im Technikumsmaßstab wurde überkritisches CO<sub>2</sub> für die Extraktion phenolischer Antioxidantien aus abdestillierten Weißweintrestern verwendet [148].

### 3.2.2.3 Autoklavieren

Autoklaven sind Druckbehälter, die u. a. in der Mikrobiologie zur Hitzesterilisation eingesetzt werden, um Wassersiedetemperaturen von über 120 °C zu erreichen [149]. Untersuchungen zum Einfluss einer Autoklavenbehandlung auf die Ballaststoffgehalte von Früchten und Gemüse sind von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt worden. Arrigoni et al. konnten in nativen Apfeltrestern eine Abnahme an unlöslichen Ballaststoffen schon nach 15-minütiger Autoklavenbehandlung nachweisen, wohingegen die Gehalte an löslichen Ballaststoffen zunahmen [42]. In entpektinisierten Trestern nahmen sowohl die Gehalte an unlöslichen als auch löslichen Ballaststoffen ab. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Versuchen mit Karotten und Steckrüben gefunden [150]. Kunzek et al. fanden heraus, dass eine 15-minütige Autoklavenbehandlung von ZM bei 121 °C zu einer beträchtlichen Pektindepolymerisation, jedoch zu keiner merklichen Pektinentesterung führte [151].

#### 3.2.2.4 Hochdruckhomogenisieren

Hochdruckhomogenisatoren bestehen aus einer Pumpeneinheit zur Erzeugung von Drücken im Bereich von 100 - 700 bar und in der Regel mehreren Ventileinheiten, mit Produktzulauf und –ablauf und werden in den meisten Fällen für die Homogenisierung flüssiger Produkte (z. B. Reduzierung der Fetttropfchengröße in Milch) verwendet [123]. Der Zerkleinerungseffekt beruht dabei auf der Kavitation von Wasserdampfblasen durch die extrem hohen Scherkräfte im Bereich der Ventile (Spalt und Prallfläche).

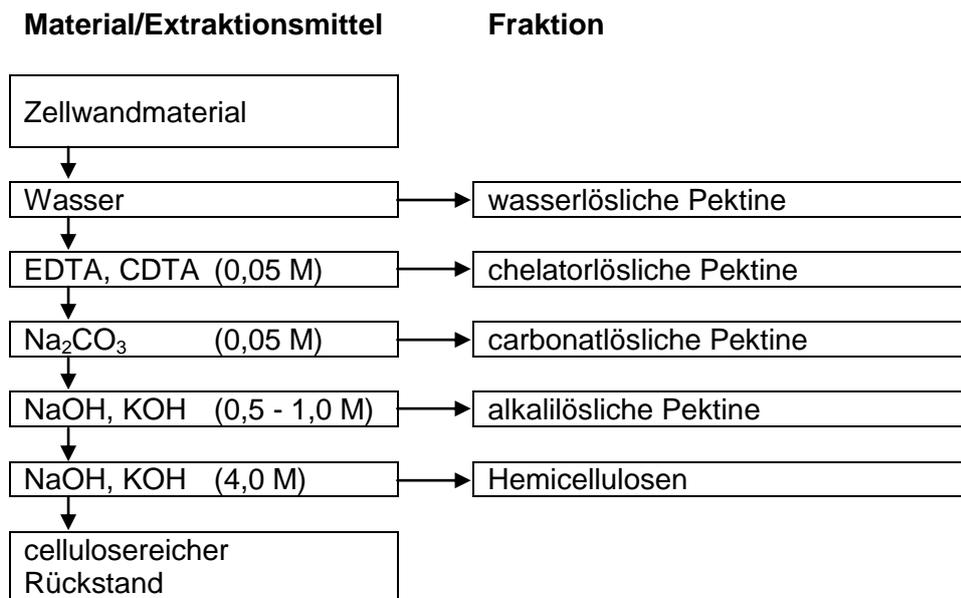
In der Obst- und Gemüseverarbeitung wurden Hochdruckhomogenisatoren bereits für die Herstellung von ZM nach entsprechender Vorbehandlung (Vorzerkleinerung, Blanchieren) eingesetzt [152, 153]. Auf diese Weise konnten Materialien mit vergleichsweise hohem Pektin-gehalt gewonnen werden, deren Partikel im Größenbereich zwischen 80 und 250 µm lagen, die jedoch im Vergleich zu den entsprechenden Basisvarianten nur mäßige Wasserbindungseigenschaften aufwiesen. Timamo et al. fanden heraus, dass sich eine zusätzliche Vorbe-handlung (18 h Rühren) begünstigend auf die Quellungseigenschaften hochdruckhomogeni-serter ZM auswirkte, das Wasserbindevermögen WBV bei 20 und 80 °C jedoch nicht verbessert wurde im Vergleich zur entsprechenden Basisvariante [76]. Zu ähnlichen Ergeb-nissen kamen Pickardt et al., wobei die im wässrigen Milieu hochdruckhomogenisierten ZM nach zusätzlicher Vorbehandlung (17 h Rühren und 2 min Ultraturrax) ähnlich hohe Quel-lungseigenschaften aufwiesen, wie die durch Mazeration (enzymatische Zellvereinzelnung) hergestellten Vergleichsvarianten [154].

#### 3.2.3 Zellwandabbau durch chemische Verfahren

Aufgrund der Komplexität pflanzlicher Zellwände ist die Aufklärung der biogenen Struktur, insbesondere der Zellwandpolysaccharide und deren Zusammensetzungen und Verknüpfun-gen untereinander bis heute ein wichtiger Forschungsschwerpunkt bei der Entwicklung pflanz-licher Lebensmittel [108]. Seit Jahrzehnten beschäftigen sich zahlreiche internationale For-schungsgruppen mit der Erarbeitung von Extraktionsmethoden zur gezielten Gewinnung interessierender Polysaccharidfraktionen und der Untersuchung der gewonnenen Präparate hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrer physiko-chemischen Eigenschaften [77, 155-158]. Die wesentlichen Schritte bei der Anwendung chemischer Verfahren zur Cha-rakterisierung pflanzlicher Fasermaterialien sind nach Brett et al. [38]:

- die Aufarbeitung der biologischen Rohstoffe zu zellstrukturierten Materialien (Entfer-nung löslicher Bestandteile und Zerkleinerung)
- die Extraktion von Zellwandkomponenten durch mehrstufige Prozessschritte
- und die physikalischen und chemischen Untersuchungen der extrahierten Materialien

Durch eine stufenweise Extraktion (Abb. 7) lassen sich ausgehend von ZM unter Einsatz wässriger Lösungsmittel verschiedene Fraktionen von Zellwandpolysacchariden mit unter-schiedlicher Zusammensetzung gewinnen [10, 45].



**Abb. 7: Extraktionsschema für Zellwandpolysaccharide nach [10, 45]**

Dabei ist es möglich, dass durch die Anwendung von Alkali zur Extraktion von Hemicellulosen noch weitere Anteile an pektischen Polysacchariden aus der Zellwand gelöst werden. Andererseits führen auch drastische Bedingungen mit konzentrierten Alkali (4,0 M) nicht zur vollständigen Freisetzung von Pektin, womit selbst im cellulosereichen Rückstand noch ein Teil von Pektin zurückbleibt [45]. Zum gleichen Ergebnis kamen Timamo et al., die in chemisch gereinigten Cellulosefasern, neben Galactose, Mannose und Xylose als Hemicellulose-Bausteine noch 6,8 % Galacturonan fanden [76]. Stevens et al. konnten in den cellulosereichen Rückständen der Apfelfaserextraktion neben verschiedenen Neutralzuckern aus Hemicellulosen noch signifikante Gehalte an Galacturonsäure nachweisen [157].

Insbesondere in den 1980er und 1990er Jahren ist die Pektinextraktion mittels chelatisierender Reagenzien und Alkali umfassend untersucht worden [114, 117, 155, 159]. Voragen et al. konnten in Hemicellulose-Extrakten aus Äpfeln nach sequenzieller Extraktion mit EDTA und schwachen sowie starken Alkali neben Arabanen, Galactanen und Xylanen Fucogalactoxyloglucane nachweisen [87]. Renard et al. verwendeten CDTA als Vorstufe für die Extraktion mittels verdünnter Alkali sowie Harnstoff zur Gewinnung von Hemicellulose-Präparaten unterschiedlicher Zusammensetzung [160]. Neben den chelatisierenden Agentien kommen für die Extraktion wasserunlöslicher Pektine auch Ammoniumoxalate in Frage [161, 162].

Industriell spielen chemische Verfahren zur Extraktion, Isolierung und Aufarbeitung pflanzlicher Materialien insbesondere bei der Pektinherstellung eine wesentliche Rolle. Allerdings werden hier aufgrund der bereits erwähnten Ausbeuteverluste durch alkalische Extraktionsverfahren ausschließlich Extraktionen im sauren pH-Bereich (pH 1 - 2) durchgeführt [9].

Um nähere Informationen über die chemische Zusammensetzung der Zellwand bzw. die durch die verschiedenen Extraktionsverfahren hergestellten Materialien zu erhalten, müssen die Polysaccharid-Bausteine qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Häufig müssen die zu untersuchenden Proben dabei noch verschiedenen Reinigungs- und Aufarbeitungsschritten unterzogen werden [49]. Der erste wesentliche Schritt der Aufarbeitung ist die vollständige

Hydrolyse der Polysaccharide in ihre Grundbausteine (Monomere). Für die Untersuchung von Zellwandpolysacchariden aus Früchten und Gemüse haben sich dabei zwei Verfahren etabliert. Zum einen können die Polymere durch eine 2-stufige Hydrolyse mit 12 M und 1 M Schwefelsäure unter Sieden für 2 h gespalten werden (Saeman-Hydrolyse) [85, 163]. Eine weitere häufig angewandte Methode ist die kombinierte enzymatische TFA-Hydrolyse [87]. Die durch die Hydrolyse freigesetzten Neutralzucker werden in der Regel als Alditolacetate nach entsprechender Derivatisierung mit Hilfe gaschromatographischer Methoden bestimmt [84, 164]. Obwohl die sauren Zuckerbausteine (Uronsäuren) prinzipiell auch nach entsprechender Aufarbeitung mittels HPLC oder GC untersucht werden können [86, 165, 166], kommen am häufigsten kolorimetrische Methoden zur Anwendung [156]. Für die Untersuchung pflanzlicher Materialien hat sich die *m*-Hydroxydiphenyl-Methode nach Blumenkrantz et al. etabliert [167].

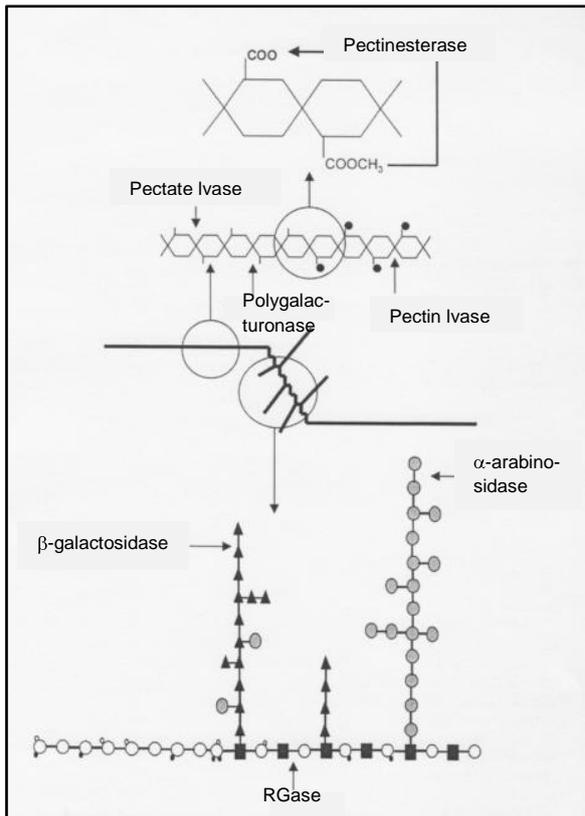
### 3.2.4 Zellwandabbau durch enzymatische Verfahren

#### 3.2.4.1 Zellwandabbauende Enzyme (Pektinasen, Hemicellulasen und Cellulasen)

Zellwandpektine werden während der Hauptentwicklungsphasen wie Wachstum, Fruchtreifung und Ernte zu einem bestimmten Grad modifiziert oder abgebaut [100]. Ein wichtiger Faktor für die Beeinflussung der Pektinstruktur während der Fruchtreifung und Fruchtverarbeitung ist die Wirkung pektischer (pektinolytischer) Enzyme, die natürlich in zahlreichen Früchten und Gemüse vorkommen (endogene oder native Enzyme) [168]. Pektinolytische Enzyme werden darüber hinaus von Mikroorganismen produziert. Sie finden unter anderem als Hilfsstoffe, in Form von aufgereinigten Flüssigpräparaten, in der Obst- und Gemüseverarbeitung Anwendung [23].

Die pektinolytischen Enzyme beinhalten die Hauptketten abbauenden Depolymerasen, darunter die Hydrolasen (Polygalacturonasen) und Lyasen (Pektin-, Pektatlyasen), sowie die Esterasen (Methylesterasen, Acetylerasen). Beide Gruppen enthalten Enzyme zum Abbau des Homogalacturonans (smooth regions) und des Rhamnogalacturonans (hairy regions). Teilaktivitäten, wie Arbanasen und Galactanasen, gehören trotz der Assoziation der entsprechenden Polysaccharidfraktionen (Arabane, Galactane) mit den Pektinen formal gesehen nicht zu den pektinolytischen Enzymen [168].

In Abb. 8 sind die stilisierten Wirkungsmechanismen der pektinolytischen Enzyme dargestellt. Polygalacturonasen (PG) spalten auf hydrolytischem Wege die  $\alpha$ -1,4-D-glykosidische Bindung zwischen den Galacturonsäure-Bausteinen [169]. Man unterscheidet dabei zwischen PG, die statistisch im Inneren der Pektinketten spalten (Endo-PG) und solchen die vom nichtreduzierenden Kettenende her spalten (Exo-PG). Das pH-Optimum von PG liegt im Bereich von 4,0 bis 6,0 und das Temperaturoptimum zwischen 40 und 45 °C [170]. In der Regel nimmt die Aktivität mikrobieller Endo-PG mit zunehmendem Veresterungsgrad ab [169]. Der gleichzeitige Einsatz von Pektinesterasen kann die Wirkung von Endo-PG jedoch begünstigen [100]. Mikrobielle, technische Pektinasepräparate werden zumeist aus *Aspergillus niger* gewonnen.



**Abb. 8: Wirkungsmechanismen pektinolytischer Enzyme leicht modifiziert nach [100]**

Unter den Pektinesterasen (PE) sind die Pektinmethylesterasen (PME) die wohl wichtigsten Vertreter dieser Enzymklasse. Sie hydrolysieren die Esterbindung zwischen dem Methanol und der Carboxylfunktion der Galacturonsäure-Bausteine im Pektinmolekül, wodurch sowohl freie Carboxylgruppen als auch freies Methanol entstehen [171]. Die pH-Optima mikrobieller PME liegen bei 4,5 und die Temperaturoptima zwischen 40 und 45 °C. Im Gegensatz zu pflanzlichen PME benötigen mikrobielle PE keine Aktivatoren (NaCl, CaCl<sub>2</sub>) und entestern statistisch [170].

Pektinlyasen (PL) und Pektatlyasen spalten die α-1,4-glykosidischen Bindungen zwischen den Galacturonsäure-Bausteinen unter Bildung einer Δ4,5-ungesättigten Bindung am nichtreduzierenden Ende [171]. Pektatlyasen spalten bevorzugt Polygalacturonsäuren, wohingegen Pektinlyasen hochveresterte Pektine spalten und nur als Endo-Enzyme vorkommen [172].

Weitere Pektinasen, die bevorzugt im Bereich der hairy regions des Pektins spalten, sind die Rhamnogalacturonasen und Xylogalacturonasen [173].

Als Hemicellulasen werden Enzyme bezeichnet, die entweder die aus Neutralzuckern bestehenden Seitenketten der hairy regions des Pektins oder andere Hemicellulosen, die in unterschiedlicher Weise im Zellwandverbund zwischen Pektinmatrix und Cellulosefibrillen assoziiert sind, spalten. Sie kommen in technischen Enzympräparaten in der Regel als Neben- oder Begleitaktivitäten der Pektinasen produzierenden Stämme vor [23]. Über Enzyme aus verschiedenen Bakterienstämmen (hauptsächlich *A. niger*), die Arabinose und Galactose aus den Pektin-Seitenketten freisetzen (Arabinanasen, Galactanasen) berichten de Vries et al. [174]. Xylane komplexer Struktur können durch sogenannte xylanolytische Systeme, die aus

mehreren Enzymen bestehen (Xylanase, Arabinofuranosidasen,  $\beta$ -Xylosidasen) abgebaut werden [175]. Vincken et al. beschreiben die Wirkungsweise verschiedener Xyloglucanasen, darunter Endoglucanasen, Glucosidasen, Xyloglucosidasen und Xylosidasen zum Abbau von Xyloglucanen [176].

Alle Cellulasen wirken an der gleichen chemischen Bindungsstelle. Dies ist die  $\beta$ -1,4-glykosidische Verknüpfung zwischen den Anhydroglucose-Bausteinen im Cellulosemolekül [177]. Die Cellulasen lassen sich nach ihrem Spaltungsmechanismus in drei Kategorien unterteilen. Die Endoglucanasen (EG) ( $\beta$ -1,4-D-glucan-4-glucanohydrolase) spalten statistisch im Inneren der Celluloseketten, und zwar hauptsächlich die amorphen (ungeordneten) Bereiche der Cellulose. Exoglucanasen oder Cellobiohydrolasen (CBH) ( $\beta$ -1,4-D-glucan cellobiohydrolase) spalten vom nicht-reduzierenden Ende der Cellulosepolymere oder -oligomere hauptsächlich Cellobiose-Einheiten ab.  $\beta$ -Glucosidase oder Cellobiase (CB) ist dann in der Lage die Cellobiose in zwei Glucose-Bausteine zu zerlegen.

Beim Celluloseabbau durch Cellulasen kann es zur Produkthemmung kommen. Das bedeutet, dass die verschiedenen cellulolytischen Enzyme durch ihre Reaktionsprodukte (CBH durch Cellobiose und CB durch Glucose) ab einer bestimmten Konzentration gehemmt werden [178, 179]. Lieb et al. berichteten in diesem Zusammenhang über gentechnische Möglichkeiten zur Herstellung glucosetoleranter Cellobiasen [180].

Kommerzielle Cellulasepräparate, die zur Lebensmittelverarbeitung eingesetzt werden, werden in der Regel aus Pilzen (z. B. *Trichoderma reesei*) gewonnen und sind Mixturen aus Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen und  $\beta$ -Glucosidasen, sowie Begleitaktivitäten an Xylanasen, Proteasen und Amylasen [177].

#### 3.2.4.2 Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung

Die Methoden zur Ermittlung der Aktivitäten pektinolytischer und cellulolytischer Enzyme ähneln sich und unterscheiden sich häufig nur in den verwendeten Substraten. Neben chromatographischen Methoden, die häufig den Vorteil der gleichzeitigen Detektion von oligomeren und monomeren Zuckerbausteinen bieten, haben sich Methoden etabliert, die die Enzymaktivitäten hydrolytisch wirkender Enzyme anhand der freigesetzten reduzierenden Endgruppen bestimmen [172, 181, 182]. Als Modellsubstrate werden dabei häufig Carboxymethylcellulose, mikrokristalline Cellulose, Xylan, Arabinogalactan und Pektine mit verschiedenen Veresterungsgraden als Suspensionen oder Lösungen in Puffersystemen bei festgelegten pH- und Temperaturbedingungen für eine definierte Zeit inkubiert und die Enzymaktivität anhand der pro Zeiteinheit und Enzymmenge freigesetzten reduzierenden Zucker bestimmt [183-185]. Häufig werden cellulolytische Aktivitäten auch mittels „Filter Paper Assay“ (FPA) analysiert [186].

Neben der Bestimmung der reduzierenden Endgruppen eignen sich auch viskosimetrische Methoden zur Aktivitätsbestimmung [172]. Bis heute werden häufig Kapillarviskosimeter verwendet und die prozentuale Viskositätsabnahme anhand der Auslaufzeiten definierter Polysaccharid-Substratlösungen ermittelt [187-189]. Gusakov et al. untersuchten die Endo-Depolymerase-Aktivitäten verschiedener pektinolytischer Enzympräparate gegenüber verdünnten Apfel-, Zitrus- und Zuckerrübenpektinlösungen (0,5 – 1,5 %) mit Hilfe eines Ostwald-Viskosimeters [190]. Sreenath verglich die Freisetzung reduzierender Zucker und Glucose aus Carboxymethylcellulose mit der Viskositätsabnahme der CMC-Substratlösungen durch kom-

merzielle Cellulasen im Ostwald-Viskosimeter [191]. Lopez et al. untersuchten den zeitabhängigen Viskositätsabbau von Polygalacturonsäure-Lösungen durch *Rhizopus oryzae* mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters [192].

Untersuchungen mit Hilfe eines Rotationsviskosimeters und zerkleinerten Karottennasstrestern zeigten, dass durch den Einsatz kommerzieller, zellwandabbauender Enzyme (Pektinasen und Cellulasen) die Viskosität der Trester in Abhängigkeit von den Milieubedingungen (Enzymkonzentration, pH, Temperatur, Ca-Gehalt) um bis zu 90 % gesenkt werden konnte [193].

### 3.2.5 Enzymeinsatz bei der Verarbeitung von Obst und Gemüse und anderer pflanzlicher Materialien

Zellwandabbauende Enzyme spielen seit langer Zeit eine wichtige Rolle bei der Bearbeitung des Feststoffgerüsts von Obst und Gemüse [194]. In der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie ist die Enzymanwendung heutzutage für die Herstellung verschiedenster Produkte, darunter Frucht- und Gemüsesäfte und andere flüssige Obst- und Gemüseerzeugnisse, nahezu unabdingbar. Technische Enzympräparate, die für diese Anwendungen eingesetzt werden, enthalten Pektinesterasen, Polygalacturonasen und Pektinlyasen in verschiedenen Mengen sowie andere Enzyme wie Hemicellulasen und Cellulasen [21]. Pektinolytische Enzyme werden bei der Verarbeitung von Früchten und Gemüse hauptsächlich für die Klärung trüber Fruchtsäfte, die Depektinisierung von Fruchtsäften, den Maischeaufschluss und die Herstellung von Nektaren und Mazeraten eingesetzt [195]. Wie bereits beschrieben, sind für den Zellwandabbau verschiedenste Enzymaktivitäten notwendig. Ein Totalabbau der Zellwand kann nur durch das synergistische Wechselwirken pektinolytischer, hemicellulolytischer und cellulolytischer Enzyme erfolgen [196]. Voragen et al. beschrieben die 4 Stufen des enzymatischen Abbaus von Apfelgewebe wie folgt (Tab. 7).

**Tab. 7: Die 4 Stufen des enzymatischen Abbaus von Apfelgewebe [196]**

Mazeration	Abbau der Mittellamellenpektine durch PG und PL
Maischefermentation	Depolymerisation von Mittellamellen- und Zellwandpektin durch PG, PE und PL
Verflüssigung	Abbau von Pektin und Cellulose durch PG, PE, PL sowie C1-Cellulasen (Exoglucanasen)
Verzuckerung	Verflüssigung durch zusätzlichen Abbau von Polysaccharidfragmenten mit Hemicellulasen; synergistische Wechselwirkung von PG, PE, PL, C <sub>1</sub> - und C <sub>x</sub> -(Endo)-Cellulasen und Hemicellulasen

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass laut der aktuell gültigen Fruchtsaftverordnung für die Herstellung von Fruchtsäften ausschließlich der Einsatz von Pektinasen, Proteasen und Amylasen zugelassen ist [197]. Cellulasen sind als Begleitaktivitäten akzeptiert, dürfen jedoch nicht in Form von ausgewiesenen Cellulase-Präparaten verwendet werden [23].

Neben dem Einsatz pektinolytischer Enzyme für die Maischebehandlung, sind Verfahren zur nachgeschalteten zweiten Extraktion der resultierenden Pressrückstände (Apfeltresterverflüssigung) heutzutage Stand der Technik bei der Herstellung klarer Apfelsaftkonzentrate [28]. Dafür eignen sich speziell solche Präparate, die neben den Pektinasen noch größere Mengen an hemicellulolytischen Aktivitäten, insbesondere Arabanasen, enthalten [22, 23]. Mehrländer et al. fanden in den Fruchtsaftkolloiden nach der Apfeltrestereextraktion mit Pektinasen und Cellulasen hohe Gehalte an Galacturonanen, Arabinanen und Galactanen [198]. Bauckhage et al. untersuchten den Einfluss von Tresterenzymen auf die Freisetzung wertgebender Inhaltsstoffe in die Tresterextraktionssäfte und konnten in diesen erhöhte Cellobiose-, sowie Calcium- und Gesamtpolyphenolgehalte nachweisen [26]. Sembries et al. fanden in den gleichen Säften erhöhte Gehalte an löslichen Ballaststoffen, die die Bildung kurzkettiger Fettsäuren begünstigen [27].

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich seit den 1990er Jahren mit dem Abbau gereinigter Apfelzellwandmaterialien durch Pektinasen und Cellulasen und deren Einfluss auf die Struktur, die chemische Zusammensetzung und die physiko-chemischen Eigenschaften beschäftigt [199-204].

Hang et al. untersuchten die Freisetzung löslicher und gesamt reduzierender Zucker aus vorzerkleinerten Maiskolben und Maishülsen (Reststoffe der Maisproduktion) mit Hilfe kommerzieller Cellulase-Präparate [205, 206]. Dabei wurden größere Mengen löslicher Zucker, insbesondere Xylose, Glucose und Cellobiose freigesetzt (Tab. 8). Die Freisetzung reduzierender Zucker aus Maiskolben hing maßgeblich von der eingesetzten Substratkonzentration ab.

**Tab. 8: Freisetzung löslicher und reduzierender Zucker aus Maishülsen und –kolben**

Behandlungsdauer	Maishülsen	Maiskolben	reduzierende Zucker	Maiskolben	
	45 h	48 h		Konzentration	15 h
	[g/kg TS]			[g/100 mL]	[g/kg TS]
Xylose	175	200		10	418
Glucose	292	260		20	335
Arabinose	27	18		30	275
Cellobiose	130	96		50	211

Reaktionsbedingungen: pH 5,0, T = 50 °C, Enzympräparat Rapidase Pomaliq (Gist Brocades, Frankreich)

Versuche zur Verzuckerung von Bananenschalen mit Hilfe cellulolytischer Enzyme aus *Trichoderma lignorum* ergaben Verzuckerungsgrade von 10 - 20 % (berechnet als reduzierende Zucker bezogen auf die Substratmenge) nach 24 h bei optimalen Milieubedingungen (pH 6,0, 45 °C) und nach 15-minütiger Vorbehandlung im Autoklaven [207].

Lignocellulosereiche Biomassen, wie Zuckerrohrbagasse, Weizenstroh und Maispflanzenreste sind in den letzten Jahren aufgrund ihres Potentials für die Bioethanol-Gewinnung in das Rampenlicht der industriellen Forschung und Entwicklung gelangt [17]. Aufgrund der natürlichen Struktur dieser Biomassen und der geringen Zugänglichkeit der Cellulosefasern sind geeignete Vorbehandlungen notwendig, die die Schutzschicht aus Lignin und Hemicellulosen abbauen und so die Cellulose für die enzymatische Hydrolyse zugänglich machen [208]. Unter den verschiedenen Verfahren, die diesen Aufschluss entweder mit Hilfe von Ammoniak, Calciumhydroxid oder Säuren bei hohen Temperaturen und Drücken (70 - 200 °C, 1 - 24 atm) bewerkstelligen, haben sich solche mit verdünnten Mineralsäuren (0,5 - 3%ige Schwefel-

säure) bewährt [18, 19]. Sun et al. verwendeten für den enzymatischen Aufschluss von Bermudagrass und Roggenstroh Cellulasen aus *T. reesei* und kommerzielle  $\beta$ -Glucosidasen nach Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure [25]. In Abhängigkeit der Säurekonzentration und Behandlungsdauer wurden dabei 50 – 66 % des Xylans in monomere Xylose zerlegt. Die Glucoseausbeute lag zwischen 30 - 52 % für Roggenstroh und 46 - 81 % für Bermudagrass (bezogen auf den Gesamtglucosegehalt).

Die Inhibierung der verschiedenen Cellulasen durch ihre Reaktionsprodukte kann eine wesentliche Rolle hinsichtlich der erreichbaren Hydrolysegrade bei der Verzuckerung spielen. So zeigten Lieb et. al, dass die relative Aktivität kommerzieller Cellobiasen bereits bei 2,5 g Glucose je Liter Testansatz um 50 % herabgesetzt ist [180]. Durch die simultane Verzuckerung und Vergärung lässt sich diese Produkthemmung prinzipiell reduzieren. Jedoch stellen die verschiedenen Temperaturoptima der Cellulasen (55 - 60 °C) und der Hefeenzyme (30 - 35 °C) häufig ein grundlegendes Problem für effektive Prozesse dar.

### **3.3 Verarbeitung von Obst zu Trinkalkohol (Obstbrennerei)**

#### **3.3.1 Vorbereitung und Vergärung von Kernobstmätschen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergärungsversuche mit anschließendem Abdestillieren des Alkohols (Labordestillation) waren Teil der Entwicklung eines technischen Gesamtverfahrens zur Herstellung von Trinkalkohol aus Apfelnasstrestern (Apfeltresterbrand) in einer Obstbrennerei. Da sich sämtliche Laborversuche an den im späteren Verlauf des Forschungsprojektes zu realisierenden Verfahrensbedingungen orientierten, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die wichtigsten Verfahrensschritte bei der Obstbrandherstellung gegeben werden.

Die wesentlichen brennereitechnischen Schritte bei der Vorbereitung und Verarbeitung von Kernobst (insbesondere bei Äpfeln) gleichen denen der Fruchtsaftherstellung. Die Äpfel (Mostäpfel) werden zunächst sortiert, gewaschen und anschließend mittels Rätzmühlen, Schleuderfräsen oder Hammermühlen zerkleinert [209, 210]. Die zerkleinerte Maische wird dann meist über Exzentrerschneckenpumpen in die Maische- bzw. Gärbehälter gepumpt. In der Brennerei werden pektinolytische Enzyme eingesetzt, um die vornehmlich dickbreiigen Obstmätschen zu verflüssigen und somit eine bessere Durchmischung und Verteilung von Maischezusätzen, wie Hefen, Säuren und Nährsalzen während der Gärung zu gewährleisten. Zur Verbesserung des Nährstoffangebotes können den Obstmätschen, die naturgemäß arm an stickstoffhaltigen Verbindungen sind, Nährsalze in Form von Ammoniumphosphaten oder -sulfaten zugegeben werden. Da Fruchtmätschen aufgrund ihres Gehaltes an Zuckern, Aminosäuren und Mineralstoffen einen idealen Nährboden für viele Mikroorganismen darstellen, ist der pH-Wert zu vergärender Obstmätschen abzusenken [211]. In der Regel verwenden Obstbrennereien dafür mineralische Säuren, hauptsächlich Schwefelsäure. Der pH-Wert sollte auf unter 3,5 eingestellt werden, da hierbei ein großer Teil der Bakterien gehemmt wird, die relativ säurebeständigen Brennereihefen jedoch noch keine Schwächung erleiden.

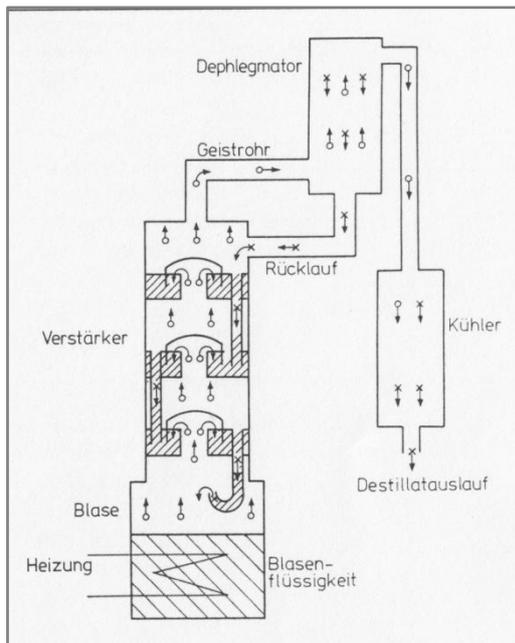
Die Einleitung der Gärung erfolgt durch Reinzuchthefen der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* [210, 212]. Spontangärungen durch sogenannte „wilde“ Hefen führen häufig zu Gärstockungen, verminderten Alkoholausbeuten sowie der Bildung von off-flavour-Aromakomponenten [210]. Die wichtigsten Vertreter unter ihnen zählen zu den Gattungen *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Torulaspora* und *Zygosaccharomyces* [213]. Im Gegensatz dazu laufen die Gärungen unter Verwendung von Reinzuchthefen in

der Regel zügig an und das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen wird durch die schnelle Vermehrung und das schnelle Wachstum der Hefen weitestgehend unterdrückt. Die Anstelltemperaturen von Obstmaischen liegen generell zwischen 15 und 30 °C, wobei höhere Temperaturen zu kürzeren Gärzeiten führen. Während der Hauptgärphase kommt es durch die intensive Gärtätigkeit zur beträchtlichen Zunahme des Alkoholgehaltes in der Maische bei gleichzeitiger Entstehung von Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>). Die Hefen wandeln dabei die vergärbaren Zucker, darunter Glucose, Fructose, Saccharose und Mannose mit Hilfe ihres Enzymsystems in Alkohol und CO<sub>2</sub> um. Nach der Grundgleichung der alkoholischen Gärung entstehen aus 100 g Zucker theoretisch 51 g Alkohol und 49 g CO<sub>2</sub>. Unter Berücksichtigung der Dichte von Alkohol (0,7893 g/mL bei 20 °C) ergeben 100 kg Zucker somit theoretisch in etwa 65 L reinen Alkohol. Da sich jedoch biologische Verluste (Hefezellenwachstum und –atmung, Bildung von Gärungsnebenprodukten, Fremdgärungen) und verfahrensbedingte Verluste (Verdunstung, Restalkohol in der Schlempe) praktisch nicht vermeiden lassen, ist bei der Obstvergärung im besten Fall mit Ausbeuten von 58 L r. A. pro 100 kg Zucker zu rechnen [210]. Zu den wichtigsten Gärungsnebenprodukten zählen Acetaldehyd, Glycerin und höhere Alkohole (u. a. Propanol, Butanol, Hexanol, Amylalkohol) [214]. Essigsäureester sind typische Aromakomponenten in Obstbränden, die durch Veresterung von Essigsäure mit Ethanol entstehen.

Methanol ist kein Gärungsnebenprodukt, sondern entsteht durch die Aktivität nativer (oder zugegebener) Pektinmethylesterasen aus dem Pektin der pflanzlichen Zellwände (Kap. 3.2.4). Daher gilt Methanol bei Obstbränden auch als Indikator für Maischezuckerungen, wenn entsprechende Mindestgehalte nicht erreicht werden. Andererseits ist Methanol ab bestimmten Konzentrationen toxisch. Die zulässigen Höchstwerte an Methanol in Bränden aus Kernobstrestern liegen nach derzeit geltender EU-Verordnung bei 1500 mg/100 mL r. A. Andraous et al. untersuchten den Einfluss verflüssigender Pektinase-Präparate auf den Methanol-Gehalt in Apfelbränden aus verschiedenen Apfelsorten und fanden 3- bis 5-fach höhere Methanolkonzentrationen im Vergleich zu Kontrollbränden, die ohne Enzymeinsatz hergestellt wurden [215]. Verfahren zur Maischepasteurisation, um native Enzymaktivitäten auszuschalten, sind grundsätzlich denkbar, beeinflussen jedoch zumeist die sensorischen Eigenschaften der Brände negativ und führen zu einem technischen und damit intensiven Mehraufwand [216].

### 3.3.2 Destillation/Rektifikation vergorener Obstmischen

Sobald die Gärung abgeschlossen ist, wird die vergorene Maische in die Brennblase überführt. Diese ist Teil des Brennapparates, in dem die Abtrennung des Alkohols auf destillativem Wege erfolgt. Moderne Brenngeräte arbeiten nach dem Prinzip der Destillation und Rektifikation. Abb. 9 zeigt, schematisch vereinfacht, einen nach diesem Prinzip funktionierenden Brennapparat mit Verstärker, Dephlegmator und Kühler.



**Abb. 9: Prinzip der Gegenstromdestillation (Rektifikation) [210]**

Die Maische wird in der Brennblase direkt (Dampfinjektion) oder indirekt bis zum Sieden erhitzt. Bei der Rektifikation wird dem aufsteigenden Dampf (Dampfgemisch aus Alkohol und Wasser) ein Kondensatstrom entgegengeführt, so dass es zu einem intensiven Wärme- und Stoffaustausch kommt. Im Verstärker findet dieser Austausch auf jedem Glockenboden statt, wobei der Rücklauf auf dem Weg vom höchsten Boden (niedrigste Temperatur) zur Blase (höchste Temperatur) das Wasser aufnimmt und den leichter siedenden Alkohol (höhere relative Flüchtigkeit) an den aufwärts gerichteten Dampfstrom abgibt, so dass es zur Alkoholanreicherung im Dampf kommt [210]. Die Flüssigkeit entzieht dem Dampf Wärme, so dass er teilweise kondensiert und die Flüssigkeit gleichzeitig auf Siedetemperatur aufgeheizt wird und verdampft. Bevor der alkoholreiche Dampf im Kühler vollständig kondensiert und als Destillat abläuft, findet im Dephlegmator nochmals eine Anreicherung von Alkohol in der Dampfphase statt, die durch die Teilkondensation der schwerer siedenden Komponente Wasser erreicht wird. Neben dem Ethanol werden bei der Destillation weitere flüchtige Maischebestandteile in das Destillat überführt. Je nach Siedeverhalten lassen sich die einzelnen Komponenten beim Destillationsvorgang mehr oder weniger stark in den verschiedenen Destillatfraktionen Vorlauf, Mittellauf und Nachlauf anreichern. Methanol hingegen lässt sich auf destillativem Weg nur bedingt von Ethanol trennen. Verschiedene Möglichkeiten zur Reduzierung des Methanolgehaltes von Obstbränden wurden bereits erörtert, führten jedoch häufig neben der Methanolreduzierung auch zu Ausbeuteverlusten an Ethanol [217, 218].

### 3.3.3 Besonderheiten bei der Verarbeitung von Kernobstrestern

Im Gegensatz zu Weintrestern, die den Ausgangspunkt für die Herstellung typischer „Trester“ oder Tresterbranntweine (in Italien „Grappa“) darstellen, ist die Verwendung von Obstrestern für die Herstellung von Trinkbranntweinen weitaus weniger verbreitet. In Deutschland werden Obsttresterbrände bisweilen nur regional (hauptsächlich in Baden-Württemberg), als Spezialitäten angeboten. Hersteller solcher Produkte sind zumeist Mostereien, die einen Teil der Trester parallel zur Apfelernte und zur Safftherstellung speziell dafür verwenden. Gegenüber Weintrestern bringen Apfeltrester den Nachteil der fruchtbedingten geringeren Zuckergehalte mit sich [210]. Da Trester innerhalb weniger Stunden mikrobiellen Veränderungen unterliegen, müssen sie in kürzester Zeit weiterverarbeitet werden. Traditionell werden Apfelnasstrester keiner weiteren Zerkleinerung unterzogen und umgehend in geeigneten Behältern (idealerweise Kunststofffässer) eingestampft und mit Wasser (10 - 20 %) versetzt, um die Luft in den verbliebenen Haufwerkshohlräumen zu verdrängen [219]. Wie für die Frischobstverarbeitung eignen sich auch hier Reinzuchthefen zur Vergärung. Häufig werden noch Ammoniumsalze zugegeben. Eine Ansäuerung mittels Schwefelsäure empfiehlt sich aufgrund des kritischen mikrobiellen Status der Trester. Aufgrund der Anreicherung von Pektin als Bestandteil der Zellwände ist in Bränden aus Kernobstrestern generell mit hohen Methanol-Gehalten zu rechnen. Desweiteren sind für Tresterbrände höhere Gehalte an höheren Alkoholen, wie n-Propanol, i-Butanol und Hexanol sowie Ethylestern typisch [220]. Verfahren zur großtechnischen Nutzung von Apfeltrestern für die Trinkbrandherstellung sind bislang nicht bekannt.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Apfeltrester

##### 4.1.1.1 Apfeltrester frisch (Apfelmasstrester)

Für die Versuche wurden Apfeltresterchargen der Jahre 2004, 2005 und 2006 verwendet. Die Trester von 2004 (November) und 2005 (Oktober) stammten aus der Kelterei Wilke (Fredersdorf/Brandenburg). Die Zerkleinerung der Äpfel erfolgte mittels Rätzmühle, das Abpressen der Apfelmaische mittels Bucherpresse. Die Trester von 2006 (November) stammten aus der Süßmost- und Weinkelterei Schulz (Diesdorf/Sachsen-Anhalt). Die Äpfelzerkleinerung erfolgte über eine Hammerschlagmühle, das Abpressen der Maische über eine kontinuierliche Zweibandpresse. In allen Fällen wurden vor dem Abpressen keine Maischeenzyme verwendet. Nach dem Abpressen wurden die Trester umgehend in kleinere Portionen (ca. je 1 kg) aufgeteilt und bei -18 °C bis zur jeweiligen Verwendung tiefgefroren.

##### 4.1.1.2 Apfeltresterfasern (als Vergleichsubstrate)

Für die Herstellung von gereinigten, getrockneten Apfeltresterfasern wurde die Apfeltrestercharge 2004 verwendet. In Abb. 10 sind die Herstellungsschemen für Apfeltresterfasern und entpektinisierte Apfeltresterfasern dargestellt. Die jeweiligen Milieubedingungen ( $T$ ,  $t$ ) sind im nachfolgenden Absatz näher erläutert.

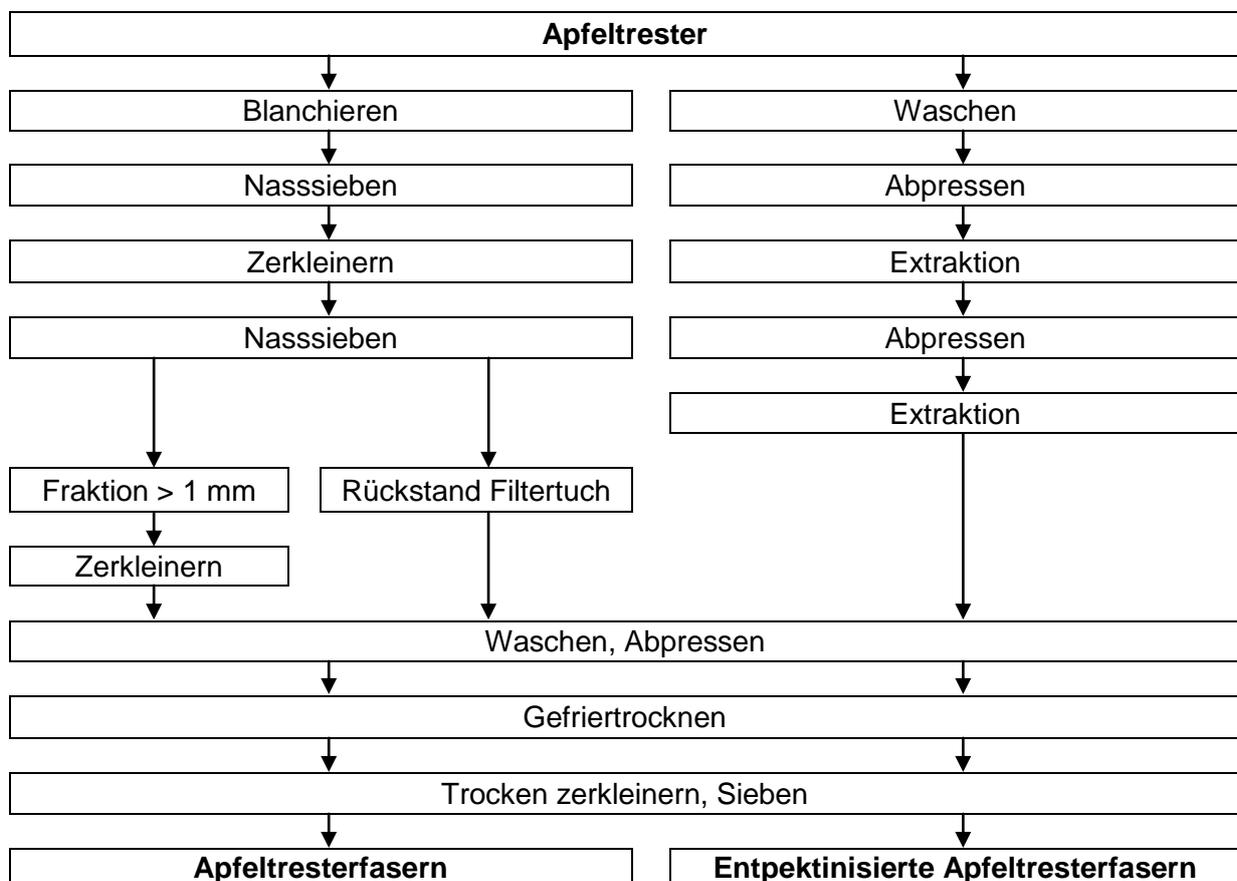


Abb. 10: Herstellungsschema für Apfeltresterfasern

Die aufgetauten Trester wurden nach Zugabe einer ausreichenden Menge Wasser (1 Teil Wasser + 1 Teil Trester) zunächst 2 min bei 80 °C blanchiert, anschließend über einem Küchensieb gesiebt und mit kaltem Wasser gewaschen. Die gewaschenen Trester wurden mit der zwei- bis dreifachen Menge an Wasser versetzt und mittels Ultraturax (IKA, Deutschland) zunächst 10 min mit grobem Werkzeug (S50N-G40G), anschließend 20 min mit feinem Werkzeug (S50N-G40F) bei 10000 U/min nasszerkleinert. Durch Nasssieben der Trester mittels 1-mm-Sieb und Filtertuch wurde einerseits eine Fraktion > 1 mm erhalten, die nochmals 20 min mit dem Ultraturax (feines Werkzeug) behandelt wurde. Der Filtertuch-Rückstand wurde direkt weiterbehandelt. Beide Fraktionen wurden mit dest. Wasser auf eine Leitfähigkeit < 50  $\mu\text{S}/\text{cm}$  gewaschen, über einem Filtertuch abgepresst, gefriergetrocknet, trockenzerkleinert und gesiebt (315  $\mu\text{m}$ ). Beide Tresterfraktionen (< 315  $\mu\text{m}$ ) wurden nach dem Sieben vereint, gemischt und bis zur jeweiligen Verwendung kühl und trocken gelagert.

Für die Herstellung von entpektinisierten Apfeltresterfasern wurden die aufgetauten Trester mit der zweifachen Menge an dest. Wasser versetzt, gerührt und durch ein Filtertuch mittels Ballonpresse 5 min abgepresst. Der Filtertuchrückstand (ca. 1 kg) wurde im Dreihalsrundkolben mit 3 L heißem dest. Wasser und 6,5 mL 65%iger  $\text{HNO}_3$  versetzt. Der Rundkolben wurde mit einem Thermometer, einem Rührer und einem Rückflusskühler bestückt und im Wasserbad (Büchi 461, Schweiz) arretiert. Die erste Extraktion erfolgte bei 85 °C für 30 min. Nach dem Abpressen (Filtertuch) wurde der Trester mit 2,5 L heißem dest. Wasser und 2,5 mL  $\text{HNO}_3$  versetzt und einer zweiten 30-minütigen Extraktion bei 85 °C unterzogen. Nach dem Abpressen (Filtertuch) wurden die Trester auf eine Leitfähigkeit  $\sigma < 50 \mu\text{S}/\text{cm}$  gewaschen und - wie für die Apfeltresterfasern beschrieben - weiterbehandelt.

#### 4.1.1.3 Apfeltrester getrocknet

Zur Materialcharakterisierung (Kap. 4.2.8) wurden die frischen Apfeltrester (je zwei Portionen) gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-4, Deutschland), zerkleinert (Analysenmühle IKA, Deutschland) und gesiebt. Alle Analysen wurden mit der Siebfraktion < 315  $\mu\text{m}$  durchgeführt.

#### 4.1.1.4 Apfeltrester säurehydrolysiert

Säurehydrolysierte Trester wurden in Anlehnung an Verfahren zur industriellen Pektinengewinnung aus Apfeltrestern der Charge 2006 hergestellt. Die Nasstrester wurden zunächst in Lochstahlkästen (Lochgröße 2 mm) bis zu einer Trockensubstanz > 95 % im Trockenschrank (Memmert M600, Deutschland) bei 102 °C getrocknet. Zur Pektinextraktion wurden zwei Extraktionsvarianten angewendet [9, 10].

Für die Rapid-set-Variante wurden 300 g getrockneter Trester in 4,8 L siedendem dest. Wasser suspendiert und der pH-Wert mit 65%iger  $\text{HNO}_3$  (ca. 6 mL) auf 2,5 eingestellt. Nach 45-minütigem Kochen wurden die hydrolysierten Trester zunächst per Hand durch ein Filtertuch und anschließend mittels Ballonpresse (5 min,  $p = 4$  bar) abgepresst. Bis zur Verwendung wurden die hydrolysierten Trester bei -18 °C tiefgefroren.

Die Slow-set-Variante wurde wie die Rapid-Set-Variante mit folgender Variation hergestellt. Die Extraktionstemperatur betrug 60 °C, die Extraktionszeit lag bei 4 h.

#### 4.1.1.5 Apfeltrester vergoren

Die vergorenen Apfeltrester fielen bei den Laborversuchen nach dem Vergären der jeweiligen Ansätze der Apfeltresterchargen 2005 und 2006 an (Kap. 4.2.6.2). Ein Teil der vergorenen Trester wurde umgehend bei -18 °C tiefgefroren, anschließend gefriergetrocknet, zerkleinert und gesiebt (< 315 µm) und bis zur Materialcharakterisierung kühl und trocken gelagert.

#### 4.1.1.6 Apfeltrester vergoren und abdestilliert

Die vergorenen und abdestillierten Apfeltrester fielen nach dem Destillieren der jeweiligen Ansätze der Apfeltresterchargen 2005 und 2006 an (Kap. 4.2.6.3). Die abdestillierten Trester wurden umgehend bei -18 °C tiefgefroren, anschließend gefriergetrocknet, zerkleinert und gesiebt (< 315 µm) und bis zur Materialcharakterisierung kühl und trocken gelagert.

### 4.1.2 Modellsubstrate

#### 4.1.2.1 Cellulosen

Für die Bestimmungen der cellulolytischen Enzymaktivitäten kamen mikrokristalline Cellulose (MCC) (0,019 mm, Serva), Na-Carboxymethylcellulose (CMC) (mittlere Viskosität, Fluka) sowie D(+)-Cellobiose (Roth) zum Einsatz.

#### 4.1.2.2 Hemicellulosen

Die Bestimmung der hemicellulolytischen Aktivitäten erfolgte gegenüber Xylan (aus Haferspelzen, Fluka) sowie Arabinogalactan (Aldrich).

#### 4.1.2.3 Pektine

Für die Bestimmung der pektinolytischen Aktivitäten wurden hochverestertes Pektin (HV) (Veresterungsgrad  $VG = 80\%$ ) und Pektinsäure ( $VG = 3\%$ ) verwendet. Beide Präparate stammten von der Firma Herbstreith & Fox (Werder/Brandenburg). Zur weitestgehenden Entfernung löslicher Restzucker wurden beide Präparate vor der Verwendung einem alkoholsauren Waschschrift unterzogen. Dazu wurden ca. 50 g Pektin bzw. Pektinsäure zunächst zweimal 10 min mit 300 mL salzsaurem 70%igem Ethanol (enthielt 5 % konzentrierte HCl), anschließend einmal mit 95%igem Ethanol gewaschen und dazwischen jeweils über eine Fritte (1000 mL, Por. 3) 5 - 10 min abgesaugt. Die Trocknung der gewaschenen Materialien erfolgte in großen Petrischalen im Trockenschrank bei 50 °C bis zur Massekonstanz.

### 4.1.3 Enzyme

#### 4.1.3.1 Cellulasen

Bei den cellulolytischen Enzympräparaten handelte es sich um Cellulasen mikrobieller Herkunft mit zum Teil ausgewiesenen Xylanase-Aktivitäten vier verschiedener nationaler sowie internationaler Enzymhersteller (Tab. 9). Desweiteren wurde eine Cellobiase der Fa. Novozymes mit dem Namen Novozym 188 bezogen.

**Tab. 9: Kommerzielle cellulolytische Enzympräparate**

Hersteller (Herkunft)	Produktname (Produktionsstamm)	Hauptaktivitäten	Temperatur [°C]	Dosierung [g/t]
AB Enzymes (Deutschland)	Rohament CL ( <i>T. reesei</i> )	Cellulasen, Xylanasen	50	150 - 200
Biopract (Deutschland)	Cellufood AL 140 ( <i>T. reesei</i> )	Cellulasen, Xylanasen	40 - 65	200 - 800
DSM (Frankreich)	Cytolase CL ( <i>T. longibrachiatum</i> )	Cellulasen	50	50 - 100
Novozymes (Schweiz)	Celluclast 1.5 L ( <i>T. reesei</i> )	Cellulasen	55 - 60	200 - 300
	Novozym 188 ( <i>A. niger</i> )	Cellobiase		

Die angegebenen Temperaturen und Dosierungen sind Empfehlungen der Hersteller. Für Novozym 188 wurde vom Hersteller eine Dosierung empfohlen, die einem Fünftel der zugegebenen Cellulase-Menge entspricht. Die bei den Enzymierungsversuchen angewendeten Dosierungen sind in Kap. 4.2.4.3 näher erläutert.

#### 4.1.3.2 Pektinasen und kombinierte Präparate

Die pektinolytischen bzw. kombinierten Präparate stammten ebenfalls von den bereits oben aufgeführten Produzenten und enthalten laut Herstellerangabe neben diversen Pektinase-Aktivitäten auch Arabanase- sowie weitere Hemicellulaseaktivitäten (Tab. 10). Die Herstellerempfehlungen variieren je nach ausgewiesenem Anwendungszweck (Maischefermentation, Mazeration, Saftklärung) bezüglich Temperatur und Dosierung zum Teil erheblich.

**Tab. 10: Kommerzielle pektinolytische und kombinierte Präparate**

Hersteller (Herkunft)	Produktname (Produktionsstamm)	Hauptaktivitäten	Temperatur [°C]	Dosierung [g/t]
AB Enzymes (Deutschland)	Rohapect DA6L ( <i>A. niger</i> )	Pektinasen, Arabanasen	20 - 30	20 - 50
Biopract (Deutschland)	Pectinase L 100 ( <i>A. niger</i> )	Pektinasen, Hemicellulasen	35 - 65	100 - 200
DSM (Frankreich)	Rapidase ADEX P ( <i>A. niger</i> )	Pektinasen, Arabanasen	50	200 - 400
Novozymes (Schweiz)	Pectinex Ultra SP-L ( <i>A. aculeatus</i> )	Pektinasen, Hemicellulasen	55 - 60	200 - 300
	Ultrazym AFP-L ( <i>T. reesei/A. niger/A. aculeatus</i> )	Pektinasen, Cellulasen	55 - 60	200 - 300

Während die ersten vier aufgeführten Präparate in Tab. 10 jeweils aus einem Produktionsstamm hergestellt wurden, handelt es sich bei Ultrazym AFP-L um ein Mischpräparat aus *Trichoderma*- und *Aspergillus*-Stämmen.

**Tab. 11: Abkürzungen der Enzym-Produktnamen**

<b>Cellulasen</b>		<b>Pektinasen/Kombinierte Präparate</b>	
Produktname	Kürzel	Produktname	Kürzel
Rohament CL	RCL	Rohapect DA6L	RPT
Cellufood AL 140	CFD	Pectinase L 100	PEC
Cytolase CL	CYT	Rapidase ADEX P	ADP
Celluclast 1.5 L	CCL	Pectinex Ultra SP-L	SPL
Novozym 188	NZ	Ultrazym AFP-L	AFP

#### **4.1.4 Hefen**

Für die Vergärungsversuche kamen Brennerei-Trockenhefen aus *Saccharomyces cerevisiae* der Fa. DSM (Frankreich) und der Fa. Gammazym (Deutschland) zum Einsatz.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Enzymaktivitätsbestimmungen**

#### 4.2.1.1 Versuche mit Modellsubstraten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten gegenüber CMC, Xylan, Arabinogalactan, Pektin und Pektinsäure erfolgte nach Herstellung und Inkubation der jeweiligen Substratlösung und Zugabe der Enzymlösung [183, 184]. Dazu wurden 50 mL der 0,1%igen (w/v) Substratlösung (Na-Acetat-Puffer 0,1 M, pH 3,6) mit 25 µL Enzymlösung versetzt und 2 h bei 30 °C im Wärmeschrank (TH 25, E. Büchler, Deutschland) unter kontinuierlichem Schwenken ( $120 \text{ min}^{-1}$ ) inkubiert. In Abhängigkeit vom Substrat wurden die Enzyme vor der Zugabe mit dest. Wasser verdünnt. Im Fall von Xylan wurden die Enzyme 1:2, für die Bestimmung gegenüber Pektin 1:10 und für Pektinsäure 1:50 verdünnt. Im Fall von CMC und Arabinogalactan wurden die Enzyme unverdünnt verwendet. Nach der Inkubation wurden die Proben zur Enzyminaktivierung im Wasserbad bei 80 °C für 10 min erhitzt, anschließend abgekühlt und mit dest. Wasser nochmals 1:2 verdünnt. Analog zum oben beschriebenen Verfahren wurde bei jeder Bestimmung eine Blindprobe untersucht, bei der anstatt der Enzymlösung 25 µL dest. Wasser zum Substrat gegeben wurden. Die Substratlösungen wurden als Doppelbestimmungen angesetzt.

Für die Bestimmung der Aktivität gegenüber MCC [185] wurde eine 0,5%ige Suspension von mikrokristalliner Cellulose in Na-Acetat-Puffer mit unverdünnter Enzymlösung inkubiert. Nach der Enzyminaktivierung wurde die Suspension in 50 mL-Zentrifugengläser überführt und 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert (T 23 Janetzki, Deutschland). Der klare Überstand wurde anschließend nochmals 1:2 verdünnt.

Für die Bestimmung der reduzierenden Endgruppen [182, 221] wurden 2 mL der Probelösung mit 2 mL Kupfer-Reagenz versetzt und 10 min im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen wurden 1 mL Arsenmolybdat-Reagenz zur Probe dazugegeben, gemischt und die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes im Spektralphotometer (Spekol 11, Carl Zeiss Jena) bei 500 nm gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Menge gebildeter reduzierender Endgruppen wurde anhand einer Glucose-Eichgerade (8 - 80 µg/mL) ermittelt und die Enzymaktivität  $EA$  in  $\text{nkat}/\mu\text{L}$  berechnet, wobei  $\text{nkat}$  der pro Sekunde freigesetzten reduzierenden Endgruppen in  $\text{nmol}$  entspricht ( $1 \text{ nkat} = 1 \text{ nmol/s}$ ).

Die rheologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Prozess-Torsionsschwingers Rheoswing® (Paar Physica, Stuttgart) durchgeführt. Die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden anhand der Viskositätsabnahme in Modellsubstratlösungen nach Zugabe der Enzymlösung ermittelt. Dazu wurden jeweils 5 g CMC bzw. HV-Pektin unter intensivem Rühren (Magnetrührer) in 500 mL Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 3,6) gelöst, zum Entweichen von Luftblasen 10 min stehen gelassen und anschließend im Wasserbad auf 30 °C temperiert. Nach Temperatureinstellung wurde der Rheoswing® auf das Probenbecherglas gesetzt, wobei die Messsonde in die Probelösung eintauchte und im Nanometer-Bereich Torsionsschwingungen ausführte. Im untersuchten Medium erfolgt die Ausbildung einer dünnen Grenzschicht  $D_{GS}$ , wobei zu beachten ist, dass bei partikulierten Systemen der Partikeldurchmesser  $d_p$  häufig größer ist als  $D_{GS}$ . Durch den Vergleich der Dämpfung durch die Flüssigkeit mit der Dämpfung in Luft konnte eine scherunabhängige Prozessviskosität  $\eta_{proz}$  [mPa·s] der Flüssigkeit bestimmt werden. Die Aufnahme der Viskositätsänderung erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde mit Hilfe der Software US 200 (Paar Physica, Stuttgart). Als Referenz wurden die Versuche analog mit Substratlösungen von CMC und Pektin durchgeführt, denen anstatt der Enzymlösung dest. Wasser zugesetzt wurde. Die Kinetik der Viskositätsabnahme (viskosimetrische Abbaurate) wurde näherungsweise nach dem Modell 1. Ordnung mit Hilfe der Software Microcal Origin 6.0 (Microcal Software Inc., USA) nach Gleichung (1) ausgewertet (s. auch Abb. 11).

$$\eta(t) = \eta_{eq} + \eta_0 e^{-kt} \quad \text{in mPa·s} \quad (1)$$

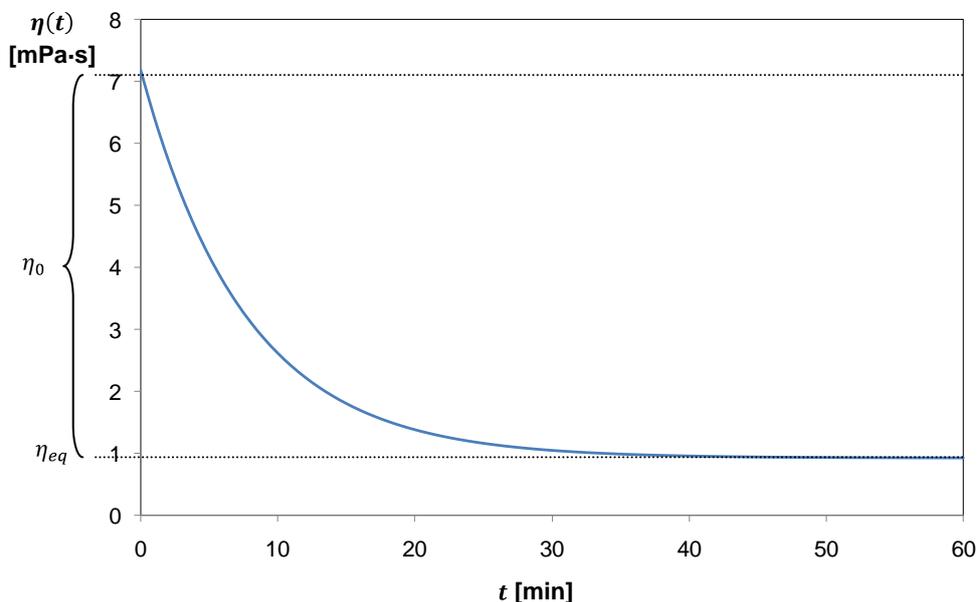


Abb. 11: Kinetik der Viskositätsabnahme – Modell 1. Ordnung (Microcal Origin 6.0)

#### 4.2.1.2 Versuche mit Apfeltresterfasern

Die Aktivitäten der neun Enzympräparate wurden gegenüber Apfeltresterfasern und entpektinisierten Apfeltresterfasern ermittelt [184]. Dazu wurden 0,2%ige (w/v) Suspensionen des jeweiligen Substrates in Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 3,6) mit 4 µL unverdünnter Enzymlösung versetzt und 2 h bei 30 °C inkubiert ( $125 \text{ min}^{-1}$ ). Nach 10-minütiger Hitzeinaktivierung der Enzyme in der Substratlösung bei 80 °C, wurden die Proben 25 min bei 6000 U/min zentrifugiert, 25 mL des klaren Überstandes entnommen, der pH-Wert mit 0,1 M Na-Acetat-Lösung auf 5,0 eingestellt und aufgefüllt (Na-Acetat-Puffer pH 5,0). In einer zweiten Serie wurden die beiden Faserpräparate analog dem beschriebenen Prozedere mit 4 µL eines 1:1-Enzymgemisches aus Cellulase und Pektinase behandelt. Als Substratblindwert wurde bei jeder Bestimmung eine Substratsuspension mitgeführt, zu der vor Inkubation hitzebehandelte (10 min, 90 °C) Enzymlösung zugegeben wurde. Auf diese Weise konnte ein möglicher Fehler durch reduzierende Zucker in der Enzymlösung kompensiert werden.

Die Bestimmung der freigesetzten reduzierenden Zucker in den aufgearbeiteten Probelösungen erfolgte nach oben beschriebener Methodik (Modellsubstrate). Parallel zur Bestimmung der reduzierenden Zucker erfolgte die Bestimmung der freigesetzten Glucose in den Probelösungen mittels Testkit zur enzymatischen D-Glucose-Bestimmung (r-biopharm, Deutschland).

### 4.2.2 Physikalischer Aufschluss von Apfeltrester

#### 4.2.2.1 Standardaufschluss

Es wurden vier verschiedene physikalische Aufschlussvarianten an Apfelsnasstrester getestet. Dabei war der Standardaufschluss die einfachste Variante und zugleich Grundlage für die weiteren Aufschlussvarianten. Alle Versuche wurden mit der Apfeltrestercharge 2004 und als Doppelbestimmung durchgeführt.

Für den Standardaufschluss wurden 100 g Apfeltrester in einem 800mL-Becherglas ( $d = 10 \text{ cm}$ ) mit 300 g dest. Wasser versetzt, mit einem Haushaltsmixer (Waring Blender 32BL79, Rotor mit Schlagkreuz;  $P = 860 \text{ W}$ ) 2 min grob zerkleinert und anschließend 4 min mittels Ultraturrax T 50 basic (IKA, Deutschland;  $P = 700 \text{ W}$ ) mit feinem Werkzeug S50N-G40F ( $d = 4 \text{ cm}$ ) fein zerkleinert (Dispergiersystem nach Rotor-Stator-Prinzip). Das Durchmesser Verhältnis „Ansatzbehälter/UT-Werkzeug“ betrug 2,5. In einer weiteren Variante wurde der Einfluss der mechanischen Vorzerkleinerung auf die Zuckerfreisetzung gesondert untersucht (Kap. 6.2.2). Dabei wurde der Trester zum Vergleich nur per Grobaufschluss (Waring Blender) zerkleinert. Eine gesonderte Partikelgrößenbestimmung erfolgte für diese Variante nicht. Zur näherungsweisen Abschätzung der zugeführten Arbeit/Energie wurde für die verschiedenen Aufschlussvarianten anhand der installierten Geräteleistung  $P$ , der Behandlungsdauer  $t$ , der Ansatzmenge  $m_A$  und des elektrisch-mechanischen Wirkungsgrades  $\eta_{e-m}$  der spezifische Energieeintrag  $Q_s$  wie folgt berechnet (2):

$$Q_s = \frac{P \cdot t \cdot \eta_{e-m}}{m_A} \quad \text{in J} \cdot \text{kg}^{-1} \quad (2)$$

#### 4.2.2.2 Ultraschallbehandlung

Nach dem Standardaufschluss wurde der zerkleinerte Apfeltrester einer 30-minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Zum Einsatz kam ein Ultraschall-Homogenisator SONOPULS HD 2200 (Bandelin, Deutschland;  $P = 200 \text{ W}$ ) mit Boosterhorn SH 213 G und Titan-Sonotrode VS 70 T, welche in das zu beschallende Medium eintauchte. Die Arbeitsfrequenz  $f$  betrug  $20 \text{ kHz}$ . Die Schwingungsamplitude  $\gamma$  wurde auf  $60 \%$  der max. Amplitude ( $\gamma_{max} = 153 \mu\text{m}$ ) eingestellt. Zur Kühlung wurde der Probenbehälter in ein Eiswasserbad gestellt. Alle  $5 \text{ min}$  wurde der Apfeltrester intensiv durchmischt. Der spezifische Energieeintrag  $Q_s$  wurde unter Einbeziehung des elektrisch-akustischen Wirkungsgrades  $\eta_{e-a}$  ( $\sim 0,5$ ) nach Gleichung (3) berechnet.

$$Q_s = \frac{P \cdot t \cdot \eta_{e-a}}{m_A} \quad \text{in J}\cdot\text{kg}^{-1} \quad (3)$$

#### 4.2.2.3 Autoklavieren

Für die hydrothermische Behandlung wurde der Apfeltrester nach dem Standardaufschluss in eine Glasflasche mit Baumwollstopfen überführt und  $30 \text{ min}$  bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  im Autoklaven GVA 4.6 (Gössner, Deutschland) behandelt. Die in die Probe eingetragene spezifische Wärmeenergie  $Q_s$  wurde unter Einbeziehung der spezifischen Wärmekapazität  $c$  (Annahme:  $c \cong c_{H_2O} = 4,19 \text{ KJ/kg} \cdot \text{K}$ ) näherungsweise nach Gleichung (4) berechnet.

$$Q_s = \frac{Q}{m} = c \cdot \Delta T \quad \text{in J}\cdot\text{kg}^{-1} \quad (4)$$

#### 4.2.2.4 Hochdruckhomogenisierung

Für die Hochdruckzerkleinerung wurde der Apfeltrester nach dem Standardaufschluss im Hochdruck-Homogenisator (Gaulin APV, Deutschland;  $P = 2200 \text{ W}$ ) in  $12$  Durchläufen bei  $300 \text{ bar}$  homogenisiert. Nach  $4$  und  $8$  und  $12$  Durchläufen wurden Proben für die Partikelgrößenbestimmung entnommen. Für die Behandlung im Homogenisator musste eine ausreichende Probenmenge (ca.  $4 \text{ kg}$ ) vorgelegt werden, so dass zunächst mehrere Ansätze ( $10$ -fach, bei Berechnung für  $Q_s$  berücksichtigt) nach dem Standard-Aufschluss (Kap. 4.2.2.1) präpariert und anschließend zu einer Mischprobe vereint wurden. Die Zeit für  $12$  Durchläufe betrug ca.  $60 \text{ min}$ . Der spezifische Energieeintrag  $Q_s$  wurde unter Einbeziehung des Massenstroms  $\dot{m}$  ( $4 \text{ kg/h}$ ) nach Gleichung (5) berechnet.

$$Q_s = \frac{P \cdot \eta_{e-m}}{\dot{m}} \quad \text{in J}\cdot\text{kg}^{-1} \quad (5)$$

### 4.2.3 Partikelgrößenbestimmung physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester

#### 4.2.3.1 Siebfraktionierung

Bei jedem Zerkleinerungsansatz (Standard, Ultraschall, Autoklav, Hochdruckhomogenisator) wurde die Trockensubstanz  $TS$  sowie die unlösliche Trockensubstanz  $UTS$  der verwendeten Trestercharge bestimmt. Die Methodik ist in Kap. 4.2.8 näher erläutert. Die verschiedenen physikalisch aufgeschlossenen Apfeltrester wurden zunächst auf einem Metallsieb (1 mm) mit 10 L Wasser nassgesiebt. Die Fraktion  $< 1$  mm wurde in einem Eimer aufgefangen, 500 mL davon für die Laserpartikelanalyse (Kap. 4.2.3.3) entnommen und bei  $-18$  °C tiefgefroren. Die Fraktion  $> 1$  mm wurde 1 h auf dem Sieb zum Abtropfen stehen gelassen und die Feuchtmasse  $m_F$  anschließend durch Subtraktion des Trockengewichtes des Prüfsiebes  $m_{Sieb}$  gravimetrisch bestimmt. Von der feuchten Probe wurden 1,5 bis 2,0 g für die Bildanalyse entnommen und mit Toluidinblau-Lösung (5 g/L) angefärbt. Weitere ca. 3 g der feuchten Probe wurden für die Bestimmung der  $UTS_{>1}$  entnommen. Die prozentualen Anteile  $F_{>1}$  (Siebfraktion  $> 1$  mm) und  $F_{<1}$  (Siebfraktion  $< 1$  mm) wurden wie folgt berechnet (6), (7), (8):

$$F_{>1} = \frac{m_{UTS,>1} \cdot 100}{m_{UTS,AT}} \quad \text{in \%} \quad (6)$$

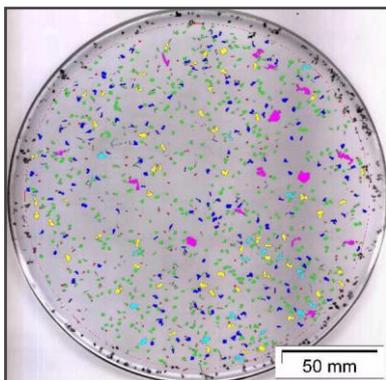
$$F_{<1} = 100 - F_{>1} \quad \text{in \%} \quad (7)$$

$$m_{UTS,>1} = m_F \cdot UTS_{>1} \quad \text{in g} \quad (8)$$

#### 4.2.3.2 Scanning und Bildanalyse

Für die bildanalytische Auswertung der Zerkleinerungsversuche wurde die angefärbte Probe ( $F_{>1}$ ) in eine große Petrischale ( $d \approx 20$  cm) überführt, in dest. Wasser suspendiert und mit Hilfe eines Metallspatels möglichst gleichmäßig verteilt. Die Petrischale wurde anschließend auf einem Scanner (CanoScan Lide 20, Canon, Deutschland) positioniert, mit weißem Papier abgedeckt und bei einer Auflösung von 300 dpi gescannt. Die gescannten Bilder wurden mit Hilfe der Bildanalyse-Software analySIS 5 (SIS, Deutschland) ausgewertet. Die Partikeldetektion erfolgte automatisch nach vorheriger Kalibrierung, Farbschwellsetzung und Shading-Korrektur (Ausgleich inhomogener Bildhintergründe und Kontrasterhöhung). Die Einteilung der Partikel erfolgte nach dem Messparameter „mittlerer Durchmesser“ [mm] in sechs Größenklassen (Tab. 12). Die detektierten Partikel wurden im Bild-Overlay farbig dargestellt, wobei gleichfarbig dargestellte Partikel zu einer Größenklasse gehören (Abb. 12).

Bei jeder Variante wurden ca. 4000 Partikel vermessen. Da beim Nasssieben praktisch keine 100%ige Abtrennung von Partikeln  $< 1$  mm erfolgte, wurden diese bei der Bildanalyse des Siebrückstandes zunächst miterfasst. Zur Vereinfachung der Berechnungen wurde angenommen, dass alle Partikel Kugelform und die gleiche Dichte besitzen. Auf diese Weise ließen sich näherungsweise aus der Anzahl der Partikel und dem mittleren Durchmesser jedes einzelnen Partikels eine Gesamtmasse für jede Größenklasse und damit eine relative Massenverteilung über den gesamten Größenbereich ermitteln, wobei die bei der Bildanalyse miterfassten Partikel  $< 1$  mm der relativen Massenhäufigkeit der Siebfraction  $< 1$  mm zugeordnet wurden.



**Abb. 12: Zerkleinerte Apfeltresterpartikel nach Scannen und automatischer Partikeldetektion**

**Tab. 12: Klasseneinteilung bei der Partikeldetektion**

Klasse	Größenbereich	Farbe (Overlay)
1	0 – 1 mm	Rot
2	1 – 2 mm	Grün
3	2 – 3 mm	Blau
4	3 – 4 mm	Gelb
5	4 – 5 mm	Türkis
6	> 5 mm	Pink

#### 4.2.3.3 Laserpartikelanalyse

Die Fraktion  $< 1$  mm der verschiedenen Zerkleinerungsvarianten wurde im Laser-Partikel-Sizer analysette 22 (Fritsch, Deutschland) untersucht. Dazu wurden 60 mL Partikelsuspension (Varianten Standard, Ultraschall, Autoklav) in den Probenvorratsbehälter mit Rührer gegeben. Im Fall der homogenisierten Variante wurden nur zwei bis vier ml Suspension eingesetzt (Soll-Anfangstrübung 7 – 15 %). Die Auswertungssoftware ordnete die nach Laserbeugungsprinzip vermessenen Partikel in 34 Größenklassen. Als Ergebnis der Messung erhielt man ein Partikelgrößen-Histogramm bzw. durch Aufsummieren der relativen Klassenhäufigkeiten die entsprechenden Volumensummenhäufigkeiten. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Der Messbereich lag zwischen 1,01 und 1055,23  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der aufgeschlossenen Apfeltrester wurden die tiefgefrorenen Proben (Fraktion < 1 mm) gefriergetrocknet, auf geeignete Probenträger aufgebracht und mit Goldstaub beschichtet. Die Aufnahmen erfolgten im Rasterelektronenmikroskop S 2700 (Hitachi, Japan).

### 4.2.4 Enzymierung physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester

#### 4.2.4.1 Materialvorbereitung

Für alle Versuche dieser Serie wurde die Apfeltrestercharge 2004 verwendet. Für einen Ansatz wurden 100 g aufgetauter Apfeltrester mit 300 g dest. Wasser versetzt. Zur Vermeidung mikrobiellen Verderbs wurde Natriumazid (0,025 % im Ansatz) verwendet. Jeder Tresteransatz wurde zunächst mittels Standardaufschluss (Kap. 4.2.2) vorzerkleinert. Die weiteren Aufschlussvarianten schlossen sich an die Standardvariante nach oben beschriebener Prozedur an. Nach dem physikalischen Aufschluss wurden die Ansätze mit 2%iger Schwefelsäure auf pH 3,3 eingestellt. Für jeden Ansatz erfolgte eine Trockensubstanzbestimmung bei 105 °C. Pro Variante wurden jeweils zwei Versuchsansätze als Doppelbestimmung vorbereitet.

#### 4.2.4.2 Versuchsdurchführung

Von den vorbereiteten Tresteransätzen wurden jeweils 50 g in sechs Erlenmeyerkolben eingewogen und mit Enzymlösung versetzt. Die jeweiligen Dosierungen sind in Kap. 4.2.4.3 näher erläutert. Vier Kolben wurden im Wärmeschrank bei 30 °C unter kontinuierlichem Schwenken ( $150 \text{ min}^{-1}$ ) für 4 h bzw. 24 h (je zwei als Doppelbestimmung) inkubiert. Die beiden 0h-Proben wurden nach Enzymzugabe sofort im Wasserbad für 10 min bei 90 °C zur Enzyminaktivierung erhitzt und anschließend unter fließendem Wasser abgekühlt. Die Behandlung der 4h- bzw. 24h-Proben erfolgte nach der jeweiligen Inkubationszeit analog. Nach Ermittlung des pH-Wertes wurden 3 g behandelte Trester im Maßkolben mit 0,1 M Na-Acetat-Puffer auf 50 mL aufgefüllt, kräftig geschüttelt, in Zentrifugengläser überführt und 25 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde nochmals 1:2 verdünnt, filtriert und zur Zuckeranalytik eingesetzt.

#### 4.2.4.3 Enzymdosierung

Zur Anwendung kamen die vier pektinolytischen Präparate Rapidase ADEX P (ADP), Pectinex Ultra SP-L (SPL), Ultrazym AFP-L (AFP) und Pectinase L 100 (PEC) sowie die cellulolytischen Präparate Cellufood AL 140 (CFD) und Novozym 188 (NZ). Diese wurden einzeln, in Kombination I (Cellulase + Pektinase) und in Kombination II (Cellulase + Pektinase + Cellobiase) eingesetzt. Die Dosierungsempfehlungen der Hersteller sowie die in den Versuchen eingesetzten Dosierungen sind in Tab. 13 dargestellt. Für die Berechnung der einzusetzenden Enzymmengen wurden die unlöslichen Trockensubstanzgehalte von frischen Äpfeln (~1,5 g/100 g) sowie von Apfeltrester (~12 g/100 g) zugrunde gelegt. Daraus resultierte, dass die absolut eingesetzten Mengen pro g Trester über den für Maischen aus frischen Äpfeln empfohlenen Dosierungen liegen. Bei Bezug auf die UTS lagen die angewendeten Dosierungen jedoch in fast allen Fällen im empfohlenen Bereich (Tab. 13).

**Tab. 13: Enzymkombinationen und Dosierungen**

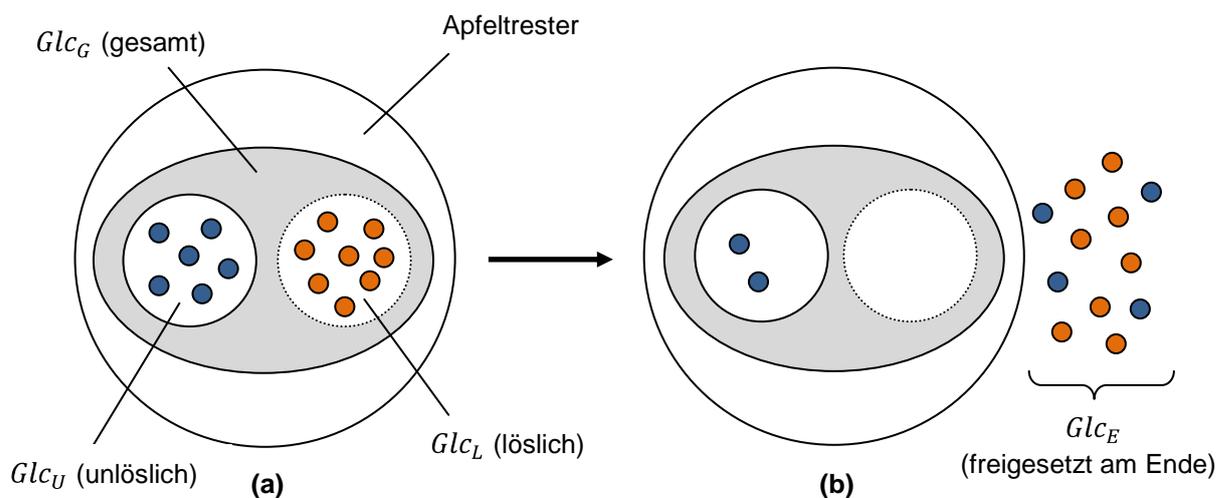
	Enzym	Empfehlung Hersteller [mL/kg UTS]	Eingesetzte Dosierung [mL/kg UTS]
Einzel	CFD	13 – 53	17
	ADP	13 – 27	17
	SPL	13 – 20	17
	AFP	13 – 20	17
	PEC	7 – 13	17
Kombination I	CFD/ADP	-	17/17
	CFD/SPL	-	17/17
	CFD/AFP	-	17/17
	CFD/PEC	-	17/17
Kombination II	CFD/ADP/NZ	-	17/17/3
	CFD/ADP/NZ	-	17/17/3
	CFD/AFP/NZ	-	17/17/3
	CFD/PEC/NZ	-	17/17/3

#### 4.2.4.4 Bestimmung reduzierender Zucker und Glucose

Der Gehalt reduzierender Zucker sowie Glucose erfolgte in den aufgearbeiteten Probelösungen nach 1:10-Verdünnung gemäß der oben beschriebenen Methoden (Kap. 4.2.1.1 und 4.2.1.2) und wurde in mg reduzierende Zucker bzw. Glucose pro g Trester Trockensubstanz angegeben. Die prozentuale Freisetzung von „Glucose gesamt“ (löslich + unlöslich) ( $FRS_{GlcG}$ ) und „Glucose unlöslich“ ( $FRS_{GlcU}$ ) wurden unter Einbeziehung der ermittelten Materialkennwerte  $Glc_E$ ,  $Glc_G$ ,  $Glc_L$  und  $Glc_U$  (Abb. 13) nach den Gleichungen (9) und (10) berechnet.

$$FRS_{GlcG} = \frac{Glc_E \cdot 100}{Glc_G} \quad \text{in \%} \quad (9)$$

$$FRS_{GlcU} = \frac{(Glc_E - Glc_L) \cdot 100}{Glc_U} \quad \text{in \%} \quad (10)$$



**Abb. 13: Schematische Darstellung der Freisetzung löslicher und unlöslicher (gebundener) Glucose aus Apfelsastrestern. (a) vor Enzymeinwirkung, (b) nach Enzymeinwirkung**

Da bei der gaschromatographischen Zuckerbestimmung Glucose als Summe aus löslichen Glucose (Restzucker) und unlöslicher Glucose (Glucose aus Cellulose und Stärke) erfasst wurde und Saccharose im Rahmen der Probenaufarbeitung vollständig zu Glucose und Fructose invertierte (Kap. 4.2.4.7), waren die ermittelten Glucosegehalte für Saccharose zu korrigieren.

#### 4.2.4.5 Bestimmung weiterer Zuckerbausteine mittels HPLC

Zur Bestimmung weiterer Zuckerbausteine in den aufgearbeiteten Probelösungen wurde eine HPLC-Anlage der Firma Jasco (Deutschland) verwendet. Die Probelösungen wurden vor dem Einspritzen in die HPLC durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) filtriert. Die Laufzeit betrug 30 min. Nachfolgend sind die wichtigsten HPLC-Parameter aufgeführt.

##### Geräte:

- Degasser GT 103 (Fa. Jasco)
- Low-Pressure Gradient Unit LG-980-02 (Fa. Jasco)
- HPLC-Pumpe PU-980 (Fa. Jasco)
- Peltier-Kolonnenthermostat für HPLC
- UV/VIS-Detektor UV-975 (Fa. Jasco), 215 nm, 8 nm Bandbreite, konische 17µL-Durchflusszelle
- Differential-Refraktometer (Fa. Knauer), thermostatiert, 35 °C Range 16, Zeitkonstante 0,25 s, Zellvolumen 12 µL
- Software Borwin, Version 1.21 (Fa. Jasco)

##### Methode:

- Laufmittel 0,008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (isokratisch)
- Kationenaustausch-Säule H<sup>+</sup>-Form Gat-Car-H, 300 \* 7,8 mm ID
- Vorsäule 50 \* 7,8 mm ID, 10 µm (Fa. Gamma Analystechnik)
- Säulentemperatur 45 °C
- Injektionsvolumen 20 µL
- Ventil Rheodyne Typ 7125 (vollständige Schleifenfüllung)
- UV/VIS- und RI-Detektor in Serie

Die Gehalte des jeweiligen Zuckerbausteins in den Probelösungen wurden anhand der Regressionsdaten nach Eichung mit den entsprechenden Standardlösungen ermittelt. Unter den angegebenen Bedingungen konnten in den Standardlösungen Cellobiose, Galacturonsäure, Rhamnose, Arabinose nebeneinander bestimmt werden (Anhang, Abb. 67). Galactose, Mannose und Xylose konnten chromatographisch nicht getrennt werden und lieferten daher nur einen Peak. Eine Schwierigkeit hinsichtlich der Auswertung der Ergebnisse bestand darin, dass Fructose (als löslicher Restzucker im Trester) zeitgleich mit Galactose, Mannose, Xylose und Rhamnose eluierte (Anhang, Abb. 68). Die Ergebnisse sind in diesem Fall als Summe der entsprechenden Hemicellulose-Bausteine und Fructose dargestellt.

#### 4.2.4.6 Rheologische Untersuchungen

Für einen Versuchsansatz wurden analog dem oben beschriebenen Verfahren 100 g Apfeltrester mit 300 g Wasser im 800-mL-Becherglas versetzt, mittels Standardaufschluss zerkleinert und der pH-Wert auf 3,3 eingestellt. Die Ansätze wurden mit Enzymlösung versetzt und kurz intensiv durchmischt. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden die vier Enzymvarianten „Kombination II“ untersucht. Als Referenz diente ein Ansatz, bei dem statt der Enzymlösung dest. Wasser zugesetzt wurde. Nach Enzymzugabe wurden die Ansätze im Wasserbad bei 30 °C für 24 h inkubiert. Zu Beginn (0 h) sowie nach ½, 2, 4, 6, 24 h wurde die Prozessviskosität  $\eta_{proz}$  mit Hilfe des Rheoswing® bestimmt. Alle Varianten wurden doppelt angesetzt und vermessen.

#### 4.2.4.7 Nachweis der Saccharose-Inversion

25 g vorzerkleinerter Apfeltrester (Standardaufschluss) wurden mit Schwefelsäure (2 %) auf pH 3,3 eingestellt, mit dest. Wasser bei Raumtemperatur extrahiert, filtriert und geklärt (Carrez-Lösungen I und II). Parallel dazu wurde eine weitere Apfeltresterprobe behandelt, die vor der Extraktion 10 min bei 90 °C im Wasserbad erhitzt wurde. Ein Aliquot (25 mL) der geklärten Lösungen wurde anschließend zur Säureinversion der nichtreduzierenden Zucker (Saccharose) mit 10 mL dest. Wasser und 2,5 mL HCl (32 %) versetzt und bei 70 °C im Wasserbad für 5 min erhitzt. Nach Abkühlen wurde mit 40%iger NaOH neutralisiert (Indikator Methylorange), 1:2 verdünnt und aufgefüllt. Die Bestimmung der reduzierenden Zucker in allen Proben erfolgte nach der Methode von Luff und Schoorl [222]. Dazu wurden 25 mL Luff'sche Lösung mit 25 mL Probelösung versetzt, 10 min am Rückfluss gekocht, anschließend abgekühlt und 50 mL 0,4 N Essigsäure und 25 mL 0,1 N Jodlösung zugesetzt. Nach Umschütteln wurden 55 mL 0,75 N Salzsäure hinzugefügt, geschüttelt und der Jodüberschuss mit 0,1 N Natriumthiosulfat-Lösung zurücktitriert. Nach Zusatz von 1 mL Stärkelösung wurde bis zum Umschlag titriert und der Gehalt an reduzierenden Zuckern anhand des Verbrauches an 0,1 N Natriumthiosulfat-Lösung ermittelt.

## 4.2.5 Enzymierungsversuche mit variierendem Tresteranteil im Ansatz

### 4.2.5.1 Versuchsdurchführung

Im Sinne einer Weiterentwicklung des Laborverfahrens wurden Enzymierungsversuche mit Apfeltresteransätzen mit unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt durchgeführt. Dabei wurde der Tresteranteil im Versuchsansatz gemäß folgendem Schema variiert (Abb. 14).



**Abb. 14: Schema der Trester/Wasser-Verhältnisse (Massenverhältnisse)**

Jede Variante wurde doppelt angesetzt, wobei im Fall von Variante (a) 150 g Trester mit 450 g dest. Wasser versetzt und mittels Standardaufschluss zerkleinert wurden und der pH-Wert auf 3,3 eingestellt, Enzym dazu gegeben und bei 30 °C im Wärmeschrank für 48 h inkubiert wurde. Es wurde der Enzym-Mix PEC/CDF/NZ in der angegebenen Konzentration (Tab. 13) verwendet. Bei Variante (b) wurden 200 g Trester und 400 g Wasser eingesetzt, bei Variante (c) 300 g Trester und 300 g Wasser. Vor der ersten Grobzerkleinerung mittels Waring-Blender (2 min) wurde der Enzym-Mix zugesetzt. Die Konzentration war auf die Gesamtansatzmenge von 600 g bezogen für alle drei Varianten gleich. Das bedeutete, dass sich das Enzym/Substrat-Verhältnis von (a) über (b) nach (c) verringerte. Die Varianten (b) und (c) wurden ebenfalls für 48 h inkubiert, wobei nach 1 h nochmals mittels Waring-Blender zerkleinert wurde. Variante (b) wurde nach 3 h mit dem Ultraturrax behandelt (4 min). Variante (c) wurde nach 3 h nochmals mit dem Waring-Blender (2 min) und nach 24 h mit dem Ultraturrax (4 min) behandelt.

### 4.2.5.2 Zuckerbestimmung und rheologische Untersuchungen

Der Gehalt an reduzierenden Zucker und Glucose in den Ansätzen wurde nach den bereits beschriebenen Methoden bestimmt, bei Variante (a) nach 0, 4, 24 und 48 h, bei den Varianten (b) und (c) nach 0, 1, 3, 6, 24 und 48 h.

Die rheologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Viskosität wurden mit dem Torsionschwinger Rheoswing® nach oben beschriebener Methodik (Kap. 4.2.4.6) zu den genannten Zeitpunkten durchgeführt.

## 4.2.6 Vergärungsversuche mit Apfeltrester

### 4.2.6.1 Materialvorbereitung

Für die Vergärungsversuche wurden Apfeltrester der Chargen 2005 und 2006, sowie die säurehydrolysierten Trester, die aus Charge 2006 hergestellt wurden (Kap. 4.1.1.4), verwendet. Es wurden vier Versuchsserien durchgeführt, wobei jede Variante doppelt angesetzt wurde. Tab. 14 gibt einen Überblick über die variierenden Versuchsbedingungen.

**Tab. 14: Versuchsserien und Varianten der Vergärungsversuche**

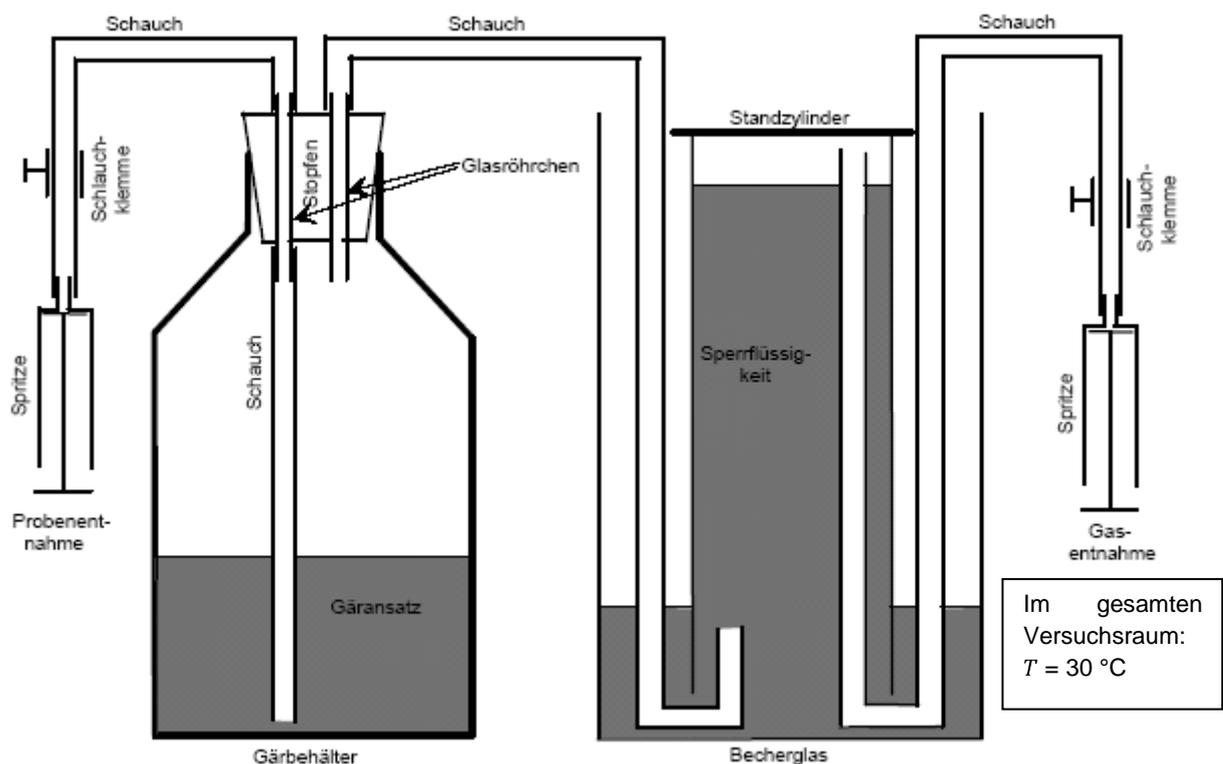
Serie	Variante	Charge	Trester + Wasser	Enzym	Variation	Hefe
1	1	2005	1 + 3	ohne		DSM
	2		1 + 3	einfach		DSM
	3		1 + 1	ohne		DSM
	4		1 + 1	einfach		DSM
2	5	2005	1 + 1	einfach		DSM
	6		1 + 1	dreifach		DSM
	7		1 + 1	dreifach	Trester vorerhitzt	DSM
3	8	2005	1 + 1	dreifach	Enzym-Mix Start	Gammazym
	9		1 + 1	dreifach	Enzym gestaffelt	Gammazym
	10		1 + 1	dreifach	Pektinase Start	Gammazym
4	11	2006	1 + 1	dreifach	nativ	Gammazym
	12		1 + 1	dreifach	rapid-set	Gammazym
	13		1 + 1	dreifach	slow-set	Gammazym

Für die Varianten 1 und 2 wurden 200 g Apfeltrester im 1L-Becherglas mit 600 g dest. Wasser, und 10 mL  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ -Lösung (2,4 % (w/v)) versetzt und durchmischt. Bei Variante 2 wurde vor der Zerkleinerung der Enzym-Mix PEC/CFD/NZ in einfacher Konzentration (Tab. 13), bei Variante 1 dest. Wasser anstatt Enzymlösung, zugesetzt. Die Ansätze wurden im Waring-Blender 2 min vorzerkleinert, anschließend der pH-Wert mit Schwefelsäure (2 %) auf 3,3 eingestellt, 1 h im Wärmeschrank bei 30 °C inkubiert, anschließend wieder 2 min mit dem Waring-Blender zerkleinert und für eine weitere Stunde inkubiert. Danach erfolgte die dritte Zerkleinerungsstufe, zunächst 2 min mit dem Waring-Blender, anschließend 4 min mit dem Ultraturrax. 580 g des homogenisierten Tresters wurden in einen 1L-Gärbehälter aus Glas überführt, mit 20 mL Hefesuspension versetzt, durchmischt und an die Versuchsanlage angeschlossen (Abb. 15). Vor der Hefezugabe wurde in allen Fällen eine Trockensubstanzbestimmung im Ansatz für die Berechnung der Alkoholausbeute durchgeführt. Die Hefesuspension wurde bereits 24 h vor Zugabe angesetzt, wobei 1 g Trockenhefe (Fermiol, DSM, Frankreich bzw. T01, Gammazym, Deutschland) zunächst in 100 mL Wasser suspendiert und 30 min bei 30 °C aufgeschlämmt wurde. Um die Hefen in einen für die Vergärung aktiven Zustand zu bringen, wurde der Hefesuspension 100 mL Apfelsaft (100 %, aus Fruchtsaftkonzentrat, Lidl, Deutschland) zugesetzt und 24 h inkubiert. Die Varianten 3 und 4 wurden analog behandelt, wobei der Tresteranteil im Ansatz erhöht wurde (400 g Trester + 400 g Wasser). In Versuchsserie 2 wurden drei Varianten bei hohem Trester-Wasser-Verhältnis (1 + 1) hergestellt, davon zwei Varianten (Variante 6 und 7) mit dreifacher Enzymkonzentration (Tab. 13). Bei Variante 7 wurde der Ansatz zusätzlich vor der Enzymbehandlung auf 90 °C erhitzt und 3 min bei dieser Temperatur gehalten, um die native Mikroorganismenflora zu inaktivieren. In

Versuchsserie 3 wurde eine weitere Brennereihefe (Gammazym) eingesetzt und der Zeitpunkt der Enzymzugabe und das zugegebene Enzym variiert. Bei Variante 8 wurde der Enzym-Mix wie in den Varianten zuvor zu Beginn des mechanischen Aufschlusses zum Ansatz gegeben. Bei Variante 9 wurde PEC mit einem Drittel der Gesamtmenge von CFD/NZ zu Beginn zugegeben, die restlichen zwei Drittel von CFD/NZ hingegen erst nach 10 h Vergärungszeit, um mögliche Enzym-Inhibierungseffekte zu testen. Bei Variante 10 wurde das Pektinase-Präparat Rapidase ADEX P in gleicher Konzentration wie der Enzym-Mix in Variante 8 zu Beginn zum Ansatz gegeben. In Versuchsserie 4 wurde ausschließlich die Apfeltrestercharge 2006 bzw. die daraus hergestellten säurehydrolysierten Trester verwendet. Variante 11 wurde analog zu Variante 6 behandelt. Bei den Varianten 12 (rapid-set) und 13 (slow-set) wurden die säurehydrolysierten Trester in der Menge zum Ansatzwasser gegeben, so dass die Gesamttrockensubstanz im Ansatz der Variante mit nativem Trester (ca. 10 %) entsprach. Im Fall der Variante rapid-set waren dies 267 g Trester + 533 g Wasser, bei der Variante slow-set 235 g Trester + 565 g Wasser.

#### 4.2.6.2 Vergärung der Ansätze

Die gemäß Kap. 4.2.6.1 hergestellten Gäransätze wurden wie folgt an die Versuchsanlage angeschlossen (Abb. 15).



**Abb. 15: Versuchsanlage für Vergärungsversuche**

Zunächst wurden die Gärbehälter mit einem zweifach durchbohrten (mit Glasröhrchen versehenen) Gummistopfen verschlossen. Über einen gasdichten Gummischlauch konnten Tresterproben zu bestimmten Zeitpunkten des Versuches (0, 1, 2, 7, 20, 24, 26, 28, 44, 48 h) entnommen werden, wobei die Proben 0, 1 und 2 h noch vor der Vergärung nach den jeweiligen Zerkleinerungsstufen dem Ansatz entnommen wurden. Während der Vergärung wurden jeweils 2 g vom Gäransatz per Kunststoffspritze abgezogen, in einen 50mL-Maßkolben über-

führt, mit Na-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 5) versetzt und 10 min im Wasserbad bei 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Puffer aufgefüllt und die Suspension anschließend bei 6000 U/min zentrifugiert. Ein Aliquot des klaren Überstands wurde je nach erwartetem Glucosegehalt nochmals verdünnt und anschließend der Glucosegehalt mittels Enzym-Testkit (r-biopharm) bestimmt. Über den zweiten Schlauch konnte das während der Vergärung gebildete CO<sub>2</sub> in einen 1L-Meßzylinder entweichen, welcher umgedreht in einem 2,5L-Becherglas arretiert wurde. Der Messzylinder war mit einer Sperrflüssigkeit (0,1 M HCl mit Tashiro-Indikator) gefüllt, in der sich das CO<sub>2</sub> aufgrund des stark sauren pH-Wertes (pH~1) nur minimal löste und somit die Sperrflüssigkeit verdrängte. Das Becherglas diente dabei als Flüssigkeitsreservoir. In regelmäßigen Zeitabständen (zu Beginn stündlich) wurde das gebildete Gas im Kopfraum des Messzylinders über eine volumenskalierte 100mL-Spritze entzogen und so der Flüssigkeitsspiegel wieder auf das Anfangslevel zurückgebracht. Auf diese Weise ließ sich das während der Vergärung gebildete CO<sub>2</sub> als Prozessparameter näherungsweise ermitteln. Da die Versuche bei 30 °C durchgeführt wurden, mussten die mittels skaliertes Spritze ermittelten CO<sub>2</sub>-Volumina mit Hilfe der idealen Gasgleichung auf Normvolumen (Normalzustand bei 273 K und 1,013 bar) berechnet werden [223]. Als Abbruchkriterium für die Vergärungsversuche dienten der Gehalt an löslicher Glucose (Glucose→0) im Trester sowie das gebildete Gasvolumen (Gasbildung→0). Die Varianten 1 - 6 sowie 8 - 11 fermentierten über einen Zeitraum von 48 h, Variante 7 dauerte 54 h und die Varianten 12 und 13 wurden 120 h vergoren.

#### 4.2.6.3 Destillation der Ansätze, Ausbeuteberechnung, Methanol und Gärungsnebenprodukte

Nach Beendigung der Vergärung wurden die vergorenen Trester in einer Labordestillationsapparatur abdestilliert [224]. Dazu wurden 400 g vergorener Trester unter Nachspülen mit 3 \* 20 mL dest. Wasser in einen 1000mL-Rundkolben überführt und mit 3 - 4 Tropfen Silikon-Entschäumer sowie 2 Keramikscherben zur Vermeidung von Siedeverzügen versetzt. Die Erhitzung der Trester erfolgte in Heiznestern, wobei der Alkohol bzw. das Alkohol-Wassergemisch langsam (1,5 h) in einen 100mL-Maßkolben (Vorlage) bis zu einem Gesamtvolumen von ca. 90 mL überdestilliert und nach Temperieren auf 20 °C mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt wurde. In den auf 20 °C temperierten Destillaten wurde der Alkoholgehalt aräometrisch bestimmt. Bei von 20 °C abweichenden Temperaturen wurde der an der Alkoholspindel abgelesene Alkoholgehalt in %vol mit Hilfe der auf den Amtlichen Alkoholtafeln basierenden Computersoftware BmonV 2.1 der Bundesmonopolverwaltung für Branntwein korrigiert. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass in den nach 1,5 h abdestillierten Destillatfraktionen kein Alkohol mehr nachgewiesen werden konnte. Die Eignung der Destillationsapparatur wurde zusätzlich mit einer Standard-Alkoholmischung (10 %mas) getestet. Die Wiederfindung im Destillat betrug knapp 99 % (9,87 %mas). Für alle Varianten wurde eine praktische Alkoholausbeute *AAB* nach den Gleichungen (11), (12) berechnet:

$$AAB = \frac{RA_{dest} \cdot 100}{RA_{max}} \quad \text{in \%} \quad (11)$$

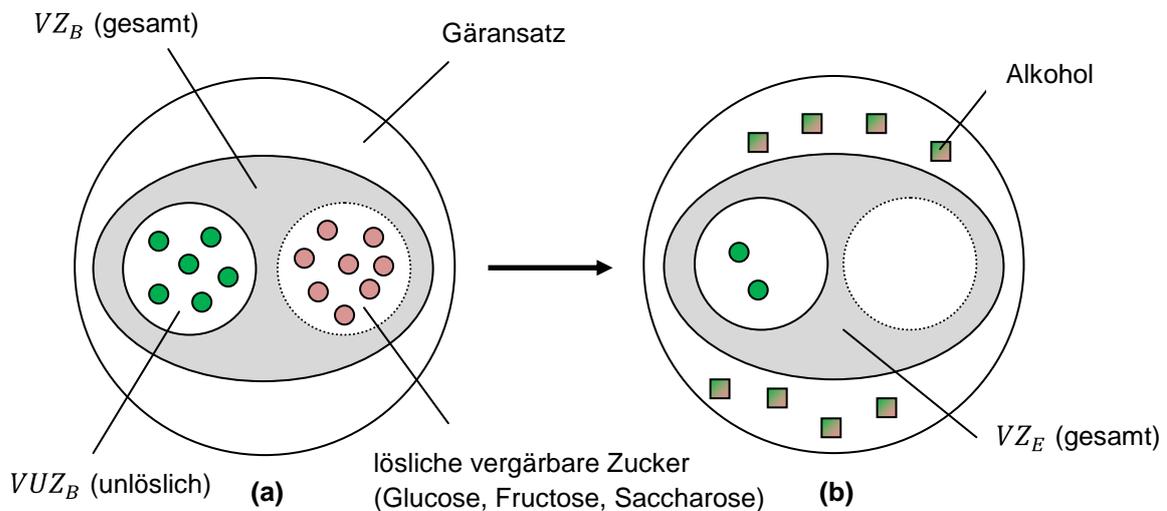
$$RA_{max} = TS \cdot VZ_B \cdot 0,5184 \quad \text{in g} \quad (12)$$

Die Menge an abdestilliertem reinem Alkohol  $RA_{dest}$  [g] ergab sich aus der Einwaage an vergorenem Trester zur Destillation und aus dem gespindeltem, temperaturkorrigierten Alkoholgehalt [mL/100 mL] nach Umrechnung in g/100 mL mittels der oben genannten Software. Der Faktor 0,5184 ergab sich aus der Grundgleichung der alkoholischen Gärung (1 g Zucker  $\rightarrow$  0,5184 g Ethanol + 0,4816 g  $CO_2$ ). In die Bilanz der gesamt vergärbaren Zucker ( $VZ_B$ ) gingen sowohl die löslichen Zucker Glucose, Fructose und Saccharose als auch die vergärbaren Zucker aus den unlöslichen Zellwandpolysacchariden (Glucose aus Cellulose, Stärke, Xyloglucan; Mannose aus Hemicellulosen) ein. Die Bestimmung der einzelnen Zuckerbausteine wird in den Kap. 4.2.8.3 bis 4.2.8.6 näher erläutert.

Für die Varianten der Versuchsserien 3 und 4 wurden zusätzlich der Fermentationsgrad ( $FG$ ) und der Hydrolysegrad unlöslicher Zucker  $HYD$  nach den Gleichungen (13) und (14) bestimmt (Abb. 16).

$$FG = \frac{VZ_B - VZ_E}{VZ_B} \cdot 100 \quad \text{in \%} \quad (13)$$

$$HYD = \frac{VUZ_B - VZ_E}{VUZ_B} \cdot 100 \quad \text{in \%} \quad (14)$$



**Abb. 16: Schematische Darstellung der Anteile vergärbbarer Zucker im Gäransatz vor (a) und nach (b) der alkoholischen Vergärung**

Da nach der Vergärung keine löslichen Zucker mehr im Ansatz waren (enzymatisch bestimmt), ergab sich der Gehalt an Restzuckern  $VZ_E$  im Gäransatz aus der Summe der aus den Zellwandpolymeren stammenden Glucose und Mannose. Da Glucose vor der Vergärung auch als löslicher Zucker vorliegt, ergab sich der Gehalt an „unlöslicher“ (gebundener) Glucose aus der Differenz zwischen der gaschromatographisch bestimmten Gesamt-Glucose (Kap. 4.2.8.3) und der mittels Enzym-Testkit bestimmten löslichen Glucose im Trester (Kap. 4.2.8.4).

Neben der aräometrischen Gesamtalkoholbestimmung wurden in den Destillaten Methanol sowie verschiedene Gärungsnebenprodukte gaschromatographisch (Headspace-GC) bestimmt. Die quantitativ ermittelten Gärungsnebenprodukte sowie die Angaben zum verwendeten GC-System sind nachfolgend aufgeführt.

Gärungsnebenprodukte:

- Acetaldehyd
- Ethylacetat
- i-Amylacetat
- n-Propanol
- i-Butanol
- n-Butanol
- i-Amylalkohole (Summe aus 2-Methylbutanol und 3-Methylbutanol)
- Hexanol

GC-System:

- Geräte            GC-14a        Shimadzu Kapillargaschromatograph  
                       C-R4AX        Integrator und Steuereinheit mit Festplatte  
                       HSS-2B        Headspace und automatischer Probengeber  
                       AOC-14        automatischer Probengeber für Flüssigprobenaufgabe
- Headspace      10 mL Gesamtvolumen, Vorheizphase 20 min bei 80 °C
- Injektion        1 mL Probevolumen aus dem Gasraum, Kanülientemperatur 80 °C
- Injektor         Split/splitless-Injektor  
                       Splitverhältnis 1:45  
                       Temperatur 200 °C
- Säule            Permabond CW20M-DF-0,25 Machery-Nagel  
                       25 m, 0,25 mm Innendurchmesser
- Temperatur-  
   regime            Ofenanfangstemperatur 40 °C, Haltezeit 1 min  
                       Aufheizphase 10 K/min auf Endtemperatur  
                       Ofenendtemperatur 180 °C, Haltezeit 7 min  
                       Abkühlphase auf 40 °C
- Detektor         FID, Temperatur 240 °C

Zur Analyse wurden die Destillate nochmals 1:10 verdünnt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mittels Computersoftware Chromatopac V3.71D, HAS V2.8, MSCONV 2.14 sowie Class Unipac SN20-12. Die Ergebnisse wurden in mg Methanol bzw. Gärungsnebenprodukt je 100 mL r. A. angegeben.

## **4.2.7 Aufarbeitung von Brennereischlempen**

### **4.2.7.1 Materialvorbehandlung**

Für diese Untersuchungen wurden die Destillationsrückstände (Schlempe) von großtechnischen Vergärungsversuchen, die in der Obstbrennerei Kullmann mit Apfeltrester der Charge 2006 durchgeführt wurden, verwendet. Die Schlempe wurde direkt nach der Destillation der vergorenen Trester heiß in hitzesterilisierte Weckgläser abgefüllt. Nach dem Abkühlen wurden 1 kg Schlempe im Weckglas für 3 min mit dem Ultraturrax T 50 basic mit feinem Werkzeug S50N-G40F vorbehandelt (Variante mit UT). Als Vergleichsvariante diente 1 kg der unbehandelten Schlempe (Variante ohne UT).

### **4.2.7.2 Fraktionierung durch Nasssieben**

In einem Screening-Test wurde 1 kg Schlempe (mit und ohne UT) auf ein 50µm-Trennsieb (mit Siebboden und Deckel) gegeben und in 5 - 6 Durchgängen je 5 min bei einer Amplitude von 60 - 100 in der Siebmaschine AS 200 basic (Retsch, Deutschland) nassgesiebt. Anschließend erfolgten die Bestimmung der absoluten Feuchtmassen, Trockensubstanzen, Gehalte an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen und Gesamt-Polyphenolgehalte beider Siebfractionen.

## 4.2.8 Materialcharakterisierung

### 4.2.8.1 Bestimmung der Trockensubstanz

Etwa 1 g (trockene Proben) bzw. 10 g (feuchte Proben) wurden in vorgetrocknete Tiegel ( $m$ ) eingewogen ( $m_{vT}$ ) und im Trockenschrank (Memmert M600, Deutschland) bei 105 °C getrocknet, anschließend im Exsikkator abgekühlt und ausgewogen. Die Trocknung wurde bis zur Massekonstanz (Massenänderung kleiner 0,002 g) wiederholt und nach der Trocknung die Endmasse ermittelt ( $m_{nT}$ ). Die Trockensubstanz ergab sich aus folgender Gleichung (15) [225].

$$TS = \frac{m_{nT} - m}{m_{vT} - m} \cdot 100 \quad \text{in \%} \quad (15)$$

### 4.2.8.2 Bestimmung von unlöslicher und löslicher Trockensubstanz

Zur Bestimmung der unlöslichen ( $UTS$ ) und löslichen ( $LTS$ ) Trockensubstanz wurden ca. 15 g Apfelnasstrester auf einem Filtergewebetuch ( $m_{FT}$ ) eingewogen ( $m_{FT,vT}$ ), fest verschnürt und in ein Soxhlet-Extraktionsgefäß überführt. In einem 2L-Rundkolben wurden 1000 mL 10%iger Ethanol vorgelegt und 3 Keramikscherben gegen Siedeverzüge hinzugefügt. Nach dem Aufsetzen des Extraktionsgefäßes auf den Rundkolben wurde bei maximaler Wärmezufuhr 3 h am Rückfluss gekocht, anschließend die Probe aus der Apparatur entnommen und bis zur Massekonstanz bei 105 °C getrocknet und die Endmasse  $m_{FT,nT}$  ermittelt. Die unlösliche Trockensubstanz  $UTS$  berechnete sich nach Gleichung (16):

$$UTS = \frac{m_{FT,nT} - m_{FT}}{m_{FT,vT} - m_{FT}} \cdot 100 \quad \text{in \%} \quad (16)$$

Die lösliche Trockensubstanz  $LTS$  ergab sich als berechneter Wert unter Einbeziehung der Trockensubstanz [g/100 g] aus Gleichung (17).

$$LTS = TS - UTS \quad \text{in \%} \quad (17)$$

### 4.2.8.3 Bestimmung der Neutralzucker mittels GC

Die Bestimmung der Neutralzuckerzusammensetzung erfolgte gaschromatographisch [164] nach kombinierter enzymatisch-saurer Hydrolyse der getrockneten, zerkleinerten Apfelnasstrester und anschließender Reduktion und Derivatisierung der Zucker zu Alditolacetaten. 15 mg Probe wurden mit 5 mL Enzym-Puffer-Lösung (0,05 M Natriumacetat, 200 ppm Rohapect AP 1, 100 ppm Rohapect B1L, 100 ppm Rohalase 7069) versetzt, 48 h bei 40 °C im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend 3 - 4 h bei 70 °C im N<sub>2</sub>-Strom zur Trockne eingedampft. Die Säurehydrolyse erfolgte nach Zugabe von 2,5 mL 2 M Trifluoressigsäure für 1 h bei 120 °C. Als innerer Standard wurden 50 µL einer 1,5%igen myo-Inositol-Lösung dazugegeben und zur Alkalisierung 0,4 mL Ammoniak dazugegeben. Nach Filtration (0,45 µm) wur-

den 0,2 mL des Filtrates zur Reduktion mit 2 mL NaBH<sub>4</sub>-Lösung (2 g/100 mL Dimethylsulfoxid) versetzt und für 90 min bei 40 °C behandelt. Die Acetylierung erfolgte durch Zugabe von 0,2 mL Eisessig (Kühlen), 0,4 mL Methylimidazol und 4 mL Essigsäureanhydrid (10 min, 20 - 25 °C). Anschließend wurden 10 mL bidest. Wasser dazugegeben, gekühlt und die Alditolaacetate mit 8 mL Dichlormethan (DCM) ausgeschüttelt. Der letzte Schritt wurde dreimal wiederholt, die DCM-Phase bei 40 °C (25 - 30 mbar) zur Trockne eingedampft und mit DCM in einen 2 mL Maßkolben überführt, 40 µL α-Glucose-Penta-Acetat (2,5 mg/mL) zugesetzt und mit DCM zur Marke aufgefüllt. Die Auswertung erfolgte über die Eichgerade des jeweiligen Zuckerstandards (Rhamnose, Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galactose, Glucose).

#### GC-System

- Geräte	GC-14a	Shimadzu Kapillargaschromatograph
	AOC-17	Shimadzu Autoinjektor
- Steuerung und Auswertung	Class VP Chromatography Data System V 4.2, Shimadzu	
- Injektor	Split/splitless-Injektor	
	Splitverhältnis 30:1	
	Temperatur 275 °C	
- Injektionsvolumen	1 µL	
- Säule	Rtx 2330; 30 m, 0,32 mm Innendurchmesser	
	Filmdicke 0,2 µm, Restek	
- Trägergas	Stickstoff, 1 mL/min	
- Temperaturregime	Ofenanfangstemperatur 180 °C, Haltezeit 1 min	
	Aufheizphase 12 K/min auf Endtemperatur	
	Ofenendtemperatur 245 °C, Haltezeit 7 min	
- Detektor	FID, Temperatur 275 °C	

#### 4.2.8.4 Bestimmung löslicher Zucker (gesamt)

In den getrockneten, zerkleinerten Apfeltrestern der verschiedenen Chargen (Kap. 4.1.1.1 und 4.1.1.3) wurden die löslichen Restzucker Glucose, Fructose und Saccharose mittels Enzym-Testkit (r-biopharm, Deutschland) bestimmt [226]. Dazu wurden 0,2 g Probe in einen 100mL-Maßkolben eingewogen, mit ca. 60 mL dest. Wasser versetzt, 1 h gerührt (Magnetprüher) und anschließend bis zur Marke aufgefüllt. Die Suspension wurde über einen Faltenfilter filtriert und 50 ml des Filtrates in einem weiteren 100mL-Maßkolben nacheinander mit je 5 mL Carrez-I- und Carrez-II-Lösung versetzt, der pH-Wert mit ca. 20 mL 0,1 M NaOH auf ca. 7 eingestellt und mit dest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Es wurde nochmals über einen Faltenfilter filtriert und 0,1 mL des Filtrates zur Bestimmung mittels Enzym-Testkit eingesetzt. Unter Berücksichtigung sämtlicher Verdünnungsfaktoren und der Probeneinwaage wurde der Gehalt an Glucose, Fructose und Saccharose in g Zucker/100 g Trestertrockensubstanz berechnet.

#### 4.2.8.5 Bestimmung löslicher Zucker (frei verfügbar)

Als frei verfügbare Zucker wurde der Anteil an löslichen Restzuckern bestimmt, der sich durch eine dreistündige Kaltwasserextraktion aus den Apfelnasstrestern entfernen ließ. Dazu wurden ca. 20 g Apfelnasstreste in ein Gewebefiltertuch eingewogen, fest verschnürt und in einen Soxhlet-Aufsatz eingebracht. Im Extraktionskolben (500mL-Dreihalsrundkolben) wurden 300 mL dest. Wasser mit 2 - 3 Keramikscherben vorgelegt. Gegen Siedeverzüge wurde des Weiteren eine fein ausgezogene Glaskapillare verwendet. Um die Wasserextraktion bei Raumtemperatur durchführen zu können, musste die Apparatur an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen werden, die einen Absolutdruck von ca. 30 mbar (Siedetemperatur ca. 24 °C) erzeugte. Für die Kondensation des Wasserdampfes wurde Kühlwasser von 5 °C mit Hilfe eines Umwälzkryostats im Kreislauf durch den aufgesetzten Kühler gepumpt. Um die für die Verdampfung erforderliche Temperaturdifferenz zu erzeugen, wurde der Rundkolben im Wasserbad auf ca. 45 °C temperiert. Nach 3 h Extraktion wurde die Extraktionslösung aus dem Rundkolben unter Nachspülen mit dest. Wasser in einen 500mL-Maßkolben überführt. Nach bereits beschriebenem Verfahren (Kap. 4.2.8.4) wurden nach Carrez-Fällung und Filtration die löslichen Zucker Glucose, Fructose und Saccharose mittels Enzym-Testkit bestimmt [226]. Aus der Nasstrestereinwaage und der Trestertrockensubstanz konnte der Gehalt der jeweiligen Zucker in g Zucker/100 g Trestertrockensubstanz bestimmt werden.

#### 4.2.8.6 Bestimmung von Stärke

Für die Stärkebestimmung mittels Testkit (r-biopharm, Deutschland) wurden zunächst 0,2 g getrocknetes, zerkleinertes Trestermaterial zum Lösen der Stärke mit 5 mL 8 M HCl und 20 mL Dimethylsulfoxid versetzt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden ca. 40 mL dest. Wasser dazugegeben, der pH-Wert mit 5 M (grob) bzw. 1 M (fein) NaOH auf 4 - 5 eingestellt, im Maßkolben auf 100 mL aufgefüllt und über einen Faltenfilter filtriert. Für die Bestimmung mittels Enzym-Testkit wurden 0,1 mL des Filtrates eingesetzt und der Stärkegehalt [g/100 g TS] berechnet [227].

#### 4.2.8.7 Bestimmung von Protein

Die Proteinbestimmung wurde als Dreifachbestimmung nach der Methode nach Kjeldahl ( $N \times 6,25$ ) durchgeführt [228]. Dazu wurden 500 mg Probematerial in einem Kjeldahlkolben mit 5 mL konzentrierter Schwefelsäure versetzt und eine Spatelspitze Selenreaktionsgemisch dazugegeben. Im Aufschlussblock wurde die Probe erhitzt bis sie klar und grünlich, bzw. nach dem Erkalten farblos erschien. Zur aufgeschlossenen Probe wurden 5 mL dest. Wasser und 3 Tropfen Phenolphthalein gegeben. Die Destillation erfolgte in der Apparatur nach Parnaß/Wagner. In einem Erlenmeyerkolben wurden 10 mL 2%ige Borsäure und 3 bis 5 Tropfen Tashiro-Indikator vorgelegt. Die Probe wurde mit ca. 10 mL Natronlauge versetzt, bis ein rosa Farbton erreicht war. Die Destillation wurde 5 min durchgeführt. Anschließend wurde das aufgefangene Destillat mit 0,01 N Schwefelsäure titriert und der Proteingehalt  $PRG$  nach Gleichung (18) berechnet:

$$PRG = \frac{(V_{Pr} - V_{BW}) \cdot F \cdot 0,0875}{E} \quad \text{in g/100 g TS} \quad (18)$$

#### 4.2.8.8 Bestimmung von Asche

Der Gehalt an Asche wurde im Muffelofen bei 525 °C bestimmt [229]. Die Tiegel wurden 1 h vorgeglüht, im Exsikkator abgekühlt und die Leermasse bestimmt ( $m$ ). 1 g Material wurden in die Tiegel eingewogen ( $m_{vT}$ ), über dem Bunsenbrenner verascht und 2 h im Ofen verglüht. Wurde die Asche nicht grau bzw. weiß, musste ein wässriger Auszug erfolgen. Die Tiegel wurden im Exsikkator abgekühlt, ausgewogen, in 30-min-Intervallen bis zur Massekonstanz (Massenänderung kleiner 0,001 g) weiter verglüht und die Endmasse ( $m_{nT}$ ) gravimetrisch bestimmt. Der Aschegehalt  $AG$  wurde nach Gleichung (19) bestimmt.

$$AG = \frac{m_{nT} - m}{m_{vT} - m} \cdot 100 \quad \text{in g/100 g TS} \quad (19)$$

#### 4.2.8.9 Bestimmung des Galacturonangehaltes

Der Galacturonangehalt wurde photometrisch mit  $m$ -Hydroxydiphenyl bestimmt [167]. Zuvor erfolgte die Extraktion des Gesamtpektins. Dazu wurden 0,1 g Material mit 45 mL 0,5%iger Chelaplex-III-Lösung versetzt, der pH-Wert mit 1 N Natronlauge auf 11,8 eingestellt und mit 5 mL Chelaplex-III-Lösung nachgespült. Nach 1 h Verweilzeit wurde der pH mit 1 N Essigsäure auf 5,0 eingestellt und mit 5 mL einer pH-5-Essigsäurelösung (eingestellt mit 1 N Natronlauge) nachgespült. Anschließend wurden 2 mL einer 0,5%igen Polygalacturonaselösung zur Suspension gegeben und diese für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymierte Probe wurde in einen Messkolben überführt, auf 100 mL mit dest. Wasser aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde nochmals 1:10 verdünnt.

Für das Aufstellen der Eichgeraden wurden 6 Konzentrationen (2, 4, 10, 20, 32, 40 µg/mL) einer Galacturonsäure-Monohydrat-Lösung hergestellt. Die Eichlösungen wurden wie die Probelösungen (siehe unten) behandelt.

Für die Bestimmung des Galacturonangehaltes wurden 0,5 mL Probelösung mit 3,0 mL Schwefelsäure-Tetraborat-Lösung gemischt, 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend im Eiswasserbad auf Raumtemperatur zurückgekühlt. Nach Zugabe von 50 µL  $m$ -Hydroxydiphenyl-Lösung erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 520 nm. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei den mitgeführten Blindwerten wurde statt der  $m$ -Hydroxydiphenyl-Lösung eine 0,5%ige Natronlauge eingesetzt. Anhand der Eichgeraden konnten über die gemessenen Extinktionen die jeweiligen Konzentrationen an Galacturonsäure ( $C_{GalA}$ ) in den Probelösungen bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ( $VF$ ) und der Einwaage ( $E$ ) wurde daraus der Galacturonangehalt  $GG$  nach Gleichung (20) bestimmt:

$$GG = \frac{C_{GalA} \cdot V \cdot VF}{E} \quad \text{in g/100 g TS} \quad (20)$$

#### 4.2.8.10 Bestimmung des Veresterungsgrades

Die Bestimmung des Veresterungsgrades erfolgte entsprechend [230] mit Chromotropsäure. Die einzusetzende Substanzmenge wurde aus dem Galacturonangehalt und dem erwarteten Veresterungsgrad berechnet. Das Material wurde zunächst in 500mL-Rundkolben eingewogen, mit 1 mL absolutem Ethanol benetzt und dann mit 75 mL dest. Wasser und 5 Tropfen Tashiro-Indikator versetzt. Nach Zugabe von 5 mL 1 N Natronlauge wurde 1 h gerührt. Die Verseifung wurde durch Zugabe von 5 mL 1 N Schwefelsäure beendet. Für die Destillation wurden die Kolben an die Apparatur nach Parnaß/Wagner angeschlossen. In einem im Eisbad gekühlten Erlenmeyerkolben wurden ca. 20 mL dest. Wasser mit 4 mL absolutem Ethanol vorgelegt. Die Destillation erfolgte so lange bis im Vorlagekolben ein Füllstand von etwa 80 mL erreicht war. Das Destillat wurde in Maßkolben auf 100 mL aufgefüllt.

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden 6 Konzentrationen (0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,1 mL/L) einer Methanol-Lösung hergestellt. Die Eichlösungen wurden wie die Probelösungen (siehe unten) behandelt.

Für die Bestimmung des Veresterungsgrades wurden 2 mL Probelösung mit 1 mL Kaliumpermanganat-Lösung versetzt und nach 15 min 0,6 mL Natriumdisulfit-Lösung dazugegeben. Im Eisbad erfolgte die Zugabe von 10 mL Chromotropsäure. Die Lösungen wurden dann 20 min bei 70 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend 20 min im Thermostaten auf 20 °C zurückgekühlt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Bei den mitgeführten Blindwerten wurde statt der Probelösung eine 5%ige ethanolische Lösung eingesetzt. Der Veresterungsgrad  $VG$  der Proben ließ sich aus folgender Beziehung (21) ermitteln:

$$VG = 4695,2 \cdot \frac{C_{ME}}{GG \cdot E} \quad \text{in \%} \quad (21)$$

#### 4.2.8.11 Bestimmung von Ballaststoffen

In den getrockneten, zerkleinerten Apfeltrestermaterialien (nativ, vergoren, vergoren und abdestilliert) und in den feuchten Fraktionen der Brennereischlempen (Kap. 4.1.1 und 4.2.7.2) wurden die Gehalte an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen nach der enzymatisch-gravimetrischen AOAC-Bestimmungsmethode ermittelt [156, 231]. Zunächst wurden 0,5 g (trockene Proben) bzw. 5 - 10 g (feuchte Proben) Probenmaterial in 50 mL Natriumphosphatpuffer (pH 6) suspendiert und der pH-Wert mit 5%iger NaOH auf pH 6 eingestellt. Zur Suspension wurden 100 µL  $\alpha$ -Amylase (Termamyl 120 L, Novozymes) gegeben und im Wasserbad für 30 min bei 100 °C temperiert. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde der pH-Wert mit 0,275 M NaOH auf 7,5 eingestellt, 200 µL Protease (Alcalase AF 2,4 L, Novozymes) dazugegeben und weitere 30 min bei 60 °C behandelt. Nach pH-Einstellung auf 4,5 mit 0,35 HCl wurden 300 µL Amyloglucosidase (Amylase AG 300 L, Novozymes) zur Suspension gegeben und nochmals 30 min bei 60 °C im Wasserbad stehen gelassen. Nach der enzymatischen Behandlung wurde die Probe über eine Glasfritte (Por. 2) abgesaugt, die vorher mit 0,5 g eines Filterhilfsmittels (Celite®) beschickt wurde. Der Rückstand wurde je zweimal mit 15 mL Ethanol (78 %), 15 mL Ethanol (99 %) und 15 mL Aceton gewaschen, anschließend bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet und nach dem Abkühlen ausgewogen (UBS). Das abgesaugte Filtrat wurde zur Ausfällung der löslichen Ballaststoffe mit 500 mL 99%igem Ethanol versetzt und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Filtration der Suspension wiederum über Glasfritten. Der Rückstand wurde analog per Lö-

sungsmittelaustausch (siehe oben) gewaschen und getrocknet (*LBS*). In den getrockneten Rückständen wurden der Asche- und Restproteingehalt bestimmt. Aus der Einwaage und den asche- und proteinkorrigierten Rückständen der zwei Fraktionen konnten die Gehalte an löslichen (*LBS*) und unlöslichen (*UBS*) Ballaststoffen in g/100 g TS bestimmt werden. Der Gesamtballaststoffgehalt ergab sich aus der Summe von *UBS* und *LBS*.

#### 4.2.8.12 Bestimmung von Polyphenolen

In den getrockneten, zerkleinerten Apfeltrestermaterialien (nativ, vergoren, vergoren und abdestilliert) und in den feuchten Fraktionen der Brennereischlempen (Kap. 4.1.1 und 4.2.7.2) wurde der Gehalt an Gesamtpolyphenolen nach Extraktion mit Methanol photometrisch nach folgender Methode bestimmt [232, 233]. Zunächst wurden 0,5 g (trockene Proben) bzw. 5-20 g (feuchte Proben) Probenmaterial im 50mL-Maßkolben mit 25 mL absolutem Methanol und 0,1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und 30 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken extrahiert. Anschließend wurde auf 50 mL mit Methanol aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. Für die Bestimmung wurden 0,1 mL Probelösung im Reagenzglas mit 0,4 mL dest. Wasser, 0,25 mL Folin-Ciocalteu-Reagenz und 1,25 mL 20%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt, auf dem Vortex gemixt und die Extinktion nach 40 min bei 725 nm gegen einen Reagenzienblindwert (0,1 mL Methanol absolut) gemessen. Die Erstellung der Eichgerade erfolgte mittels Gallussäure im Konzentrationsbereich zwischen 0,04 und 0,2 mg/mL. Der Gesamtpolyphenolgehalt *PPG* wurde anhand der Eichgerade nach Gleichung (22) als Gallussäure-Äquivalente berechnet:

$$PPG = \frac{C_{G\ddot{A}} \cdot V \cdot VF}{E} * 100 \quad \text{in g/100 g TS} \quad (22)$$

## 4.2.9 Statistik

### 4.2.9.1 Durchschnittliche absolute Mittelwertabweichung

Im Rahmen der verschiedenen Versuchsserien erfolgte die Berechnung der Mittelwerte in Abhängigkeit der Analysenmethode aus Doppel- oder Mehrfachbestimmungen. Um die Streuung innerhalb einer Datengruppe zu berechnen und in den Diagrammen als Fehlerindikatoren darzustellen, wurde in allen Fällen die durchschnittliche absolute Mittelwertabweichung  $d_{\bar{x}}$  nach Gleichung (23) berechnet:

$$d_{\bar{x}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}| \quad (23)$$

$n$  – Anzahl der Einzelmesswerte

$x_i$  – Messwert der  $i$ -ten Messung

$i$  – Laufzahl von 1 bis  $n$

$\bar{x}$  – arithmetischer Mittelwert

Aufgrund des in einigen Fällen geringeren Stichprobenumfanges ( $n < 5$ ) erschien es sinnvoller,  $d_{\bar{x}}$  anstatt der allgemein üblich verwendeten Standardabweichung  $s$  zu berechnen.

### 4.2.9.2 Multifaktorielle Varianzanalyse

In ausgewählten Fällen wurden die experimentell ermittelten Versuchsdaten in multifaktoriellen Versuchsplänen zusammengefasst [234] und mit Hilfe des Softwareprogramms Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp., USA) einer Varianzanalyse (ANOVA, multifactor categorical) unterzogen. Eine Übersicht über die aufgestellten Versuchspläne mit den jeweiligen experimentellen Faktoren und den untersuchten Zielgrößen ist im Anhang (Kap. 12.6) dargestellt.

Für jeden untersuchten Einzelfaktor, sowie den Interaktionen zwischen den Einzelfaktoren wurden multiple Mittelwertsvergleiche nach der LSD-Methode (LSD – Least significant difference) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,05$  durchgeführt. In den jeweiligen Diagrammen sind die Mittelwerte für die Einzelfaktoren und Interaktionen mit 95%-Konfidenzintervallen angegeben. Überschneiden sich die Konfidenzintervalle der untersuchten Faktoren nicht, so kann angenommen werden, dass hinsichtlich der untersuchten Zielgröße (z. B. Glucosegehalt nach Enzymierung) mit 95%iger Sicherheit ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Einflussfaktoren besteht.

## 5 AKTIVITÄTEN ZELLWANDABBAUENDER ENZYME GEGENÜBER MODELL-SUBSTRATEN UND APFELTRESTERFASERN

### 5.1 Enzymaktivitäten gegenüber Modells substraten

#### 5.1.1 Enzymaktivitäten anhand der freigesetzten, reduzierenden Endgruppen

##### 5.1.1.1 Cellulolytische Aktivitäten

Zunächst wurden die Aktivitäten der vier cellulolytischen (CYT, RCL, CCL, CFD) und der fünf pektinolytischen (ADP, RPT, SPL, AFP, PEC) Enzympräparate einzeln gegenüber Cellulose-Modells substraten (mikrokristalline Cellulose MCC, Carboxymethylcellulose CMC, Cellobiose) bestimmt (Abb. 17). Jede hydrolytische Spaltung innerhalb der Polymerkette von MCC und CMC bzw. innerhalb des Dimers Cellobiose bewirkt die Freisetzung einer zusätzlichen reduzierenden Endgruppe. Je höher die Anzahl der freigesetzten, reduzierenden Endgruppen, desto höher ist die Enzymaktivität *EA*. In einigen Fällen ist die Bezugsgröße für die Berechnung der Enzymaktivität nicht das Volumen an Enzympräparat in mL sondern der Proteingehalt des Präparates in g. Die nachfolgend ermittelten Ergebnisse sind auf das Volumen in mL berechnet. Die Proteingehalte der Enzymlösungen sind im Anhang (Abb. 65) dargestellt.

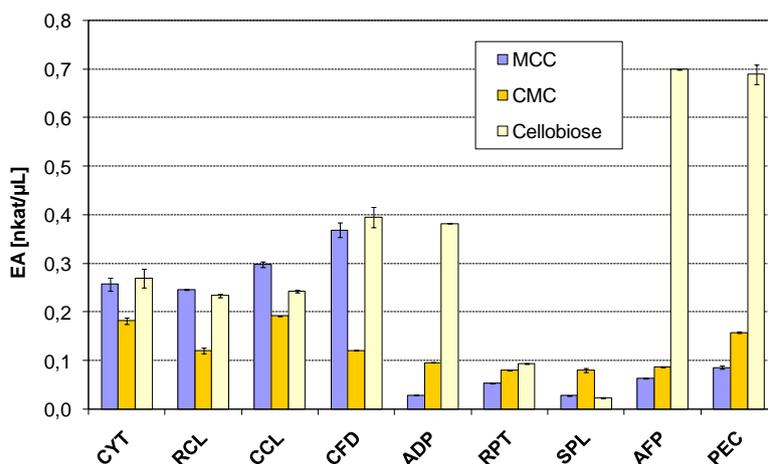


Abb. 17: Cellulolytische Aktivitäten

Erwartungsgemäß besaßen die vier Cellulasen die höchsten Aktivitäten gegenüber MCC. Unter diesen zeigte CFD die höchste Aktivität, wie auch gegenüber Cellobiose ( $\beta$ -Glucosidase-Aktivität). Auffallend hoch waren die Cellobiase-Aktivitäten von AFP und PEC. SPL zeigte gegenüber den drei Modells substraten nur geringe Aktivität. ADP wies zwar verhältnismäßig geringe Endo- und Exo-Glucanase-Aktivität auf, besaß jedoch recht hohe Aktivität gegenüber Cellobiose. RPT zeigte allgemein geringe cellulolytische Aktivitäten. Die Unterschiede in den Endoglucanase-Aktivitäten (CMC) aller Präparate waren weitaus geringer. Es ist bekannt, dass CMC auch relativ leicht durch pektinolytische Enzympräparate gespalten wird, wenn diese nur eine Nebenaktivität an Cellulasen enthalten. Auch Tableros et al. fanden für verschiedene pektinolytische Präparate annähernd hohe Aktivitäten gegenüber CMC wie für Cellulasen [235].

### 5.1.1.2 Hemicellulolytische Aktivitäten

Die hemicellulolytischen Aktivitäten der neun Präparate wurden anhand des Abbaus von Xylan und Arabinogalactan ermittelt (Abb. 18).

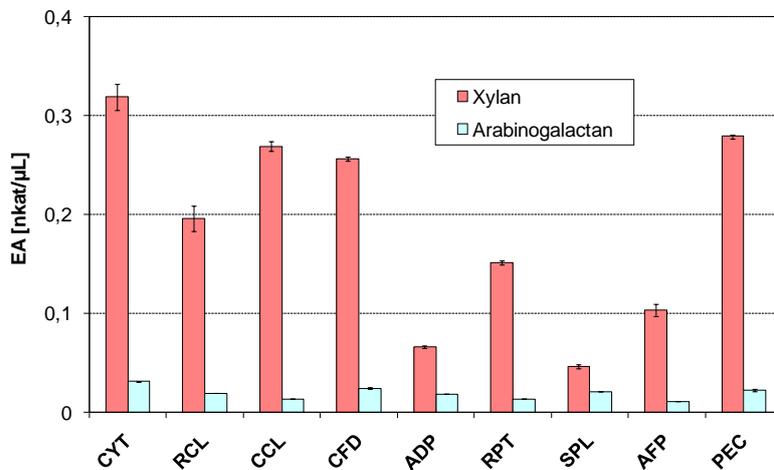


Abb. 18: Hemicellulolytische Aktivitäten

Cellulolytische Präparate aus *Trichoderma reesei* besitzen gemäß Herstellerangaben ausgewiesene Xylanase-Begleitaktivitäten. Diese Angaben konnten im Rahmen der Aktivitätsbestimmungen gegenüber Xylan eindeutig belegt werden. Insbesondere CYT zeigte unter den vier cellulolytischen Enzymen hohe Xylanase-Aktivität. Auch die pektinolytischen Enzyme besaßen zum Teil hohe hemicellulolytische Begleitaktivitäten. Erstaunlich hoch waren diese im Falle von PEC, welches bereits erhöhte cellulolytische Aktivitäten aufwies (Abb. 17). Die Aktivitäten gegenüber Arabinogalactan waren in allen Fällen gering.

### 5.1.1.3 Pektinolytische Aktivitäten

Abb. 19 zeigt die Aktivitäten der Cellulasen und Pektinasen gegenüber hochverestertem (HV-Pektin) und niedrigverestertem Pektin (Pektinsäure) (VG siehe Kap. 4.1.2.3).

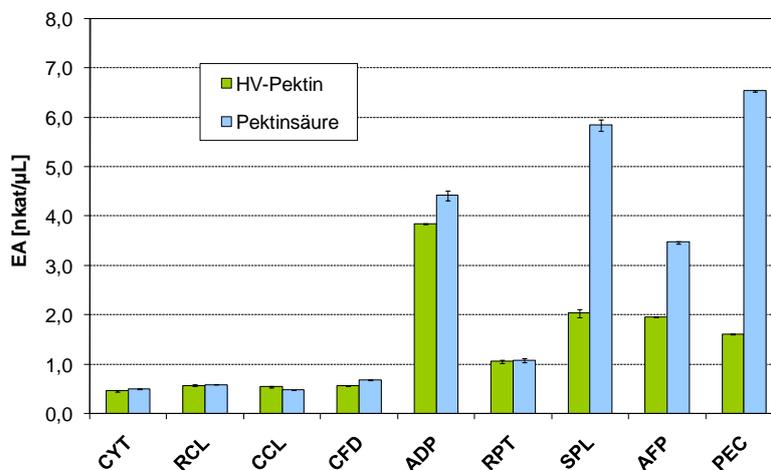


Abb. 19: Pektinolytische Aktivitäten

Wie erwartet, waren die pektinolytischen Aktivitäten der Cellulase-Präparate nur gering ausgeprägt. Bei den Pektinase-Präparaten waren deutliche Unterschiede beim Abbau von HV-Pektin und Pektinsäure zu erkennen. HV-Pektin wurde insbesondere durch ADP innerhalb der zweistündigen Inkubation bei 30 °C und pH 3,6 stärker abgebaut als durch die anderen Pektinasepräparate. Bis auf RPT zeigten alle Präparate eine höhere Aktivität gegenüber Pektinsäure als gegenüber HV-Pektin. Dieser Unterschied war besonders im Fall von PEC und SPL stark ausgeprägt.

Generell sind für den Pektinabbau, wie beschrieben, sowohl Polygalacturonasen (PG), Pektinesterasen (PE) und Pektinlyasen (PL) verantwortlich [168]. In kommerziellen, mikrobiellen Präparaten aus *Aspergillus niger*, die in der Fruchtsaftindustrie eingesetzt werden, sind neben Pektinmethylesterasen, die Endo-PG und PL die wichtigsten Enzyme [236]. Exo-PG und Pektatlyasen spielen eine eher untergeordnete Rolle. Die Pektinspaltung hochveresterter Pektine durch Pektinlyasen führt neben der Freisetzung einer reduzierenden Endgruppe zu einer Doppelbindung zwischen dem C4- und C5-Atom am nichtreduzierenden Ende des Galacturonsäuremoleküls [170]. Pektinlyase-Aktivitäten werden in der Regel anhand der Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 235 nm gemessen [237].

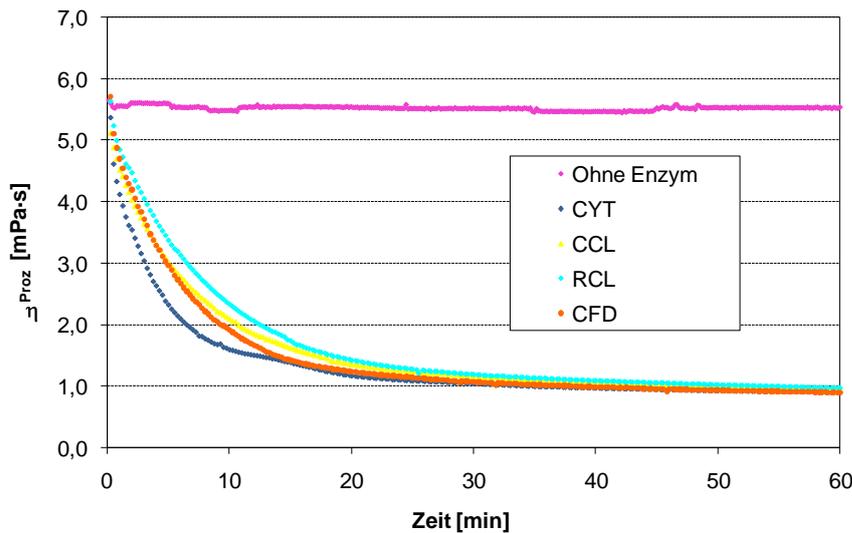
Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wurden Pektinlyase- und Pektinmethylesterase-Aktivitäten nicht bestimmt. Dennoch wird der Abbau von HV-Pektin bei diesen Versuchen zum größeren Teil auf die Wirkung von Polygalacturonasen zurückzuführen sein, da die pH-Optima mikrobieller Pektinlyasen eher im Bereich von pH 5 bis 6 liegen [170, 237]. Das bedeutet demzufolge, dass hohe Aktivitäten gegenüber HV-Pektin erst im Beisein ausreichender Mengen Pektinesterasen erzielt würden. Dies scheint für ADP der Fall zu sein. PEC und SPL scheinen hingegen ein geringes Verhältnis von PE/PG aufzuweisen, da die Aktivität gegenüber Pektinsäure deutlich erhöht ist.

### 5.1.2 Enzymaktivitäten anhand der Viskositätsabnahme

Im Gegensatz zu den Aktivitätsbestimmungen anhand der reduzierenden Endgruppen, bei denen jede Kettenspaltung zur Freisetzung einer reduzierenden Gruppe führt, werden bei der Ermittlung der Viskositätsabnahme von Modellsubstratlösungen vom Wesen des Viskositätsbegriffes her im Wesentlichen Aktivitäten erfasst, die im Inneren der Polymere wirken (Endo-Aktivitäten). Kettenspaltungen, die vorrangig vom äußeren Kettenende stattfinden (Exo-Aktivitäten) führen hingegen zu keiner messbaren oder nur zu einer minimalen Viskositätsänderung.

Zunächst wurden die cellulolytischen Aktivitäten der vier Cellulasen anhand der Viskositätsabnahme einer 1%igen CMC-Lösung über einen Zeitraum von 1 h mit Hilfe des Torsionsschwingers Rheoswing<sup>®</sup> ermittelt (Abb. 20). Der Vorteil dieser Messmethode liegt in der Möglichkeit, das Viskositätsverhalten über den Versuchszeitraum scherunabhängig aufnehmen zu können.

Im Blindversuch (CMC ohne Enzym) konnte über den Messzeitraum von 60 min keine Abnahme der Viskosität verzeichnet werden. Die Viskosität betrug ca. 5,5 mPa·s. Die vier Cellulasen senkten die Viskosität der Substratlösung annähernd gleich schnell. Geringe Unterschiede waren erkennbar, so z. B. der vergleichsweise schnellere Abbau durch CYT.

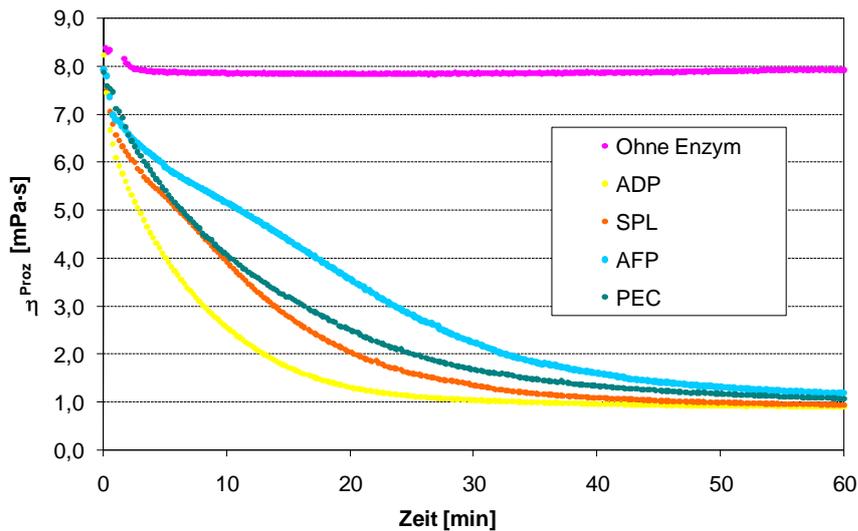


**Abb. 20: Viskositätsabnahme in CMC-Lösungen durch Cellulasen**

Die im Versuch ermittelten Kurvenverläufe konnten mit Hilfe einfacher mathematischer Modelle (Kinetik 1. Ordnung) gut korreliert werden. Auf diese Weise wurden die wichtigsten Regressionsparameter ermittelt und in Tab. 15 zusammengestellt. Die Bestimmtheitsmaße  $r^2$  lagen in fast allen Fällen über 0,99. Nach einer Stunde Enzymeinwirkung näherten sich die Viskositäten in allen Fällen einem Wert um 1,0 mPa·s an.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der über die reduzierenden Endgruppen ermittelten Aktivitäten (Abb. 17) macht deutlich, dass nach zwei Stunden Enzymeinwirkung eindeutige Unterschiede in den cellulolytischen Aktivitäten der vier Cellulasen festgestellt werden konnten, wohingegen bei den rheologischen Messungen bereits nach 1 h gleiche Viskositäten gemessen wurden. Folglich laufen noch nach 1 h Kettenspaltungen ab, die jedoch nur vom äußeren Kettenende her stattfinden. Desweiteren ist anzunehmen, dass die Polymerketten nach 60 min bereits Längen erreicht haben, deren Weiterspaltung zu keiner signifikanten Viskositätsabnahme mehr führt. Es ist jedoch anzumerken, dass mit dem Grenzwert (Gleichgewichtviskosität  $\eta_{eq}$ ) von ca. 1 mPa·s die Viskosität des Dispersionsmittels Wasser erreicht ist. Desweiteren stellt das ermittelte Viskositätslevel ein Integral dar, bei dem das „Volumen“ eines Partikels/Moleküls am Beispiel des hydrodynamischen Durchmessers bestimmt wird. Liegen in einem System größere Partikulierungen vor, tragen kleinere Partikel/Moleküle nicht zur Viskositätsentwicklung bei. Wenn auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Messkurven der vier Cellulasen nur gering sind, so lässt sich doch eine Reihenfolge bei der Abnahmege­schwindigkeit (CYT > CFD > CCL > RCL) feststellen, die sich objektiv durch die rechnerisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_0$  bestätigen lässt (Tab. 15). So lag der  $k_0$ -Wert für CYT mit  $188,9 \text{ s}^{-1}$  deutlich über dem Wert für CFD ( $155,8 \text{ s}^{-1}$ ), welcher wiederum größer war als der für CCL ermittelte Wert ( $131,4 \text{ s}^{-1}$ ). Der geringste  $k_0$ -Wert wurde mit  $121,3 \text{ s}^{-1}$  für RCL ermittelt. Die Übereinstimmung der  $k_0$ -Werte mit den Ergebnissen der reduzierenden Endgruppen (CFD > CYT > CCL > RCL) war jedoch vergleichsweise gut (Abb. 17).

Bei den Untersuchungen gegenüber HV-Pektin zeigten sich deutlichere Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen pektinolytischen Präparate (Abb. 21). Wie bei den Versuchen gegenüber CMC konnte auch bei HV-Pektin im Blindversuch (ohne Enzym) keine wesentliche Viskositätsänderung über den Messzeitraum von 60 min festgestellt werden. Die Anfangsviskositäten lagen in allen Fällen bei ca. 8,0 mPa·s.



**Abb. 21: Viskositätsabnahme in Pektin-Lösungen (HV-Pektin) durch Pektinase- und kombinierte Präparate**

Nach Enzymzugabe (0 h) wurde die Viskosität im Verlauf der Einwirkung auf ca. 1,0 mPa·s herabgesetzt. ADP senkte die Viskosität der Pektinlösung im Vergleich zu den anderen Produkten relativ schnell. In diesem Fall stimmten die Ergebnisse der rheologischen Untersuchungen auch relativ gut mit denen der reduzierenden Endgruppen überein, wo ADP die höchsten Aktivitäten zeigte (Abb. 19). Ein Vergleich der Messkurven mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k_0$  zeigte eine gute Korrelation zwischen Kurvenverlauf und  $k_0$ -Wert, woraus sich folgende Reihenfolge ADP ( $140,0 \text{ s}^{-1}$ ) > SPL ( $81,5 \text{ s}^{-1}$ )  $\approx$  PEC ( $75,5 \text{ s}^{-1}$ ) > AFP ( $42,0 \text{ s}^{-1}$ ) ableiten ließ. Für die Aktivitäten gegenüber HV-Pektin galt beim Vergleich der Ergebnisse aus beiden Methoden wie für CMC, dass offensichtlich nach 60 min noch weitere Kettenspaltungen stattfinden, die zu einer Erhöhung des Gehaltes reduzierender Zucker, jedoch nicht zur Viskositätsabnahme führen.

**Tab. 15: Parameter der Viskositätsabnahme in Pektin\*- und CMC\*\*-Lösungen, ermittelt aus den kinetischen Modellen 1. Ordnung**

	$r^2$	$\eta_{eq}$ [mPa·s]	$\eta_0$ [mPa·s]	$k$ [1/s]	$k_0$ [1/s]
ADP*	0,994	0,92 (0,11)	6,27 (0,11)	109,0 (1,0)	140,0 (12,0)
SPL*	0,996	0,84 (0,09)	6,55 (0,09)	104,2 (2,8)	81,5 (5,5)
AFP*	0,992	0,41 (0,15)	6,99 (0,02)	89,0 (2,8)	42,0 (1,0)
PEC*	0,999	1,03 (0,01)	6,52 (0,01)	90,5 (0,4)	75,5 (2,5)
CYT**	0,981	1,00 (0,03)	3,60 (0,29)	88,7 (3,0)	188,9 (3,4)
CCL**	0,995	1,03 (0,04)	3,83 (0,22)	89,7 (1,2)	131,4 (11,8)
RCL**	0,998	1,03 (0,02)	4,24 (0,07)	90,1 (0,8)	121,3 (0,7)
CFD**	0,996	0,98 (0,01)	4,24 (0,08)	84,8 (6,1)	155,8 (4,3)

(Mittelwertabweichungen in Klammern)

Die Ermittlung der Viskosität mit Hilfe des Rheoswing ist daher insbesondere hinsichtlich der Anfangskinetik enzymatischer Abbaureaktionen von Interesse und stellt eine Art Referenz- oder Pauschalmethode zur einfachen Bestimmung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme, die nach dem Endo-Mechanismus spalten, dar.

## 5.2 Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern

### 5.2.1 Zusammensetzung von Apfeltresterfasern

Nachdem die Haupt- und Nebenaktivitäten der verschiedenen Enzympräparate gegenüber ausgewählten Modellsubstraten ermittelt wurden, bestand der nächste Schritt in der Ermittlung ihrer Aktivität gegenüber komplexen Substraten. Dazu dienten getrocknete Fasern (TS > 95 %), die über mehrstufige Zerkleinerungs- und Waschschriffe aus Apfelnasstrestern hergestellt wurden (Kap. 4.1.1.2) und als eine Form von Zellwandmaterialien angesehen werden können. Zur Herstellung entpektinierter Apfeltresterfasern wurde eine zusätzliche Behandlung mit HNO<sub>3</sub> zur Pektinentfernung durchgeführt. Tab. 16 zeigt die Zusammensetzung beider Materialien.

Tab. 16: Zusammensetzung getrockneter, gereinigter Apfeltresterfasern

Zusammensetzung [g/100 g TS]	Apfeltresterfasern	Entpektinisierte Apfeltresterfasern
Rhamnose	1,6	0,8
Fucose	0,7	0,5
Arabinose	9,9	1,1
Xylose	4,4	4,3
Mannose	1,6	2,1
Galactose	7,1	4,1
Glucose	24,3	27,4
Galacturonan	22,2	8,0
Veresterungsgrad [%]	66,4	59,1
Protein	4,5	9,5
Asche	1,9	0,6

Die Apfeltresterfasern bestanden zum größten Teil aus den Neutralzuckern und dem Galacturonan als Bausteine der Apfelzellwände. Unter den Neutralzuckern war Glucose mit 24,3 g/100 g TS am meisten enthalten. Der Galacturonangehalt war mit 22,2 g/100 g TS typisch für Zellwandmaterialien, die aus den Resten der Apfelverarbeitung hergestellt wurden [238]. Die Protein- und Aschegehalte machten in der Fasertrockensubstanz einen verhältnismäßig geringen Anteil aus. Generell lagen die gefundenen Gehalte im Bereich veröffentlichter Literaturdaten für Fasern aus Apfeltrestern und entpektinisierten Apfeltrestern [81]. Die reduzierten Gehalte an Rhamnose, Arabinose und Galactose sind auf den Abbau großer Teile des Hemicellulose-Pektin-Netzwerkes in der Zellwand durch die Säureextraktion zurückzuführen. Es zeigte sich, dass durch die extremen Bedingungen bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen (85 °C) zwar Pektin entfernt wurde, jedoch mit 8,0 g/100 g TS auch ein relativ großer Teil noch im Material zurückblieb. Die Aschegehalte in den entpektinisierten Fasern waren durch die Extraktions- und Waschschriffe ebenfalls reduziert, wohingegen eine Anreicherung an Glucose und Protein zu verzeichnen war. Zum Methodenvergleich wurden die gaschromatographisch ermittelten Glucosegehalte mit den Werten verglichen, die nach zweistufiger Säurebehandlung (Saeman-Hydrolyse) der Fasern erhalten wurden [85]. Dabei zeigten sich praktisch keine Unterschiede in den gefundenen Glucose-Gehalten (Anhang, Tab. 26). Lösliche Restzucker (Glucose, Fructose und Saccharose) konnten in beiden Apfeltrestermaterialien nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

## 5.2.2 Enzymaktivitäten anhand der freigesetzten, reduzierenden Endgruppen und der Freisetzung von Glucose

Die Ermittlung der Aktivität gegenüber den Tresterfasern erfolgte zum einen anhand der reduzierenden Endgruppen nach zweistündiger Inkubation bei pH 3,6 und 30 °C und zum anderen anhand der Freisetzung von Glucose aus den Fasermaterialien. Die neun Präparate wurden zunächst einzeln gegenüber beiden Fasermaterialien getestet (Abb. 22 und Abb. 23).

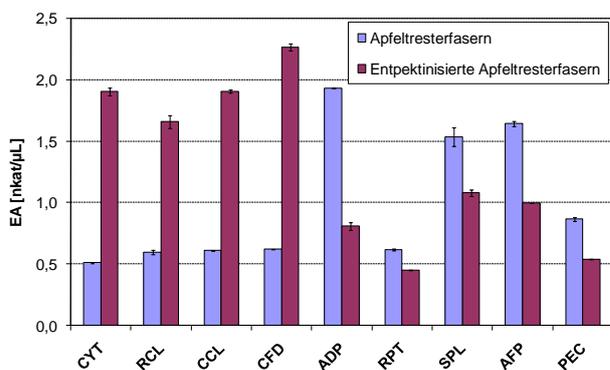


Abb. 22: Aktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern – Enzyme einzeln

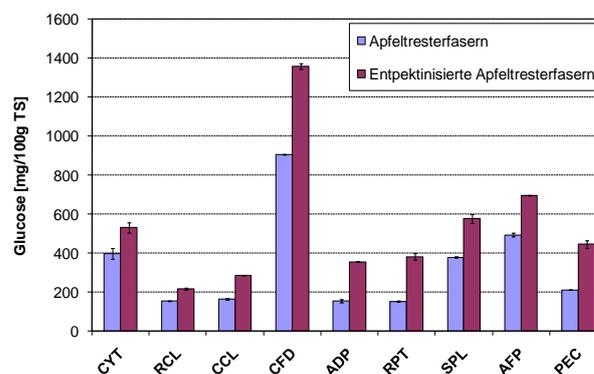


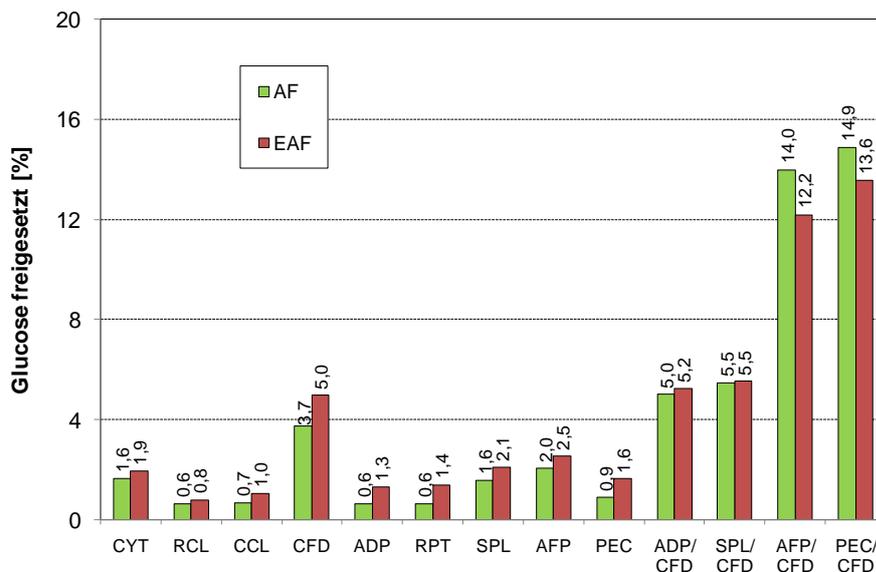
Abb. 23: Glucosefreisetzung aus Apfeltresterfasern – Enzyme einzeln

Gegenüber den Apfeltresterfasern zeigten die pektinolytischen Enzympräparate bis auf RPT eindeutig höhere Gesamtaktivitäten als die cellulolytischen Präparate. Dabei setzte ADP die meisten reduzierenden Zucker frei. Gegenüber den entpektinisierten Fasern hingegen zeigten die Cellulasen deutlich höhere Aktivitäten als die Pektinasen. Wie auch schon gegenüber den Modellsubstraten, erwies sich CFD als das cellulolytische Präparat, welches die höchsten Abbaugrade erzielte.

Die Aktivitäten der pektinolytischen Enzyme gegenüber den entpektinisierten Fasern waren in allen Fällen geringer als gegenüber den nativen Tresterfasern. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Aktivitäten der pektinolytischen Präparate zum großen Teil auf dem Abbau der Pektin- und Hemicellulosefraktionen beruhen, die durch die Säurehydrolyse entfernt wurden. Die erhöhten Cellulase-Aktivitäten deuten hingegen auf eine verbesserte Zugänglichkeit der Cellulosefasern nach dem Teilabbau des Pektin-Hemicellulose-Netzwerkes.

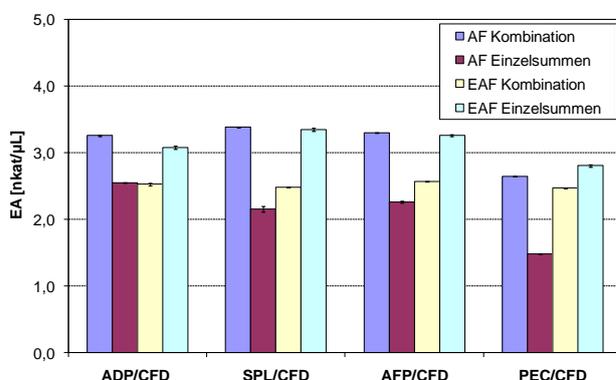
Die Ermittlung der während der zweistündigen enzymatischen Hydrolyse freigesetzten Glucose diente dem Screening solcher Präparate, die sich insbesondere dazu eignen, aus Apfeltrestern höhere Gehalte an zusätzlich vergärbaren Zucker zu liefern. Dabei zeigte sich, dass CFD unter den Cellulasen die eindeutig höchsten Glucosemengen aus beiden Fasermaterialien freisetzte (Abb. 23). Generell setzten alle Präparate unterschiedlich hohe Mengen an Glucose frei, jedoch absolut aus den entpektinisierten Fasern mehr als aus den nativen. Nach CFD war AFP als Mischpräparat aus Pektinasen und Cellulasen am besten geeignet und setzte sogar mehr Glucose als die anderen drei Cellulasen frei. Die durch die pektinolytischen Präparate erzielten Glucosegehalte deuten darauf hin, dass entsprechende hemicellulolytische Begleitaktivitäten enthalten sind, die Glucose möglicherweise auch aus den Hemicellulosen freisetzen (z. B. Xyloglucan). Sreenath et al. konnten in den Ultrafiltraten enzymbehandelter Karotten-ZM durch die Verwendung kommerzieller Pektinasepräparate ebenfalls erhöhte Glucosegehalte finden [239].

Erstaunlich niedrig waren die Gesamtaktivität und Glucosefreisetzung durch PEC, welches gegenüber den Modellsubstraten mit die besten Ergebnisse lieferte. Trotz der hohen Aktivitäten der Cellulasen gegenüber den entpektinisierten Fasern waren die freigesetzten Glucosemengen doch noch sehr gering. So lagen die Gehalte an prozentual freigesetzter Glucose (Quotient aus freigesetzter Glucose und Gesamtglucose im Material) durch Cellulasen im besten Fall bei 5,0 % (Abb. 24). Es ist zu vermuten, dass während der zweistündigen Hydrolyse die Cellulosefibrillen zwar durch die Kombination aus Endo- und Exo-Glucanasen zu Oligomeren, abgebaut, jedoch nicht in größerem Maße zu Glucose weitergespalten werden.

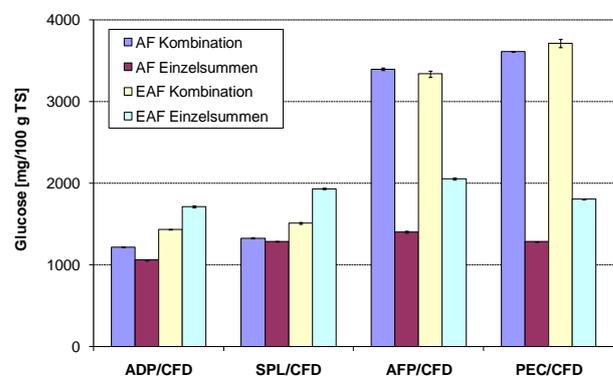


**Abb. 24: Relative Glucosefreisetzung [%] aus Apfeltresterfasern nach enzymatischer Behandlung**

In einer zweiten Versuchserie wurden die erfolgversprechendsten pektinolytischen Präparate (ADP, SPL, AFP, PEC) mit der am meisten Erfolg versprechenden Cellulase (CFD) gegenüber beiden Tresterfasern getestet, um Kombinationen mit besonders hohen synergistischen Wechselwirkungseffekten hinsichtlich des Zellwandabbaus und insbesondere hinsichtlich der Glucosefreisetzung herauszufinden. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 und Abb. 26 dargestellt.



**Abb. 25: Aktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern – Enzyme kombiniert**



**Abb. 26: Glucosefreisetzung aus Apfeltresterfasern – Enzyme kombiniert**

Dabei zeigte sich zunächst, dass alle Kombinationen von Pektinase und Cellulase deutlich höhere Aktivitäten gegenüber den nativen Apfeltresterfasern (AF) aufwiesen, als die summierten Aktivitäten der Einzelpräparate (Superposition = synergistische Wechselwirkung). Dieser Effekt konnte erstaunlicherweise gegenüber den entpektinisierten Fasern nicht nachgewiesen werden. So ergaben die Einzelsummen-Aktivitäten in allen Fällen höhere Werte als die kombinierten Aktivitäten. Für mögliche Konkurrenzreaktionen zwischen Pektinasen, Hemicellulasen und Cellulasen bei partiell abgebauten Zellwandmaterialien konnten bislang keine Literaturangaben gefunden werden.

Hinsichtlich der Glucosefreisetzung aus beiden Fasern kehrten sich die angesprochenen Effekte zumindest zum Teil wieder um. Hier waren die synergistischen Effekte zwischen Pektinase und Cellulase gegenüber den Tresterfasern im Fall von ADP und SPL deutlich geringer. Dagegen wurden durch die Kombination von CFD mit AFP und insbesondere mit PEC die freigesetzten Glucosegehalte drastisch erhöht (Abb. 26). Im Gegensatz zu den ermittelten Gesamtaktivitäten konnte dieser Effekt bei AFP/CFD und PEC/CFD auch gegenüber den entpektinisierten Fasern festgestellt werden. Durch diese Kombinationen ließen sich die prozentualen Freisetzungen an Glucose aus beiden Trestern auf 12,2 % (AFP-AF) bzw. 14,9 % (PEC-AF) erhöhen (Abb. 24).

Mit Hilfe der multifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) konnten die ermittelten Ergebnisse statistisch abgesichert werden und die Haupt- und Wechselwirkungseffekte (Anhang, Tab. 30) der drei Faktoren „Faser“, „Enzympräparat“ und „Enzymkombination“ (Anhang, Tab. 29) in Mittelwertdiagrammen graphisch dargestellt werden (Anhang, Abb. 81 bis Abb. 92). Dabei zeigten bis auf die Kombination „Faser-Aktivität“ (99 %) alle Haupt- und Wechselwirkungseffekte einen signifikanten Einfluss hinsichtlich der untersuchten Variablen „Aktivität“ und „Glucose“ von 99,9 %. Betrachtet man die Haupteffekte, so lässt sich bestätigen, dass sowohl die Aktivität als auch die Freisetzung an Glucose bei den entpektinisierten Fasern höher war als bei den nativen Fasern (Anhang, Abb. 81 und Abb. 89).

Hinsichtlich des Faktors „Enzymkombination“ wurden zwar mittels ANOVA signifikant höhere Aktivitäten und Glucosegehalte für die Enzymkombinationen gegenüber den Einzelsummen ermittelt (Anhang, Abb. 85 und Abb. 91). Die Untersuchung des Wechselwirkungseffektes „Faser-Enzymkombination“ zeigte jedoch deutlich die bereits diskutierten Unterschiede zwischen beiden Fasermaterialien (Anhang, Abb. 82 und Abb. 88). Die durchweg signifikant höheren Glucosemengen aus den entpektinisierten Fasern, die über den Mittelwertvergleich der Varianzanalyse ermittelt wurden, ergaben sich aus der deutlichen höheren Glucosefreisetzung im Falle von AFP und PEC. Die differenziertere Betrachtung der Ergebnisse (Abb. 26) zeigt jedoch, dass dieser Effekt nicht für ADP und SPL gilt und macht deutlich, dass die über die ANOVA ermittelten Ergebnisse in jedem Fall im Zusammenhang mit den Einzelergebnissen diskutiert werden müssen.

Hinsichtlich des Wechselwirkungseffektes „Faser-Enzympräparat“ zeigten sich bei den Aktivitäten signifikante Unterschiede zwischen den Enzympräparaten in Abhängigkeit der verwendeten Faser (Anhang, Abb. 84). Während ADP gegenüber AF die signifikant höchste Aktivität aufwies, war diese gegenüber EAF deutlich reduziert. Der gleiche Effekt konnte für SPL nachgewiesen werden, wobei hier die Abnahme deutlich geringer war. ADP zeichnet sich offensichtlich durch hohe pektinolytische Aktivitäten aus, die im Falle von partiell abgebauten Materialien deutlich verringert werden. Im Gegensatz dazu stiegen die Aktivitäten von AFP und PEC in Kombination mit CFD durch die Entpektinisierung deutlich an, was darauf deutet, dass diese Präparate insbesondere dazu geeignet sind, die Zugänglichkeit der Cellulosefibi-

rillen durch den Abbau der Hemicellulose-Matrix zu begünstigen, wahrscheinlich aufgrund der entsprechenden Begleitaktivitäten in den Präparaten. Dies steht in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen, die für den Wechselwirkungseffekt „Faser-Enzympräparat“ hinsichtlich der freigesetzten Glucosegehalte ermittelt wurden (Anhang, Abb. 90). So zeigten AFP und PEC sowohl für AF als auch für EAF deutlich höhere Mengen an freigesetzter Glucose als SPL und ADP. Es war jedoch auch zu erkennen, dass letztere dennoch aus EAF mehr Glucose freisetzen als aus AF, was wiederum die Vermutung zuließ, dass auch diese Präparate entsprechende Nebenaktivitäten aufweisen und damit die Untersuchungen gegenüber den Modellsubstraten bestätigen.

### 5.3 Zusammenfassende Wertung

Mit dem Ziel, geeignete Enzyme für einen möglichst vollständigen Zellwandabbau zu finden, wurden neun kommerzielle Enzympräparate verschiedener Hersteller hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten getestet. Bei den Enzymen handelte es sich um Präparate, die hauptsächlich in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie zum Einsatz kommen, darunter vier Cellulase- und vier Pektinase-Präparate und ein Mischpräparat aus Cellulasen und Pektinasen. Es zeigte sich bei den Einzelaktivitäten, dass die Pektinasepräparate neben den pektinolytischen Hauptaktivitäten, verschiedene Begleitaktivitäten aufwiesen. Insbesondere PEC wies als ausgewiesenes Pektinasepräparat (Herstellerangabe) hohe Xylanase- und Cellobiase-Aktivität auf. Neben den Cellulasen zeigten alle Pektinase-Präparate CMC-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in der Literatur gefunden werden [20, 235, 240]. Schönfeld et al. bestimmten in kommerziellen Pektinasepräparaten neben den PG-, PE- und PL-Aktivitäten Begleitaktivitäten an Exo-Cellulasen und Xylanasen [187]. Massiot et al. konnten in einem Pektinasepräparat Endo-Cellulase- und Cellobiase-Aktivitäten nachweisen [184]. Die Cellulasen zeigten erwartungsgemäß hohe Aktivitäten gegenüber mikrokristalliner Cellulose.

Im Vergleich zu den Aktivitäten, die über die Freisetzung reduzierender Endgruppen bestimmt wurden, konnte mit Hilfe des Torsionsschwingers Rheoswing<sup>®</sup>, der unter anderem zur Untersuchung von Milchgerinnungsvorgängen eingesetzt wird [241], eine rheologische Referenzmethode zur Ermittlung des zeitabhängigen und scherunabhängigen Viskositätsabbaus von Pektin- und CMC-Lösungen genutzt werden. Es zeigte sich, dass die Pektinasen und Cellulasen die Viskosität der Substratlösungen innerhalb von 60 min auf nahezu gleiche Endwerte senkten. Sowohl bei den Cellulasen als auch bei den Pektinasen waren jedoch Unterschiede in den Anfangskinetiken des Viskositätsabbaus erkennbar. Der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigte, dass Spaltungsreaktionen der Polysaccharide ab einer bestimmten Kettenlänge zu keinem weiteren messbaren Viskositätsabbau führten (Grenzwert 1 mPa·s, Viskosität des Dispersionsmittels).

Bei den Untersuchungen gegenüber komplexen Substraten (Apfeltresterfasern) zeigten sich signifikante Unterschiede in den ermittelten Gesamtaktivitäten und freigesetzten Glucosemengen in Abhängigkeit von der Faserart (nativ oder entpektinisiert), des Enzympräparates und der Enzymkombination (einzeln, in Kombination, als Einzelsummen). Die zweistufige Säurehydrolyse der Apfeltrester führte zum Abbau großer Teile des Pektin-Hemicellulose-Netzwerkes, was zu einer erhöhten Aktivität der Cellulasen und zu einer reduzierten Aktivität der Pektinasen führte. Die prozentuale Freisetzung an Glucose durch die Einzelpräparate war

jedoch gering. Durch die Kombination von Pektinase und Cellulase zeigten sich in Abhängigkeit von der Faserart synergistische Wechselwirkungseffekte [196] hinsichtlich der Aktivität und der Glucosefreisetzung, wobei letztere insbesondere bei zwei Kombinationen stark ausgeprägt war. Die geringen Freisetzungsgrade an Glucose resultieren vermutlich aus den verhältnismäßig kurzen Einwirkungszeiten der Enzyme.

Untersuchungen gegenüber Karottenfasern zeigten, dass der größte Teil der Neutralzuckerbausteine erst nach 20-stündiger Behandlungsdauer aus den Fasern entfernt werden konnte [184]. Diese Ergebnisse verdeutlichen auch die Notwendigkeit längerer Enzymeinwirkzeiten für eine möglichst vollständige Verzuckerung, was bei der Technologieentwicklung für großtechnische Versuchsanlagen (z. B. in der Brennerei) ebenfalls berücksichtigt werden muss.

## 6 ENZYMATISCH-PHYSIKALISCHER AUFSCHLUSS ZUR VERFLÜSSIGUNG UND VERZUCKERUNG VON APFELTRESTERN

### 6.1 Zusammensetzung von Apfeltrestern

Für die Untersuchungen zum enzymatisch-physikalischen Aufschluss von Apfelnasstrestern wurde die Charge aus dem Jahr 2004 verwendet, für die Vergärungsversuche (Kap. 7) die Chargen 2005 und 2006. Die Zusammensetzung aller drei verwendeten Chargen ist in Tab. 17 dargestellt. Für die Saftgewinnung, bei denen die jeweiligen Apfeltrester anfielen, wurden keine Enzyme zugesetzt. Die Ausbeute lag bei Herstellung der Charge 2006 bei 75 bis 80 % (Liter Saft je 100 kg Äpfel).

Tab. 17: Zusammensetzung von nativen Apfeltrestern (Apfelnasstrester)

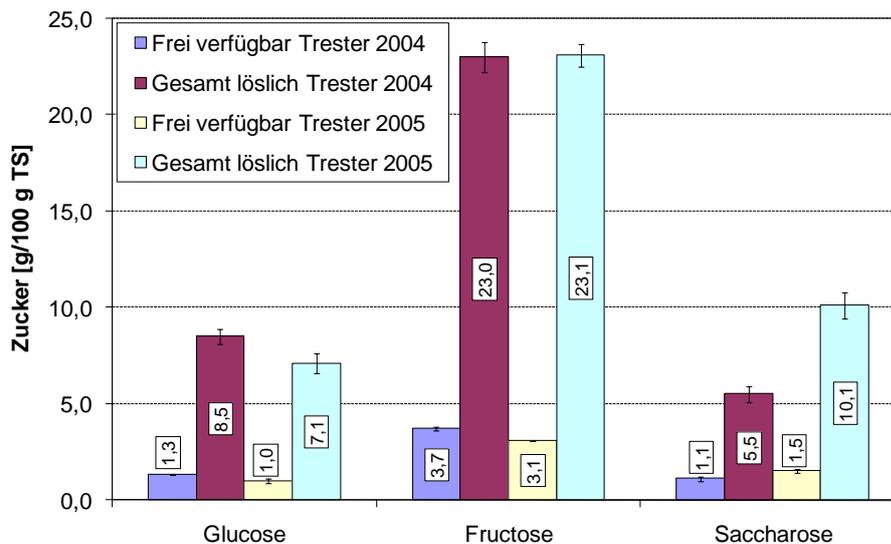
Zusammensetzung		Apfeltrester		
		2004*	2005*	2006**
TS	[g/100 g FS]	21,6	20,7	20,4
UTS	[g/100 g FS]	12,9	10,3	13,2
LTS	[g/100 g FS]	8,7	10,4	7,2
Galacturonan	[g/100 g TS]	11,6	11,1	13,8
Veresterungsgrad	[%]	62,8	63,2	67,9
Protein	[g/100 g TS]	3,5	4,0	5,2
Asche	[g/100 g TS]	1,6	1,5	1,7
Stärke	[g/100 g TS]	3,2	1,5	0,6
Rhamnose	[g/100 g TS]	0,8	0,8	0,9
Fucose	[g/100 g TS]	0,4	0,4	0,3
Arabinose	[g/100 g TS]	4,4	4,5	4,2
Xylose	[g/100 g TS]	2,1	2,2	2,4
Mannose	[g/100 g TS]	2,2	1,9	1,4
Galactose	[g/100 g TS]	3,7	3,4	3,0
Glucose unlöslich	[g/100 g TS]	14,9	13,3	15,6
Glucose löslich	[g/100 g TS]	8,5	7,1	8,0
Fructose	[g/100 g TS]	23,0	23,1	19,3
Saccharose	[g/100 g TS]	5,5	10,1	3,9

\*Kelterei Wilke, Fredersdorf (Bucher-Presse)

\*\*Süßmost- und Weinkelterei Schulz, Diesdorf (Zweibandpresse)

Die Apfelnasstrester hatten Trockensubstanzen zwischen 20 und 22 %, wobei die unlösliche Trockensubstanz geringfügig größer als die lösliche Trockensubstanz war. Der Pektingehalt (Galacturonan) lag mit 11,1 bis 13,8 % im Bereich der Literaturwerte [2]. Von großem Inter-

esse für die Bewertung des Erfolges der mechanischen und enzymatischen Verflüssigung bzw. Verzuckerung sind die Gehalte an freigesetzten vergärbaren Zuckern während des Hydrolyseprozesses. Die wichtigsten vergärbaren Zucker im Apfeltrester sind Glucose, Fructose und Saccharose. Die beiden letzteren bleiben ausschließlich als lösliche Restzucker des nicht abgepressten Restsaftes im Trester zurück. Glucose kommt im Trester zum Teil ebenfalls als löslicher Restzucker (7,1 - 8,5 g/100 g TS) vor. Der größere Teil liegt mit 13,3 bis 15,6 g/100 g TS hingegen in gebundener Form in den Zellwandpolysacchariden (insbesondere Cellulose) vor. Zu einem nicht vernachlässigbaren Anteil (0,6 – 3,2 %) beinhaltet diese Fraktion unter anderem auch Stärke (Tab. 17). Im Allgemeinen lagen die ermittelten Werte für alle drei Chargen im Bereich der Literaturwerte [2]. Binnig gibt für Cellulose einen Gehalt von 12 - 16 %, für Hemicellulosen 4 - 5 % und für Pektin Gehalte von 10 - 13 % an [37]. Villas-Boas et al. fanden in Apfeltrestern lediglich 5,5 % Pektin und 7,2 % Cellulose [6]. Joshi et al. ermittelten in nativen Apfeltrestern Gesamtzuckergehalte von 50 g/100 g TS und eine lösliche Trockensubstanz von 59,4 g/100 g TS [4]. Die Gehalte an Protein und Asche machen an der Trestertrockensubstanz mit 3,5 - 5,2 bzw. 1,5 - 1,7 einen geringen Anteil aus und liegen ebenfalls im Bereich der in der Literatur gefundenen Werte [4, 6, 41]. Das Galacturonan (Pektin) der Apfeltrester lag erwartungsgemäß zum überwiegenden Teil (63 - 68 %) mit Methanol verestert vor. Es ist durchaus möglich, dass die gefundenen Werte gegenüber den frischen Äpfeln (Werte nicht ermittelt) aufgrund der Wirkung nativer Pektinesterasen bereits reduziert wurden.



**Abb. 27: Frei verfügbare Zucker in Apfeltrestern der Chargen 2004 und 2005**

Da der Erfolg der Freisetzung vergärbaren Zucker aus den Apfelsastrestern durch mechanische und enzymatische Verfahrensschritte nicht allein auf dem Abbau glucosehaltiger Zellwandpolymere (insbesondere Cellulose) beruht, sondern darüberhinaus auf der Freisetzung der löslichen Restzucker, hat der Einsatz von Pektinase-Präparaten mit hohen Hemicellulose-Begleitaktivitäten zwei wichtige Effekte. Zum einen wird die Zugänglichkeit der Cellulosefasern für die cellulolytischen Enzyme durch den Abbau der Pektin-Hemicellulose-Matrix wesentlich verbessert. Zum anderen kann durch die enzymatische Zellwandverflüssigung eine verbesserte Restsaftextraktion erfolgen. Kommerzielle Enzympräparate, die zur Tresterverflüssigung

eingesetzt werden können, enthalten dazu die entsprechenden Haupt- und Nebenaktivitäten [22, 23, 26].

Um festzustellen, wie hoch der Anteil an löslichen Zuckern war, die auch ohne mechanische und enzymatische Behandlungsschritte als sogenannte freie Zucker zur Verfügung standen, wurden die Apfeltrester mit Wasser mehrmals über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur extrahiert und anschließend der Gehalt an extrahierten Zuckern ermittelt (Abb. 27). Dabei zeigte sich, dass aus beiden Tresterchargen nur etwa 14 bis 20 % der Gesamtgehalte an Glucose, Fructose bzw. Saccharose ausgewaschen werden konnten. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit des Einsatzes von leistungsfähigen tresterverflüssigenden Enzymen und deren Kombinationen um synergistische Wechselwirkungseffekte insbesondere hinsichtlich der Freisetzung vergärbare Zucker (löslich und unlöslich) maximal nutzen zu können.

## 6.2 Enzymatische Verflüssigung und Verzuckerung nach mechanischem Standardaufschluss

### 6.2.1 Ermittlung der optimalen Enzymvariante

In einer weiteren Versuchsserie zur Charakterisierung der Aktivität zellwandabbauender Enzyme wurden die vier Pektinase-Präparate einzeln, in Kombination mit der Cellulase CFD (Kombination I) und in Kombination mit CFD und einem kommerziellen  $\beta$ -Glucosidase-Präparat (Kombination II) gegenüber Apfelnasrestrestern getestet. Die Trester wurden zunächst im Verhältnis von 1:4 mit Wasser verdünnt und anschließend per mechanischem Standardaufschluss (Labormixer + Ultraturrax) zerkleinert. Die Enzymierung erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. In Abb. 28 sind die Gehalte an freigesetzten reduzierenden Zuckern in Abhängigkeit der Einwirkdauer der eingesetzten Pektinase in der Mischung und der Art der Enzymkombination dargestellt.

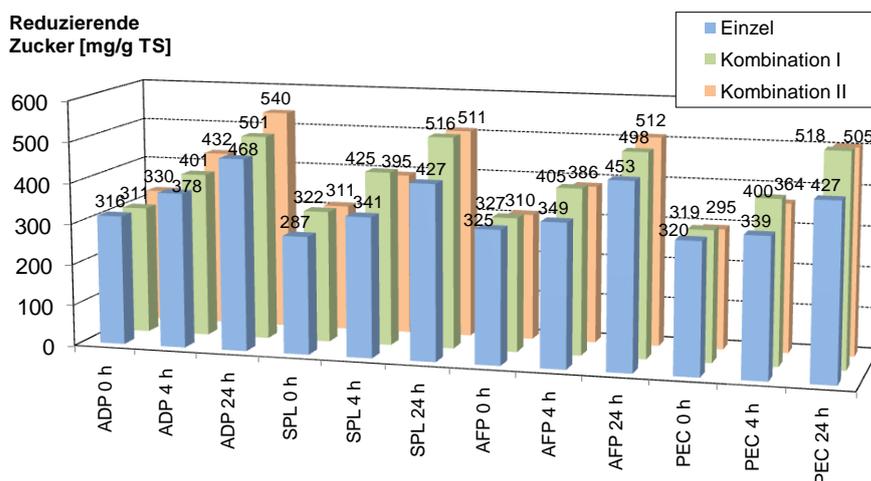


Abb. 28: Freisetzung reduzierender Zucker nach 0, 4 und 24 h

Zur Bestimmung signifikanter Einflussfaktoren und deren Wechselwirkungseffekten wurden die ermittelten Daten für reduzierende Zucker und Glucose zusätzlich einer multifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen (Anhang, Kap. 12.6.2.1, Abb. 93 bis Abb. 104).

Nach dem mechanischen Voraufschluss waren durchschnittlich etwa 315 mg reduzierende Zucker je g TS freigesetzt (Abb. 28). In allen Fällen stiegen während der Enzymierung die Zuckergehalte nach 4 und 24 h signifikant an. Bis auf ADP zeigte sich bei allen Enzympräparaten nach 4 h eine geringere Zuckerfreisetzung durch die Kombination II als durch die Kombination I. Der gleiche Effekt war nach 24 h noch bei SPL und PEC zu erkennen. Bei ADP war in Kombination mit Cellulase und Cellobiase die freigesetzte Menge an reduzierenden Zuckern nach 24 h signifikant höher als durch alleinige Kombination mit der Cellulase und zeigte unter allen Präparate und deren Kombinationen die höchste Gesamtaktivität. Generell konnte jedoch keine signifikante Erhöhung des Gehaltes an reduzierenden Zuckern nach 24-stündiger Behandlungsdauer durch Kombination II im Vergleich zu Kombination I erzielt werden, wie der Mittelwertvergleich der statistischen Auswertung in Abb. 98 (Anhang) zeigt.

Da durch die Enzymeinwirkung aus der Zellwand sowohl Polysaccharide als auch Oligo- und Monosaccharide freigesetzt werden [28], die in ihrer Summe den Gehalt an reduzierenden Zuckern maßgeblich beeinflussen, erweisen sich differenziertere Aussagen zum Zellwandabbau mittels dieser Ergebnisse als nicht möglich.

Bessere Hinweise ergaben sich aus der Betrachtung der freigesetzten monomeren Zuckerbausteine, wie der Glucose (Abb. 29). Die Gehalte an Glucose lagen nach mechanischem Voraufschluss im Mittel bei etwa 90 mg/g TS. Damit war bereits der größte Teil an löslicher Glucose freigesetzt. Die Mengen an Glucose nahmen im Verlauf der Enzymierung nach 4 h und 24 h deutlich zu.

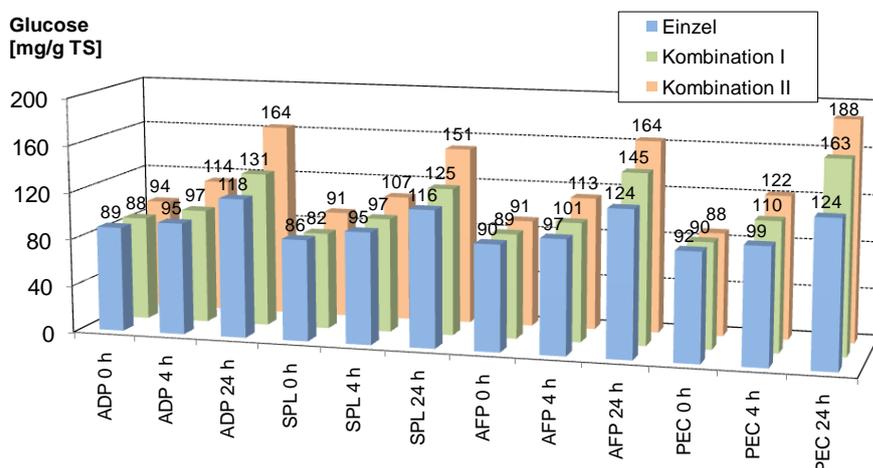


Abb. 29: Freisetzung von Glucose nach 0, 4 und 24 h

Unabhängig von der verwendeten Pektinase wurden nach 4 h und 24 h signifikant höhere Mengen an Glucose durch Kombination II als durch Kombination I freigesetzt (Anhang, Abb. 104). Offensichtlich begünstigt der Einsatz der Cellobiase den Cellulose-Abbau durch die synergistische Wechselwirkung von Endo- und Exo-Glucanasen zusätzlich. Insbesondere

wurde die Freisetzung von Glucose durch die Kombination aus PEC und CFD begünstigt, die sich wie auch schon gegenüber den Apfeltresterfasern als die beste Enzymvariante herausstellte.

Im Vergleich zu allen anderen Varianten ließen sich durch die Zugabe von Cellobiase bei dieser Variante mit 188 mg/g TS die höchsten Mengen an Glucose aus den Apfeltrestern freisetzen. Im Gegensatz zu PEC, was hinsichtlich der Glucosefreisetzung bereits durch die Kombination mit CFD alleine stark begünstigt wurde, war der Effekt bei ADP und SPL minimal. Die Glucosefreisetzung wurde bei letzterer erst durch den Zusatz von Cellobiase begünstigt, was vermuten lässt, dass durch die Kombination I zwar Cellobiose in größeren Mengen gebildet wurde, diese jedoch aufgrund der fehlenden  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität nicht weiter zu Glucose abgebaut werden konnte.

Diese Vermutung ließ sich durch die mittels HPLC bestimmten Cellobiosegehalte in den enzymierten Proben bestätigen (Abb. 30). So war zunächst deutlich zu erkennen, dass in allen Fällen durch die Pektinase-Präparate alleine keine Cellobiose freigesetzt wurde. Durch die Kombination mit der Cellulase (Kombination I) häuften sich hingegen bei ADP und SPL über den Zeitraum der Enzymeinwirkung größere Mengen an Cellobiose an, wohingegen sich bei AFP und PEC lediglich nach 4 h geringe Mengen an Cellobiose nachweisen ließen, die jedoch nach 24 h vermutlich durch die in den jeweiligen Präparaten enthaltenen Cellobiase-Aktivitäten zu Glucose abgebaut wurden. Dies steht auch in guter Übereinstimmung zu den ermittelten Aktivitäten gegenüber dem Modellsubstrat Cellobiose (Abb. 17). Erst durch die Zugabe von Cellobiase wurde Cellobiose in allen Fällen, so auch bei ADP und SPL, in entsprechendem Maße zu Glucose weiter abgebaut. Hang et al. konnten beim enzymatischen Aufschluss von Maishülsen feststellen, dass während der Einwirkung eines Enzymmischpräparates aus *A. niger* und *T. reesei*, welches offenbar nicht ausreichende Cellobiaseaktivität aufwies, neben verschiedenen monomeren Neutralzuckern erhebliche Mengen an Cellobiose akkumuliert wurden [205]. Bonnin et al. 2000 stellten fest, dass die gebildeten Cellobiosenmengen während der enzymatischen Hydrolyse cellulosereicher Materialien aus Zuckerrübenschnitzeln mit einer kommerziellen Cellulase nach zwei bis vier Stunden ihr Maximum erreichten [242].

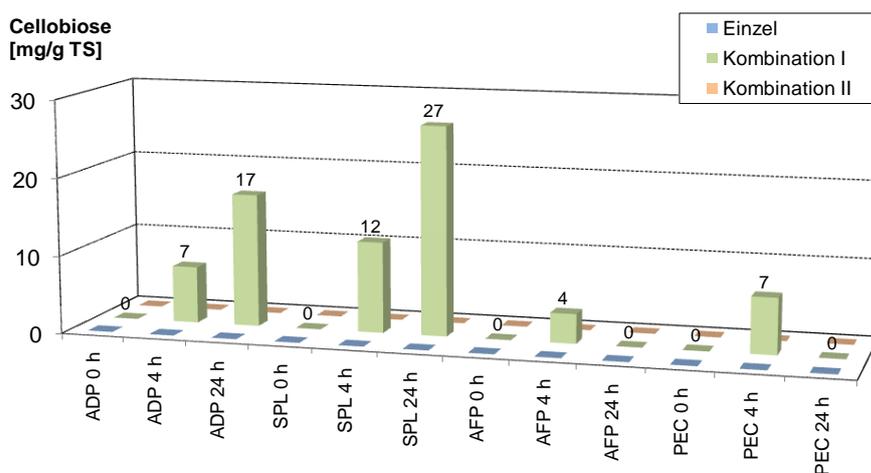
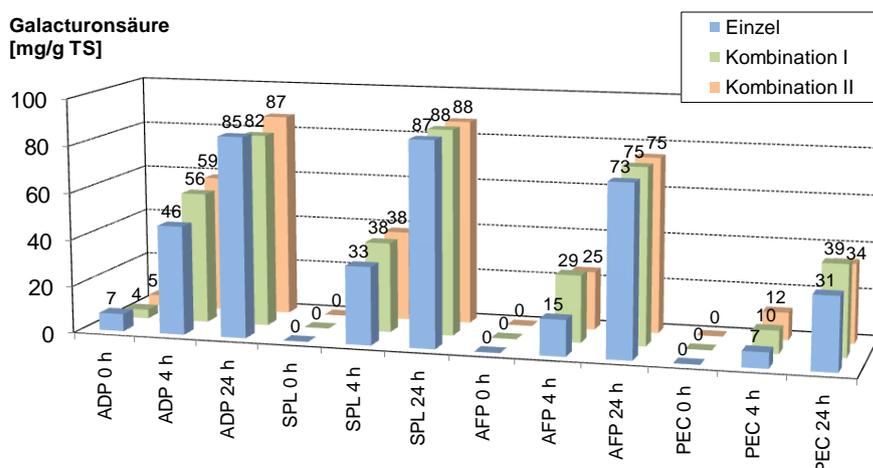


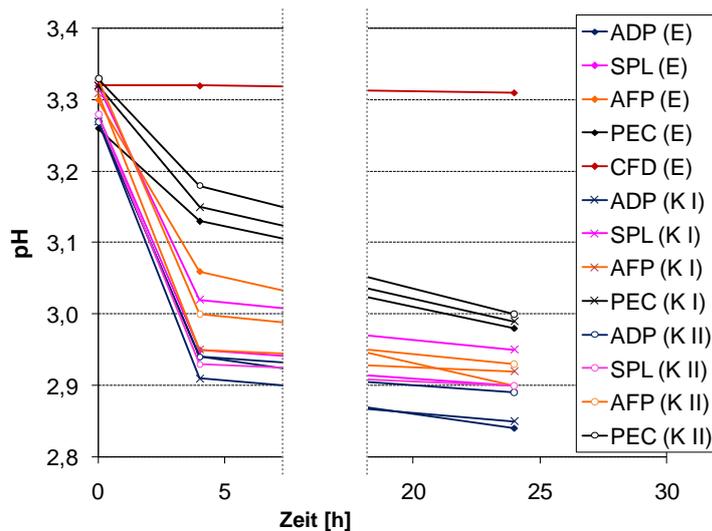
Abb. 30: Freisetzung von Cellobiose nach 0, 4 und 24 h

Die mittels HPLC ermittelten Gehalte an Galacturonsäure, die während der Enzymierung aus den Apfelzellwänden freigesetzt wurden, sind in Abb. 31 dargestellt.



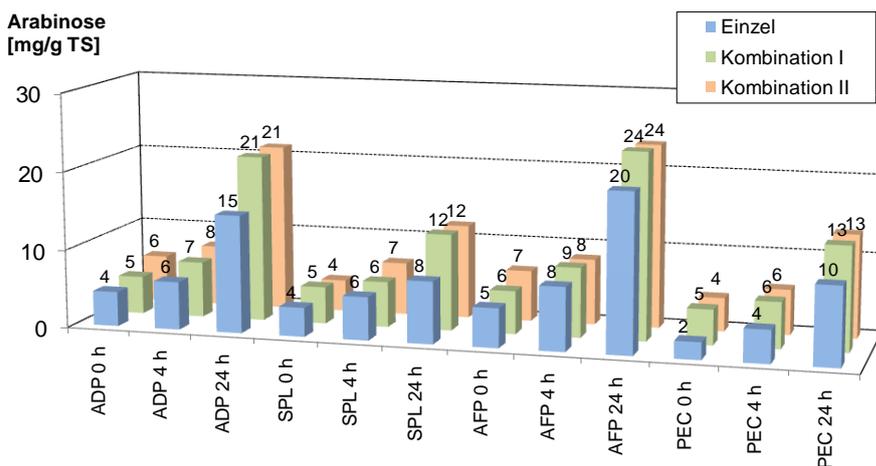
**Abb. 31: Freisetzung von Galacturonsäure nach 0, 4 und 24 h**

Auch hier ließen sich eindeutige Parallelen zu den Untersuchungen gegenüber den Modellsubstraten ziehen. So konnten insbesondere durch ADP und SPL aber auch durch AFP größere Mengen an Galacturonsäure freigesetzt werden. Durch die Einwirkung von PEC hingegen wurden nur geringe Gehalte freier Galacturonsäure gefunden. Dabei ist offensichtlich, dass mit Ausnahme von PEC in allen Fällen bereits durch die alleinige Einwirkung des Pektinase-Präparates nach 24 h genauso viel Galacturonsäure freigesetzt wurde, wie durch die Kombination mit Cellulase oder Cellulase und Cellobiase. Der Abbau scheint lediglich etwas verzögert abzulaufen, wie der Vergleich der Werte nach 4 h für die Einzelpräparate und die Kombination mit der Cellulase zeigt. Die höchsten Werte für freie Galacturonsäure wurden mit 88 mg/g TS nach 24 h bei SPL und Kombination I bzw. II gefunden. Das entsprach in etwa 76 % der gesamt enthaltenen Galacturonsäure (116 mg/g TS) im Trester (Tab. 17). Im Fall von PEC lag der Freisetzungsgrad von Galacturonsäure mit ca. 29 % deutlich niedriger. Die Freisetzung von Galacturonsäure aus der Zellwand führte außerdem zur deutlichen Absenkung des pH-Wertes im Apfeltrester während der Enzymeinwirkung (Abb. 32). So wurde bei allen Enzymkombinationen eine pH-Reduzierung um mindestens 0,3 Einheiten erreicht. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Enzympräparaten korrelierten in bestimmten Fällen mit den Gehalten an freier Galacturonsäure. So war doch zumindest im Falle von PEC zu erkennen, dass die pH-Absenkung im Gegensatz zu den anderen Enzymen geringfügig schwächer war. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Bauckhage et al., die in den Extraktionssäften aus enzymatisch aufgeschlossenen Apfeltrestern deutlich höhere Mengen an Galacturonsäure als in den entsprechenden Premium-Säften fanden [26]. Zudem trugen die freigesetzten Galacturonsäuren im Wesentlichen zur Erhöhung der Gesamtsäuregehalte der entsprechenden Säfte bei.



**Abb. 32: pH-Wert-Verlauf während des enzymatischen Abbaus von Apfeltrester**

Bei der Ermittlung der freigesetzten Arabinosegehalte aus den Apfeltrestern fiel auf, dass bereits zu Beginn, nach mechanischem Voraufschluss, geringe Gehalte an löslicher Arabinose vorhanden waren (Abb. 33). Während der Enzymierung nahmen die Arabinosegehalte in den Extrakten insbesondere nach 24 h deutlich zu. Durch die Kombination I konnte bei allen Enzympräparaten eine geringe Zunahme im Gegensatz zu den Einzelenzymen festgestellt werden. Die Zugabe von Cellobiase zur Kombination I führte zu keiner weiteren Freisetzung an Arabinose. Die höchsten Arabinosegehalte wurden mit 21 und 24 mg/g TS nach 24 h für ADP bzw. AFP in Kombination I bzw. II ermittelt. Dies entspricht in etwa 55 % des Gesamtgehaltes an Arabinose (44 mg/g TS) im Trester. Mehrländer et al. 2002 fanden in den Kolloiden von Extraktionssäften aus Apfeltrester ebenfalls erhöhte Arabinosegehalte im Vergleich zu den entsprechenden Premiumsäften [198].

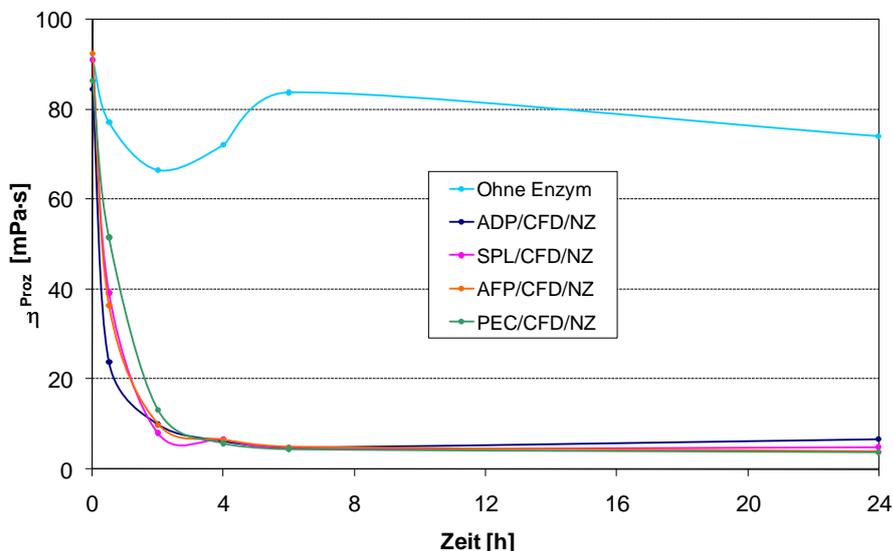


**Abb. 33: Freisetzung von Arabinose nach 0, 4 und 24 h**

Weitere Aussagen über den Zellwandabbau anhand der Detektion zusätzlicher Neutralzuckerbausteine war im Rahmen dieser Versuchsserie nicht möglich, da die Peaks der entspre-

chenden Zucker (Rhamnose, Galactose, Mannose, Xylose) bei der HPLC durch den vergleichsweise großen Fructosepeak überlagert wurden (Anhang, Abb. 67 und Abb. 68). Abb. 69 zeigt die summarischen Mengen an freigesetzter Fructose und Neutralzuckern und macht deutlich, dass differenzierte Aussagen über die Wirkung der Enzyme und deren Kombinationen auf diese Weise nicht möglich waren.

Neben der Untersuchung der Freisetzung von reduzierenden Zuckern und verschiedenen monomeren Zuckern und den rheologischen Versuchen zum Viskositätsabbau von Modellsubstratlösungen sollten die eingesetzten Enzyme hinsichtlich ihrer Verflüssigungsleistung anhand des Viskositätsabbaus von Apfelsastrestern näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Trester analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit Wasser verdünnt (1:4), mechanisch vorzerkleinert (Standardaufschluss) und anschließend 24 h bei 30 °C mit den Enzymmischungen nach „Kombination II“ (Pektinase/Cellulase/Cellobiase) behandelt. Abb. 34 zeigt die für die vier untersuchten Varianten ermittelten Kurvenverläufe zum Viskositätsabbau im Vergleich zur Blindprobe (ohne Enzym).



**Abb. 34: Viskositätsverlauf während des enzymatischen Abbaus von Apfelsastrestern (Enzymkombination II)**

Die Anfangsviskosität der Trester lag in allen Fällen bei etwa 90 mPa·s. Innerhalb der ersten 30 min sank die Tresterviskosität in Abhängigkeit der Enzymvariante bereits drastisch ab. So betrug die Viskosität im Fall von ADP nur noch 25 mPa·s und war damit nach 30 min bereits um 72 % (bezogen auf die Anfangsviskosität) gesunken, wohingegen AFP und SPL zu einer Viskositätsabnahme um 56 % ( $\approx 40$  mPa·s) führten und PEC die Viskosität lediglich um 44 % senkte. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen gegenüber den Modellsubstraten, wobei gegenüber dem HV-Pektin eine ähnliche Aktivitätstendenz hinsichtlich der Anfangskinetik in der Reihenfolge ADP > SPL  $\approx$  AFP > PEC ermittelt werden konnte (Abb. 21, Tab. 15).

Nach 2 h Enzymeinwirkung waren die Unterschiede zwischen den Varianten nur noch minimal und nach 4 h war die Tresterviskosität bereits auf unter 7 mPa·s abgesunken und keine Unterschiede mehr zwischen den Varianten erkennbar. Singh et al. 1999 konnten anhand rheo-

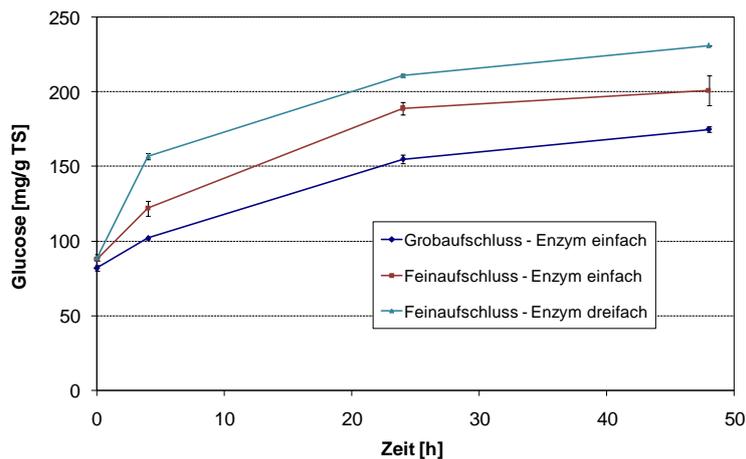
logischer Untersuchungen von Mangopulpe nachweisen, dass die scheinbare Viskosität durch die enzymatische Verflüssigung mit Hilfe eines Enzym-Cocktails aus Pektinasen und Cellulasen im Vergleich zu unbehandelter Pulpe bereits nach 30 min um bis zu 78 % absank, wohingegen innerhalb weiterer 90 min keine wesentlichen Veränderungen mehr beobachtet werden konnten [243]. Zu gleichen Ergebnissen kamen Sreenath et al. 1987 und 1995 bei der Untersuchung zur Verflüssigung von Mangopulpe mit pektinolytischen sowie cellulolytischen Enzymen und deren Kombinationen [244, 245]. Bei der Verflüssigung von Karottentrestern konnten Stoll et al. hingegen eine vergleichbar starke Viskositätsabnahme erst bei sehr hohen Enzymkonzentrationen erreichen [193].

Bei der Tresterblindprobe ohne Enzymzusatz wurde die Viskosität im Vergleich zu den Enzymvarianten über den Zeitraum der Inkubation um lediglich 17 % gesenkt. Innerhalb der ersten 2 h nimmt die Viskosität, wahrscheinlich aufgrund der Wirkung nativer Pektinasen, etwas stärker ab, steigt anschließend jedoch wieder an. Möglicherweise spielen hierbei Quellvorgänge durch die Zugabe des Wassers zum Verdünnen der Trester eine Rolle. Wie auch schon bei den Untersuchungen mit den Modellsubstraten dargestellt, eignet sich der Rheoswing<sup>®</sup>-Torsionschwinger insbesondere dazu, die Wirkung von Enzymen zu untersuchen, die vorwiegend im Inneren der Polysaccharidketten spalten. Durch den Abbau der Polysaccharide zu Oligosacchariden kommt es vergleichsweise schnell zur Viskositätsabnahme [189, 191, 246]. Daher eignen sich die zeitabhängigen Untersuchungen hauptsächlich zur Ermittlung der Anfangskinetik enzymatischer Reaktionen. Der Vergleich mit den Untersuchungen zur Freisetzung der monomeren Zuckerbausteine macht jedoch deutlich, dass mit Hilfe der rheologischen Messmethode nur Teilaussagen zum Zellwandabbau getroffen und keine näheren Rückschlüsse auf den Abbau von Oligo- zu Monosacchariden gezogen werden können. Grundsätzlich spielen rheologische Methoden jedoch eine wesentliche Rolle bei der Charakterisierung des Fließverhaltens von flüssigen oder pastösen Frucht- und Gemüseprodukten in Abhängigkeit innerer (Gehalt löslicher/unlöslicher Feststoffe, Partikelgröße, native Enzyme, pH-Wert) und äußerer Faktoren (z. B. Temperatur) [247-249]. Die physikalischen Wechselwirkungen zwischen den Polysacchariden (Verhakungen, Verfilzungen) sind hinsichtlich der Viskosität von Partikelsuspensionen ebenfalls von maßgeblicher Bedeutung [250].

### **6.2.2 Einfluss der mechanischen Vorzerkleinerung und der Enzymkonzentration auf die Zuckerfreisetzung**

Ein wesentlicher Faktor bei der Erarbeitung des Laborverfahrens zur Verflüssigung und Verzuckerung von Apfeltrestern war das Erreichen einer möglichst hohen Menge an vergärbaren Zucker. Darüberhinaus sollte überprüft werden, inwiefern der mechanische Feinaufschluss mit Hilfe des Ultraturrax die Glucosefreisetzung zusätzlich zum Grobaufschluss mittels Waring Blender begünstigt. Darüber hinaus wurde die Inkubationsdauer auf 48 h verlängert und die Enzymdosage (PEC/CFD/NZ) auf die dreifache Menge erhöht.

Es zeigte sich zunächst, dass die Freisetzung von Glucose durch den Feinaufschluss bei einfacher Enzymkonzentration deutlich begünstigt wurde (Abb. 35). Gegenüber dem Grobaufschluss waren die Anfangsglucosegehalte (0 h) leicht erhöht, was auf die bessere Freisetzung an löslichen Zuckern durch die intensivere mechanische Vorbehandlung der Trester zurückzuführen war.



**Abb. 35:** Freisetzung von Glucose nach Grob- und Feinaufschluss von Apfeltrester in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (PEC/CFD/NZ)

**Tab. 18:** Prozentuale Glucosezunahme während der Enzymierung nach Grob- und Feinaufschluss

Glucosezunahme [%]	
	113
	138
	160

Der Unterschied in den Anfangszuckergehalten wurde beim Betrachten der ermittelten Werte für gesamt reduzierende Zucker noch deutlicher (Anhang, Abb. 71). Der zusätzliche Aufschluss mit Hilfe des Ultraturrax führte vermutlich zu einer weiteren Reduzierung der Partikelgrößen und eventuell auch zur Umwandlung von unlöslichem Pektin in lösliches Pektin, so dass einerseits die verfügbare Oberfläche für den Enzymangriff vergrößert sowie eine bessere Zugänglichkeit der Cellulosematrix erreicht wurde [251, 252]. Begünstigt wurde die stufenweise Zerkleinerung durch den Ultraturrax darüberhinaus durch die Abnahme der Prozessviskosität während der Enzymierung (Abb. 34). Desweiteren zeigte sich, dass nach 48 h weitere Glucosemengen freigesetzt wurden, die Zunahme jedoch geringer war als innerhalb der ersten 24 h. Die gegenüber dem Grobaufschluss erzielte Ausbeuteerhöhung an Glucose macht jedoch die Nützlichkeit und Notwendigkeit effektiver Zerkleinerungsverfahren für die vollständige Verflüssigung und Verzuckerung pflanzlicher Zellgewebe deutlich. Anzustreben wären diesbezüglich Partikelgrößenspektren im Bereich von 0 – 200 µm. Eine weitere Erhöhung der Glucosegehalte konnte darüberhinaus durch Erhöhung der Enzymkonzentration erreicht werden (Abb. 35). Tab. 18 verdeutlicht die Effektivität der zusätzlichen mechanischen Behandlung und der höheren Enzymkonzentration anhand der prozentualen Glucosezunahme während der 48-stündigen Enzymierung.

**Tab. 19:** Freisetzung von „Glucose gesamt“ und „Glucose unlöslich“ aus Apfeltrester

Enzymkombination II (Zeit)	Enzymkonzentration	Glucose zu Beginn [g/100 g TS]	Glucose am Ende [g/100 g TS]	$FRS_{GlcG}$ (gesamt) [%]	$FRS_{GlcU}$ (unlöslich) [%]
ADP (24 h)	einfach	9,4	16,4	58	34
SPL (24 h)	einfach	9,1	15,1	52	25
AFP (24 h)	einfach	9,1	16,4	58	34
PEC (24 h)	einfach	8,8	18,7	69	51
PEC (48 h)	einfach	8,8	20,1	74	60
PEC (48 h)	dreifach	8,9	23,1	87	79

In Tab. 19 sind die Werte der prozentualen Glucosefreisetzung bezogen auf die gesamt verfügbare Glucose und die Glucose aus den unlöslichen Polysacchariden für sechs verschiedene Versuchsvarianten angegeben. Unter den vier verschiedenen Pektinase-Enzymen in Kombination mit Cellulase und Cellobiase konnten nach 24 h mit PEC die höchsten Freisetzungsgrade an Gesamtglucose (74 %) und Glucose aus den unlöslichen Bestandteilen (51 %) erzielt werden. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit und durch Erhöhung der Enzymkonzentration konnten die Freisetzungsgrade nochmals auf 87 % bzw. 79 % erhöht werden. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde die Enzymkombination PEC/CFD/NZ als Vorzugsvariante für die weiteren Versuche verwendet.

### 6.3 Einfluss zusätzlicher physikalischer Aufschlussvarianten auf die Verflüssigung und Verzuckerung

#### 6.3.1 Partikelgröße und Partikelstruktur physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester

##### 6.3.1.1 Partikelgrößenverteilungen physikalisch aufgeschlossener Apfeltrester

Im Rahmen der Entwicklung des Laborverfahrens zur enzymatischen Verflüssigung und Verzuckerung von Apfelsastrestern sollte der Einfluss zusätzlicher physikalischer Voraufschlussvarianten auf die Zuckerfreisetzung untersucht werden. Zum Einsatz kamen dabei solche Verfahren, die sich einerseits hinsichtlich ihres Grundwirkungsprinzips (thermisch, nicht-thermisch) unterschieden und andererseits grundlegende Prozessschritte (Erhitzung, Zerkleinerung) bei der Verarbeitung von Früchten und Gemüse darstellten bzw. simulierten. Zusätzlich bzw. nachfolgend zum bislang angewendeten Vorzerkleinerungsschritt mittels Waring Blender (Hauptwirkprinzip „Schlag“, siehe Kap. 4.2.2.1) und Ultraturrax (Standard-Aufschluss) wurden die Apfeltrester drei verschiedenen Aufschlussvarianten unterzogen. Dies waren eine Ultraschallbehandlung, die Behandlung im Autoklaven und die Behandlung im Hochdruckhomogenisator über 12 Durchläufe (Kap. 4.2.2). In Abb. 36 sind die relativen Massenhäufigkeiten der sechs ermittelten Partikelgrößenklassen dargestellt.

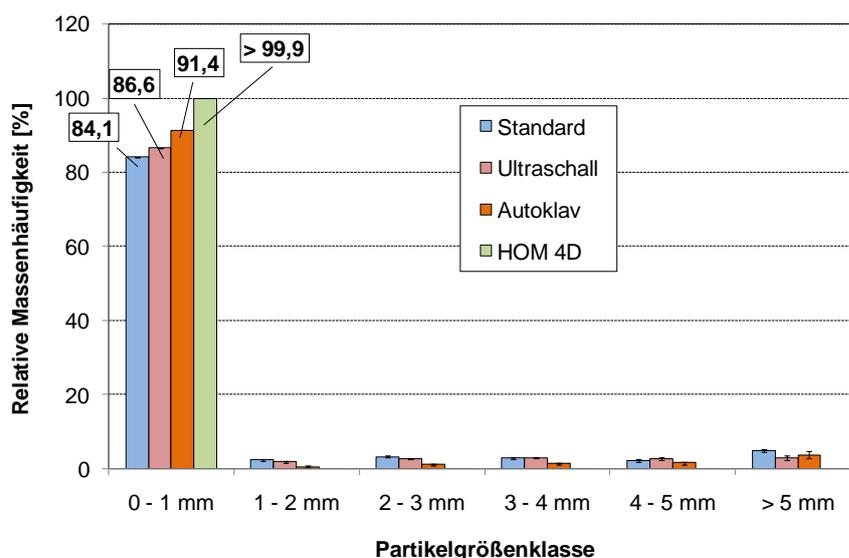


Abb. 36: Relative Massenhäufigkeitsverteilungen von Apfeltresterpartikeln (0 – 1 mm ermittelt über LPA, 1 - >5 mm ermittelt über Bildanalyse)

In allen Fällen wurden durch die angewendeten physikalischen Voraufschlussvarianten Partikel erzeugt, die zu über 80 % kleiner als 1 mm waren. Dementsprechend gering waren die relativen Massenhäufigkeiten innerhalb der anderen Partikelgrößenklasse. Zudem konnten zwischen diesen Klassen keine signifikanten Unterschiede erkannt werden. Eindeutigere Unterschiede zwischen den Aufschlussvarianten zeigten sich jedoch darin, dass durch die Ultraschallbehandlung ein signifikant größerer Anteil an Partikeln < 1 mm vorlag und die Autoklavenbehandlung wiederum einen höheren Anteil kleiner Partikel im Vergleich zur Ultraschallbehandelten Variante aufwies. Durch die Hochdruckbehandlung im Homogenisator konnten bereits nach 4 Durchläufen keine Partikel größer 1 mm mehr nachgewiesen werden. Die Abb. 72 bis Abb. 74 im Anhang zeigen mikroskopische Aufnahmen zerkleinerter Apfeltresterpartikel nach 4 bzw. 8 und 12 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator. Nach 4 Durchläufen waren noch vereinzelt Zellen bzw. Zellgewebepartikel zu erkennen (Abb. 72), wohingegen nach 12 Durchläufen fast ausschließlich Zellfragmente nahezu gleicher Form vorlagen (Abb. 74).

### 6.3.1.2 Laserpartikelanalyse (LPA)

Mit Hilfe der Laserpartikelanalyse wurden die Partikelgrößenfraktionen im Bereich von 0 bis 1 mm der verschiedenen Varianten nochmals gesondert untersucht (Abb. 37). Dabei zeigten sich anhand der Verläufe der Volumensummenkurven nahezu identische Partikelgrößenverteilungen für die nach Standardaufschluss (Standard) und Autoklavenbehandlung (AK) zerkleinerten Apfeltrester. Lediglich die Ultraschallbehandlung (US) führte im Vergleich dazu zu einer leichten Verschiebung der Volumensummenkurve in Richtung kleinerer Partikel. Betrachtet man die Einzel-Häufigkeitsverteilungen (Anhang, Abb. 79) so fällt auf, dass Standard und AK ein Maximum im Partikelgrößenbereich von 500 bis 800  $\mu\text{m}$  aufwiesen, wobei das Maximum bei AK geringfügig in Richtung kleinerer Partikel verschoben war. Das Maximum von US lag ebenfalls im genannten Größenbereich. Es zeigte sich jedoch ein geringfügig größerer Anteil an Partikeln kleiner 200  $\mu\text{m}$ , was darauf deutete, dass insbesondere kleinere Fragmente von Zellen oder Gewebepartikeln abgespalten wurden. Dies könnte eine Folge von Kavitationseffekten an der Oberfläche der Zellen sein [136].

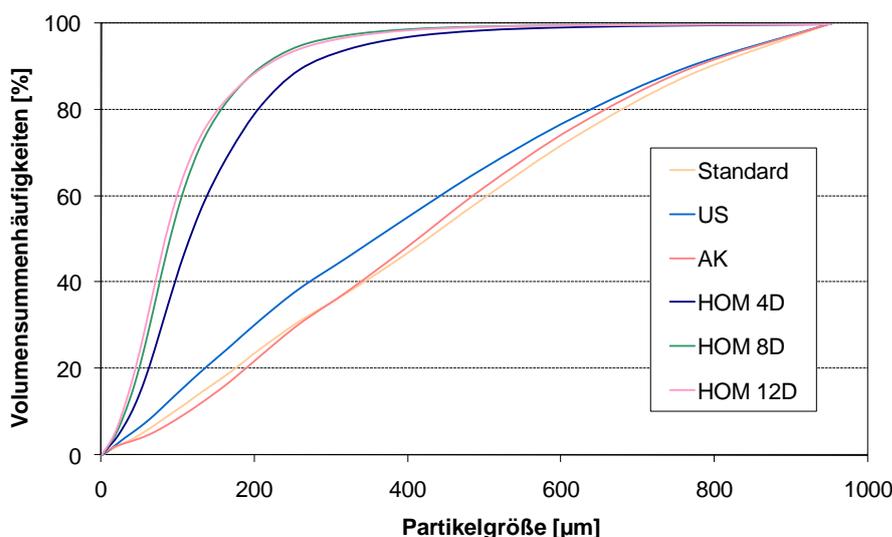
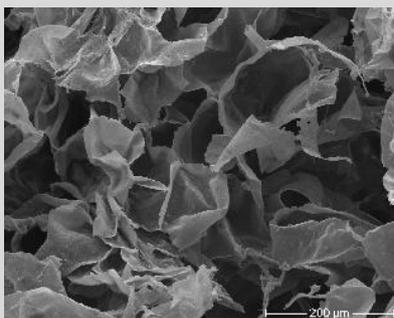


Abb. 37: Volumensummenverteilungen von Apfeltresterpartikeln < 1 mm

Die Hochdruckhomogenisierung führte hingegen zu Partikel, die zu über 95 % kleiner als 400 µm waren (Abb. 37). Genauer betrachtet, waren bereits nach vier Durchläufen durch den Homogenisator ca. 80 % der Partikel kleiner als 200 µm (HOM 4D). Nach weiteren vier Durchläufen war die Volumensummenkurve nochmals in Richtung kleinerer Partikel verschoben und bereits über 90 % der Partikel kleiner als 200 µm (HOM 8D). Im Gegensatz dazu konnte durch die vier letzten Durchläufe nur noch ein minimaler Zerkleinerungseffekt erzielt werden (HOM 12D), wie die relativen Häufigkeitsverteilungen in Abb. 79 (Anhang) verdeutlichen. Das Maximum der Partikelgrößenhäufigkeit lag für diese Varianten im Bereich von 100 µm, was darauf schließen lässt, dass es sich bei den vermessenen Partikeln zu einem großen Teil um Zellfragmente handelt. Khan et al. geben für Apfelparenchymzellen Zellgrößen im Bereich von 200 bis 300 µm an [253]. Kunzek et al. konnten in getrockneten Apfel-ZM nach der Hochdruckhomogenisierung im wässrigen Milieu bei den Partikelgrößenverteilungen ein Maximum im Bereich von 80 bis 200 µm finden [152]. Allerdings könnten Partikelaggregationen durch die Trocknung eine Verschiebung in Richtung größerer Partikel bewirkt haben. Bei der Hochdruckhomogenisierung frischer Möhren im wässrigen und ethanolischen Milieu konnten hingegen Partikelgrößen kleiner 50 µm erzielt werden [154]. Der Zerkleinerungserfolg im Hochdruckhomogenisator ist vermutlich auch stark von der Gewebefestigkeit abhängig, in der sich Äpfel und Möhren offensichtlich unterscheiden. Desweiteren wird auch der Wassergehalt der zu homogenisierenden Materialien den Erfolg maßgeblich beeinflussen [152].

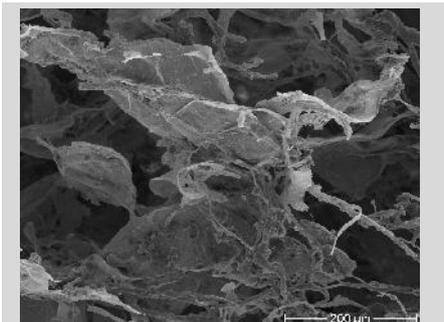
### 6.3.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen, dass die biologisch gewachse Hohlraumstruktur der Apfelzellen nach dem Standardaufschluss noch weitestgehend erhalten blieb (Abb. 38). Demgegenüber waren durch die Ultraschallbehandlung schon offensichtlich Veränderungen an den Zelloberflächen erkennbar (Abb. 39). Die fibrillären Strukturen an den Zellkanten deuten darauf, dass durch die Ultraschallbehandlung Zellfragmente mehr oder weniger abgerissen werden. Dies würde auch den mittels Laserpartikelanalyse detektierten höheren Anteil an kleineren Partikeln erklären (Abb. 37).



**Abb. 38: REM-Aufnahme zerkleinerter Apfeltrester (Standard)**

*„Weitgehend intaktes räumliches Netzwerk“*

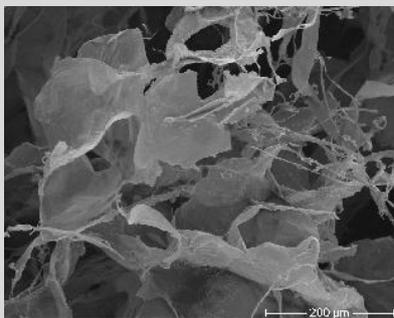


**Abb. 39: REM-Aufnahme zerkleinerter Apfeltrester (US)**

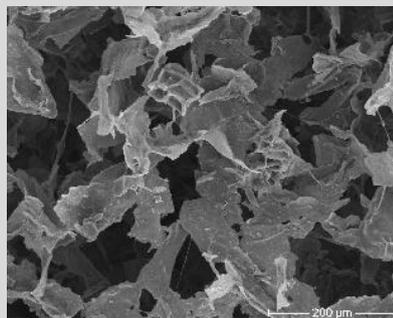
*„Angegriffenes räumliches Netzwerk“*

Eine Art von Fibrillierung ließ sich auch bei den autoklavierten Apfeltrestern feststellen (Abb. 40). Die Hohlraumstruktur war nahezu vollständig aufgehoben. Bei den hochdruckhomogenisierten Trestern war die Zellfragmentierung deutlich erkennbar (Abb. 41). Allerdings waren die nach der Hochdruckzerkleinerung resultierenden Fragmente augenscheinlich noch relativ

groß, was mit den Partikelgrößenverteilungen nach LPA korrelierte und verdeutlicht, dass sich Partikelgrößen < 100 µm auf diese Weise, selbst nach 12 Durchläufen und relativ hohen Drücken von 300 bar, aus vorzerkleinerten Apfeltrestern nur schwerlich erzeugen ließen.



**Abb. 40: REM-Aufnahme zerkleinertener Apfeltrester (AK)**  
*„Übergang zu zweidimensionaler Partikelstruktur“*

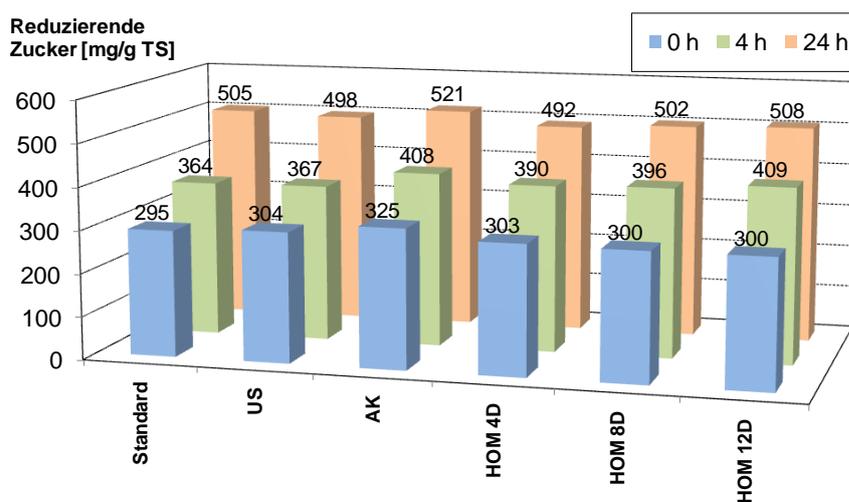


**Abb. 41: REM-Aufnahme zerkleinertener Apfeltrester (HOM 12D)**  
*„Zweidimensionale Partikelstruktur (vereinzelt), in der inneren Struktur aufgelöst“*

Die Abb. 75 bis Abb. 78 im Anhang zeigen weitere REM-Aufnahmen der zerkleinerten Apfeltrester nach den verschiedenen Aufschlussvarianten in geringer Vergrößerung und machen insbesondere die Größen- und Strukturunterschiede zwischen den hochdruckhomogenisierten und den anderen Varianten (Standard, US, AK) deutlich.

### 6.3.2 Zuckerfreisetzung nach physikalischem Voraufschluss

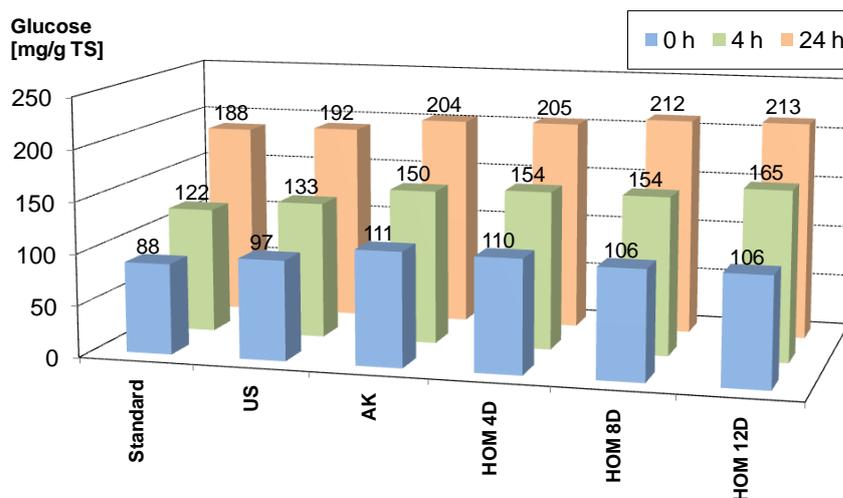
Der Effekt der verschiedenen Voraufschlussvarianten wurde analog der bereits beschriebenen Versuche nach 24-stündiger Inkubation mittels Enzym-Mix PEC/CFD/NZ (einfache Konzentration) und 1:4 verdünnten Trestern anhand der freigesetzten reduzierenden Zucker und Glucose ermittelt (Abb. 42, Abb. 43).



**Abb. 42: Freisetzung reduzierender Zucker nach physikalischem Voraufschluss**

Anhand der Freisetzung der gesamt reduzierenden Zucker konnten in dieser Versuchsserie wie auch schon in den vorangegangenen Versuchen nur bedingt Rückschlüsse auf den Zellwandabbau gezogen werden. So konnten zwar erwartungsgemäß signifikante Zuckerzunahmen nach jeweils 4 und 24 h beobachtet werden, die Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten waren jedoch bis auf die Autoklavenbehandlung nicht signifikant, wie mittels varianzanalytischer Auswertung der Daten ermittelt werden konnte (Anhang, Abb. 105 bis Abb. 110, Tab. 33 und Tab. 34). Im Fall von AK konnten signifikant höhere Mengen an reduzierenden Zuckern freigesetzt werden. Möglicherweise sind diese auf den vermehrten Pektinabbau durch die Behandlung bei hohen Temperaturen ( $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zurückzuführen. Kunzek et al. konnten nachweisen, dass beim Autoklavieren große Anteile des unlöslichen Protopektins in wasserlösliches Pektin umgewandelt werden [151].

Es ist bekannt, dass thermische Behandlungen zum Verlust der Zellwandfestigkeit und damit zur Gewebeerweichung führen, die im Wesentlichen auf dem Abbau der Zellwandpektine, insbesondere des Mittellamellenpektins beruhen, wodurch unter anderem die Zellseparation stark begünstigt wird [45, 128, 131, 134, 254, 255]. Bei diesem Vorgang spielt die  $\beta$ -eliminative Spaltung des Pektins eine maßgebliche Rolle, wobei deren Ausprägung neben zahlreichen anderen Faktoren stark pH-abhängig ist und unter alkalischen Bedingungen zunimmt [58, 130]. Unter sauren Bedingungen läuft die Pektindepolymerisation hingegen vornehmlich durch hydrolytische Bindungsspaltung ab, wobei der Abbau durch  $\beta$ -Eliminierung unter sauren Bedingungen bis heute tiefgründig untersucht und diskutiert wird [68, 69, 256].



**Abb. 43: Freisetzung von Glucose nach physikalischem Voraufschluss**

Wie beim Vergleich der verschiedenen Enzymvarianten zuvor (Kap. 6.2.1), zeigte sich bei der Glucosefreisetzung ein deutlicheres Bild bezüglich des Einflusses der Aufschlussvarianten (Abb. 43). Die Auswertung mit Hilfe der multifaktoriellen Varianzanalyse ergab für die untersuchten Faktoren „Aufschluss“ und „Zeit“ höchste Signifikanzniveaus für die Haupt- und Wechselwirkungseffekte (Anhang, Tab. 33, Tab. 34). Im Vergleich zum Standardaufschluss konnten durch die zusätzlichen Vorbehandlungsmaßnahmen (US, AK, HOM) signifikant höhere Mengen an Glucose während der anschließenden Enzymeinwirkung freigesetzt werden (Anhang, Abb. 106). Bis auf US waren dabei nach 24 h signifikant höhere Mengen an Glucose verfügbar, verglichen mit der Standardvariante (Anhang, Abb. 110).

Die insbesondere nach Autoklaven- und Hochdruckbehandlung erhöhten Glucosemengen in den Trestern zu Beginn der Enzymierung (0 h) lassen darauf schließen, dass hauptsächlich lösliche Zucker aus dem Restsaft freigesetzt wurden. Dies konnte auch für die ultraschallbehandelte Probe festgestellt werden. Entezari et al. konnten durch eine Kurzzeit-Ultraschallbehandlung die Zuckerextraktion aus Datteln wesentlich verbessern [139]. Haevecker konnte bereits 1970 bei der Behandlung von Obstmaischen nachweisen, dass Ultraschall hoher Intensität zu irreversiblen Schädigungen der Fruchtzellen durch Zerplatzen des Zellkerns, Ablösen des Protoplasten von den Zellwänden und der Zerstörung der Zellwände führte [138]. Der Vergleich der freigesetzten Glucosemengen durch AK und HOM ergab direkt nach dem Voraufschluss (0 h) keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten. Nach 4 h waren die Werte im Fall von HOM 12D signifikant höher als bei AK, HOM 4D und HOM 8D. Die höchsten Glucosemengen wurden nach 24 h für HOM 8D sowie für HOM 12D gefunden. Der größere Anteil kleiner Partikel (Abb. 37) begünstigt offenbar die Angreifbarkeit der Zellwandpolymere durch die Enzyme. Desweiteren wurden durch die Hochdruckhomogenisierung und anschließende Enzymierung höhere Mengen an freier Galacturonsäure und eine geringfügige Erhöhung löslicher Hemicellulosebausteine in den Trestern im Vergleich zum Standardaufschluss gefunden (Anhang, Abb. 70).

Trotz des höheren Anteils größerer Partikel wiesen die autoklavierten Trester eine gute Abbaubarkeit durch die zellwandabbauenden Enzyme auf. Man kann davon ausgehen, dass die Zellwandmatrix durch die hohen Temperaturen und erhöhten Drücke in einen amorphen und damit energiereicheren Zustand überführt werden und der physikalische Zustand der Apfel-tresterpartikel dadurch maßgeblich beeinflusst wird [73, 250, 257]. Durch den verstärkten Abbau unlöslicher Zellwandbestandteile, insbesondere der Pektine, kommt es zur Erhöhung des Anteils löslicher Komponenten [151, 258] wodurch der Angriff durch die Enzyme zudem verbessert wird [10]. Demzufolge hängt die Effektivität der Enzymwirkung nach mechanischer bzw. thermischer Vorbehandlung nicht nur vom erzielten Partikelgrößenspektrum ab, sondern auch vom physikalischen Zustand (Quellung, Aufspreizung der Zellwandmatrix). Daher ist anzunehmen, dass der Enzymangriff nicht ausschließlich von der Partikeloberfläche, sondern auch vom Partikelinneren her erfolgt (Diffusionseffekte).

Tab. 20 gibt die spezifischen Energieeinträge für die verschiedenen Tresteraufschlussvarianten wieder. Dabei ergeben sich die Einträge für die zusätzlichen Voraufschlussvarianten US und HOM aus der Summe der mechanischen Energieeinträge für den Standard-Aufschluss und der entsprechenden Zusatzbehandlung. Im Gegensatz zu US korreliert der zusätzliche Energieeintrag bei HOM sehr gut mit der Mehrausbeute an freigesetzter Glucose nach anschließender Enzymbehandlung (Tab. 20, Abb. 43).

**Tab. 20: Spezifische Energieeinträge für verschiedene Trester-Aufschlussvarianten**

Aufschluss	Spezifischer Energieeintrag [kJ/kg]		
	mechanisch	thermisch	gesamt
Standard	542	-	542
Standard + US	542 + 450	-	992
Standard + AK	542	423	-
Standard + HOM	542 + 1584	-	2126

Ein direkter Vergleich der summierten Energieeinträge für AK und HOM wurde aufgrund der verschiedenen zugeführten Energieformen (mechanisch, thermisch) nicht durchgeführt. Es fällt jedoch auf, dass der zahlenmäßig (423 KJ/kg) weitaus geringere spezifische Energieeintrag bei der thermischen Behandlung (Standard + AK) offensichtlich zu gleichen Endergebnissen hinsichtlich der Glucosemehrausbeute führt (Abb. 43), verglichen mit dem höheren spezifischen Energieeintrag bei der Hochdruckhomogenisierung (Standard + HOM).

## 6.4 Versuche zur Optimierung des mechanisch-enzymatischen Aufschlusses

### 6.4.1 Kombination von mechanischen und enzymatischen Prozessschritten im mehrstufigen Laborverfahren

Mit dem Ziel, die Zuckerkonzentrationen in den Tresteransätzen insbesondere im Hinblick auf die zu erzielenden Alkoholausbeuten im weiteren Verlauf der Verfahrensentwicklung, zu erhöhen, wurden die Trestergehalte in den Versuchsansätzen stufenweise erhöht. Dabei sollten die einzelnen Prozessschritte des Laborverfahrens so miteinander kombiniert werden, dass eine ausreichende Verflüssigung der Apfeltrester im Sinne der Herabsetzung der Tresterviskosität bei möglichst gleichbleibender Zuckerfreisetzung, insbesondere Glucose, erfolgte. Im Vergleich zur bisher eingesetzten Tresterverdünnung von 1:4 (1 Gewichtsanteil Trester + 3 Gewichtsanteile Wasser) wurden nun zusätzlich Tresteransätze mit höherem Tresteranteil (1 + 2 und 1 + 1) hergestellt. Die Herstellung der drei Versuchsvarianten ist in Abb. 44 dargestellt.

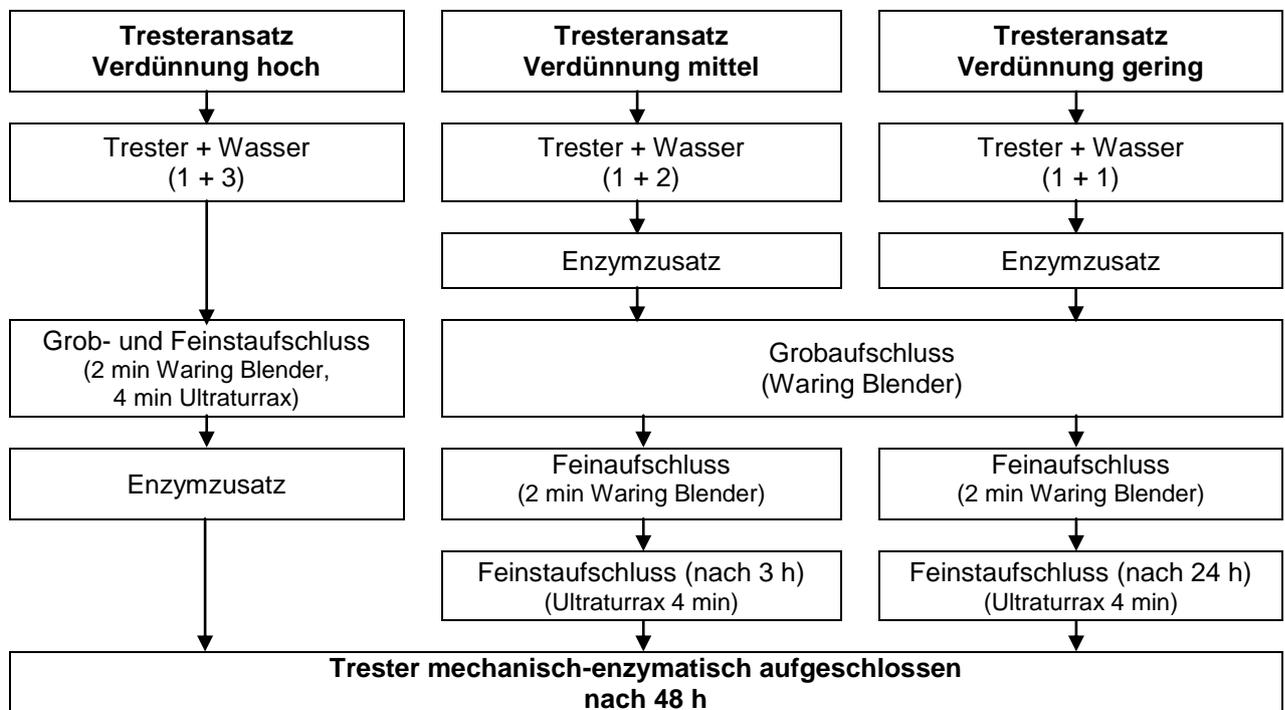


Abb. 44: Schema des mechanisch-enzymatischen Aufschlusses von Apfeltrestern verschiedener Verdünnungsstufen

Durch den höheren Tresteranteil in den Varianten mit „mittlerer“ und „geringer“ Verdünnung mussten die enzymatischen und mechanischen Verfahrensschritte im Sinne einer Verschachtelung so miteinander kombiniert werden, dass der abschließende Homogenisierungsschritt (Feinstaufschluss mittels Ultraturrax, Prinzip s. Kap. 4.2.2.1) technisch realisiert werden konnte. Im Fall der Tresteransätze mit geringer Verdünnung wurde der Feinstaufschluss bei dieser Versuchsserie erst nach 24 h durchgeführt (Abb. 44). Grob- und Feinaufschluss wurden jeweils mit dem Waring Blender durchgeführt.

## 6.4.2 Einfluss der Tresterverdünnung auf die Zuckerfreisetzung und die Viskosität während der Verflüssigung und Verzuckerung

In den nachfolgenden Abbildungen sind zunächst die freigesetzten Mengen reduzierender Zucker dargestellt (Abb. 45, Abb. 46). Zum besseren Verständnis wurden die Zuckermengen sowohl mit Bezug auf die Trockensubstanz als auch auf die Feuchtsubstanz dargestellt. Zunächst konnte festgestellt werden, dass der Anteil reduzierender Zucker in den Versuchsansätzen zu Beginn der Enzymierung bezogen auf die Feuchtsubstanz mit zunehmendem Tresteranteil erwartungsgemäß zunahm (Abb. 45). Während der 48-stündigen Enzymeinwirkung wurden in allen drei Ansätzen deutliche Zuckerzunahmen verzeichnet. Bezog man die freigesetzten Zucker jedoch auf die Trockensubstanzen der Ansätze, so zeigte sich, dass die Zuckergehalte in den Tresteransätzen mit geringerem Feststoffanteil zu jedem Zeitpunkt deutlich höher waren als bei der jeweiligen nächsthöheren Feststoffkonzentration (Abb. 46).

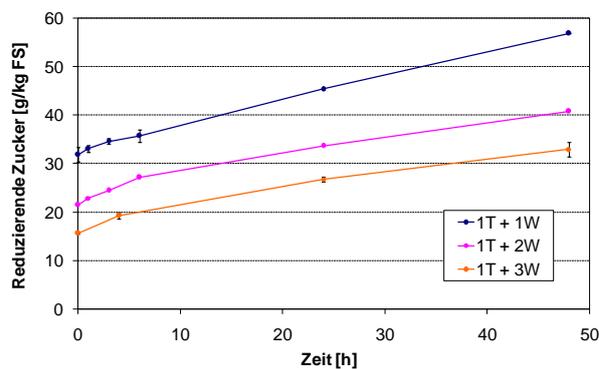


Abb. 45: Freisetzung reduzierender Zucker aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Feuchtsubstanz

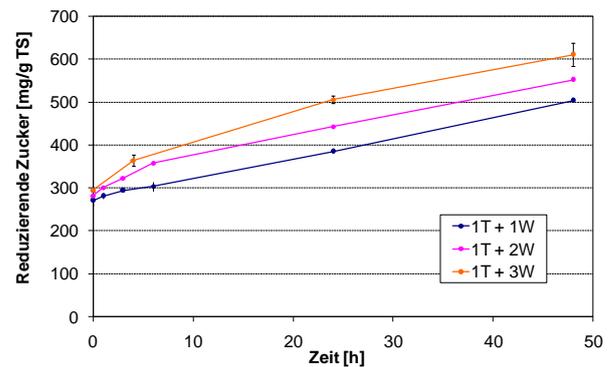


Abb. 46: Freisetzung reduzierender Zucker aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Trockensubstanz

Der gleiche Effekt konnte erwartungsgemäß bei der Freisetzung von Glucose aus den verschiedenen Tresteransätzen beobachtet werden. So lagen die Glucosegehalte der Varianten mit höherem Tresteranteil bezogen auf die Feuchtmasse deutlich über denen mit stärkerer Verdünnung (Abb. 47).

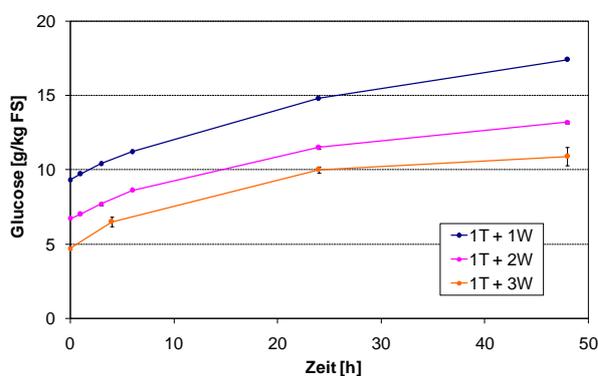


Abb. 47: Freisetzung von Glucose aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Feuchtsubstanz

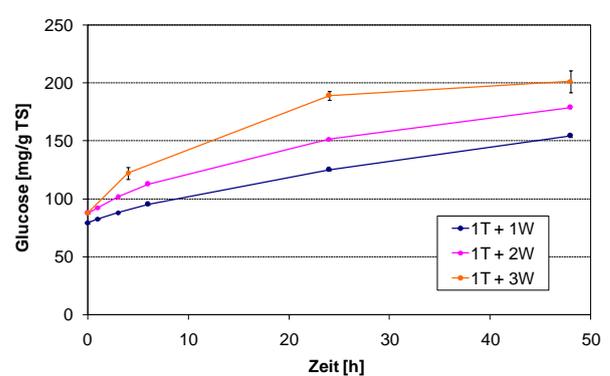
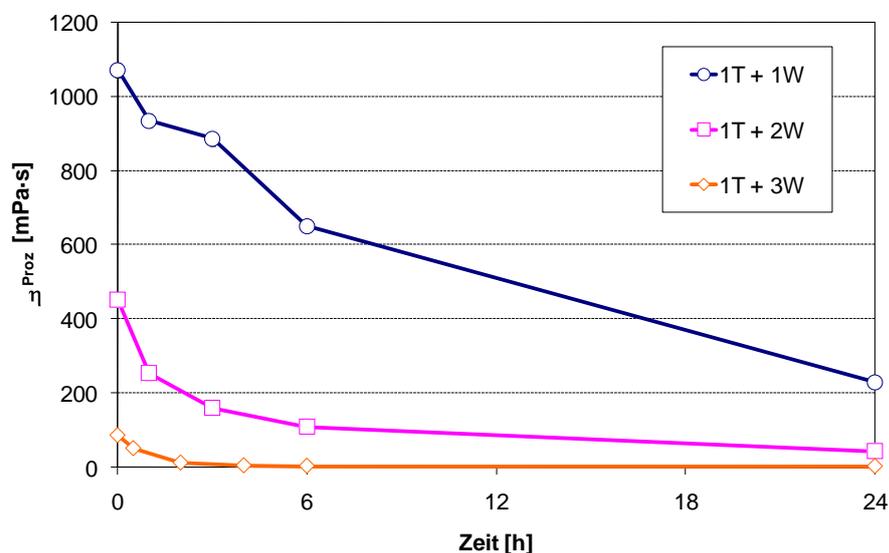


Abb. 48: Freisetzung von Glucose aus Apfeltrester verschiedener Verdünnungsstufen bezogen auf die Trockensubstanz

Jedoch zeigte sich auch hier, dass pro Masseneinheit Trockensubstanz bei geringerem Verdünnungsverhältnis deutlich geringere Mengen an Glucose freigesetzt wurden (Abb. 48). Die Reduzierung des Wassergehaltes führte offensichtlich zur verminderten Aktivität der Enzyme hinsichtlich des Zellwandabbaus. Wahrscheinlich kommt es durch den geringeren Anteil an freiem Wasser zur stärkeren Aneinanderlagerung von Partikeln, Zellgewebestrukturen sowie Einzelzellen und zu stärkeren Wechselwirkungen der Zellwandpolymere [250], die den Angriff durch die Enzyme maßgeblich erschweren. Das bedeutet, dass vermutlich auch die molekulare Flexibilität der Polysaccharide eingeschränkt ist und die Diffusion der Enzyme in das Zellgewebe zusätzlich erschwert ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hang et al. 2001 bei der Untersuchung der Zuckerfreisetzung aus Maiskolben in Abhängigkeit der Substratkonzentration [206].

Die erhöhten Feststoffkonzentrationen führten zur deutlichen Zunahme der Viskosität der Apfeltrester zu Beginn der Inkubation (Abb. 49), im Fall der Variante mit geringer Verdünnung (1T + 1W) sogar über 1000 mPa·s.



**Abb. 49: Viskositätsabnahme in Apfeltrestern verschiedener Verdünnungsstufen**

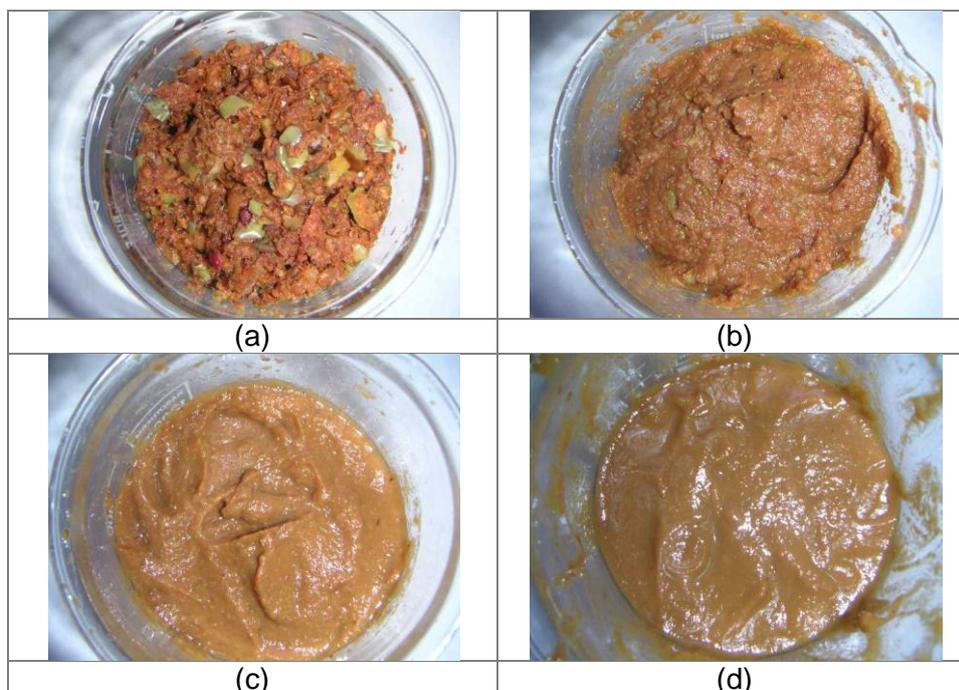
Hierbei ist zu erwähnen, dass der optimale Messbereich des Rheoswing bei 0 – 100 mPa·s liegt und somit für zwei Varianten (1 + 1 und 1 + 2) Prozessviskositäten gemessen wurden, die weit über der oberen praktischen Messgrenze lagen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Modellsubstraten (kolloidale Lösungen) wurden hier reale Suspensionsviskositäten gemessen, bei denen die Partikulierung des Systems (Messung der Bruttoviskosität – große Partikel) einen wesentlichen Einfluss nimmt.

Die Anfangsviskosität der Variante 1T + 2W lag bei Beginn bei ca. 450 mPa·s, im Fall der Variante mit dem höchsten Verdünnungsgrad (1T + 3W) bei knapp unter 90 mPa·s. Es zeigte sich jedoch, dass durch die Kombination der Verfahrensschritte durch den mehrstufigen mechanisch-enzymatischen Aufschluss ein für technische Zwecke hinreichender Verflüssigungseffekt über einen Zeitraum von 24 h erzielt und die Viskosität der Trester deutlich reduziert werden konnte.

**Tab. 21: Prozentuale Viskositätsabnahme und Glucosezunahme nach 24 bzw. 48 h bezogen auf den Ausgangszustand (0 h)**

		Viskositätsabnahme	Glucosezunahme
Trester + Wasser	1 + 1	78 %	87 %
	1 + 2	90 %	97 %
	1 + 3	95 %	113 %

Der Vergleich der Ergebnisse beider Untersuchungen machte jedoch deutlich, dass sowohl Verflüssigungs- als auch Verzuckerungsleistung maßgeblich durch die Feststoffkonzentration beeinflusst wurden (Tab. 21). So wurden die prozentualen Viskositätsabnahmen bzw. Glucosezunahmen mit geringerem Tresteranteil deutlich erhöht. Es ist jedoch zu vermuten, dass auch bei höheren Feststoffkonzentrationen gleiche Freisetzungsraten erzielt werden können, wenn die Inkubationszeiten nochmals verlängert würden (hier nicht untersucht). Die Kurvenverläufe der Glucosefreisetzung bei den Varianten mit höherem Tresteranteil deuten durch das Nicht-Erreichen eines Plateaus auf eine zeitlich verzögerte Reaktion hin (Abb. 48). Eine weitere Erklärung für reduzierte Zuckerfreisetzungen könnte die Produkthemmung der Cellulasen, insbesondere der Cellobiase sein. Lieb et al. stellten fest, dass die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität eines kommerziellen Cellobiasepräparates (wie in vorliegender Arbeit verwendet) gegenüber mikrokristalliner Cellulose bereits ab Konzentrationen von 2,5 g Glucose pro kg Testansatz um mehr als 50 % reduziert wurde [180]. Zur Veranschaulichung der durch die Kombinierung von mechanischen und enzymatischen Verfahrensschritten erzielten Verflüssigung sind im Folgenden vier Foto-Aufnahmen ausgehend von den unbehandelten Trestern (a) über die grob (b) und fein (c) aufgeschlossenen Trester bis hin zur feinstzerkleinerten Stufe nach Ultraturrxbehandlung (d) dargestellt (Abb. 50). Der zunehmende Grad der Homogenisierung der Trester ist dabei deutlich zu erkennen.



**Abb. 50: Apfeltrester nativ (a), nach Grobaufschluss (b), nach Feinaufschluss (c) und nach Feinstaufschluss (d)**

## 6.5 Zusammenfassende Wertung

Die für die Untersuchungen eingesetzten Apfelsnasstester bestanden zum größten Teil aus neutralen sowie sauren Zuckern als Bausteine der Zellwandpolysaccharide (Cellulose, Hemicellulose, Pektin) und aus löslichen Restzuckern (Glucose, Saccharose, Fructose). Die Gehalte an Protein und Asche waren vergleichsweise gering. Der Anteil an löslichen Zuckern, die sich als sogenannte frei verfügbare Zucker durch mehrfache Extraktion mit Kaltwasser ohne zusätzlichen Aufschluss aus den Nasstrestern extrahieren ließen, war mit maximal 20 % eher gering, so dass die Anforderungen an die zu verwendenden Enzyme neben dem Erzielen einer hohen Verzuckerungsrate (Freisetzung monomerer Zucker) auch die gezielte Verflüssigung der Apfeltrester im Sinne einer zweiten Extraktion waren. Bei den Untersuchungen zur Ermittlung optimaler Enzymvarianten zeigten sich signifikante Wechselwirkungseffekte hinsichtlich der verwendeten pektinolytischen Enzyme und deren Kombination mit einer ausgewählten Cellulase sowie in Kombination mit Cellulase und Cellobiase in Abhängigkeit der Enzymierungsdauer. Dabei kam es neben der Freisetzung von Glucose zur Bildung von freier Galacturonsäure durch den Abbau der Pektinmatrix, was unter anderem zur deutlichen Absenkung der pH-Werte in den enzymierten Trestern führte. Die Freisetzung von Arabinose wurde durch die Kombination von Pektinase und Cellulase ebenfalls begünstigt. Die Kombination der Pektinasen mit Cellulase und Cellobiase führte innerhalb der ersten vier Stunden der Enzymierung zur drastischen Viskositätsabsenkung in den Trestern. Sowohl anhand der freigesetzten Zuckerbausteine als auch anhand der rheologischen Untersuchungen konnten einige Parallelen zu den Ergebnissen der Untersuchungen gegenüber den Modellsubstraten gezogen werden. Durch den mechanischen Standardaufschluss und eine 48-stündige Enzymierung mit dreifacher Enzymkonzentration konnte ein Hydrolysegrad (berechnet als Glucose aus den unlöslichen Zellwandpolysacchariden) von 79 % erreicht werden.

Die Partikel mechanisch aufgeschlossener Apfeltrester lagen zu über 80 % im Größenbereich unter 1 mm. Durch zusätzliche physikalische Voraufschlussvarianten (Ultraschall, Autoklavieren, Hochdruckhomogenisieren) konnte dieser Anteil noch erhöht werden. Die erhöhten Freisetzungsraten insbesondere an Glucose durch die zusätzliche Behandlung wurde einerseits auf den höheren Anteil kleinerer Partikel und die damit verbundene Vergrößerung der Angriffsfläche für die Enzyme zurückgeführt. Andererseits hat sich der physikalische Zustand (amorphe Matrix) durch die hydrothermische Behandlung vermutlich derart verändert, dass ein erleichterter Zellwandabbau durch die Enzyme erfolgen konnte. Die Veränderung der Zelloberflächenstrukturen und Partikelgrößenverhältnisse konnte durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen belegt werden.

Durch die Kombination von mechanischen und enzymatischen Prozessschritten im mehrstufigen Laborverfahren konnten auch bei den Versuchsansätze mit höherem Tresteranteil vergleichsweise gute Verflüssigungserfolge erzielt und somit die absoluten Gehalte vergärbare Zucker (Glucose) erhöht werden. Die prozentuale Freisetzung von Glucose nach 48-stündiger Enzymeinwirkung nahm dabei jedoch mit zunehmendem Feststoffanteil ab, was einerseits auf den vermutlich erschwerten Zugang der Enzyme zu den Zellwandpolymeren aufgrund verstärkter Wechselwirkungen zwischen den Feststoffpartikeln zurückzuführen sein könnte. Andererseits könnte bei den vorliegenden Glucosekonzentrationen in den Tresteransätzen die Produktinhibierung der Cellobiase eine Rolle spielen.

## 7 SIMULTANE VERFLÜSSIGUNG, VERZUCKERUNG UND VERGÄRUNG VON APFELNASSTRESTER IM LABORMAßSTAB

### 7.1 Vergärungsversuche mit nativen Apfeltrestern

#### 7.1.1 Einfluss des Enzymeinsatzes

Im Sinne der simultanen Verflüssigung, Verzuckerung und Vergärung wurden die nativen Apfeltrester nach zweistündigem mechanisch-enzymatischem Voraufschluss mit Hilfe einer kommerziellen Brennereitrockenhefe (*S. cerevisiae*) über einen Zeitraum von 48 h in Batch-Versuchen vergoren. Anschließend wurde der Alkohol über eine einfache Labordestillation aus den vergorenen Trestern abdestilliert und der Alkoholgehalt aräometrisch bestimmt [224]. Als Maß für die Effektivität der verschiedenen Vergärungsvarianten diente in den ersten Versuchen die Alkoholausbeute (Kap. 4.2.6.3, Gl. (11)).

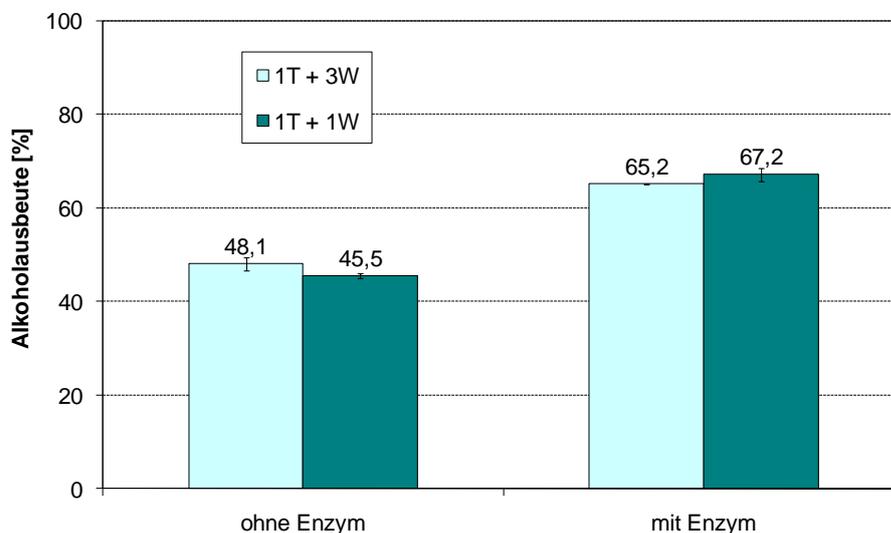


Abb. 51: Alkoholausbeute nach der Vergärung von Apfeltrestern unterschiedlicher Verdünnung mit und ohne Enzymeinsatz

Durch den Einsatz des Enzym-Mix PEC/CFD/NZ konnte die Alkoholausbeute im Vergleich zu den nicht-enzymierten Referenzansätzen bei geringem Trester-Wasserverhältnis (1T + 3W) relativ um 36 % und bei erhöhtem Tresteranteil (1T + 1W) im Ansatz um 48 % gesteigert werden (Abb. 51). Die Ausbeutesteigerung war dabei sowohl auf die leicht erhöhten Alkoholausbeuten bei der Variante mit Enzym als auch auf die geringfügig reduzierten Ausbeuten bei der Variante ohne Enzym zurückzuführen. Das Erreichen annähernd gleicher Alkoholausbeuten bei beiden Trester-Wasser-Verhältnissen deutete darauf hin, dass mögliche Inhibierungseffekte bei höherem Tresteranteil im Ansatz und die dadurch erhöhten Glucosegehalte aufgrund der simultanen Verzuckerung und Vergärung aufgehoben wurden.

Zur Prozesskontrolle wurden bei allen Vergärungsversuchen als Parameter die Glucosegehalte in den gärenden Trestern sowie die gebildeten Gasmengen in festgelegten Abständen detektiert. Diese dienen somit vorrangig als Abbruchkriterien für die jeweiligen Versuche. Da Glucose als einziger Zucker im Trester sowohl als löslicher Restzucker als auch zusätzlich aus den Zellwandpolysacchariden freigesetzter Zucker vorlag, musste zunächst nachgewiesen werden, dass auch die weiteren löslichen Zucker Saccharose und Fructose in etwa zeit-

gleich wie die Glucose vergoren wurden (Abb. 52). Es muss erwähnt werden, dass die entnommenen Tresterproben in diesem speziellen Fall im Rahmen der Probenaufarbeitung nicht hitzebehandelt und daher umgehend untersucht wurden, um die Saccharose-Inversion so weit wie möglich zu minimieren.

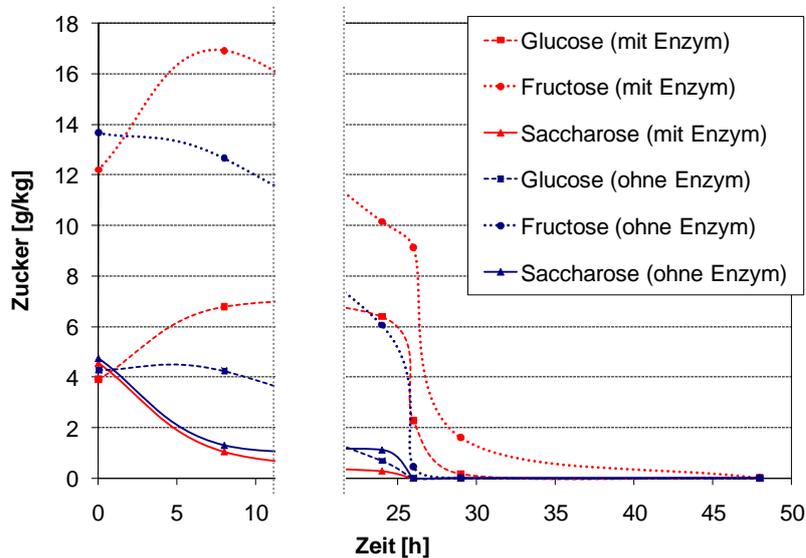


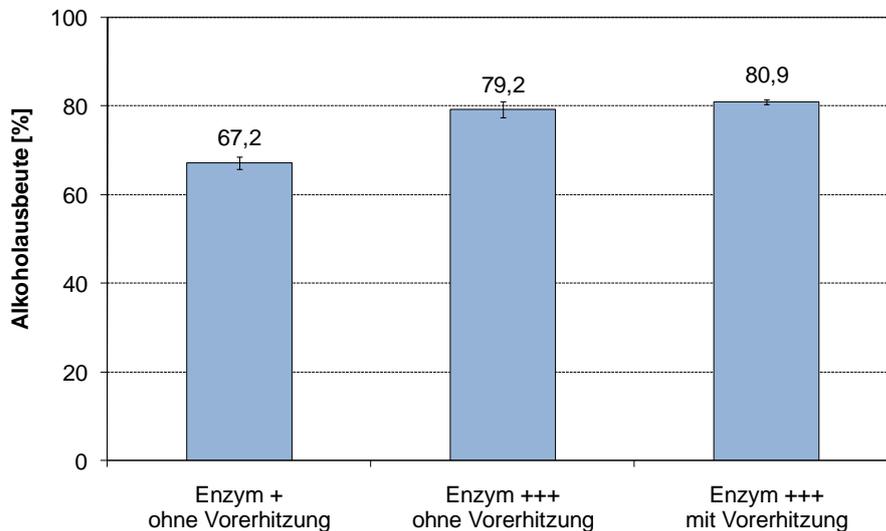
Abb. 52: Zuckerkonzentration in Apfeltrestern während der Vergärung mit und ohne Enzym

Durch den Enzymeinsatz kam es im Gegensatz zu den nicht-enzymierten Trestern zu einer erhöhten Freisetzung von Glucose und Fructose innerhalb der ersten 10 h der Vergärung. Die Saccharosekonzentration nahm hingegen von Beginn an ab, was auf die Saccharose-Inversion sowohl durch Säurehydrolyse [259] durch die niedrigen pH-Werte als auch auf die Spaltung durch hefeeigene Invertase zurückzuführen war [214]. Glucose und Saccharose wurden geringfügig schneller vergoren als Fructose, was aber im Wesentlichen durch die höheren Anfangsgehalte an Fructose bedingt war. Dennoch waren nach 48 h alle drei Zucker vergoren. Während die Fructosegehalte der enzymierten Ansätze nach dem Erreichen des Maximums bei 10 h durch die Hefeaktivität wieder stark abfielen, nahm die Glucosekonzentration bei der Vergärung erst nach 25 h ab. Die Glucosefreisetzung durch die Enzymwirkung und die Glucosevergärung liefen offenbar über einen Zeitraum von über 10 h mit annähernd gleicher Geschwindigkeit ab.

### 7.1.2 Einfluss der Enzymkonzentration und der Trestervorbehandlung

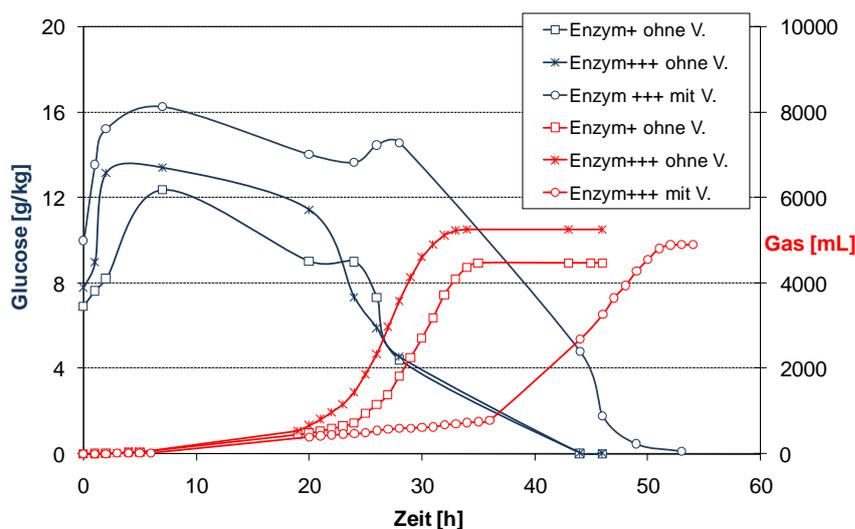
In der zweiten Versuchsreihe wurden der Einfluss der Enzymkonzentration durch den Vergleich der Varianten mit einfacher und dreifacher Enzymkonzentration sowie der Einfluss einer zusätzlichen thermischen Vorbehandlung der Trester bei 90 °C für wenige Minuten zur weitestgehenden Inaktivierung der nativen Mikroorganismen, untersucht. Ziel letzterer Behandlung war die Überprüfung von Möglichkeiten zur Alkoholausbeuteerhöhung als auch zur Senkung des Anteils an Gärungsnebenprodukten in den Destillaten, wie Acetaldehyd oder höheren Alkoholen. Bei der Herstellung von Trinkbrandweinen kommen solche Verfahren jedoch nicht in Betracht, da diese in der Regel zu Fehlparfümen in den Destillaten führen [210]. Kurze Anlagphasen durch leistungsstarke Reinzuchthefen und deren schnelle Vermehrung zu Beginn

der Fermentation minimieren in der Regel die Gefahr der Fehlgärungen durch wilde Hefen. Durch die Erhöhung der Enzymkonzentration auf die dreifache Menge wurden auch die Alkoholausbeuten, wie aufgrund der Ergebnisse der Enzymierungsversuche zu vermuten war, erhöht (Abb. 53) und lagen im Fall der nicht erhitzten Variante bei 79,2 % bzw. bei 80,9 % im Fall der vorerhitzten Variante. Der Effekt der Vorerhitzung auf die Alkoholausbeute war somit nur minimal. Auf die Gärungsnebenprodukte wird im Kap. 7.1.4 näher eingegangen.



**Abb. 53: Alkoholausbeute in Abhängigkeit der Trestervorbehandlung und der Enzymkonzentration**

Insbesondere innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden der Vergärung fand durch den erhöhten Enzymeinsatz eine verstärkte Glucosefreisetzung aus den Treestern statt (Abb. 54). Dementsprechend höher waren die insgesamt gebildeten Gasmengen, die als Prozessparameter für das durch die alkoholische Gärung gebildete Kohlendioxid genutzt wurden.



**Abb. 54: Glucosekonzentration und gebildetes Gasvolumen (kumulativ) in Abhängigkeit der Trestervorbehandlung und der Enzymkonzentration**

Durch die Hitzebehandlung der Trester wurde die Angärphase bei der entsprechenden Variante deutlich verlängert (Abb. 54), was möglicherweise auf die inhibierende Wirkung unerwünschter Abbauprodukte, wie z. B. Furfural, zurückzuführen ist, welches während der thermischen Behandlung gebildet werden könnte [260]. Auffällig lang waren jedoch auch die Angärphasen bei den anderen Varianten, was eventuell auch auf eine vergleichsweise gärschwache Hefe deutete, da die Milieubedingungen (pH, Temperatur, Zuckerkonzentration, Alkoholkonzentration) zu jedem Zeitpunkt prinzipiell in den von *Saccharomyces*-Hefen tolerierbaren Bereichen lagen [261, 262].

### 7.1.3 Einfluss des Enzymzugabezeitpunktes und der Enzymkombination

Unter Verwendung einer gärstarken Brennereihefe (*S. cerevisiae*) konnte durch den mechanisch-enzymatischen Aufschluss und der simultanen Vergärung der Apfeltrester der Charge 2006 Alkohol mit einer Ausbeute von 81,2 % gewonnen werden. Diese lag somit nur geringfügig höher als die Maximal-Ausbeute der vorangegangenen Versuchserie. Die Angärphasen waren mit 3 bis 4 h jedoch weitaus kürzer und die Vergärung nach ca. 20 h abgeschlossen (Abb. 55, Abb. 56).

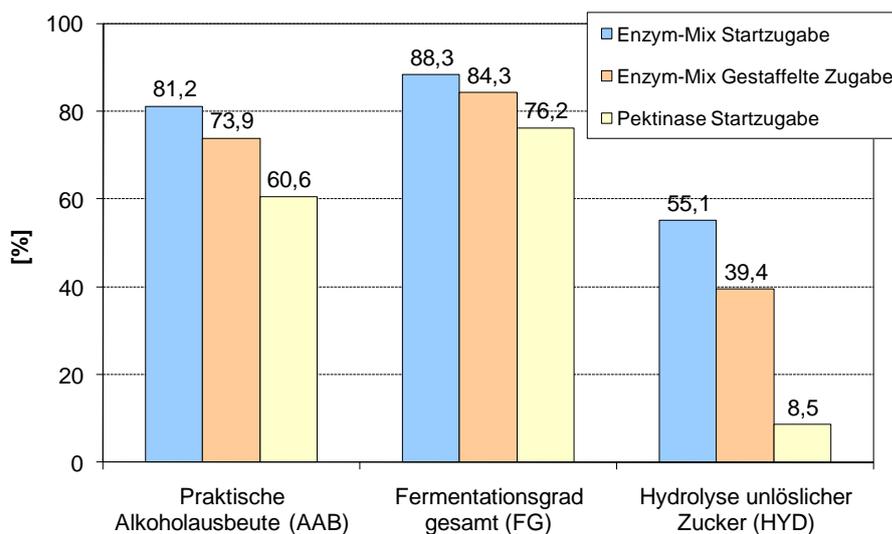
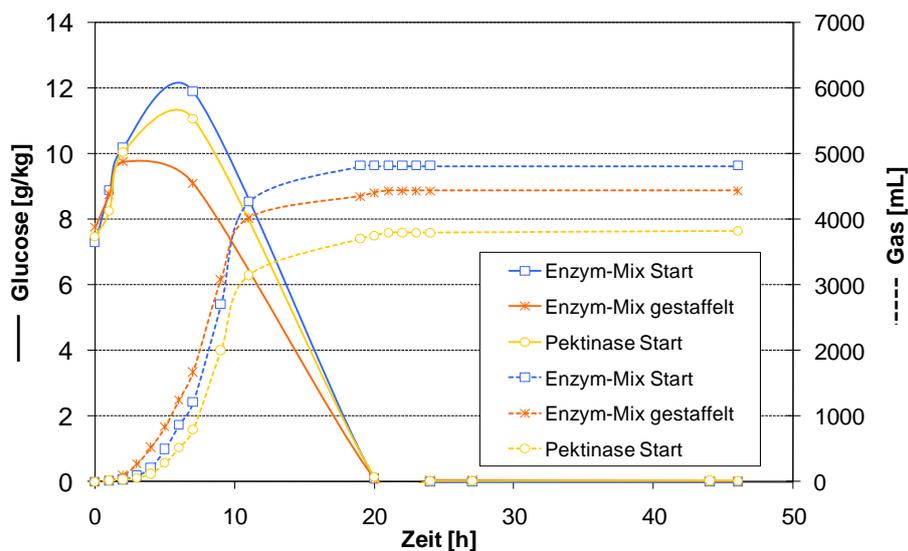


Abb. 55: Vergärungsparameter in Abhängigkeit von Enzymvariante und Zugabezeitpunkt

Bei der Variante „Gestaffelte Enzymzugabe“ wurde ein Teil des Cellulase/Cellobiase-Gemisches nach ca. 10 h Vergärungszeit (Hauptgärphase) zugegeben, um zu testen, ob sich dadurch eine mögliche Inhibierung der Cellulasen durch die hohen Glucosekonzentrationen zu Beginn der Vergärung minimieren ließ. Tatsächlich wurde die Alkoholausbeute jedoch durch diese Maßnahme sogar auf 73,9 % gesenkt (Abb. 55). Es ist davon auszugehen, dass die beste Enzymsynergie erreicht wird, wenn die beteiligten zellwandabbauenden Enzyme mit den jeweiligen Aktivitäten bereits von Beginn an wechselwirken. Varga et al. konnten durch die gestaffelte Zugabe von Cellulasen und Cellobiasen bei der simultanen Verzuckerung und Vergärung hydrothermisch vorbehandelter Maispflanzenresten Alkoholausbeuten von bis zu 83 % erreichen [263]. Im Anhang sind die pH-Wert-Verläufe für die verschiedenen Vergärungsvarianten dargestellt und erläutert (Anhang, Abb. 80).

Um den synergistischen Enzymeffekt auch bei den Vergärungsversuchen nachzuweisen, wurde dem Trester in einem weiteren Versuch, das hochverflüssigende Pektinase-Präparat ADP in der gleichen Dosierung wie der Enzym-Mix PEC/CFD/NZ zugesetzt. Die Alkoholausbeute lag in diesem Fall jedoch nur noch bei knapp 61 %, was die vorangegangenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen gegenüber den Apfeltresterfasern und Apfelsnasrestern bestätigte und die Notwendigkeit des Einsatzes geeigneter Kombinationen von Pektinasen und Cellulasen für einen maximalen Zellwandaufschluss unterstrich.



**Abb. 56: Glucosekonzentration und gebildetes Gasvolumen (kumulativ) in Abhängigkeit von Enzymvariante und Zugabezeitpunkt (durchgezogene Linien: Glucose; gestrichelte Linien: Gas)**

Die ermittelten praktischen Alkoholausbeuten korrelierten von der Tendenz gut mit den während der Vergärung freigesetzten Gasmengen. Je höher die Alkoholausbeute war, desto mehr Gas wurde gebildet (Abb. 56). Allerdings waren die ermittelten Gasmengen in allen Fällen geringer als anhand der Alkoholausbeute und der Grundgleichung der alkoholischen Gärung (Kap. 4.2.6.3) berechnet. Neben Gasverlusten in der Apparatur (Schlauchverbindungen, Stopfen) könnten dafür auch Verluste durch gelöstes CO<sub>2</sub> im Fermentationssubstrat verantwortlich sein [264]. Da bei der Berechnung der Alkoholausbeute die diversen Gär- und Destillationsverluste (Gärungsnebenprodukte, Aufbau von Hefebiomasse, Verdunstungsverluste, Restalkohol in der Schlempe) nicht berücksichtigt wurden, wurde der Gesamtfermentationsgrad aus dem Gehalt vergärbare Zucker vor und nach der Vergärung in den Trestern bestimmt. Es war erkennbar, dass die Fermentationsgrade tatsächlich deutlich über den ermittelten Alkoholausbeuten lagen und im besten Fall über 88 % der vergärbaren Zucker verstoffwechselt wurden (Abb. 55). Bezieht man den Restgehalt an vergärbaren Zuckern (aus unlöslichen Polymeren; gaschromatographisch bestimmt) auf den Gehalt an vergärbaren Zuckern aus unlöslichen Polymeren vor der Vergärung, erhält man den Hydrolysegrad, der im Fall der Vorzugsvariante (Enzym-Mix Startzugabe) bei knapp über 55 % lag, wohingegen durch ADP nur 8,5 % der potentiell vergärbaren Zucker aus den Zellwandpolysacchariden genutzt wurden.

### 7.1.4 Gärungsnebenprodukte in Labordestillaten aus nativen Apfeltrestern

In Tab. 22 sind die Gehalte an Gärungsnebenprodukten sowie Methanol ausgewählter Enzymvarianten dargestellt.

**Tab. 22: Gärungsnebenprodukte in Labordestillaten aus nativen Apfeltrestern**

	Variante				
	6	7	8	9	10
Gärungsnebenprodukte [mg/100 mL r. A.]	Enzym +++ ohne V.	Enzym +++ mit V.	Enzym-Mix Start	Enzym-Mix gestaffelt	Pektinase Start
Acetaldehyd	72,8	35,9	53,8	91,0	89,2
Ethylacetat	8,9	2,6	9,6	14,5	32,4
i-Amylacetat	0,2	0,0	0,2	0,0	0,8
Methanol	3379	3241	3388	3692	4194
n-Propanol	58,6	61,8	50,7	56,2	52,6
i-Butanol	83,5	78,9	57,8	66,1	92,9
n-Butanol	9,0	8,1	9,2	10,6	12,4
i-Amylalkohole	255	239	235	236	422
Hexanol	7,6	7,4	8,5	10,5	11,3
Summe höhere Alkohole	413	395	361	380	591

Im Vergleich zu den Literaturdaten für Obstbrände sind die ermittelten Gehalte an Acetaldehyd und Ethylacetat sowie i-Amylacetat eher gering [210]. Ethylacetat entsteht durch Veresterung von Ethanol mit Essigsäure, ist eine typische Vorlaufkomponente und kann daher im technischen Verfahren destillativ relativ einfach abgetrennt werden. Acetaldehyd hingegen ist ein in Trinkbranntweinen unerwünschter Stoff, der vornehmlich im Vorlauf abgetrennt wird, aber auch im Mittellauf vorkommt [210]. Die Hauptkomponente bei den höheren Alkoholen waren die i-Amylalkohole mit ca. 60 % der gesamt bestimmten höheren Alkohole. Es ist zu beachten, dass bei der Labordestillation keine Fraktionierung in Vor-, Mittel- und Nachlauf vorgenommen wurde. Vielmehr ging es hierbei um die Bestimmung der Alkoholausbeuten bei den verschiedenen Varianten.

Die Methanol-Gehalte in den Labordestillaten lagen in allen Fällen über 3000 mg/100 mL r. A. und damit deutlich über den laut EU-Verordnungen zulässigen Höchstgehalten von 1500 mg/100 mL r. A. Da die verwendeten Apfeltrester aus Herstellungsverfahren stammten, bei denen zur Maischebehandlung keine Enzyme zugesetzt wurden, wiesen diese noch einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Pektin mit hohem Veresterungsgrad auf (Tab. 17). Methanol ist kein Gärungsnebenprodukt, sondern entsteht durch die Freisetzung aus dem Zellwandpektin durch die Wirkung von Pektinesterasen [215]. Durch die alleinige Anwendung mit der Pektinase ADP lagen die Methanolgehalte noch deutlich höher als bei den Enzym-Mix-Varianten. Die Vorerhitzung der Apfeltrester für wenige Minuten bei 90 °C hatte nur einen geringen Effekt bezüglich der Senkung unerwünschter Gärungsnebenprodukte. Lediglich die Acetaldehydgehalte sowie die Estergehalte waren niedriger als in den unbehandelten Vergleichdestillaten.

## 7.2 Vergärungsversuche mit säurehydrolysierten Apfeltrestern

Entpektinisierte Apfeltrester fallen bei der großindustriellen Pektingewinnung in großen Mengen an und werden z. B. in getrockneter Form als Futtermittelzusatz verwendet (Beispiel: Herbavital F 12, Herbafood Ingredients GmbH). Ziel der Untersuchungen war es, entpektinisierte Trester im Labormaßstab in Anlehnung an die großtechnische Produktion aus nativen Apfelnastrestern herzustellen und zu überprüfen, inwiefern sich auch diese zur Gewinnung von Alkohol eignen. Ein weiterer Grund für die erwarteten Erfolgsaussichten hinsichtlich der verbesserten Hydrolyse der Trester waren die Ergebnisse aus den Enzymierungsversuchen gegenüber den entpektinisierten Apfeltresterfasern (Kap. 5.2.2).

### 7.2.1 Zusammensetzung säurehydrolysierter Apfeltrester

Zum Vergleich wurden zwei säurehydrolysierte Varianten aus getrockneten Trestern der Charge 2006 nach unterschiedlichen Extraktionsbedingungen [10] hergestellt. Tab. 23 zeigt die Zusammensetzung beider Varianten.

**Tab. 23: Zusammensetzung säurehydrolysierter Apfeltrester (Varianten „Rapid Set“ und „Slow Set“)**

Zusammensetzung		Variante	
		Rapid Set	Slow Set
TS	[g/100 g FS]	29,8	34,3
Galacturonan	[g/100 g TS]	9,5	11,8
Veresterungsgrad	[%]	61,8	65,4
Protein	[g/100 g TS]	9,8	7,6
Asche	[g/100 g TS]	0,9	0,8
Stärke	[g/100 g TS]	0,4	1,0
Rhamnose	[g/100 g TS]	1,1	1,3
Fucose	[g/100 g TS]	0,6	0,6
Arabinose	[g/100 g TS]	2,1	4,7
Xylose	[g/100 g TS]	3,0	3,0
Mannose	[g/100 g TS]	2,3	1,6
Galactose	[g/100 g TS]	3,6	4,2
Glucose unlöslich	[g/100 g TS]	26,1	25,1
Glucose löslich	[g/100 g TS]	1,5	1,0
Fructose löslich	[g/100 g TS]	3,2	2,3
Saccharose	[g/100 g TS]	0,0	0,0

Eine Bilanzierung der extrahierten Pektinmenge wurde nicht vorgenommen, sondern nur qualitativ mittels Alkoholfällung überprüft. Zur Vergleichbarkeit mit der großtechnischen Pektinengewinnung wurde nach dem Abpressen der Trester bewusst auf weitere Auswaschungsschritte zur Entfernung löslicher Restbestandteile verzichtet.

Im Vergleich zu den nativen Trestern wiesen die hydrolysierten Trester deutlich geringe Gehalte an löslichen Zuckern auf (Tab. 23), womit der Gehalt an unlöslichen vergärbaren Zuckern relativ stieg. Auffällig hoch waren hingegen die Pektingehalte in den „entpektinisierten“ Trestern mit 9,5 % (rapid set) bzw. 11,8 % (slow set). Dass eine vollständige Pektinentfernung aus dem Zellwandgerüst pflanzlicher Materialien nicht gelingt, wurde bereits in zahlreichen Arbeiten belegt [42, 81, 151, 255]. Selbst chemisch gereinigte Cellulosefasern enthielten nach dem Waschen mit Wasser noch anteilige Mengen an Galacturonan [76], was in guter Übereinstimmung mit den für die entpektinisierten Apfeltresterfasern ermittelten Werte steht (Tab. 16). Desweiteren ist davon auszugehen, dass nach dem Abpressen Pektine zurückbleiben, die bereits aus dem Zellwandgerüst gelöst worden sind. Stolle-Smits et al. vermuteten, dass selbst solubiliserte Zellwandpolymere aufgrund ihrer verzweigten Struktur in der Zellwandmatrix verankert blieben [131]. Die ermittelten Veresterungsgrade waren durch die Extraktionen im Vergleich zum nativen Trester nur geringfügig herabgesenkt worden. Rolin gibt an, dass Slow-set-Pektine reduzierte Veresterungsgrade im Gegensatz zu Rapid-set-Pektinen aufweisen [9]. Ein Vergleich war hier jedoch nicht möglich, da die Galacturonangehalte in den Treestern und nicht in den extrahierten Pektinen untersucht worden waren.

## 7.2.2 Einfluss der Hydrolysebedingungen auf die wichtigsten Vergärungsparameter

Die säurehydrolysierten Trester wurden insgesamt über einen Zeitraum von 120 h vergoren, da nach 48 h nochmals eine leichte Zunahme der Gasmengen in beiden Fällen zu verzeichnen war (Abb. 57).

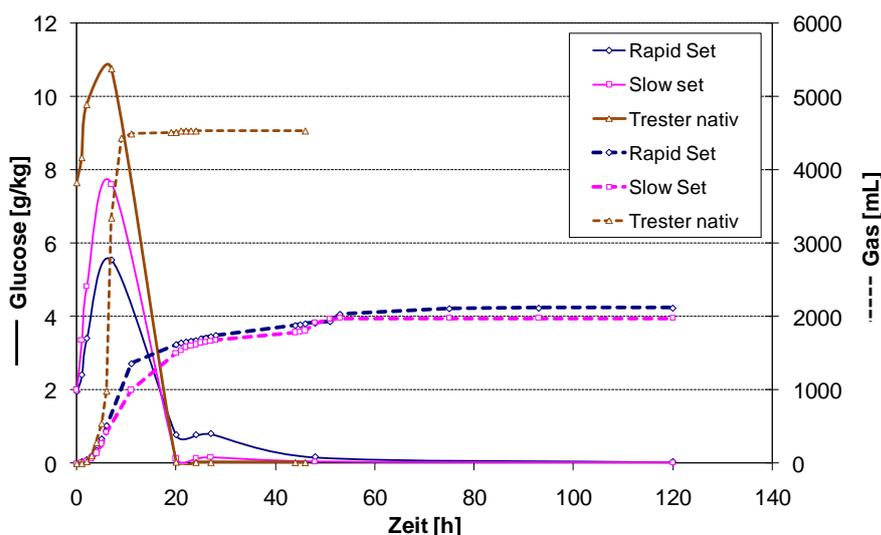
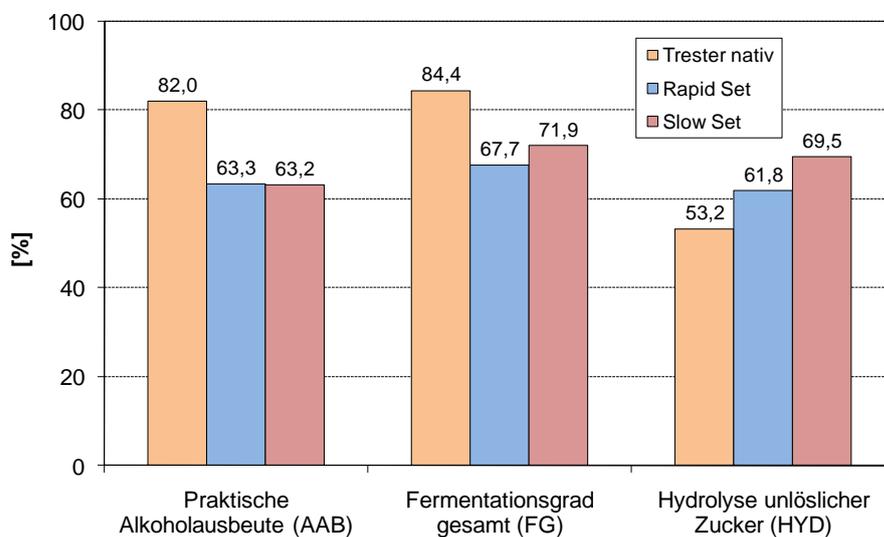


Abb. 57: Glucosekonzentration und gebildetes Gasvolumen (kumulativ) in nativen und säurehydrolysierten Apfeltrestern (durchgezogene Linien: Glucose; gestrichelte Linien: Gas)

In allen drei Versuchsansätzen wurden zu Beginn der Fermentation relativ hohe Glucosemengen freigesetzt. Da der Gehalt löslicher Restglucose in den säurehydrolysierten Treestern nur noch minimal war (1,0 bis 1,5 % TS), wurde der größte Teil an Glucose folglich aus den unlöslichen Polymeren freigesetzt. Die ermittelten Alkoholausbeuten der hydrolysierten Trester stimmten tendenziell gut mit den gebildeten Gasmengen überein. Die Fermentationsgrade als auch die Hydrolyse unlöslicher Zucker waren jedoch im Fall der Slow-Set-Trester verglichen mit den Rapid-Set-Trestern leicht erhöht. Möglicherweise bedingen die längeren Hydrolysezeiten bei geringerer Temperatur (4 h, 60 °C) eine bessere Aufquellung bzw. Erweichung der Zellwandmatrix, wodurch der Zugang der Enzyme zu den Cellulosefasern verbessert wird. Die praktischen Alkoholausbeuten und Gesamtfermentationsgrade der hydrolysierten Trester waren absolut zwar im Vergleich zu den nativen Treestern niedriger. Die Hydrolysegrade lagen mit 61,8 % (rapid-set) bzw. 68,5 % (slow-set) jedoch deutlich über den Werten der nativen Trester (53,2 %) (Abb. 58).



**Abb. 58: Vergärungsparameter für native und säurehydrolysierte Apfeltrester**

Da die absoluten Pektingehalte in den hydrolysierten Treestern höher als erwartet waren, war auch in den Destillaten aus den jeweiligen vergorenen Ansätzen mit erhöhten Methanolgehalten zu rechnen. Tatsächlich lagen diese sogar erheblich über den Gehalten, die aus den nativen Treestern freigesetzt wurden (Tab. 24). Wahrscheinlich waren nicht nur der Pektingehalt und Veresterungsgrad Einflussfaktoren bezüglich des Methanolgehaltes, sondern auch der Zustand des Pektins (löslich/unlöslich). Insbesondere im Destillat aus Slow-Set-Trestern wurden extrem hohe Methanolgehalte von über 11000 mg/100 mL r. A. gefunden, die darauf deuten, dass der Angriff durch die Pektinesterasen besonders stark begünstigt wurde. Die verlängerten Vergärungszeiten könnten die Methanolfreisetzung zudem begünstigt haben. Eine Senkung der Methanolgehalte könnte sich möglicherweise durch weitere Auswaschschritte insbesondere löslicher Pektinfraktionen als auch durch ein intensiveres Abpressen der hydrolysierten Trester erreichen lassen, wäre jedoch im Sinne der Wirtschaftlichkeit der Pektin Gewinnungsverfahren wahrscheinlich nicht empfehlenswert.

Im Gegensatz zu den Destillaten aus nativen Treestern wiesen die Destillate aus den hydrolysierten Tresten geringere Gehalte an i-Amylalkoholen und Hexanol auf. Die Gehalte an Ethylacetat waren hingegen leicht erhöht (Tab. 24).

**Tab. 24: Gärungsnebenprodukte in Labordestillaten aus säurehydrolysierten Apfeltrestern**

Gärungsnebenprodukte [mg/100 mL r. A.]	Rapid Set	Slow Set	Trester nativ
Acetaldehyd	92,6	65,5	62,9
Ethylacetat	30,1	35,1	15,8
i-Amylacetat	0,3	0,4	0,3
Methanol	5888	11857	4724
n-Propanol	66,4	68,4	50,2
i-Butanol	75,3	98,2	76,9
n-Butanol	4,2	4,5	13,0
i-Amylalkohole	198	231	291
Hexanol	5,1	8,9	38,4
Summe höhere Alkohole	349	413	470

### 7.3 Zusammenfassende Wertung

Durch den mechanisch-enzymatischen Voraufschluss nativer Apfeltrester mit anschließender Verzuckerung und Vergärung ließen sich die Alkoholausbeuten durch die Verwendung der Enzymkombination PEC/CFD/NZ auf über 80 % (bezogen auf die Ausbeute bei 100%iger Konvertierung vergärbarer Zucker) erhöhen. Dabei konnten die höchsten Fermentations- und Hydrolysegrade durch die Zugabe des Enzym-Mix zu Beginn des Verfahrens erzielt werden. Im Gegensatz dazu führten die gestaffelte Enzymzugabe als auch die Verwendung der sehr gut verflüssigenden Pektinase ADP zu deutlich geringeren Ausbeuten und Hydrolysegraden, sowie zu teilweise stark erhöhten Methanolgehalten in den gewonnen Destillaten. Eine Vorerritzung der Trester im Sinne einer Pasteurisation erwies sich hinsichtlich der Erhöhung der Alkoholausbeute und der Reduzierung an Gärungsnebenprodukten als nicht effektiv.

Die Nutzung „entpektinierter“ Apfeltrester zur Gewinnung von Alkohol ist grundsätzlich möglich. Durch die eingesetzten Extraktionsverfahren konnte die Freisetzung vergärbarer Zucker aus den unlöslichen Zellwandpolymeren der hydrolysierten Trester verbessert werden, was vermutlich auf den verbesserten physikalischen Zustand und der damit verbundenen besseren Zugänglichkeit der Zellwandpolymere für die Enzyme zurückzuführen war.

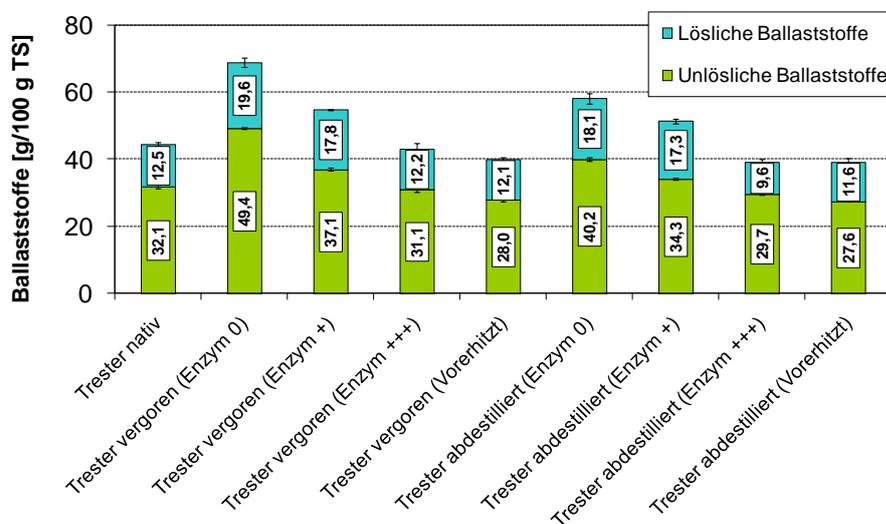
Kritisch zu betrachten sind allerdings die stark erhöhten Methanolgehalten, die aus den relativ hohen Restpektingehalten im Material und den vergleichsweise hohen Veresterungsgraden sowie dem vermutlich begünstigten Abbau durch Polygalacturonasen und Pektinesterasen resultieren. Entsprechende Nachbehandlungen der hydrolysierten Trester könnten zur Reduzierung des Methanols beitragen.

## 8 BALLASTSTOFFE UND POLYPHENOLE IN NATIVEN, VERGORENEN UND ABDESTILLIERTEN APFELTRESTERN

### 8.1 Ballaststoffe, Neutralzuckerzusammensetzung und Polyphenolgehalte in den Laborsubstraten

#### 8.1.1 Ballaststoffe und Neutralzuckerzusammensetzung

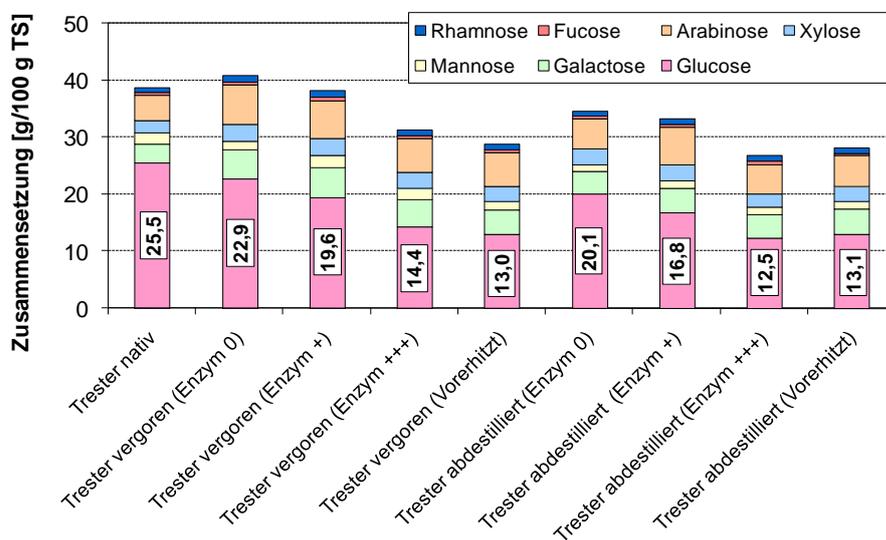
Im Hinblick auf die mögliche Gewinnung bioaktiver Stoffe [265] aus den Rückständen des Laborverfahrens wurden die Gehalte an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen in den vergorenen bzw. vergorenen und abdestillierten Treestern untersucht und den jeweiligen Werten der nativen Apfeltrester gegenüber gestellt (Abb. 59, Abb. 60).



**Abb. 59: Ballaststoffgehalte in nativen, vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern**  
(Ergänzung: „vorerhitzt“ = 3 min, 90 °C, anschließend Enzym+++)

In den nativen Treestern lag der Gesamtballaststoffgehalt bei knapp 45 % (Abb. 59). Prinzipiell ergaben sich die Gesamtballaststoffgehalte bei Apfelmaterialeinheiten aus den Fraktionen der Cellulose, der Hemicellulosen und des Pektins. Dementsprechend stimmten die ermittelten Ergebnisse für die nativen Trester gut mit den gefundenen Werten aus der Neutralzuckeranalyse und der Galacturonangehaltsbestimmung überein (Tab. 17, Abb. 60). In allen untersuchten Tresterproben war der Gehalt an löslichen Ballaststoffen geringer als der Gehalt an unlöslichen Ballaststoffen. Das Verhältnis von löslichen zu unlöslichen Ballaststoffen lag dabei zwischen 1:2 und 1:3. Sowohl aus ernährungsphysiologischer Sicht als auch hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften wird ein solches Verhältnis als günstig angesehen [11, 266]. Mit zunehmender Enzymdosage nehmen sowohl lösliche als auch unlösliche Ballaststoffgehalte ab. Damit korreliert die Abnahme der Gesamtballaststoffe sehr gut mit der Mehrausbeute an Ethanol (Abb. 51, Abb. 53). Andererseits fällt auf, dass die ermittelten Ballaststoffgehalte bei hoher Enzymkonzentration (Enzym +++ und vorerhitzt, vergoren und abdestilliert) bei nur noch ca. 40 % liegen. Es wird angenommen, dass dies zum einen auf der relativen Zunahme der Proteingehalte aufgrund der Biomasse-Zunahme während der Vergärung (Hefenvermehrung und -wachstum) beruht. So konnten Joshi et al. und Sandhu et al. während der

Vergärung von Apfeltrestern in Abhängigkeit der Milieubedingungen Zunahmen des Proteingehaltes auf über 20 % feststellen [4, 14]. Zum anderen ist davon auszugehen, dass ein beträchtlicher Teil der durch die enzymatische Verflüssigung und Verzuckerung gebildeten Oligomere, insbesondere pektischer und hemicellulosischer Herkunft, nicht miterfasst wurden [27]. Gebhardt et al. beschrieben die sogenannte Analysenimbalance für die wasserlöslichen Komponenten im Roggen, die aufgrund ihrer Ethanollöslichkeit als Ballaststoffe im Rahmen der AOAC-Methode nicht miterfasst wurden [199, 267]. In den vergorenen und abdestillierten Trestern lagen die Gesamtballaststoffgehalte im Vergleich zu den vergorenen Trestern geringfügig niedriger mit Ausnahme der vorerhitzten Trestern. Dies deutete zunächst darauf, dass durch den Kochprozess beim Abdestillieren sowohl unlösliche Fraktionen zu löslichen abgebaut [42, 46, 150] und die löslichen ebenfalls weiter abgebaut werden, so dass diese durch die ethanolische Behandlung nicht mehr ausgefällt werden. Betrachtet man jedoch die Neutralzuckerzusammensetzung, bei der unabhängig der Ballaststofffraktion alle Neutralzucker erfasst werden, kann dort der gleiche Trend erkannt werden (Abb. 60).



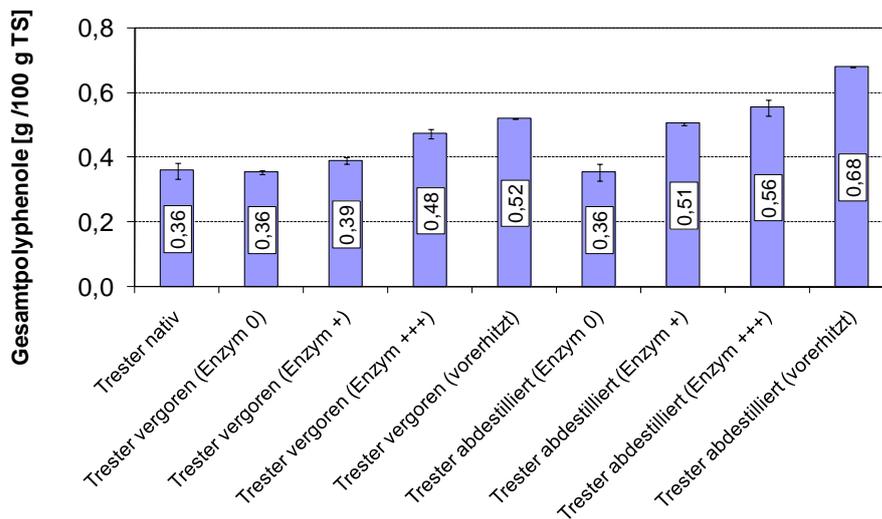
**Abb. 60: Neutralzuckerzusammensetzung in nativen, vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern**  
(Ergänzung: „vorerhitzt“ = 3 min, 90 °C, anschließend Enzym+++)

So konnten bei allen Varianten Abnahmen der Neutralzuckergerhalte, insbesondere der Glucosegehalte festgestellt werden. Möglicherweise nehmen die oligomeren Zucker an Maillard-Reaktionen mit den Proteinen in den Trestern teil, die sie für die Neutralzuckeranalyse unverfügbar machen. Dies würde auch mit dem Ergebnis korrelieren, dass bei den vorerhitzten Trestern zwischen den vergorenen und den abdestillierten Trestern keine bzw. nur minimale Unterschiede in den Ballaststoffgehalten und der Neutralzuckerzusammensetzung erkennbar waren. Die Ergebnisse der Neutralzuckeranalyse korrelierten einerseits mit den Mehrausbeuten an Ethanol bei den entsprechenden Varianten und zeigten andererseits anhand der Restglucosegehalte das verbleibende, nicht genutzte Restpotential vergärbarer Zucker auf. Bei der Vergärung der Trestersätze ( $TS \cong 10\%$ ) im Labormaßstab kam es zu keiner signifikanten Abnahme der Abproduktmasse (Bilanzen nicht dargestellt). Das bedeutet, dass die resultierende Schlempe (Trestern abdestilliert) in etwa der Gäransatzmenge zu Beginn der Vergärung entsprach. Durch die alkoholische Fermentation nahm die Feststoffkonzentration im Gäransatz bzw. im Endprodukt Schlempe jedoch um ca. 40 % ab.

## 8.1.2 Polyphenole

Die phenolischen Verbindungen sind in Äpfeln insbesondere in den Schalenbereichen lokalisiert [53]. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass durch den enzymatischen Aufschluss mittels kommerzieller pektinolytischer und cellulolytischer Enzympräparate nicht nur Zellwandpolysaccharide zu einem bestimmten Grad abgebaut werden, sondern der Zellwandabbau gleichzeitig mit einer verstärkten Freisetzung von phenolischen Verbindungen mit antioxidativem Potential einhergeht [28, 268]. Schieber et al. konnten in Apfeltrestern 0,24 g Polyphenole je 100 g TS finden, die sich im Wesentlichen aus Catechinen, Quercetinen und Chlorogensäure zusammensetzten [12]. Lu et al. fanden 0,72 g und Sudha et al. 1,02 g Polyphenole je 100 g TS in nativen Apfeltrestern [13, 90]. Unterschiede könnten in Abhängigkeit des verwendeten Rohmaterials (Sorte, Erntezeitraum) auftreten [92].

Da die phenolischen Verbindungen während der Vergärung nicht oder nur minimal abgebaut werden, war bei den Vergärungsversuchen mit einer Anreicherung an Polyphenolen in den verflüssigten und vergorenen Trestern zu rechnen. Abb. 61 zeigt die Gesamtpolyphenolgehalte der untersuchten Varianten.



**Abb. 61: Polyphenolgehalte in nativen, vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern**

(Ergänzung: „vorerhitzt“ = 3 min, 90 °C, anschließend Enzym+++)

Die für die nativen Trester ermittelten Gesamtpolyphenolgehalte lagen mit 0,36 g/100 g TS im Bereich der angegebenen Literaturwerte (Abb. 61). Während in den nicht enzymierten vergorenen Trestern keine Unterschiede in Polyphenolgehalten im Vergleich zu den nativen Trestern festgestellt werden konnten, wurden mit zunehmender Enzymmenge höhere Polyphenolgehalte in den Trestern nach der Vergärung gefunden. Insbesondere in den vorerhitzten Trestern konnte eine deutliche Zunahme beobachtet werden, was vermutlich auf die verbesserte Enzymwirkung gegenüber dem zunehmend erweichten Gewebe zurückzuführen ist. Die Hitzebehandlung durch das Abdestillieren der vergorenen Trester scheint die Freisetzung bzw. die Verfügbarkeit der Polyphenole zusätzlich zu begünstigen.

## 8.2 Möglichkeiten zur Isolierung von Ballaststoffen und Polyphenolen aus abdestillierten Apfeltrestern (Brennereischlempen)

### 8.2.1 Hintergrund und Zielstellung

Trotz der Nutzung zusätzlich vergärbare Zucker durch die enzymatische Verflüssigung, Verzuckerung und die Vergärung der aufgeschlossenen Apfeltrester, verbleiben nach dem Abdestillieren der vergorenen Trester erhebliche Restmengen, die als Schlempen bezeichnet werden und in der Regel als Abwässer der Brennerei entsorgt werden müssen. Als Dünge- oder Futtermittel sind Obstbrennereischlempen aufgrund ihres hohen Anteils an organischen Verbindungen, dem niedrigen pH-Wert und dem vergleichsweise geringen Nährstoffgehalt nur bedingt geeignet [210].

Nach der näheren Charakterisierung der vergorenen und abdestillierten Trester der Laborversuche sollten die im Rahmen des großtechnischen Verfahrens zur Verflüssigung, Vergärung und Destillation von Apfeltrestern anfallenden Brennereischlempen nach entsprechender Vorbehandlung auf den Gehalt an bioaktiven Stoffen untersucht werden. Unter Berücksichtigung des möglichen Einsatzes in angereicherten Frucht- oder Gemüsegetränken [52] wurden apparativ einfache Zerkleinerungs- und Siebfraktionierungsversuche zur Gewinnung von Partikeln im kleinen Größenbereich ( $< 50 \mu\text{m}$ ) durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen hinsichtlich des Ballaststoff- und Polyphenolgehaltes untersucht.

### 8.2.2 Nassfraktionierung von Apfeltresterschlempen

Durch die Nasssiegung der Schlempe auf dem  $50\mu\text{m}$ -Sieb wurden zwei Fraktionen erhalten, die massenbezogen in etwa die gleichen Trockensubstanzgehalte aufwiesen (Abb. 62 a). Durch die zusätzliche Ultraturrax-Behandlung vor der Siebung konnte die Massen-Fraktion  $< 50 \mu\text{m}$  relativ um 15 % vergrößert werden (Abb. 63). Dementsprechend groß war die relative Massenabnahme in der Fraktion  $> 50 \mu\text{m}$ .

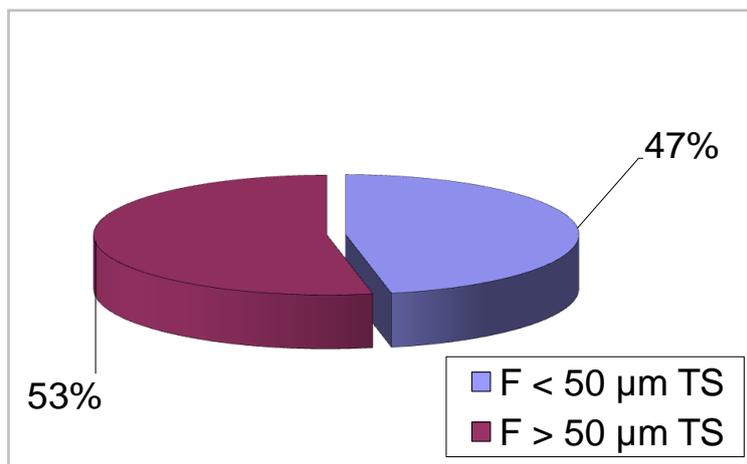


Abb. 62: Schlempefraktionen nach Nasssiegung ohne Ultraturrax-Behandlung (bezogen auf Trockensubstanz)

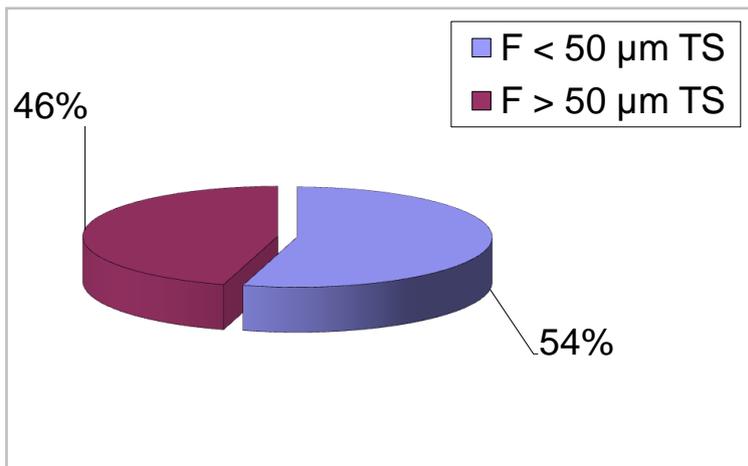


Abb. 63: Schlempefraktionen nach Nasssiebung mit Ultraturax-Behandlung (bezogen auf Trockensubstanz)

### 8.2.3 Ballaststoffe und Polyphenole in den Schlempefraktionen

Die Gehalte an löslichen sowie unlöslichen Ballaststoffen und Polyphenolen in den unzerkleinerten (ohne UT) und vorzerkleinerten Schlempen (mit UT) der jeweiligen Siebfraktion sind in Abb. 64 dargestellt.

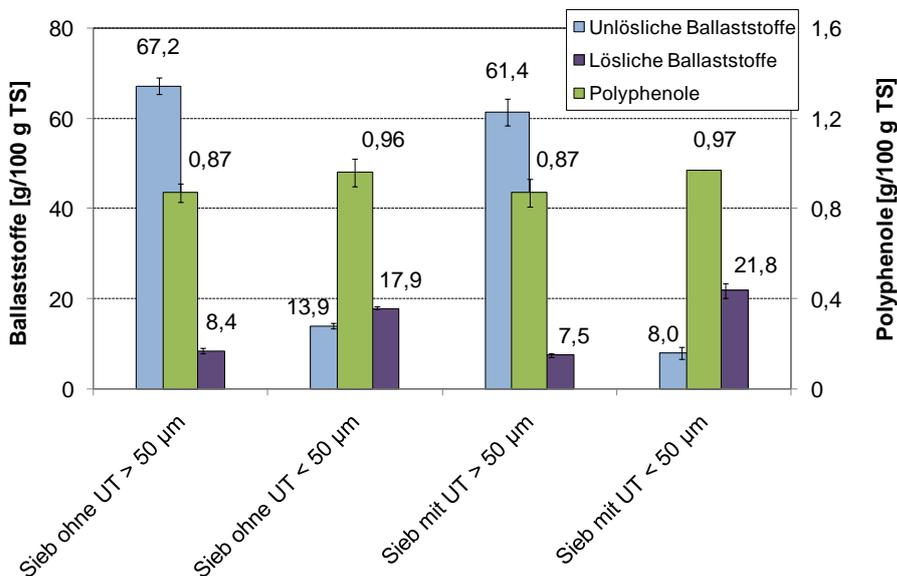


Abb. 64: Ballaststoffe und Polyphenole in verschiedenen Schlempefraktionen

Sowohl bei den unzerkleinerten als auch bei den zerkleinerten Schlempen kam es in der Fraktion > 50 µm zu einer Anreicherung an unlöslichen Ballaststoffen, wohingegen sich die löslichen Ballaststoffe in den Fraktionen < 50 µm anreicherten. Durch die Vorzerkleinerung nahmen die Gehalte unlöslicher Ballaststoffe in beiden Siebfraktionen ab. Insbesondere in der Siebfraktion < 50 µm fand sich ein hohes Verhältnis von löslichen zu unlöslichen Ballaststoffen. Es fiel jedoch auch hier wieder auf, dass die ermittelten Ballaststofffraktionen mit ca. 30 %

nur einen geringen Teil der Schlempeetrockensubstanz in den Fraktionen < 50 µm ausmachen und zu vermuten war, dass tatsächlich ein beträchtlicher Teil an ethanol-löslichen Oligosacchariden nicht erfasst wurde. Die Vorzerkleinerung hatte hinsichtlich der Polyphenolgehalte in den Schlempefraktionen keinen Effekt. Eine leichte Anreicherung in beiden Fraktionen < 50 µm ließ sich jedoch feststellen (Abb. 64). Die Zunahme der Polyphenolgehalte gegenüber den nativen Trestern (Charge 2006: 0,60 g/100 g TS) lag dabei im gleichen Größenbereich, wie bei den Laborversuchen.

Laurrauri et al. geben an, dass kommerzielle Ballaststoffpräparate einen Mindestgehalt an Gesamtballaststoffen von 50 % enthalten und fett- und kalorienarm sowie geruchs- und geschmacksneutral sind [50]. Tatsächlich weisen Ballaststoffpräparate aus verschiedenen Früchten und Getreide in der Regel Ballaststoffgehalte von 60 - 90 % auf [269]. Eine nähere Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ballaststoffe wurde nicht durchgeführt. Prinzipiell waren die gefundenen Gehalte an löslichen Ballaststoffen mit 18 - 22 % in Brennereischlempen im Vergleich zu herkömmlichen Präparaten als positiv zu bewerten (Tab. 25).

Für die Eignung als Ballaststoffe müssten die gewonnenen Fraktionen jedoch zunächst grundlegend hinsichtlich ihrer genauen chemischen Zusammensetzung, ihrer ernährungsphysiologischen Eigenschaften (antioxidatives Potential, Fermentation durch Mikroorganismen und Bildung kurzkettiger Fettsäuren) sowie ihrer funktionellen Eigenschaften (Wasserbindung, Rheologie) untersucht werden [27, 77, 89, 270].

**Tab. 25: Lösliche Ballaststoffe in Fasermaterialien  
(Auszug aus [47] verglichen mit Apfeltresterschlempe)**

<b>Material</b>	<b>Lösliche Ballaststoffe [%]</b>
Erbsenfasern	9
Johannisbeerfasern	12
Apfelfasern	13
Aroniafasern	16
<b>Apfeltresterschlempe</b>	<b>18 – 22</b>
Apfelfaser aufgeschlossen	26
Orangefasern	35

### 8.3 Zusammenfassende Wertung

In mechanisch-enzymatischen aufgeschlossenen Apfeltrestern reichern sich nach der Vergärung in Abhängigkeit des Enzymeinsatzes, der Enzymkonzentration und der Trestervorbehandlung unterschiedliche Mengen an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen sowie Polyphenole an. Nach dem Abdestillieren des Alkohols aus den Trestern finden sich in den Rückständen (Schlempen) erhöhte Gehalte an Gesamtpolyphenolen, deren Verfügbarkeit vermutlich durch die zusätzliche Hitzebehandlung erhöht wird. Die Abnahme der Gesamtballaststoffgehalte und der Restglucosemengen in den vergorenen Trestern korreliert dabei mit den Alkoholmehrausbeuten der verschiedenen Vergärungsvarianten. Der Vergleich der Ballaststoffgehalte mit den Gehalten an Neutralzuckerbausteinen deutet darauf hin, dass während des Abdestillierens möglicherweise Maillard-Reaktionen zwischen mono- und oligomeren Zuckerbausteinen und den Proteinkomponenten im Trester stattfinden. Zum anderen wird angenommen, dass ein Großteil der während der enzymatischen Verflüssigung und Verzuckerung freigesetzten kurzkettigen Oligomere aufgrund ihrer Ethanollöslichkeit mit Hilfe der angewendeten Ballaststoffanalytik nicht erfasst wird. Wie groß dieser Anteil ist und welche Auswirkung dieser auf die ernährungsphysiologischen und technologischen Eigenschaften der Ballaststoffe haben könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Brennereischlempen, die während der großtechnischen Alkoholerzeugung aus aufgeschlossenen und vergorenen Apfelsnasstrestern anfielen, wurden hinsichtlich ihres Gehaltes an Ballaststoffen und Polyphenolen untersucht. Durch einfache Vorzerkleinerungs- und Nasssiebungsschritte konnten vier Ballaststofffraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung gewonnen werden. Dabei hatte die Vorzerkleinerung auf die Verteilung der bioaktiven Stoffe in den verschiedenen einen geringeren Einfluss als die Siebfraktionierung. In den Siebfraktionen < 50 µm reicherten sich insbesondere lösliche Ballaststoffe und Polyphenole an, wobei der Gehalt an löslichen Ballaststoffen im Bereich kommerzieller Ballaststoffpräparate lag.

## 9 WEITERFÜHRENDE ARBEITEN

Da die Anforderungen an die chemische Zusammensetzung und die sensorischen Eigenschaften der zu erzeugenden Brände bei der Trinkalkoholherstellung von maßgeblicher Bedeutung sind und neben der Rohware im Wesentlichen durch die während der Vergärung gegebenen Milieubedingungen (insbesondere pH-Wert und Temperatur) beeinflusst werden, waren der Entwicklung eines praktikablen Laborverfahrens zur möglichst vollständigen Verzuckerung der Zellwandpolysaccharide enge Grenzen gesetzt.

Die angewandten Verfahrensschritte der enzymatischen Verflüssigung, Verzuckerung und Vergärung der Apfeltrester führten hinsichtlich der erreichten Fermentationsgrade zu erfolgversprechenden Ergebnissen. Dennoch verblieb ein bestimmter Teil an nicht genutztem Restpotential vergärbaren Zucker in den Rückständen des Verfahrens, der für die weitere Erhöhung der Alkoholausbeute eine maßgebliche Rolle spielen kann. Eine weitere Möglichkeit dieses bislang nicht genutzte Restpotential zu nutzen, bestünde in der Anwendung drastischerer Vorbehandlungsmaßnahmen, wie sie bei der Ethanolherstellung aus lignocellulosereichen Biomassen breite Anwendung finden. Dabei würden jedoch die hohen Temperaturen vermutlich größere Probleme hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung und der sensorischen Eigenschaften bereiten als die Verwendung verdünnter mineralischer Säuren.

Da Enzyme prinzipiell einen wichtigen Kostenfaktor bei der Anwendung in großtechnischen Prozessen darstellen, wäre desweiteren von großem Interesse, ob die eingesetzten Enzympräparate nach der Vergärung noch nutzbare Restaktivitäten aufweisen. Diese könnten möglicherweise nach geeigneter Aufarbeitung für nachfolgende Vergärungsansätze wiederverwendet werden und somit zu einem bestimmten Maße im Kreislauf geführt werden. Die Überprüfung von Möglichkeiten zum „Recycling“ der zellwandabbauenden Enzyme könnte ein Ansatzpunkt für weiterführende Forschungs- und Entwicklungsarbeiten sein.

Es stellte sich sowohl bei den Laborversuchen als auch bei den großtechnischen Versuchen heraus, dass weniger die Gärungsnebenprodukte als vielmehr der Methanolgehalt erwartungsgemäß ein kritischer Faktor bei der Verwendung pektinreicher Kernobsttrester für die Erzeugung von Trinkalkohol ist, und eben dieser Gehalt gesetzlich stark reglementiert wird. Das wesentliche Problem liegt in der nachgewiesenen Tatsache, dass der maximale Zellaufschluss nur dann gelingt, wenn neben den entsprechenden cellulolytischen Aktivitäten zur Freisetzung der vergärbaren Zucker ausreichende pektinolytische Hauptaktivitäten beteiligt sind, die die Pektinmatrix möglichst vollständig zerlegen, um den Zugang zu den Cellulosefibrillen zu erleichtern. Gerade dieser Aufschluss ist im Wesentlichen für die hohen Methanolgehalte verantwortlich und umso kritischer zu bewerten, je höher die Ausgangspektinergehalte und die Veresterungsgrade der Pektine sind.

Da die Trennung von Methanol und Ethanol bislang nur mit mäßigem Erfolg gelingt, könnten detaillierte Untersuchungen der Saftgewinnungsprozesse mit besonderem Hinblick auf die Verfahrensschritte Maischeenzymierung, Zerkleinerung und Maischeabpressen, weitere Ansatzpunkte für weiterführende Arbeiten bieten. Auf diese Weise könnten gezielte Aussagen getroffen werden, inwiefern die genannten Prozessschritte Einfluss nehmen auf die wesentlichsten Produktparameter (Tresterzusammensetzung, Destillatzusammensetzung) und auf Verfahrensparameter der nachfolgenden Schritte der Tresterbehandlung (sukzessive Zerkleinerungsoperationen, notwendige Enzymaktivitäten, Trester-Wasser-Verhältnis).

Im Hinblick auf die Praktikabilität großtechnischer Prozesse wären darüber hinaus zusätzliche Informationen über die physiko-chemischen Eigenschaften der verflüssigten Apfeltrester von großem Interesse. Ein weiter zu verfolgender Aspekt könnte demzufolge die Ermittlung des rheologischen Verhaltens (u. a. scherabhängiges Fließverhalten) von Apfeltrestersuspensionen sein, da anzunehmen ist, dass dieses wie bei allen Feststoffdispersionen neben der Temperatur im Wesentlichen von der Feststoffkonzentration, der chemischen Zusammensetzung, der Partikelgröße und der Partikelwechselwirkungen untereinander, beeinflusst wird.

Die Nutzung der Schlemphen als Reststoffe des Verfahrens für die Gewinnung weiterer Wertstoffe hängt maßgeblich vom Gehalt und der Zusammensetzung der interessierenden Fraktionen ab. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten bioaktiven Stofffraktionen, wie lösliche Ballaststoffe und Gesamtpolyphenole deuten darauf hin, dass Apfeltresterschlemphen grundsätzlich noch entsprechende Gehalte der in Frage kommenden Fraktionen enthalten. Nähere Aussagen zur Eignung dieser Stoffe ergäben sich durch die gezielte Charakterisierung der gewonnenen Fraktionen hinsichtlich ihrer physiko-chemischen sowie ernährungsphysiologischen Eigenschaften, wenn möglich nach entsprechender Veredelung (Aufarbeitung zu Zellwandpräparaten). Desweiteren wäre eine nähere Charakterisierung der im Rahmen der hier angewendeten Ballaststoffanalytik nicht erfassten ethanollöslichen, oligomeren Bestandteile von großem Interesse. Gleiches gilt für die Polyphenole. So könnte ein weiterer Aspekt für Forschungsarbeiten die genauere Untersuchung der Polyphenolfractionen mittels chromatographischer Methoden, z. B. HPLC, sein sowie die Ermittlung deren antioxidativen Potentials.

In größerem Maßstab ließen sich die Obstschlemphen darüberhinaus im Sinne einer energetischen Verwertung für die Biogaserzeugung (mehrstufige anaerobe Fermentation zu Methan) einsetzen. Zwar mit vergleichsweise geringen Trockensubstanzgehalten von 2 – 3 %, jedoch hohem Zerkleinerungsgrad und hohem relativen Anteil an organischer Trockensubstanz (ca. 95 %) könnten dabei Biogaserträge (TS-bezogen) erreicht werden, die im Bereich der Werte für andere häufig verwendete Substrate (z. B. Gülle oder Getreidesilage) liegen [271, 272]. Weitere Maßnahmen, wie die Verfütterung und Düngung, wären erst nach entsprechenden Aufbereitungsschritten (u. a. pH-Wert-Regulierung) denkbar, spielen jedoch eher eine untergeordnete Rolle.

Für den Scale-Up der erarbeiteten Prozessschritte in ein funktionsfähiges und ökonomisches Gesamtverfahren (großtechnische Versuchsanlage/Produktionsanlage) wären insbesondere die Schritte der mechanischen Zerkleinerung zu überdenken. Hocheffektive Zerkleinerungsverfahren zur Erzielung geringer Partikelgrößen ließen sich möglicherweise durch leistungsstarke Dispergiermaschinen (z. B. Dispax-Reactor<sup>®</sup>, IKA Deutschland) erzielen, für die jedoch vergleichsweise dünnflüssige Substrate vorliegen müssten. Der dafür notwendige Voraufschluss könnte mehrstufig mit Hilfe von Rätz- oder Hammermühlen in Kombination mit dem enzymatischen Aufschluss erfolgen. Im Hinblick auf die ökonomische Effizienz des Gesamtverfahrens (u. a. Reduzierung der Energiekosten für Destillation/Rektifikation) läge das Hauptaugenmerk dabei im Wesentlichen auf der Minimierung der zuzusetzenden Wassermengen.

## 10 ZUSAMMENFASSUNG

Apfeltrester sind die Rückstände bei der Apfelsaftherstellung und fallen jährlich zu großen Mengen als industrielle Reststoffe an. In Abhängigkeit von der Rohware und der Technologie der Saftgewinnung besitzen Apfeltrester eine Trockensubstanz von 20 - 30 %, die sich zum größten Teil aus löslichen Restzuckern, unlöslichen Zellwandpolysacchariden sowie Proteinen, Mineralstoffen, Lignin und phenolischen Verbindungen zusammensetzen. Neben der traditionellen Verwertung von Apfeltrestern, wie der Tierverfütterung oder der Kompostierung versucht man die Trester heutzutage im Sinne der Wertstoffgewinnung einer sinnvollen Wiederverwertung zuzuführen. Aus industrieller Sicht hat sich dabei die Gewinnung von Pektin unter Anwendung geeigneter Extraktions- und Aufarbeitungsmaßnahmen etabliert. Moderne technische Prozesse ermöglichen darüberhinaus die Gewinnung weiterer wertgebender Lebensmittelinhaltsstoffe, wie Aromen, Süßstoffe oder Polyphenole durch die gezielte Aufteilung der Stoffströme während und nach der Pektinextraktion. Dennoch verbleiben auch bei solchen Verfahren größere Mengen an Reststoffen (entpektinisierte Trester), die letztendlich wieder der Tierverfütterung zugeführt werden.

Bei der Apfelverarbeitung zu Fruchtsaft wird der größte Teil an löslichen Bestandteilen in den Saft überführt, während sich in den zurückbleibenden Nasstrestern unlösliche Zellwandbestandteile, darunter im Wesentlichen Zellwandpolysaccharide, anreichern. Pflanzliche Zellwände bestehen zum größten Teil aus Cellulose, Hemicellulosen und Pektin, die innerhalb der verschiedenen Zellwandbereiche über unterschiedliche Bindungsformen miteinander verknüpft bzw. verankert sind. Durch geeignete physikalische, chemische bzw. enzymatische Verfahren lassen sich pflanzliche Gewebe und Zellwandstrukturen zu einem bestimmten Grad abbauen. Physikalische Verfahren, darunter mechanische und thermische Verfahren, beeinflussen die Struktur von Zellgeweben insbesondere hinsichtlich der Partikelbeschaffenheit, -größe und -form und führen in Abhängigkeit von den Milieubedingungen (Wassergehalt, Temperatur, pH-Wert) zu Veränderungen des physikalischen Zustandes (z. B. Partikulierung, Gewebeerweichung). Dahingegen lassen sich durch Anwendung chemischer Verfahren in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen Polysaccharidfraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung gewinnen. Am spezifischsten gelingt der Zellwandabbau hingegen durch den Einsatz zellwandabbauender Enzyme, welche sich entsprechend ihrer Hauptaktivitäten grob in die drei Klassen der Pektinasen, Hemicellulasen und Cellulasen unterteilen lassen. Kommerzielle Enzympräparate mikrobieller Herkunft, die in der obst- und gemüseverarbeitenden Industrie für verschiedenste Zwecke eingesetzt werden, besitzen neben den ausgewiesenen Hauptaktivitäten verschiedene Begleit- bzw. Nebenaktivitäten. Für die möglichst vollständige Verflüssigung und Verzuckerung der Zellwandpolymere zu Oligo- und Monomeren müssen die verschiedenen pektinolytischen, hemicellulolytischen und cellulolytischen Aktivitäten zur Ausnutzung synergistischer Wechselwirkungseffekte miteinander kombiniert werden.

Im Gegensatz zur Fruchtsaftherstellung ist der Einsatz von Cellulasen in Brennereien für die Verarbeitung von Obst zu Obstbränden nicht ausdrücklich verboten. Dies eröffnet prinzipiell die Möglichkeit den Grad der Verflüssigung und Verzuckerung polysaccharidreicher Biomassen im Gegensatz zur alleinigen Anwendung pektinolytischer Enzyme zu erhöhen und insbesondere das in der Regel nicht oder nur schwer verfügbare Potential an zusätzlichen vergärbaren Zuckern in Form der in der Cellulose gebundenen Glucose zu nutzen. Das Erreichen hoher Alkoholausbeuten unter der Vorgabe der Einhaltung der wichtigsten Qualitätsparameter, wie der chemischen Zusammensetzung und der sensorischen Eigenschaften, stellt dabei

eine große Herausforderung an die notwendige Verfahrens- und Produktentwicklung der Obstbranderzeugung dar.

Im Rahmen der Erarbeitung von Prozesstechniken für eine großtechnische Produktionsanlage zur Obstbrandherstellung war ein praktikables Laborverfahren zur möglichst vollständigen Verflüssigung, Verzuckerung und Vergärung von Apfelnasstrestern zu entwickeln. Zu diesem Zweck war zunächst ein umfangreiches Methodenspektrum (Labormaßstab, Analytik) zu erarbeiten bzw. anzupassen mit dem die wichtigsten Produkt- und Prozessparameter ermittelt werden konnten. So wurde die Zusammensetzung der verschiedenen Apfeltrestermaterialien (Fasern sowie native, säurehydrolysierte, vergorene und abdestillierte Trester) mit Hilfe enzymatischer Testkits, der gaschromatographischen Neutralzuckeranalyse sowie verschiedener photometrischer und nasschemischer Inhaltsstoffanalysen untersucht. Zur Ermittlung der Verflüssigungs- und Verzuckerungsleistung zellwandabbauender Enzyme wurden die gesamt freigesetzten reduzierenden Zucker, sowie einzelne monomere und dimere Zellwandbausteine, darunter Glucose, Cellobiose und Galacturonsäure mittels photometrischer und chromatographischer Bestimmungsmethoden ermittelt. Mit Hilfe des Torsionsschwingers Rheoswing® konnte eine einfache Referenzmethode für die Abbauleistung verflüssigender Enzyme anhand der Viskositätsabnahme in scherunabhängigen Versuchen ermittelt werden. Für die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung physikalisch vorbehandelter Apfelnasstrester wurde eine Methode zur automatischen Partikeldetektion und Größenanalyse der zerkleinerten Apfeltresterpartikel mit Hilfe bildanalytischer Verfahren etabliert, die die Ermittlung von Massenhäufigkeitsverteilungen verschiedener Partikelgrößenfraktionen ermöglichte.

Für die Vergärungsversuche im Batch-Verfahren wurde eine Laborapparatur errichtet, die sowohl die anaerobe Fermentation der Tresteransätze als auch die Ermittlung der wichtigsten Prozessparameter, wie den Gehalt löslicher Glucose und die Freisetzung von Kohlendioxid (indirekt), während der Vergärung erlaubte. Die Gewinnung des Alkohols erfolgte in einer einfachen Labordestillationsapparatur.

Im Rahmen der Entwicklung des Laborverfahrens wurden zunächst verschiedene kommerzielle zellwandabbauende Enzympräparate hinsichtlich ihrer Haupt- und Nebenaktivitäten gegenüber Modellsubstraten charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass neben den Cellulasepräparaten, die erwartungsgemäß hohe Exo-Cellulase- und Xylanase-Aktivitäten aufwiesen auch die pektinolytischen Präparate zum Teil entsprechend hohe Begleitaktivitäten zeigten. Insbesondere zwei Pektinase-Präparate wiesen hohe Aktivitäten gegenüber Cellobiose auf. Der Vergleich der Ergebnisse der Aktivitäten ermittelt über die freigesetzten, reduzierenden Endgruppen und die Viskositätsabnahme der entsprechenden Substratlösungen, machte deutlich, dass sich die rheologische Methode mit Hilfe des Rheoswing® durchaus für die Ermittlung der Anfangskinetik enzymatischer Abbaureaktionen sehr gut eignet, jedoch ab einem bestimmten Abbaugrad aufgrund der reduzierten Kettenlängen der Oligosaccharide anhand des Viskositätslevels keine weiteren Kettenspaltungen detektiert werden können.

Die Untersuchungen gegenüber gereinigten, getrockneten Apfeltresterfasern zeigten, dass die Freisetzung reduzierender Zucker und Glucose stark durch die Entpektinierung der Trester beeinflusst wird. Die höheren Aktivitäten der Cellulasen wurden auf den Teilabbau des Pektin-Hemicellulose-Netzwerkes zurückgeführt. Es zeigte sich auch, dass trotz zweimaliger saurer Extraktion bei der Faser-Herstellung noch Restgehalte an Pektin in den Materialien verblieben. Die Kombination von Pektinase und Cellulase führte in Abhängigkeit von der Faserart und der eingesetzten Pektinase zu überadditiven Wechselwirkungseffekten hinsichtlich der

Zuckerfreisetzung. Die prozentual freigesetzten Glucosemengen aus den Fasern waren jedoch vermutlich aufgrund der relativ kurzen Inkubationszeiten verhältnismäßig gering.

Die für die Enzymierungs- und Vergärungsversuche verwendeten Apfelnasstresters setzten sich zum größten Teil aus löslichen Restzuckern und unlöslichen Zellwandpolysacchariden zusammen. Alle ermittelten Kennwerte lagen im Bereich der Literaturdaten. Zur Ermittlung einer optimalen Enzymvariante, mit der die Freisetzung vergärbarer Zucker, insbesondere Glucose, maximiert werden sollte, wurden ausgewählte Pektinasen einzeln und in Ein- und Zweifach-Kombination mit cellulolytischen Enzympräparaten gegenüber Apfelnasstrestern getestet. Dabei zeigten sich in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer, der Enzymkombination und der verwendeten Pektinase signifikante Wechselwirkungseffekte hinsichtlich der Zuckerfreisetzung. So konnten nach 48-stündiger Enzymeinwirkung nach mechanischem Standardvoraufschluss und erhöhter Enzymkonzentration mit dem Enzym-Mix PEC/CFD/NZ knapp 90 % der gesamten im Material verfügbaren Glucose freigesetzt werden, was einem Hydrolysegrad (Freisetzung unlöslicher Glucose) von 79 % entsprach.

Durch die Enzymeinwirkung kommt es zum starken Abbau der Pektinmatrix, was aufgrund erhöhter Gehalte an freier Galacturonsäure zur Absenkung des pH-Wertes führt. Durch den zusätzlichen physikalischen Voraufschluss ließ sich insbesondere durch die Hochdruckhomogenisierung ein zusätzlicher Zerkleinerungseffekt der mechanisch voraufgeschlossenen Apfelnasstresters erzeugen, der zu einer signifikanten Erhöhung der Glucosefreisetzung nach enzymatischer Behandlung führte. Die Zerkleinerungseffekte durch Ultraschall und Autoklavenbehandlung waren eher gering. Es wurde angenommen, dass die zusätzliche Zuckerfreisetzung durch die Autoklavenbehandlung auf einem verbesserten physikalischen Zustand des Zellgewebes beruhte und so eine bessere Zugänglichkeit der Enzyme zu den Cellulosefibrillen durch die Erweichung der amorphen Pektinmatrix ermöglicht wurde. Die durch die Autoklavenbehandlung und die Hochdruckhomogenisierung erzielten hohen Glucoseausbeuten korrelierten dabei auch mit den vergleichsweise hohen spezifischen Energieeinträgen bei den entsprechenden Prozessschritten.

Die Erhöhung des Tresteranteils in den Enzymierungsansätzen führte erwartungsgemäß zu hohen Anfangsviskositäten der entsprechenden Varianten und zu einer verzögerten Abnahme der Prozessviskosität über den Zeitraum der Inkubation. Trotz der Erhöhung der Anfangszuckergerhalte wurde mit zunehmendem Tresteranteil in den Versuchsansätzen weniger Glucose freigesetzt, was im wesentlichen auf die verstärkten Partikelwechselwirkungen und die herabgesetzte Aktivität hydrolytisch spaltender Enzyme durch die geringeren Wassergehalte zurückgeführt wurde.

Durch die simultane Verflüssigung, Verzuckerung und Vergärung von nativen Apfelnasstrestern nach mechanisch-enzymatischem Standard-Voraufschluss konnte mit Hilfe der Enzym-Vorzugsvariante PEC/CFD/NZ eine Alkoholausbeute von maximal 81,2 % erzielt werden. Das Erreichen eines Gesamtfermentationsgrades von 88,3 % wies dabei auf nicht vermeidbare Alkoholverluste hin. Die Zugabe des Enzymmix zu Beginn des Aufschlusses erwies sich als beste Variante im Vergleich zur gestaffelten Enzymzugabe oder zur alleinigen Anwendung hochverfüssigender Pektinasepräparate. So konnte im besten Fall ein Hydrolysegrad von 55,1 % erreicht werden.

Eine zusätzliche Trestervorerhitzung zur Inaktivierung der nativen Mikroorganismenflora führte zu keiner signifikanten Erhöhung der Alkoholausbeute. Durch den Einsatz einer gärstarken Brennereihefe konnten die entsprechenden Tresteransätze innerhalb von 20 Stunden vergoren werden. Die gewonnenen Destillate wiesen im Allgemeinen die üblichen Gehalte an typi-

schen Gärungsnebenprodukten, darunter Acetaldehyd, Essigester und höhere Alkohole auf. Als kritisch zu bewerten waren hingegen die hohen Methanolgehalte, die auf die Wirkung von Pektinmethylesterasen zurückzuführen waren.

Die Vergärung säurehydrolysierter Apfeltrester führte zwar absolut zu geringeren Alkoholausbeuten. Die Hydrolysegrade waren jedoch aufgrund des relativ höheren Anteils unlöslicher vergärbare Zucker im Vergleich zu den nativen Trestern erhöht. Dennoch ist deren Verwendung für die Erzeugung zu Trinkalkohol ohne weitere Aufarbeitung nicht zu empfehlen, da die Methanolgehalte insbesondere im Fall der Slow-set-Variante stark erhöht waren. Bezogen auf die Trestertrockensubstanz waren die Pektingehalte und die Veresterungsgrade in den hydrolysierten Trestern nur geringfügig herabgesenkt worden. Es wurde geschlussfolgert, dass lösliche Pektine nach der Hydrolyse im Zellgewebe verankert bleiben und damit nur teilweise entfernt werden und der Angriff dieser Pektinfraktionen durch pektinolytische Enzyme besonders begünstigt wird.

In den vergorenen und abdestillierten Apfeltrestern reichern sich in Abhängigkeit von der Trestervorbehandlung und Enzymkonzentration unterschiedliche Mengen unlöslicher und löslicher Ballaststofffraktionen sowie Polyphenole an, die durch geeignete Nachbehandlungs- und Aufarbeitungsmaßnahmen einer Wiederverwertung als funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe genutzt werden könnten. Von großem Interesse könnten dabei aus ernährungsphysiologischer Sicht lösliche Ballaststoffe sein, die im Rahmen der hier durchgeführten Ballaststoffanalytik nicht erfasst wurden.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass sich Apfelnasstrester grundsätzlich zur Herstellung von Obstbränden eignen. Durch die geschickte Kombination zellwandabbauender Enzyme mit entsprechenden komplementären Wirkungsmechanismen und effektiven physikalischen Aufschlussverfahren konnten erfolgversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Freisetzung zusätzlich vergärbare Zucker, deren Umwandlung zu Ethanol und der dadurch erzielten höheren Alkoholausbeute verzeichnet werden. Kritisch zu bewerten sind die erwartungsgemäß hohen Methanolgehalte der erzeugten Destillate. Umfangreichere Untersuchungen insbesondere unter Einbeziehung der Technologie zur Saftgewinnung könnten zu weiteren Fortschritten hinsichtlich der untersuchten Thematik führen. Ein weiterer Ansatz für weiterführende Forschungsarbeiten könnte die nähere Charakterisierung der Rückstände des entwickelten Verfahrens sein, insbesondere des spezifischen Gehalts an bioaktiven Stoffen sowie deren genaue Zusammensetzung und die Ermittlung physiko-chemischer und ernährungsphysiologischer Parameter.

Im Rahmen eines möglichen Scale-ups der Prozessführung auf die großtechnische Versuchsanlage bzw. die Produktionsanlage müssten Lösungsmöglichkeiten für effiziente Zerkleinerungsoperationen in Kombinationen mit geeigneten enzymatischen Aufschlussvarianten erarbeitet werden, um eine stufenweise Reduzierung der Partikelgröße bei gleichzeitiger Absenkung der Prozessviskosität zu erreichen und somit die Basis für ein praktikables und ökonomisches Gesamtverfahren zu schaffen.

## 11 LITERATUR

1. VDF (2006) *Geschäftsbericht 2005*. Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e. V., Trier/Bonn
2. Kennedy, M., List, D., Lu, Y., Foo, L. Y., Newman, R. H., Sims, M., Bain, P. J. S., Hamilton, B., Fenton, G. (1999) *Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis*. In: Linskens, H.-F., Jackson, J. F. (eds.) *Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 20 Analysis of Plant Waste Materials*. Springer, Berlin, p. 75-119.
3. Binnig, R., Salewski, J. (1997) *Apfeltrester als Futterwert in der Tierernährung*. Flüssiges Obst **1**, 22-25
4. Joshi, V. K., Sandhu, D. K. (1996) *Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace*. Bioresource Technology **56**, 251-255
5. Nussbaum, H. (2004) *Silage aus Apfeltrester mit und ohne Siliermittel*. Landinfo **6**, 55-59
6. Villas-Bôas, S. G., Esposito, E., Matos de Mendonca, M. (2003) *Bioconversion of apple pomace into a enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus**. World Journal of Microbiology & Biotechnology **19**, 461-467
7. May, C. D. (1990) *Industrial pectins: Sources, production and applications*. Carbohydrate Polymers **12**, 79-99
8. Pilgrim, G. W., Walter, R. H., Oakenfull, D. G. (1991) *Jams, jellies, and preserves*. In: Walter, R. H. (ed.) *The chemistry and technology of pectin*. Academic Press Inc., San Diego, p. 24-50.
9. Rolin, C. (2002) *Commercial pectin preparations*. In: Seymour, G. B., Knox, J. P. (eds.) *Pectins and their manipulation*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p. 222-239.
10. Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J.-F., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. (1995) *Pectins*. In: Stephen, A. M. (ed.) *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker Inc., New York, p. 287-339.
11. Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., Asenjo, F. (2005) *Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment*. Food Chemistry **91**, 395-401
12. Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreß, H.-U., Rentschler, C., Carle, R. (2003) *A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace*. Innovative Food Science and Emerging Technologies **4**, 99-107
13. Sudha, M. L., Baskaran, V., Leelavathi, K. (2007) *Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making*. Food Chemistry **194**, 686-692
14. Sandhu, D. K., Joshi, V. K. (1997) *Solid state fermentation of apple pomace for concomitant production of ethanol and animal feed*. Journal of Scientific and Industrial Research **56**, 86-90
15. Das, H., Singh, S. K. (2004) *Useful byproducts from cellulosic wastes of agricultural and food industry - a critical appraisal*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **44**, 77-89
16. Knauf, M., Moniruzzaman, M. (2004) *Lignocellulosic biomass processing: a respective*. International Sugar Journal **106**, 147-150
17. Peterson, J. B. D. (2006) *Ethanol production from agricultural residues*. International Sugar Journal **108**, 177-180
18. Lloyd, T. A., Wyman, C. E. (2005) *Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids*. Bioresource technology **96**, 1967-1977

19. Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzaple, M., Ladisch, M. R., Lee, Y. Y. (2005) *Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies*. *Bioresource Technology* **96**, 1959-1966
20. Pilnik, W., Voragen, A. G. J. (1991) *The significance of endogenous and exogenous pectic enzymes in fruit and vegetable processing*. In: *Food enzymology Vol. 1*. Elsevier, London, p. 303-335.
21. Voragen, A. G. J., Schols, H. A., Beldman, G. (1992) *Maßgeschneiderte Enzyme in der Fruchtsaftherstellung*. *Flüssiges Obst* **59**, 404-410
22. Urlaub, R. (1996) *Vorteile der enzymatischen Apfelmatsche-Behandlung und der Apfeltrester-Verflüssigung*. *Flüssiges Obst* **63**, 377-382
23. Urlaub, R. (2000) *Enzymtechnologie im Überblick: Anwendungspotentiale und aktuelle Entwicklungen*. *Flüssiges Obst* **9**, 515-525
24. Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. (2005) *Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol*. *Biotechnology Progress* **21**, 816-822
25. Sun, Y., Cheng, J. J. (2005) *Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production*. *Bioresource technology* **96**, 1599-1606
26. Bauckhage, K. (2000) *Einsatz cellulasehaltiger Enzympräparate zur Behandlung von Apfeltrester- Analysendaten und wertgebende Inhaltstoffe der gewonnenen Produkte*. *Flüssiges Obst* **5**, 288-293
27. Sembries, S. (2000) *Einsatz cellulosehaltiger Enzympräparate zur Behandlung von Apfeltrester - Ernährungsphysiologische Aspekte der Ballaststoffe*. *Flüssiges Obst* **5**, 294-298
28. Will, F., Bauckhage, K., Dietrich, H. (2000) *Apple pomace liquefaction with pectinases and cellulases: analytical data of the corresponding juices*. *European Food Research & Technology* **211**, 291-297
29. Gupta, L. K., Pathak, G., Tiwari, R. P. (1990) *Effect of nutrition variables on solid state alcoholic fermentation of apple pomace by yeasts*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **50**, 55-62
30. Joshi, V. K., Sandhu, D. K., Jaiswal, S. (1995) *Effect of addition of SO<sub>2</sub> on solid-state fermentation of apple pomace*. *Current Science* **69**, 263-264
31. Schobinger, H. U., *Frucht- und Gemüsesäfte*. 1987, Stuttgart: Ulmer.
32. Höhn, A., Sun, D., Nolle, F. (2005) *Enzymes in the fruit juice and wine industry*. In: Barret, D. M., Somogyi, L.Ramaswamy, H. (eds.) *Processing Fruits - Science and technology*. CRC Press, Boca Raton, p. 97-112.
33. Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J. L. (1998) *Industrial applications of pectic enzymes: a review*. *Process Biochemistry* **33**, 21-28
34. Rutledge, P. (1996) *Production of non-fermented fruit products*. In: Arthey, D.Ashurst, P. R. (eds.) *Fruit processing*. Blackie Academic & Professional, London, p. 196-220.
35. Root, W. H., Barret, D. M. (2005) *Apples and apple processing*. In: Barret, D. M., Somogyi, L.Ramaswamy, H. (eds.) *Processing Fruits - Science and technology*. CRC Press, Boca Raton.
36. Cohn, R., Cohn, A. L. (1996) *The by-products of fruit processing*. In: Arthey, D.Ashurst, P. R. (eds.) *Fruit processing*. Blackie Academic & Professional, London, p. 196-220.
37. VDF (2001) *Die Möglichkeiten der Verwertung von Trestern aus der Fruchtsaftherstellung*. Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e. V., Trier/Bonn
38. Brett, C. T., Waldron, K. W., *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. 1996, London: Chapman & Hall.

39. Nawirska, A., Kwasniewska, M. (2005) *Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste*. Food Chemistry **91**, 221-225
40. Hatfield, R. D., Jung, H. J. G., Ralph, J., Buxton, D. R., Weimer, P. J. (1994) *A comparison of the insoluble residues produced by Klason Lignin and acid detergent lignin procedures*. Journal of the Science of Food and Agriculture **65**, 51-58
41. Gullón, B., Falqué, E., Alonso, J. L., Parajó, J. C. (2007) *Evaluation of apple pomace as a raw material for alternative applications in food industries*. Food Technology and Biotechnology **45**, 426-433
42. Arrigoni, E., Caprez, A., Amadò, R., Neukom, H. (1986) *Chemical composition and physical properties of modified dietary fibre sources*. Food Hydrocolloids **1**, 57-64
43. Ternes, W., *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung*. 1998, Hamburg: Behr's.
44. Souci-Fachmann-Kraut, *Lebensmitteltabelle für die Praxis*. 1991, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
45. Selvendran, R. R., Robertson, J. A. *Dietary fibre in foods: amount and type*. in *Physico-chemical properties of dietary fibre and effect of processing on micronutrients availability, Proceedings of a workshop*. 1994. Carry Le Rouet-Marseille, France.
46. Chesson, A. (1995) *Dietary Fiber*. In: Stephen, A. M. (ed.) *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York, p. 547-566.
47. Endress, H. U. *Ballaststoffe - Definitionen und Anwendungen aus technologischer und ernährungsphysiologischer Sicht*. www.herbafood.de - Herbafood Ingredients GmbH
48. Bollinger, H. (1999) *Functional Food (Erfolgreiche 2. Generation) Einsatz von Ballaststoffen als multifunktionelle Komponente*. Lebensmitteltechnik **31**, 20-23
49. Harris, P., Morrison, A., Dacombe, C. (1995) *A practical approach in polysaccharide analysis*. In: Stephen, A. M. (ed.) *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, New York, p. 547-566.
50. Laurrauri, J. A. (1999) *New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products*. Trends in Food Science & Technology **10**, 3-8
51. Schulze, J., Bock, W., *Aktuelle Aspekte der Ballaststoffforschung*. 1993, Hamburg: Behr's.
52. Henn, T., Kunz, B. (1996) *Pflanzliche Reststoffe zur Herstellung von Functional Drinks*. Flüssiges Obst **63**, 715-719
53. Schieber, A., Stintzing, F. C., Carle, R. (2001) *By-products of plant food processing as a source of functional food compounds - recent developments*. Trends in Food Science & Technology **12**, 401-413
54. Schieber, A., Hilt, P., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. (2002) *Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new HPLC stationary phase with hydrophilic end-capping*. Journal of Separation Science **25**, 361-364
55. Steingass, H., Haussner, A. (1988) *Futterwert von Obsttrester*. Confructastudien **3**, 96-104
56. Endress, H. U. (2000) *High quality resulting from product integrated protection - PIUS*. Fruit processing **10**, 273-276
57. Endress, H. U. (1990) *Polysaccharide in den Zellwänden höherer Pflanzen*. Industrielle Obst- und Gemüseverwertung **75**, 250-264
58. Thakur, B. R., Rakesh, K. S., Handa, A. K. (1997) *Chemistry and uses of pectin - a review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition **37**, 47-73

59. Faravash, R. S., Ashtiani, F. Z. (2008) *The influence of acid volume, ethanol-to-extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace*. Food Hydrocolloids **22**, 196-202
60. Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., Wathelet, B. (2007) *Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol*. Journal of Food Science **72**, C1-C9
61. Hwang, J.-K., Kim, C.-J., Kim, C.-T. (1998) *Extrusion of apple pomace facilitates pectin extraction*. Journal of Food Science **63**, 1-4
62. Jarvis, M. C. (2002) *Biophysical properties of pectins*. In: Seymour, G. B., Knox, J. P. (eds.) *Pectins and their manipulation*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p. 99-130.
63. Axelos, M. A. V., Thibault, J.-F. (1991) *The chemistry of low-methoxyl pectin gelation*. In: Walter, R. H. (ed.) *The chemistry and technology of pectin*. Academic Press Inc., San Diego, p. 109-118.
64. Oakenfull, D. G. (1991) *The chemistry of high-methoxyl pectins*. In: Walter, R. H. (ed.) *The chemistry and technology of pectin*. Academic Press Inc., San Diego, p. 87-108.
65. Walter, R. H., Sherman, R. M. (1984) *Flow profiles of aqueous dispersed pectins*. Journal of Food Science **49**, 67-69
66. Michel, F., Thibault, J.-F., Doublier, J.-L. (1984) *Viscosimetric and potentiometric study of high-methoxyl pectins in the presence of sucrose*. Carbohydrate Polymers **4**, 283-297
67. Herbstreith & Fox-Broschüre: *Pektin - Das Naturprodukt*.
68. Diaz, J. V., Anthon, G. E., Barret, D. M. (2007) *Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**, 5131-5136
69. Fraeye, I., de Roeck, A., Duvetter, T., Verlent, I., Hendrickx, M., van Loey, A. (2007) *Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation*. Food Chemistry **105**, 555-563
70. Kravtchenko, T. P., Arnould, I., Voragen, A. G. J., Pilnik, W. (1992) *Improvement of the selective depolymerisation of pectic substances by chemical  $\beta$ -elimination in aqueous solution*. Carbohydrate Polymers **19**, 237-242
71. Renard, C. M. G. C., Thibault, J.-F. (1996) *Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation*. Carbohydrate Research **286**, 139-150
72. Kunzek, H., Kabbert, R. (1997) *Die Bedeutung zellstrukturierter Materialien für die Obst- und Gemüseverarbeitung*. Industrielle Obst- und Gemüseverwertung **82** (1), 2-9
73. Kunzek, H., Kabbert, R., Gloyna, D. (1999) *Aspects of material science in food processing: changes in plant cell walls of fruits and vegetables*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **208**, 233-250
74. Schalow, S., Kunzek, H. (2004) *The influence of predrying treatment and of suspension solution conditions on the rehydration of apple cell wall materials*. European Food Research & Technology **219**, 329-340
75. Kunzek, H., Vetter, S. (2001) *Funktionelle Eigenschaften von Lebensmittelbestandteilen und die Entwicklung innovativer Produkte*. Deutsche Lebensmittel Rundschau **97**, 12-22
76. Timamo, A., Kern, K., Kunzek, H. (2005) *Vergleichende Herstellung eines Gelierpulvers sowie Pektin und Zellwandpräparaten bei der rückstandsarmen Apfelverarbeitung*. Deutsche Lebensmittel Rundschau **101**, 437-446
77. Kunzek, H. (2005) *Hydratationseigenschaften von Zellwandmaterialien und Ballaststoffen*. Deutsche Lebensmittel Rundschau **101**, 236-255

78. Senge, B., Opel, H., Kunzek, H. (1996) *Rheologische Untersuchungen von zellstrukturierten Materialien. 1. Mitteilung: Konventionelle Untersuchung von zellstrukturiertem Apfelmateriale*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **203**, 351-365
79. Kunzek, H., Opel, H., Senge, B. (1997) *Rheological examination of material with cellular structure. II. Creep and oscillation measurements of apple material with cellular structure*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **205**, 193-203
80. Kunzek, H., Kruse, R., Neumann, A. (1996) *Rückstandsarme Apfelerarbeitung - 2. Mitteilung*. Flüssiges Obst **63**, 314-319
81. Renard, C. M. G. C., Thibault, J.-F. (1991) *Composition and physico-chemical properties of apple fibres from fresh fruits and industrial products*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **24**, 523-527
82. Massiot, P., Rouau, X., Thibault, J.-F. (1987) *Characterisation of cell-wall polysaccharides of carrot*. Food Hydrocolloids **1**, 541-544
83. Massiot, P., Thibault, J.-F. (1989) *Enzymic analysis of carrot cell-wall polysaccharides*. Carbohydrate Research **190**, 121-136
84. Blakeney, A. B., Harris, P. J., Stone, B. A. (1983) *A simple and rapid preparation of alditole acetates for monosaccharide analysis*. Carbohydrate Research **113**, 291-299
85. Brillouet, J.-M., Rouau, X., Hoebler, C., Barry, J.-L., Carré, B., Lorta, E. (1988) *A new method for determination of insoluble cell walls and soluble nonstarchy polysaccharides from plant materials*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **36**, 969-979
86. Villanueva-Suárez, M. J., Redondo-Cuenca, A., Rodríguez-Sevilla, M. D., de las Heras Martínez, M. (2003) *Characterization of nonstarch polysaccharides content from different edible organs of some vegetables, determined by GC and HPLC: comparative study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**, 5950-5955
87. Vorage, F. 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*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **177**, 251-256
88. Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., Drilleau, J.-F. (2003) *Variability of the polyphenolic composition of cider apple (Malus domestica) fruits and juices*. Journal of the Science of Food and Agriculture **51**, 6240-6247
89. Boyer, J., Liu, R. H. (2004) *Apple phytochemicals and their health benefits*. Nutrition Journal **3:5**
90. Lu, Y., Foo, L. Y. (1997) *Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace*. Food Chemistry **59**, 187-194
91. Lu, Y., Foo, L. Y. (2000) *Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace*. Food Chemistry **68**, 81-85
92. Van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A. D., Jongen, W. M. F. (2001) *Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**, 3606-3613
93. Baltes, W., *Lebensmittelchemie*. 1995, Berlin: Springer.
94. Kammerer, D. R., Schieber, A., Carle, R. (2005) *Polyphenole in pflanzlichen Lebensmitteln - ein Paradigmenwechsel*. Ernährung im Fokus **5**, 91-95
95. Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J.-F. (2001) *Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences*. International Journal of Biological Macromolecules **29**, 115-125
96. Hang, Y. D., Lee, C. Y., Woodams, E. E. (1982) *A solid state fermentation system for production of ethanol from apple pomace*. Journal of Food Science **47**, 1851-1852

97. Ngadi, M. O., Correia, L. R. (1992) *Kinetics of solid-state ethanol fermentation from apple pomace*. Journal of Food Engineering **17**, 97-116
98. Hang, Y. D., Lee, C. Y., Woodams, E. E., Cooley, H. J. (1981) *Production of alcohol from apple pomace*. Applied and Environmental Microbiology **42**, 1128-1129
99. Nikolic, M. V., Mojovic, L. (2007) *Hydrolysis of apple pectin by the coordinated activity of pectic enzymes*. Food Chemistry **101**, 1-9
100. Tucker, G. A., Seymour, G. B. (2002) *Modification and degradation of pectins*. In: Seymour, G. B., Knox, J. P. (eds.) *Pectins and their manipulation*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p. 151-173.
101. Akin-Osanaiye, B. C., Nzelibe, H. C., Agbaji, A. S. (2005) *Production of ethanol from Carica papaya (pawpaw) agro waste: effect of saccharification and different treatments on ethanol yield*. African Journal of Biotechnology **4**, 657-659
102. Bhushan, S., Joshi, V. K. (2006) *Baker's yeast production under fed batch culture from apple pomace*. Journal of Scientific & Industrial Research **65**, 72-76
103. Shojaosadati, S. A., Babaeipour, V. (2002) *Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor*. Process Biochemistry **37**, 909-914
104. Berovic, M., Ostroversnik, H. (1997) *Production of Aspergillus niger pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace*. Journal of Biotechnology **53**, 47-53
105. Hang, Y. D., Woodams, E. E. (1994) *Production of fungal polygalacturonase from apple pomace*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **27**, 194-196
106. Joshi, V. K., Parmar, M., Rana, N. S. (2006) *Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations*. Food Technology and Biotechnology **44**, 253-256
107. Zheng, Z., Shetty, K. (2000) *Solid state production of polygalacturonase by Lentinus edodes using fruit processing wastes*. Process Biochemistry **35**, 825-830
108. Waldron, K. W., Parker, M. L., Smith, A. C. (2003) *Plant cell walls and food quality*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **2**, 101-119
109. Waldron, K. W., Smith, A. C., Parr, A. J., Ng, A., Parker, M. L. (1997) *New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture*. Trends in Food Science & Technology **8**, 213-220
110. Schindler, T. (1993) *Das neue Bild der Zellwand*. Biologie unserer Zeit **23**, 113-120
111. McCann, M. C., Roberts, K. (1991) *Architecture of the primary cell wall*. In: Lloyd, C. W. (ed.) *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. Academic Press, San Diego, p. 109-129.
112. Carpita, N. C., Gibeaut, D. M. (1993) *Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. Plant Journal **3**, 1-30
113. Chiang, W. D., Thomas, R. L., Kunkel, M. E. (1994) *Calcium binding by cellulose and lignin*. Food Chemistry **50**, 191-196
114. De Vries, J. A., den Uijl, C. H., Voragen, A. G. J., Rombouts, F. M., Pilnik, W. (1983) *Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances*. Carbohydrate Polymers **3**, 193-205
115. Schols, H. A., Voragen, A. G. J. (2002) *The chemical structure of pectins*. In: Seymour, G. B., Knox, J. P. (eds.) *Pectins and their manipulation*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p. 1-29.
116. Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., Voragen, A. G. J. (1995) *A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin*. Carbohydrate Research **279**, 265-279

117. Voragen, F. G. J., Schols, H. A., Pilnik, W. (1986) *Structural features of the hemicellulose polymers of apples*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **183**, 105-110
118. Janshekar, H., Fiechter, A. (1983) *Lignin: Biosynthesis, application, and biodegradation*. In: Fiechter, A. (ed.) *Pentoses and lignin*. Springer, Berlin, p. 2-32.
119. Rombouts, F. M., Thibault, J.-F. (1986) *Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp*. Carbohydrate Research **154**, 177-187
120. Rombouts, F. M., Thibault, J.-F. (1986) *Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar beet pulp*. Carbohydrate Research **154**, 189-203
121. Micard, V., Renard, C. M. G. C., Thibault, J.-F. (1997) *Dehydroferulic acids from sugar beet pulp*. Phytochemistry **44**, 1365-1368
122. Levigne, S., Ralet, M.-C., Thibault, J.-F. (2002) *Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet pulp under different conditions using an experimental design*. Carbohydrate Polymers **49**, 145-153
123. Fellows, P., *Food processing technology*. 1988, Weinheim: VCH.
124. Kabbert, R., Kunzek, H. (1995) *Charakterisierung der Größenverteilung von Einzel-Zellmaterial mit der Laser-Partikel-Analyse*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **201**, 387-389
125. Müller, S., Kunzek, H. (1998) *Material properties of processed fruit and vegetables I. Effect of extraction and thermal treatment on apple parenchyma*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **206**, 264-272
126. Kunzek, H., Müller, S., Vetter, S., Godeck, R. (2002) *The significance of physico chemical properties of plant cell walls materials for the development of innovative food products*. European Food Research & Technology **214**, 361-376
127. Vetter, S., Kunzek, H. (2003) *The influence of the pre-drying treatment on the hydration properties of dried cell wall materials from apples*. European Food Research & Technology **216**, 129-137
128. Mittal, G. S. (1994) *Thermal softening of potatoes and carrots*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **27**, 253-258
129. Nyman, M., Gustafsson, K., Svanberg, M., Asp, N. G. *Effects of processing on dietary fibre*. in *Physico-chemical properties of dietary fibre and effect of processing on micronutrients availability, Proceedings of a workshop*. 1994. Carry Le Rouet-Marseille, France.
130. Sajjaanantakul, T., Van Buren, J. P., Downing, D. L. (1992) *Effect of methyl ester content on heat degradation of chelator-soluble carrot pectin*. Journal of Food Science **54**, 1272-1277
131. Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J. G., van Dijk, C., Voragen, A. G. J., Recourt, K. (1995) *Cell wall dissolution during industrial processing of green beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **43**, 2480-2486
132. Lewicki, P. P. (1998) *Effect of pre-drying treatment, drying and rehydration on plant tissue properties: a review*. International Journal of Food Properties **1**, 1-22
133. Gierschner, K., Jahn, W., Philippos, S. (1995) *Neues Herstellungsverfahren für nasskonserviertes Gemüse hoher Qualität sowie über hierbei an den Zellwand-Hydrokolloiden ablaufende Veränderungen*. Industrielle Obst- und Gemüseverwertung **5**, 186-194
134. Ng, A., Waldron, K. W. (1997) *Effect of cooking and pre-cooking on cell-wall chemistry in relation to fruit firmness of carrot tissues*. Journal of the Science of Food and Agriculture **73**, 503-512
135. Sajjaanantakul, T., Van Buren, J. P., Downing, D. L. (1993) *Effect of cations on heat degradation of chelator-soluble carrot pectin*. Carbohydrate Polymers **20**, 207-214

136. Mason, T. J. (1998) *Power ultrasound in food processing - the way forward*. In: Povey, M. J. W. Mason, T. J. (eds.) *Ultrasound in food processing*. Blackie Academic & Professional, London, p. 105-126.
137. Mason, T. J., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. (1996) *The uses of ultrasound in food technology*. *Ultrasonics Sonochemistry* **3**, S253-S260
138. Haevecker, E. (1970) *Anwendungsmöglichkeiten von Ultraschall in der obstverarbeitenden Industrie*. *Die Lebensmittel-Industrie* **17**, 63-67
139. Entezari, M. H., Nazary, S. H., Khodaparast, M. H. K. (2004) *The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms*. *Ultrasonics Sonochemistry* **11**, 379-384
140. Nielsen, M., Martens, H. J. (1997) *Low frequency ultrasonics for texture measurements in cooked carrot (*Daucus carota* L.)*. *Journal of Food Science* **62**, 1167-1175
141. Toepfl, S., Heinz, V., Knorr, D. (2005) *Overview of pulsed electric field processing for food*. In: Sun, D.-W. (ed.) *Emerging technologies for food processing*. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 69-97.
142. Guderjahn, M., Elez-Martínez, P., Knorr, D. (2007) *Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **8**, 55-62
143. Schilling, S., Toepfl, S., Ludwig, M., Dietrich, H., Knorr, D., Neidhart, S., Schieber, A., Carle, R. (2008) *Comparative study of juice production by pulsed electric field treatment and enzymatic maceration of apple mash*. *European Food Research & Technology* **226**, 1389-1398
144. Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B. (2008) *Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **9**, 85-91
145. Hogan, E., Kelly, A. L., Sun, D.-W. (2005) *High pressure processing of foods: an overview*. In: Sun, D.-W. (ed.) *Emerging technologies for food processing*. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 3-32.
146. Rastogi, N. K., Rhagavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., Knorr, D. (2007) *Opportunities and challenges in high pressure processing of foods*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**, 69-112
147. Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R. (1999) *Advances in supercritical carbon dioxide technologies*. *Trends in Food Science & Technology* **10**, 217-222
148. Pinelo, M., Ruiz-Rodríguez, A., Sineiro, J., Senoráns, F. J., Reglero, G., Nunez, M. J. (2007) *Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study*. *European Food Research & Technology* **226**, 199-205
149. Schlegel, H. G., *Allgemeine Mikrobiologie*. 1992, Stuttgart: Thieme.
150. Redondo, A., Villanueva, M. J., Rodríguez, M. D., Saco, M. D. (1997) *Autoclaving effects on the dietary fibre content of carrots (*Daucus carota*) and turnips (*Brassica napus*): an evaluation of different methods*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **205**, 457-463
151. Kunzek, H., Loewe, B., Renger, S. (1993) *Herstellung und Charakterisierung von zellstrukturierterem Apfelmateriale mit unterschiedlichem Pectingehalt*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **197**, 353-357
152. Kunzek, H., Bergemann, U., Kühl, B., Hoffmann, B. (1994) *Einsatz der Druckhomogenisierung zur Herstellung von zellstrukturierterem Apfelmateriale*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **198**, 239-243

153. Kunzek, H., Matthies, I., Kern, K., Kabbert, R. (1995) *Einsatz der Druckhomogenisierung zur Herstellung von zellstrukturiertem Apfelmateriale 2. Mitteilung*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **201**, 570-576
154. Pickardt, C., Dongowski, G., Kunzek, H. (2004) *The influence of mechanical and enzymatic disintegration of carrots on the structure and properties of cell wall materials*. European Food Research & Technology **219**, 229-239
155. Renard, C. M. G. C., Thibault, J.-F. (1993) *Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents*. Carbohydrate Research **244**, 99-114
156. Thibault, J.-F., Renard, C. M. G. C., Guillon, F. (1994) *Physical and chemical analysis of dietary fibres in sugar beet and vegetables*. In: Linskens, H. F., Jackson, J. F. (eds.) *Vegetables and vegetable products*. Springer, Berlin, p. 23-55.
157. Stevens, B. V. H., Selvendran, R. R. (1984a) *Structural features of cell-wall polysaccharides of the apple*. Carbohydrate Research **135**, 155-166
158. Selvendran, R. R. (1985) *Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers*. Journal of Cell Science Supplement **2**, 51-58
159. Renard, C. M. G. C., Voragen, A. G. J., Thibault, J.-F., Pilnik, W. (1989) *Studies on apple protopectin. I: Extraction of insoluble pectin by chemical means*. Carbohydrate Polymers **12**, 9-25
160. Renard, C. M. G. C., Voragen, A. G. J., Thibault, J.-F., Pilnik, W. (1991) *Studies on apple protopectin. IV: Apple xyloglucans and influence of pectin extraction treatments on their solubility*. Carbohydrate Polymers **15**, 387-403
161. Talbott, L. D., Ray, P. M. (1992) *Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides*. Plant Physiology **98**, 357-368
162. Vetter, S., Kunzek, H. (2003) *The influence of the sequential extractions on the structure and the properties of single cell materials from apples*. European Food Research & Technology **217**, 392-400
163. Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., Millet, M. A. (1954) *Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography*. Tappi Journal **37**, 336-343
164. Gloyna, D., Kabbert, R., Kunzek, H. (1997) *Chromatographische Bausteinanalyse von Zellwandpolysacchariden in zellstrukturierten Obst- und Gemüsepräparaten*. Poster Anakon '97, Konstanz, Kurzreferate 42
165. Doco, T., O'Neill, M. A., Pellerin, P. (2001) *Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives*. Carbohydrate Polymers **46**, 249-259
166. Peris-Tortajada, M. (2000) *HPLC determinations of carbohydrates in foods*. In: Nollet, L. M. L. (ed.) *Food analysis by HPLC*. Marcel Dekker, New York, p. 287-302.
167. Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) *New method for quantitative determination of uronic acids*. Analytical Biochemistry **54**, 484-489
168. Benen, J. A. E., Voragen, A. G. J. (2003) *Pectic enzymes*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 854-856.
169. Benen, J. A. E., Visser, J. (2003) *Polygalacturonases*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 857-866.
170. Dongowski, G., Bock, W. (1994) *Pektinspaltende Enzyme*. In: Ruttloff, H. (ed.) *Industrielle Enzyme*. Behr's, Hamburg, p. 646-685.
171. Benen, J. A. E., Vincken, J.-P., van Alebeek, G.-J. W. M. (2002) *Microbial pectinases*. In: Seymour, G. B., Knox, J. P. (eds.) *Pectins and their manipulations*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, p. 174-221.

172. Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E. J. (1993) *Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications*. *Advances in Applied Microbiology* **39**, 213-294
173. Schols, H. A., Geraeds, C. C. J. M., Searle-van Leeuwen, M. J. F., Kormelink, F. J. M., Voragen, A. G. J. (1990) *Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins*. *Carbohydrate Research* **206**, 105-115
174. De Vries, R. P., Visser, J. (2003) *Enzymes releasing L-arabinose and D-Galactose from the side chains of pectin*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 867-877.
175. Biely, P. (2003) *Xylanolytic enzymes*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 879-915.
176. Vincken, J.-P. (2003) *Enzymes with activity towards xyloglucan*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 917-930.
177. Tenkanen, M., Niku-Paavola, M.-L., Linder, M., Viikari, L. (2003) *Cellulases in food processing*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 771-790.
178. Gama, F. M., Mota, M. (1997) *Enzymatic hydrolysis of cellulose (I): relationship between kinetics and physico-chemical parameters*. *Biocatalysis and Biotransformation* **15**, 221-236
179. Schulz, G., Hirte, W. F. (1994) *Cellulose- und Hemicellulose-spaltende Enzyme*. In: Ruttloff, H. (ed.) *Industrielle Enzyme*. Behr's, Hamburg, p. 686-727.
180. Lieb, C., Luca, S. F. (1999) *Innovationen in Brennereien*. *Die Branntweinwirtschaft* 282-285
181. König, J., Grasser, R., Pikor, H. (2002) *Determination of xylanase, b-Glucanase, and cellulase activity*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **374**, 80-87
182. Southgate, D. A. T., *Determination of food carbohydrates*. 1991, London: Elsevier.
183. Bonnin, E., Le Goff, A., Körner, R., Van Alebeek, G.-J. W. M., Christensen, T. M. I. E., Voragen, A. G. J., Roepstorff, P., Caparari, C., Thibault, J.-F. (2001) *Study of the mode of action of endopolygalacturonase from Fusarium moniliforme*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1526**, 301-309
184. Massiot, P., Thibault, J.-F., Rouau, X. (1989) *Degradation of carrot (Daucus carota) fibres with cell-wall polysaccharide-degrading enzymes*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **49**, 45-57
185. Buchholz, K., Rapp, P., Zadrazil, F. (1984) *Cellulases*. In: Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methods of enzymatic analysis IV*. VCH-Wiley, Weinheim, p. 178-188.
186. Johnston, D. (2003) *Methodologies for assaying the hydrolysis of cellulose by cellulases*. In: Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J., Wong, D. W. S. (eds.) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker, New York, p. 761-770.
187. Schönfeld, A., Behnke, U. (1991) *Charakterisierung des Enzymspektrums von Pektinenzym- und Cellulase-Präparaten sowie deren Wirkung auf die Zellwandpolymeren der Möhre. 1. Mitt. Charakterisierung der Enzympräparate*. *Die Nahrung* **35**, 395-402
188. Pimenta-Braz, P. N., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. (1998) *Evaluation of pectolytic activities of enological interest in industrial enzyme preparations*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **206**, 14-20
189. Gadre, R. V., van Driessche, G., van Beumen, J., Bhat, M. K. (2003) *Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus Mucor flavus*. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 321-330

190. Gusakov, A. V., Markov, A. V., Grishutin, S. G., Semenova, M. V., Kondratyeva, E. G., Sinitsyn, A. P. (2002) *Viscosimetric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases*. *Biochemistry Moscow* **67**, 676-682
191. Sreenath, H. K. (1993) *Hydrolysis of carboxymethyl celluloses by cellulases*. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **26**, 224-228
192. Lòpez, P., de la Fuente, J. L., Burgos, J. (1994) *Continous determination of endopolygalacturonase activity by means of rotational viscosimeters*. *Analytical Biochemistry* **220**, 346-350
193. Stoll, T., Schweiggert, U., Schieber, A., Carle, R. (2003) *Process for the recovery of a carotene-rich functional food ingredient from carrot pomace by enzymatic liquefaction*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **4**, 415-423
194. Kabbert, R., Kunzek, H., Goworek, S. (1998) *Zellwandabbauende Enzyme in der Obst- und Gemüseverarbeitung - Verabeitung der Rückstände zu Ballaststoff- und Zellwandpräparaten*. *Flüssiges Obst* **65**, 320-324
195. Pilnik, W., Voragen, A. G. J. (1991) *Wirkung der Enzymbehandlung auf die Qualität von verarbeiteten Früchten und Gemüse*. *Flüssiges Obst* **58**, 422-427
196. Voragen, A. G. J., Pilnik, W. (1981) *Spezifische Enzymwirkungen bei der Verflüssigung von Apfenzellwandpräparaten*. *Flüssiges Obst* **47**, 261-264
197. Fruchtsaftverordnung vom 24. Mai 2004, Anlage zu § 2 Abs. A. 3 und 5: B. Zusatzstoffe für die Verarbeitung.
198. Mehrländer, K., Dietrich, H., Sembries, S., Dongowski, G., Will, F. (2002) *Structural characterisation of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1230-1236
199. Dongowski, G., Sembries, S. (2001) *Effects of commercial pectolytic and cellulolytic enzyme preparations on the apple cell wall*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4236-4242
200. Kabbert, R., Goworek, S., Kunzek, H. (1997) *Preparation of single-cell material from enzymatically disintegrated apple tissue - changes in structure and functional properties*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **205**, 380-387
201. Massiot, P., Renard, C. M. G. C. (1997) *Composition, physico-chemical properties and enzymatic degradation of fibres prepared from different tissues of apple*. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **39**, 800-806
202. Renard, C. M. G. C., Searle van Leeuwen, M. J. F., Voragen, A. G. J., Thibault, J.-F., Pilnik, W. (1991) *Studies on apple protopectin. II: Apple cell wall degradation by pure polysaccharidases and their combinations*. *Carbohydrate Polymers* **14**, 295-314
203. Renard, C. M. G. C., Voragen, A. G. J., Thibault, J.-F., Pilnik, W. (1991) *Studies on apple protopectin. V: Structural studies on enzymatically extracted pectins*. *Carbohydrate Polymers* **16**, 137-154
204. Renard, C. M. G. C., Thibault, J.-F., Voragen, A. G. J., van den Broek, L. A. M., Pilnik, W. (1993) *Studies on apple protopectin. VI: Extraction of pectins from apple cell walls with rhamnogalacturonase*. *Carbohydrate Polymers* **22**, 203-210
205. Hang, Y. D., Woodams, E. E. (1999) *Enzymatic production of soluble sugars from corn husks*. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **32**, 208-210
206. Hang, Y. D., Woodams, E. E. (2001) *Enzymatic production of reducing sugars from corn cobs*. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **34**, 140-142
207. Baig, M. M. V., Baig, M. L. B., Baig, M. I. A., Yasmeen, M. (2004) *Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes*. *African Journal of Biotechnology* **3**, 447-450

208. Fleischer, S., Senn, T. (2006) *Cellulosic and starch-based raw materials in the ethanol production*. Sugar Industry **131**, 766-769
209. Jung, O. (2002) *Geräte zum Zerkleinern*. Kleinbrennerei **10**, 8-11
210. Pieper, H. J., Bruchmann, E.-E., Kolb, E., *Technologie der Obstbrennerei*. 1993, Stuttgart: Eugen Ulmer.
211. Tanner, H., Brunner, H. R., *Obstbrennerei heute - Ein Leitfaden für Kleinbrenner*. 1982, Schwäbisch Hall: Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH.
212. Heinisch, J. J. (2002) *Kurzer Leitfaden für Kleinbrenner - Mikrobiologie, Genetik und Gentechnik (Hefen I)*. Kleinbrennerei **11**, 4-12
213. Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. (1998) *The role of non-saccharomyces yeast in industrial winemaking*. International Microbiology **1**, 143-148
214. Dittrich, H. H. (1996) *Wine and brandy*. In: Rehm, H. J., Reed, G.Röhr, M. (eds.) *Biotechnology Vol. 6, Products of primary metabolism*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 464-504.
215. Andraous, J. I., Claus, M. J., Lindemann, D. J., Berglund, K. A. (2004) *Effect of liquefaction enzymes on methanol concentration of distilled fruit spirits*. American Journal of Enology and Viticulture **55** 199-201
216. Jung, O. (2005) *Analytische Kennzahlen - Hilfe bei der Beurteilung von Obstbränden*. Kleinbrennerei **6**, 8-10
217. Glatthar, J., Senn, T., Pieper, H. J. (2001) *Investigations on reducing the methanol content in distilled spirits made of bartlett pears*. Deutsche Lebensmittel Rundschau **97**, 209-216
218. Nusser, R., Adam, L., Engel, K. H. (2000) *Untersuchungen zur Senkung des Methanolgehalts in Spirituosen mit Hilfe von Verdunstungsverfahren*. Kleinbrennerei **6**, 5-8
219. Wüstenfeld, H., Haeseler, G., *Trinkbranntweine und Liköre*. 1996, Wien: Blackwell.
220. Postel, W., Adam, L. (1989) *Fruit distillate flavours*. In: Piggot, J. R. Paterson, A. (eds.) *Distilled beverage flavour*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, p. 133-148.
221. Spiro, R. G. (1966) *Analysis of sugars found in glycoproteins*. In: Neufeld, E. F. Ginsburg, V. (eds.) *Methods in enzymology VIII*. Academic Press, New York, p. 3-25.
222. Rauscher, K., Engst, R., Freimuth, U., *Untersuchung von Lebensmitteln*. 1972, Leipzig: Fachbuchverlag.
223. Riedel, E., *Allgemeine und anorganische Chemie*. 1994, Berlin: de Gruyter.
224. Adam, L., Bartels, W., Christoph, N., Stempf, W., *Brennereianalytik, Band I, Qualitätskontrolle in der Brennerei und beim Spirituosenhersteller*. 1995, Hamburg: Behr's.
225. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung der gesamten Trockensubstanz in Frucht- und Gemüsesäften, 31.00-18 (September 1997).
226. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose in Eiern und Eiprodukten (Enzymatisches Verfahren), 05.00-10 (Dezember 2003).
227. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Stärke in Fleischerzeugnissen, 07.00-25 (Mai 1983).
228. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Stickstoffgehaltes in Milch (Teil 1: Kjeldahl-Verfahren), 01.00-10/1 (Dezember 2002).

229. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung der Asche in Brot einschließlich Kleingebäck aus Brotteigen, 17.00-3 (Mai 1982).
230. Bäuerle, G., Otterbach, G., Gierschner, K., Baumann, G. (1977) *Bestimmung des Polyuronidgehaltes und des Veresterungsgrades von Handelspektinpräparaten*. Deutsche Lebensmittel-Rundschau **73**, 281-286
231. Prosky, L., Asp, N.-G., Schweizer, T. F., de Vries, J. W., Furda, I. (1988) *Determination of total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study*. Journal of Association of Official and Analytical Chemists **71**, 1017-1023
232. Escarpa, A., Gonzalez, M. C. (2001) *Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods*. Analytica Chimica Acta **427**, 119-127
233. Maksimovic, Z., Malencic, D., Kovacevic, N. (2005) *Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis Stigma extracts*. Bioresource technology **96**, 873-877
234. Scheffler, E., *Einführung in die Praxis der statistischen Versuchsplanung*. 1986, Leipzig: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie.
235. Tableros, M. A., Endreß, H.-U., Bannert, E., Finger, C., Shen, Z., Gierschner, K. (1987) *Bestimmung verschiedener glykosidischer Aktivitäten in Enzympräparaten des Handels*. Industrielle Obst- und Gemüseverwertung **72**, 351-355
236. Grassin, C., van der Weijden, C., van der Hoeven, R. A. M., van Dijk, P. W. M., de Boer, W. R. (2005) *Die Enzymzusammensetzung kommerzieller Pektinasen in der Fruchtsaftindustrie*. Flüssiges Obst **12**, 638-642
237. Ceci, L., Lozano, J. (1998) *Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice*. Food Chemistry **61**, 237-241
238. Grohmann, K., Bohtast, R. J. (1994) *Pectin-rich residues generated by processing of citrus fruits, apples, and sugar beets*. In: Himmel, M. E. (ed.) *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. ACS, Washington, p. 373-390.
239. Sreenath, H. K., Frey, M. D., Radola, B. J., Scherz, H. (1984) *Degradation of washed carrot preparation by cellulases and pectinases*. Biotechnology and Bioengineering **26**, 788-796
240. Dongowski, G., Sembries, S., Bauckhage, K., Will, F., Dietrich, H. (2002) *Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations*. Nahrung/Food **46**, 105-111
241. Schulz, D., *Untersuchung von Strukturierungsvorgängen bei der Lab- und Säuregerinnung von Milch*, in D83/FB 15 Nr. 166. 2000, TU Berlin.
242. Bonnin, E., Grange, H., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.-F. (2000) *Enzymic release of cellobiose from sugar beet pulp, and its use to favour vanillin production in Pycnoporus cinnabarinus from vanillic acid*. Carbohydrate Polymers **41**, 143-151
243. Singh, N. I., Dhuique-Mayer, C., Lozano, Y. (2000) *Physico-chemical changes during enzymatic liquefaction of mango pulp (cv. Keitt)*. Journal of Food Processing Preservation **24**, 73-85
244. Sreenath, H. K., Nanjundaswamy, A. M., Sreekanthiah, K. R. (1987) *Effect of various cellulases and pectinases on viscosity reduction of mango pulp*. Journal of Food Science **52**, 230-231
245. Sreenath, H. K., Sudashana Krishna, K. R., Santhanam, K. (1995) *Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **28**, 196-200
246. Mutlu, M., Sarioglu, K., Demir, N., Ercan, M. T., Acar, J. (1999) *The use of pectinase in fruit juice industry, Part I: viscosimetric determination of enzyme activity*. Journal of Food Engineering **41**, 147-150

247. Haminiuk, C. W. I., Sierakowski, M. R., Vidal, J. R. M. B., Masson, M. L. (2006) *Influence of temperature on the rheological behavior of whole araca pulp (Psidium cattleianum sabine)*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **39**, 426-430
248. Pelegri, D. H., Silva, F. C., Gasparetto, C. A. (2002) *Rheological behavior of pineapple and mango pulps*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **35**, 645-648
249. Sharma, S. K., LeMaguer, M., Liptay, A., Poysa, V. (1996) *Effect of composition on the rheological properties of tomato thin pulp*. Food Research International **29**, 175-179
250. Guillon, F., Champ, M. (2000) *Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology*. Food Research International **33**, 233-245
251. Kunzek, H., Dongowski, G. (1991) *Der Einfluss des mechanolytischen Abbaus von Obst- und Gemüsetrockenpräparaten auf die Bestimmung des Wasserbindevermögens unter Verwendung verschiedener Methoden*. Lebensmittelindustrie **38**, 77-80
252. Düsterhoft, E.-M., Engels, F. M., Voragen, A. G. J. (1993) *Parameters affecting the hydrolysis oil-seed meals, lignocellulosic by-products of the food industry*. Bioresource technology **44**, 39-46
253. Khan, A. A., Vincent, J. F. V. (1990) *Anisotropy of apple parenchym*. Journal of the Science of Food and Agriculture **52**, 455-466
254. Van Buren, J. P. (1979) *The chemistry of texture in fruits and vegetables*. Journal of Texture Studies **10**, 1-23
255. Massiot, P., Guiller, I., Baron, A., Drilleau, J.-F. (1992) *Cell wall modifications during heat treatment and enzymatic degradation of carrot tissue*. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie **25**, 559-563
256. Krall, S. M., McFeeters, R. F. (1998) *Pectin hydrolysis: Effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**, 1311-1315
257. Amadò, R. *Physico-chemical properties related to type of dietary fibre*. in *Physico-chemical properties of dietary fibre and effect of processing on micronutrients availability, Proceedings of a workshop*. 1994. Carry Le Rouet-Marseille, France.
258. Thibault, J.-F., Renard, C. M. G. C., Ralet, M.-C., Guillon, F., Barry, J.-L. (1994) *Effects of processing on physicochemical properties of dietary fibre*. In: Amadò, R., Barry, J.-L., Frølich, W. (eds.) *Physico-chemical properties of dietary fibre and effect of processing on micronutrients availability, Proceedings of a workshop*. Carry Le Rouet-Marseille, France, p. 55-59.
259. Belitz, H.-D., Grosch, W., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 1987, Berlin: Springer.
260. Pfeifer, P. A., Bonn, G., Bobleter, O. (1984) *Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by Saccharomyces carlsbergensis W 34*. Biotechnology Letters **6**, 541-546
261. Matthews, T. M., Webb, C. (1991) *Culture Systems*. In: Tuite, M. F., Oliver, S. G. (eds.) *Biotechnology Handbooks Volume 4: Saccharomyces*. Plenum Press, New York, p. 254-255.
262. Lonsane, B. K., Vijayalakshmi, G., Krishnaiah, M. M. (1997) *Yeasts and energy. The production of fuel-grade ethanol*. In: Spencer, J. F. T., Spencer, D. M. (eds.) *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer, Berlin, p. 314-352.
263. Varga, E., Klinke, H. B., Réczey, K., Thomsen, A. B. (2004) *High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol*. Biotechnology and Bioengineering **88**, 567-574
264. El Haloui, N., Picque, D., Corrieu, G. (1988) *Alcoholic fermentation in winemaking: on-line measurement of density and carbon dioxide evolution*. Journal of Food Engineering **8**, 17-30

265. Dietrich, H., Thielen, C., Würth, K., Bonerz, D., Will, F. (2005) *Neue Erkenntnisse über bioaktive Stoffe in Fruchtsäften*. Flüssiges Obst **9**, 472-478
266. Jaime, L., Mollá, E., Fernández, A., Martín-Cabrejas, M. A., López-Andréu, F. J., Esteban, R. M. (2002) *Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) Tissues*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**, 122-128
267. Gebhardt, E., Dongowski, G., Huth, M., Mersiowsky, E., Herrmann, U., *Ballaststoffreiche Getreideprodukte - Gewinnung, Verwendung und Analytik*, in *Internationale Tagung zu Problemen der Getreideverarbeitung und Getreidechemie - Funktionelle Getreidelebensmittel*. 1999.
268. Meyer, A. S., Jepsen, S. M., Sørensen, N. S. (1998) *Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**, 2439-2446
269. Herbafood-Broschüre: *Ballaststoffe für eine gesunde Ernährung*. [www.herbafood.de](http://www.herbafood.de) - Herbafood Ingredients GmbH.
270. Sembries, S., Dongowski, G., Jacobasch, G., Mehrländer, K., Will, F., Dietrich, H. (2003) *Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats*. British Journal of Nutrition **90**, 607-615
271. Krüger, M. (2007) *Konzept zur Nutzung von Biogas zur Wärme- und Elektroenergieerzeugung in der Hansestadt Greifswald*. IPP-Report 16/16, Max-Planck-Institut für Plasmaphysik.
272. Schattauer, A., Weiland, P. (2006) *Beschreibung ausgewählter Substrate*. In: *Handreichung - Biogasgewinnung und Nutzung*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), Gülzow, p. 86-96.
273. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Proteingehaltes nach der Biuret-Methode in Lösungen für immunologische Untersuchungen in Fleisch und Fleischerezeugnissen, 06.00-23 (Mai 1986).

## 12 ANHANG

### 12.1 Proteingehalte in kommerziellen Enzympräparaten

#### Methodik

#### „Biuret-Methode“ [273]

- Spektralphotometrisch bei 330 nm
- Eichgerade mittels Rinderserumalbumin (0,1 bis 2 mg/mL)
- Enzymlösungen entsprechend verdünnen
- 1 mL verdünnte Enzymlösung mit 1 mL 20%iger Trichloressigsäure versetzen
- Nach 5 min bei 15000 g für 5 min zentrifugieren und Überstand vorsichtig abdekantieren
- Sediment mit 1 mL 6%iger Trichloressigsäure waschen, nochmals zentrifugieren und dekantieren
- Sediment mit 5 mL Biuret-Reagenz versetzen und lösen lassen (90 min)
- Extinktion bei 330 nm gegen Blindwert messen und Proteingehalt mittels Eichgerade bestimmen

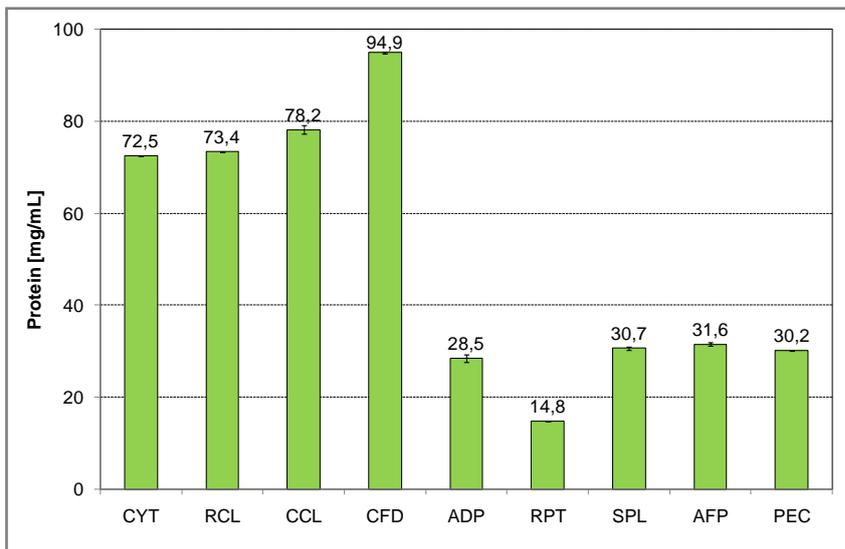


Abb. 65: Proteingehalte von Enzymlösungen (n = 4)

Die Untersuchung der Proteingehalte in den Enzymlösungen ergab, dass in den cellulolytischen Enzympräparaten deutlich größere Mengen an Protein enthalten waren, als in den pektinolytischen Präparaten. Insbesondere CFD wies signifikant höhere Gehalte an Protein als die anderen Cellulasen auf (Abb. 64). Daraus ließen sich auch die höheren Enzymaktivitäten von CFD gegenüber den Cellulose-Modellsubstraten erklären. Nach Auskunft der Enzymhersteller werden bei den Proteingehaltsbestimmungen auch Nicht-Enzym-Proteine miterfasst. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, die freigesetzten Zucker auf den Gehalt an Enzymlösung in mL und nicht auf den Proteingehalt in g zu beziehen.

## 12.2 Vergleich der Glucosegehalte ermittelt über enzymatische TFA-Hydrolyse und zweistufige schwefelsaure Hydrolyse

### Methodik

„2-stufige schwefelsaure Hydrolyse (Saeman-Hydrolyse)“ [85, 163]

- 0,25 g trockenes Material in 10 mL 72%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei Raumtemperatur 2 h rühren
- Mit 101,3 mL dest. Wasser verdünnen und 2 h am Rückfluss kochen
- Neutralisieren mit 32%iger NaOH
- In 250mL-Maßkolben überführen, mit dest. Wasser auffüllen und über Faltenfilter filtrieren
- Filtrat zur Glucosebestimmung mittels Enzymtestkit (r-biopharm) einsetzen

**Tab. 26: Glucosegehalte nach enzymatischer TFA-Hydrolyse und zweistufiger schwefelsaurer Hydrolyse**

	Glucose [mg/g TS]	
	Enzym + TFA*	2-stufig H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> **
Apfeltresterfasern	24,3 (1,92)	25,4 (0,15)
Entpektinisierte Apfeltresterfasern	27,4 (1,42)	27,6 (0,21)

- \*bestimmt nach kombinierter enzymatischer TFA-Hydrolyse (siehe Kap. 4.2.8.3)

- \*\*bestimmt nach Saeman-Hydrolyse (siehe oben)

- Mittelwertabweichung in Klammern (n = 4)

Zur Absicherung der Ergebnisse der über die gaschromatographische Bestimmungsmethode ermittelten Glucosegehalte nach enzymatisch-saurer TFA-Hydrolyse wurden die Apfeltresterfaser-Materialien einer zweistufigen, schwefelsauren Hydrolyse nach Saeman unterzogen. Die Glucosegehalte in den aufgearbeiteten Extraktionlösungen wurden mittels Enzymtestkit bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Glucosegehalten zwischen beiden Bestimmungsmethoden (Tab. 26).

## 12.3 Ergänzungen zum enzymatisch-physikalischen Aufschluss von Apfelnasstrestern

### 12.3.1 Nachweis der Saccharose-Inversion während der Aufarbeitung der enzymierten Apfeltrester

Äpfel enthalten als lösliche Zucker Glucose, Fructose und Saccharose, wobei die Gehalte an Saccharose und Glucose in der Regel geringer sind als die von Fructose [44]. Saccharose ist nur im neutralen bzw. alkalischen pH-Bereich stabil und invertiert schon unter schwach sauren Bedingungen teilweise zu Glucose und Fructose [259]. Da die Enzymierungsversuche im sauren pH-Bereich (pH 3,3) durchgeführt wurden, war anzunehmen, dass die Saccharose im Trester unter den jeweiligen Bedingungen mehr oder weniger stark invertiert. Da nicht auszuschließen war, dass auch die verwendeten Enzympräparate Invertase-Nebenaktivitäten besitzen, hätte eine Schwierigkeit bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten darin bestehen können, dass etwaige Glucosezunahmen nicht allein auf die Wirkung zellwandabbauender Enzyme sondern auch zu einem gewissen Teil auf Invertase-Aktivitäten und den Säureabbau der Saccharose zurückzuführen gewesen wären.

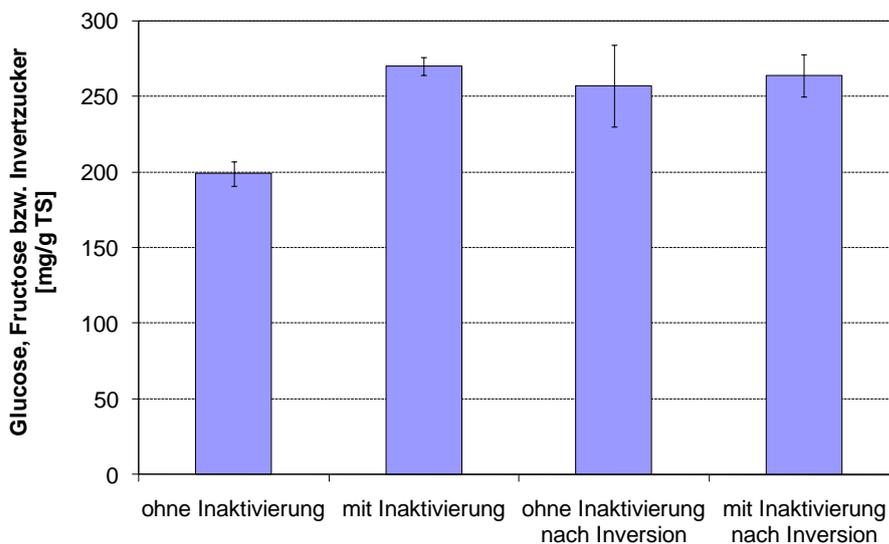


Abb. 66: Invertzuckergehalte von Apfeltrester vor und nach Enzyminaktivierung (n = 4)

Da alle enzymierten Tresterproben vor der Zuckerbestimmung zur Enzyminaktivierung für 10 min bei 90 °C erhitzt wurden, musste nachgewiesen werden, dass durch diese Behandlung sämtliche Saccharose zu Glucose und Fructose invertiert. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden daher zwei Tresterproben bei pH 3,3 einmal mit und einmal ohne Hitzeinaktivierung auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern untersucht und beide anschließend jeweils nach säure-katalysierter Inversion nach Luff-Schoorl. Abb. 66 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung. Es wird deutlich, dass Saccharose bei pH 3,3 schon durch die 10-minütige Hitzebehandlung vollständig zu Glucose und Fructose invertiert, da sich die Zuckergehalte nach der Inversion nicht signifikant von denen nach der Hitzebehandlung unterscheiden. Damit war es zulässig, jeden Glucoseanstieg nach der Inkubation auf die Wirkung der jeweils verwendeten Enzyme zurückzuführen.

### 12.3.2 HPLC-Chromatogramme - Zuckerstandards

Abb. 67 zeigt ein HPLC-Chromatogramm der für die Zuckerquantifizierung eingesetzten Zuckerstandards. Unter den angegebenen HPLC-Bedingungen (Kap. 4.2.4.5) war eine Trennung von Galactose, Mannose und Xylose nicht möglich. Cellotetraose und Cellotriose konnten in den aufgeschlossenen Apfeltrestern zu keinem Zeitpunkt der Enzymierung detektiert werden (Kap. 6.2.1).

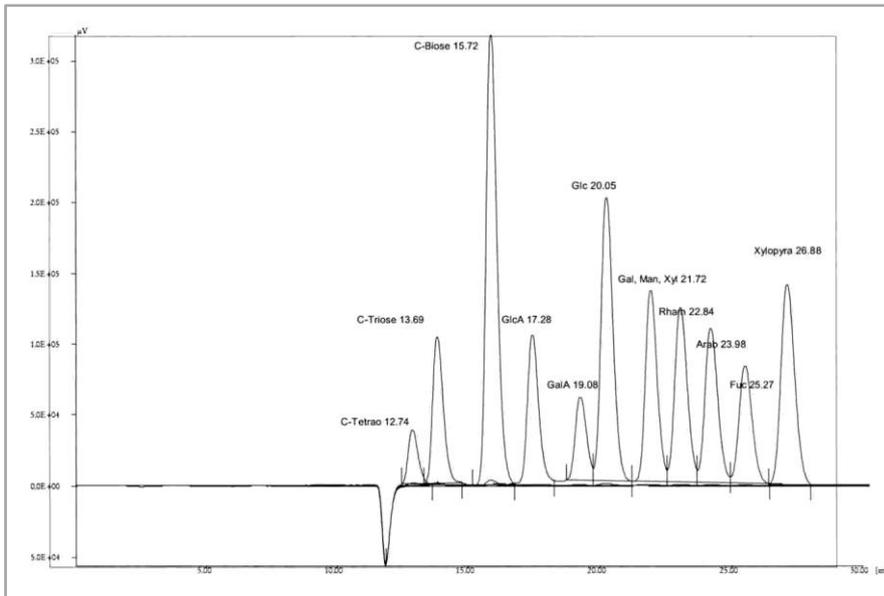


Abb. 67: HPLC-Chromatogramm der Zuckerstandards

Bei der Untersuchung der Zuckerfreisetzung aus den Apfelnasstrestern bestand ein weiteres Problem in der Überlappung des Fructose-Peaks mit den Peaks für Galactose, Mannose und Rhamnose (Abb. 68). Daher konnten die entsprechenden Zuckergehalte mittels HPLC nur summarisch angegeben werden (Abb. 69). Die weiteren untersuchten Zucker Glucose, Arabinose, Galacturonsäure und Cellobiose konnten problemlos detektiert werden.

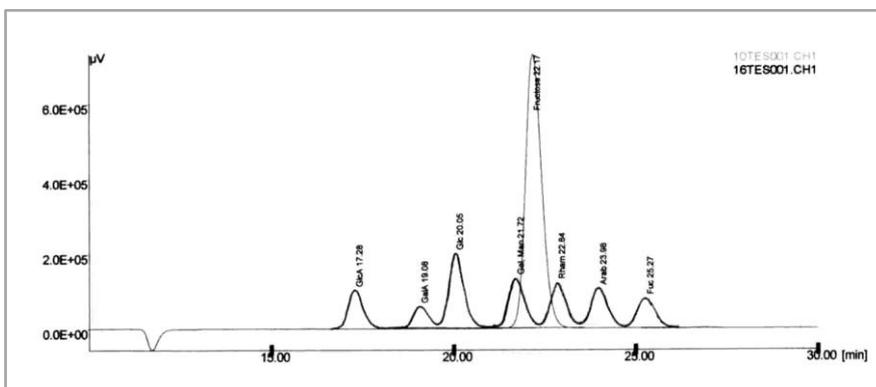


Abb. 68: HPLC-Chromatogramm der Zuckerstandards und Peak-Überlappung durch Fructose

### 12.3.3 Zuckerfreisetzung aus Apfelsastrestern

In den nachfolgenden Diagrammen sind die freigesetzten Mengen verschiedener Zucker (summarisch) in Abhängigkeit der Zeit und der Enzymkombination (Abb. 69) und in Abhängigkeit der physikalischen Vorbehandlung (Standard vs. Hochdruck) (Abb. 70) sowie die freigesetzten reduzierenden Zucker nach Grob- und Feinaufschluss in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (Abb. 71) dargestellt. Da die jeweiligen Versuchsergebnisse in den Kapiteln 6.2.2 und 6.3.2 im ausführlichen Zusammenhang diskutiert werden, wird hier auf eine nähere Erläuterung verzichtet.

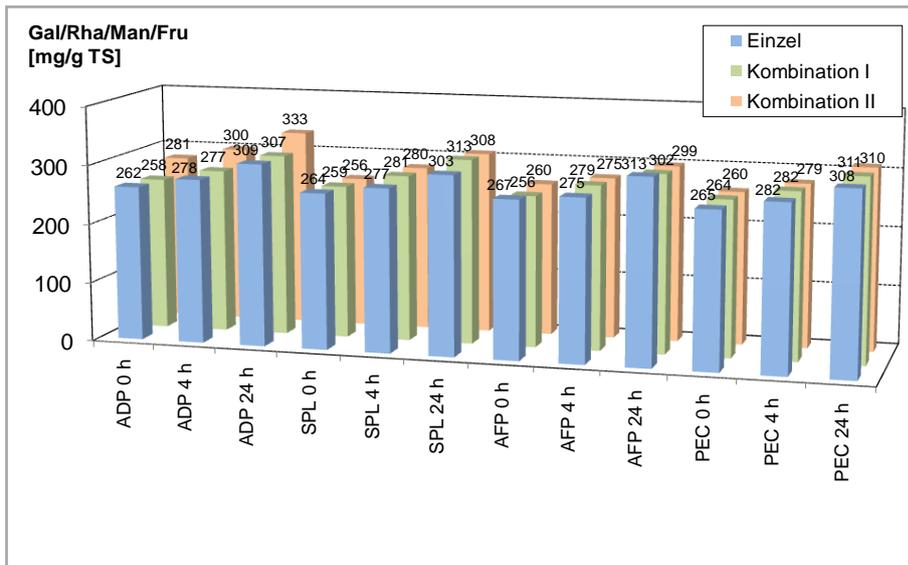


Abb. 69: Freisetzung (summiert) verschiedener Zucker in Abhängigkeit der Zeit und der Enzymkombination

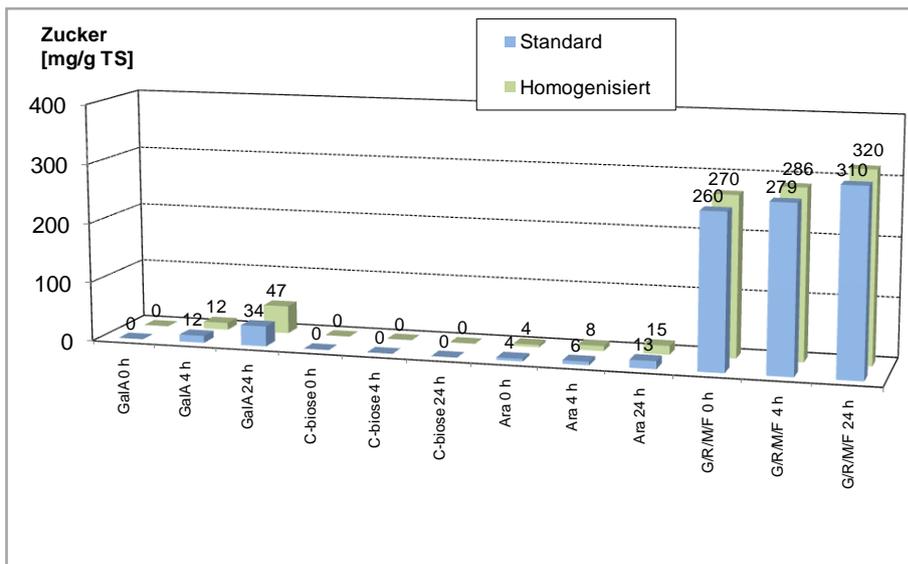


Abb. 70: Freisetzung verschiedener Zucker aus Apfeltrester nach Standard-Aufschluss und nach 12 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator

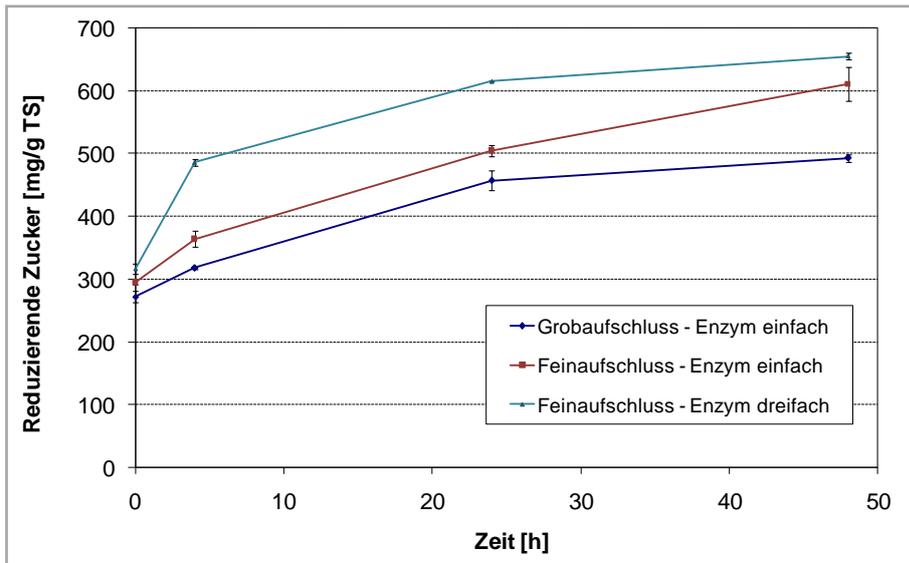
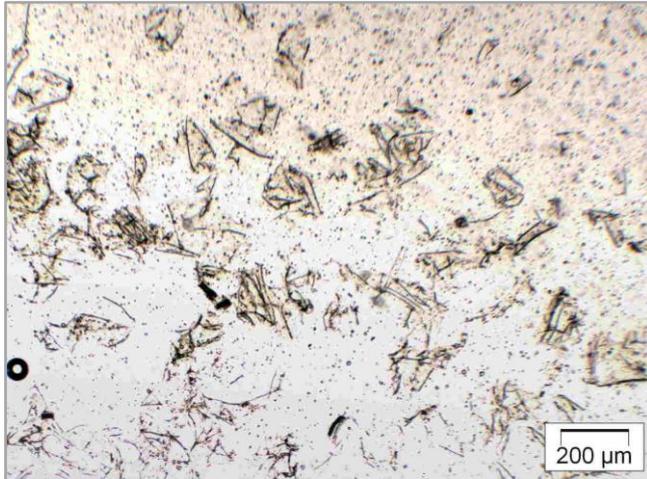


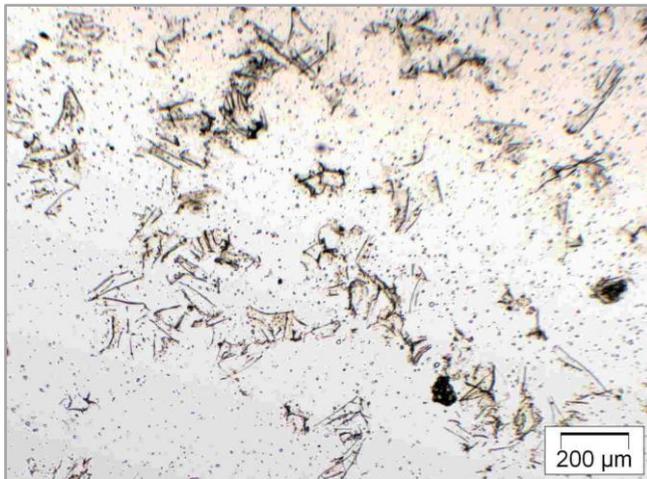
Abb. 71: Freisetzung reduzierender Zucker nach Grob- und Feinaufschluss von Apfeltrester in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (PEC/CFD/NZ)

## 12.4 Zerkleinerungsversuche mit Apfeltrester

### 12.4.1 Mikroskopische Aufnahmen hochdruckhomogenisierter Apfeltrester



**Abb. 72:** Mikroskop-Aufnahme – Apfeltrester nach 4 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator



**Abb. 73:** Mikroskop-Aufnahme – Apfeltrester nach 8 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator



**Abb. 74:** Mikroskop-Aufnahme – Apfeltrester nach 12 Durchläufen im Hochdruckhomogenisator

## 12.4.2 REM-Aufnahmen zerkleinerter Apfeltrester

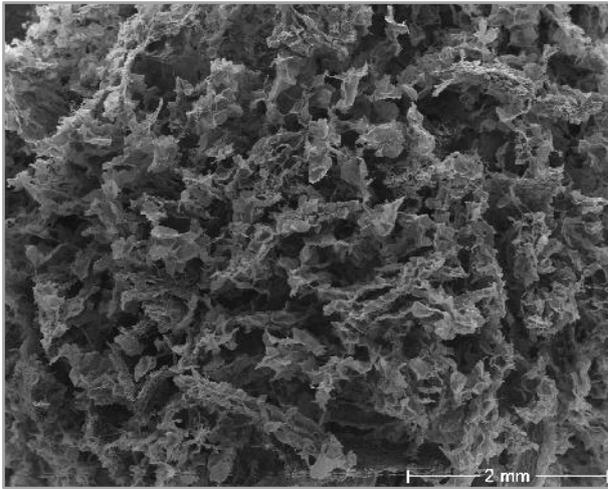


Abb. 75: REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Standardaufschluss

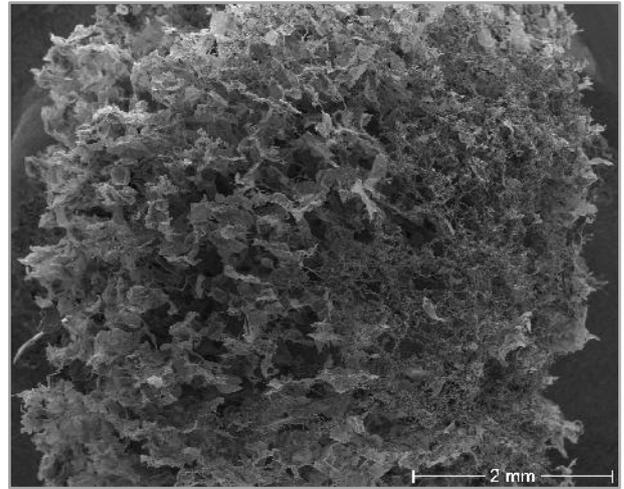


Abb. 76: REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Ultraschallbehandlung

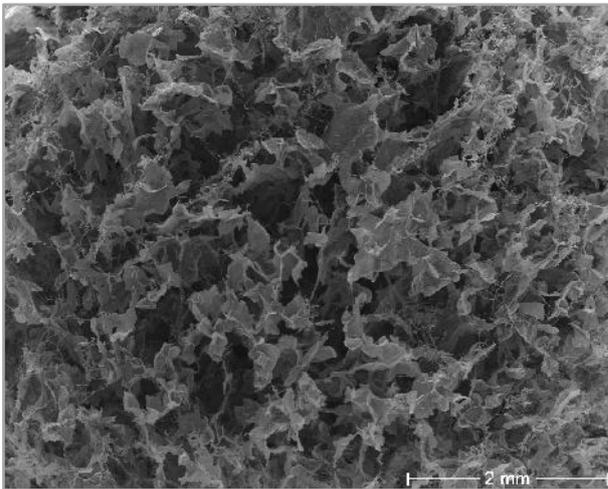


Abb. 77 REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Autoklavenbehandlung

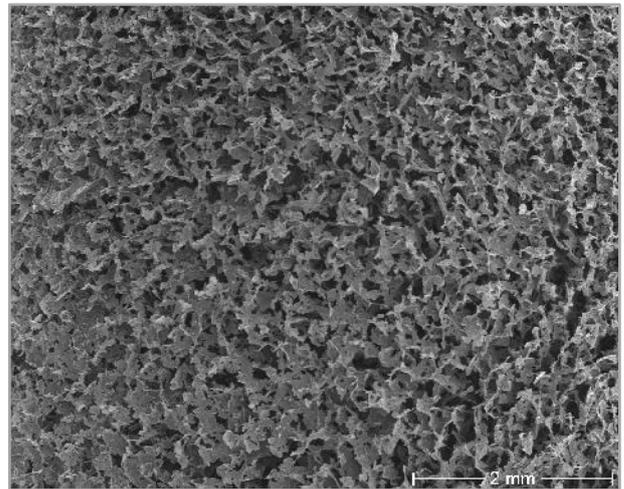


Abb. 78 REM-Aufnahme – Apfeltrester nach Hochdruckhomogenisieren (12 D)

### 12.4.3 Relative Partikelpartikelgrößenhäufigkeiten nach physikalischem Voraufschluss

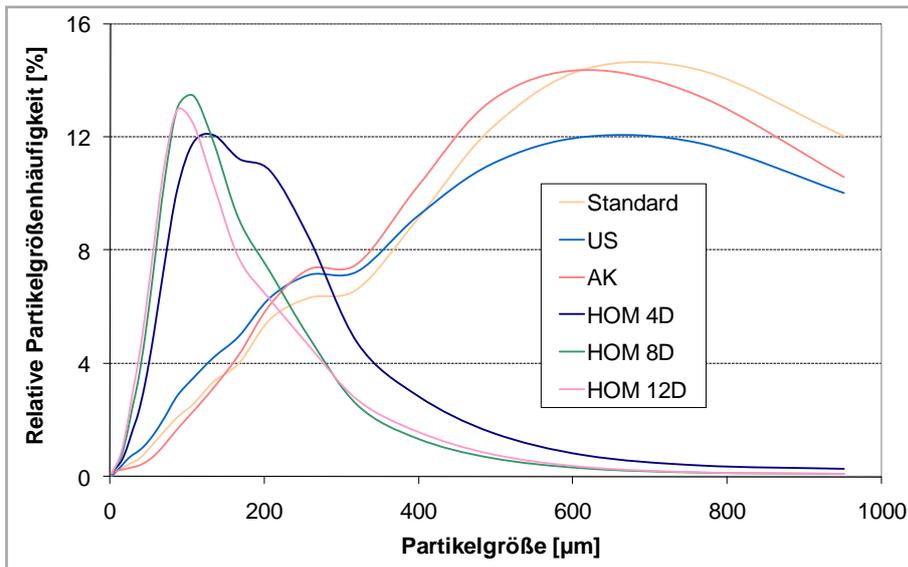


Abb. 79: Partikelgrößenhäufigkeiten (einzeln) nach Aufschlussvarianten\*

\*Standard, US, AK: „behandeltes Partikelspektrum“ – abgeseibte Fraktion > 1 mm

Tab. 27: Partikelgrößenklassen-Häufigkeiten (einzeln und summiert) nach Aufschlussvarianten (Basisdaten)

Partikelgrößenklasse [µm]	Klassenhäufigkeit [%]											
	Standard		US		AK		HOM 4D		HOM 8D		HOM 12D	
	einzeln	summiert	einzeln	summiert	einzeln	summiert	einzeln	summiert	einzeln	summiert	einzeln	summiert
1,41	0,051	0,057	0,059	0,057	0,073	0,073	0,124	0,124	0,145	0,057	0,153	0,057
1,75	0,041	0,092	0,048	0,107	0,069	0,142	0,106	0,229	0,124	0,269	0,130	0,283
2,17	0,035	0,127	0,044	0,151	0,071	0,213	0,098	0,327	0,114	0,383	0,121	0,403
2,70	0,038	0,165	0,050	0,201	0,085	0,298	0,109	0,436	0,127	0,510	0,135	0,539
3,36	0,049	0,214	0,068	0,270	0,109	0,407	0,140	0,576	0,163	0,673	0,176	0,714
4,17	0,066	0,280	0,093	0,363	0,134	0,541	0,179	0,755	0,209	0,882	0,227	0,941
5,18	0,090	0,370	0,122	0,484	0,157	0,698	0,222	0,977	0,259	1,141	0,282	1,222
6,44	0,123	0,493	0,158	0,643	0,179	0,877	0,269	1,246	0,316	1,457	0,347	1,569
8,00	0,169	0,662	0,204	0,847	0,202	1,079	0,322	1,568	0,386	1,844	0,430	1,999
9,94	0,219	0,881	0,259	1,105	0,222	1,302	0,383	1,951	0,474	2,318	0,542	2,541
12,35	0,266	1,147	0,325	1,430	0,237	1,538	0,462	2,413	0,597	2,915	0,703	3,244
15,35	0,311	1,459	0,410	1,840	0,251	1,789	0,590	3,004	0,802	3,717	0,968	4,212
19,08	0,365	1,824	0,525	2,365	0,272	2,061	0,815	3,819	1,162	4,879	1,418	5,630
23,70	0,434	2,258	0,656	3,021	0,301	2,362	1,172	4,991	1,733	6,612	2,109	7,739
29,46	0,516	2,773	0,786	3,807	0,338	2,700	1,664	6,655	2,512	9,124	3,030	10,769
36,60	0,613	3,387	0,910	4,717	0,385	3,085	2,252	8,907	3,425	12,550	4,083	14,852
45,48	0,841	4,228	1,129	5,847	0,507	3,592	3,311	12,218	4,978	17,527	5,739	20,592
56,52	1,181	5,409	1,503	7,350	0,724	4,315	5,021	17,239	7,343	24,871	8,139	28,730
70,23	1,602	7,011	2,082	9,432	1,118	5,433	7,470	24,710	10,392	35,263	11,006	39,736
87,27	2,103	9,114	2,872	12,304	1,690	7,123	10,184	34,894	13,056	48,318	12,996	52,732
108,45	2,582	11,695	3,511	15,815	2,327	9,450	11,851	46,745	13,478	61,796	12,460	65,191
134,76	3,371	15,066	4,236	20,051	3,162	12,612	12,088	58,833	11,795	73,592	10,301	75,492
167,46	4,020	19,085	4,983	25,034	4,327	16,940	11,252	70,086	9,089	82,680	7,715	83,208
208,09	5,582	24,667	6,349	31,383	6,102	23,041	10,813	80,898	7,222	89,902	6,259	89,467
258,58	6,328	30,995	7,143	38,526	7,341	30,383	8,423	89,321	4,909	94,811	4,624	94,091
321,31	6,642	37,637	7,270	45,796	7,539	37,922	4,713	94,034	2,516	97,327	2,717	96,807
399,28	9,119	46,756	9,224	55,019	10,269	48,191	2,857	96,891	1,338	98,665	1,598	98,405
496,15	12,357	59,113	11,073	66,093	13,324	61,515	1,551	98,442	0,649	99,315	0,799	99,204
616,53	14,416	73,529	12,020	78,113	14,378	75,893	0,752	99,193	0,287	99,602	0,350	99,554
766,12	14,368	87,897	11,785	89,898	13,436	89,329	0,392	99,585	0,139	99,741	0,163	99,717
952,00	12,043	99,940	10,034	99,932	10,593	99,922	0,275	99,861	0,095	99,836	0,111	99,828

## 12.5 pH-Werte während der Vergärung von Apfeltrester

Die pH-Wert-Verläufe der verschiedenen Vergärungsvarianten (Tab. 28) sind in Abb. 80 zusammengefasst.

Tab. 28: Beschreibungen zu den aufgeführten Vergärungsvarianten

Variante	Beschreibung
Var. 8	Enzym-Mix Startzugabe
Var. 9	Enzym-Mix Gestaffelte Zugabe
Var. 10	Pektinase Startzugabe
Var. 11	Trester nativ
Var. 12	Rapid Set
Var. 13	Slow Set

Nach dem enzymatisch-mechanischen Voraufschluss sinkt der pH-Wert in Abhängigkeit der Vergärungsvariante mehr oder weniger stark ab. Durch den Einsatz der Pektinase in hoher Konzentration (Var. 10) ist der Endwert schon nach 2 h nahezu erreicht. Die säurehydrolysierten Trester (Var. 12 und 13) zeigen im Lauf der Verflüssigung und Vergärung eine deutlich stärkere pH-Absenkung als die Referenzvariante ohne Säurehydrolyse (Var. 11), vermutlich aufgrund der verstärkten Freisetzung von Galacturonsäure durch die verstärkte Wirkung pektinolytischer Enzyme.

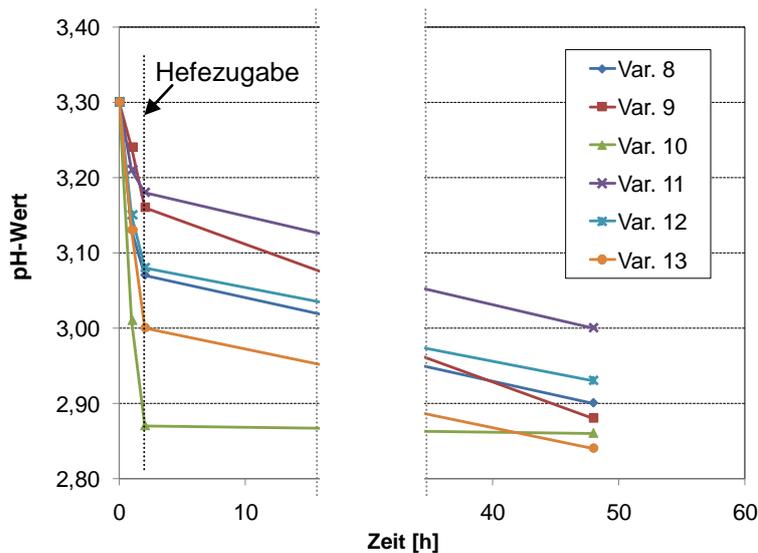


Abb. 80: pH-Wert-Verläufe während der Vergärung von nativen und säurehydrolysierten Apfeltrestern

## 12.6 Statistische Auswertungen (ANOVA)

In den nachfolgenden Kapiteln 12.6.1 und 12.6.2 wurden die ermittelten Messwerte der Enzymaktivitätsbestimmungen gegenüber Apfeltresterfasern und Apfelnasstrestern einer multifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen (Kap. 4.2.9.2). Für die untersuchten Parameter (Variablen) Aktivität, reduzierende Zucker und Glucose wurden pro Variante (z. B. AF-ADP-Einzeln, Tab. 29) 4 Messwerte (n = 4) in die statistische Auswertung einbezogen. Daraus ergab sich für den Versuchsplan „Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern“ pro Variable eine Gesamtanzahl an Messwerten von n = 96, für den Versuchsplan „Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrestern – Standardaufschluss“ pro Variable eine Messwertanzahl von n = 144 (Kap. 12.6.2.1) und für den Versuchsplan „Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrestern – Physikalische Vorbehandlung“ pro Variable eine Messwertanzahl von n = 72 (Kap. 12.6.2.2).

### 12.6.1 Statistik – Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern

Tab. 29: Versuchsplan – Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern

Faktor			Variable
Faser	Enzym (kombiniert mit CFD)	Kombination	(n = 96)
Apfeltresterfasern (AF)	ADP	Einzeln	Aktivität
Entpektinisierte Apfeltresterfasern (EAF)	AFP	Summe einzeln	Glucose
	SPL	Kombiniert	
	PEC		

Tab. 30: Signifikanzniveaus der Haupt- und Wechselwirkungseffekte – Enzymaktivitäten gegenüber Apfeltresterfasern

	Aktivität	Glucose
<b>Haupteffekte</b>		
Faser	++	+++
Enzym	+++	+++
Kombination	+++	+++
<b>Wechselwirkungseffekte</b>		
Faser-Enzym	+++	+++
Faser-Kombination	+++	+++
Enzym-Kombination	+++	+++
Faser-Enzym-Kombination	+++	+++

- keine Signifikanz, +Signifikanz 95 %, ++ Signifikanz 99 %,

+++ Signifikanz 99,9 %

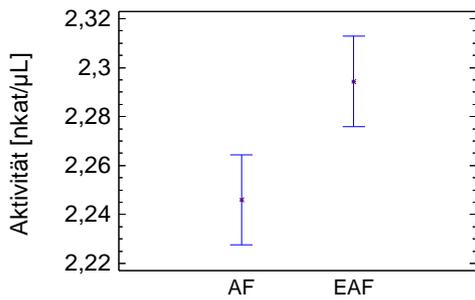


Abb. 81: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Faserart auf die Aktivität (n = 96)

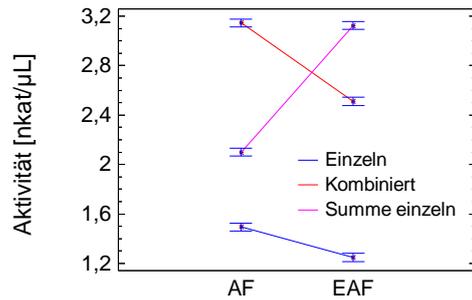


Abb. 82: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzymkombination auf die Aktivität (n = 96)

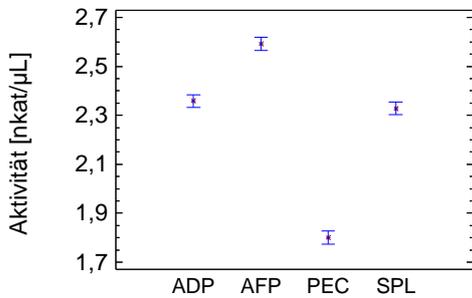


Abb. 83: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzympräparate auf die Aktivität (n = 96)

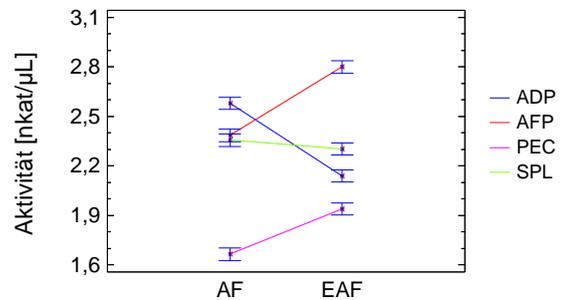


Abb. 84: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzympräparate auf die Aktivität (n = 96)

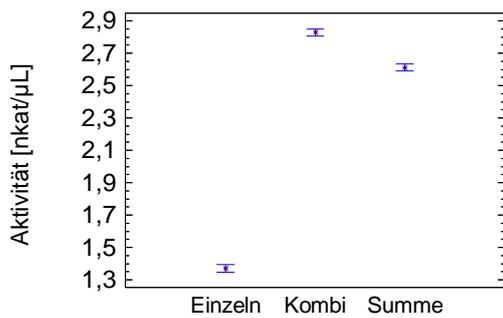


Abb. 85: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf die Aktivität (n = 96)

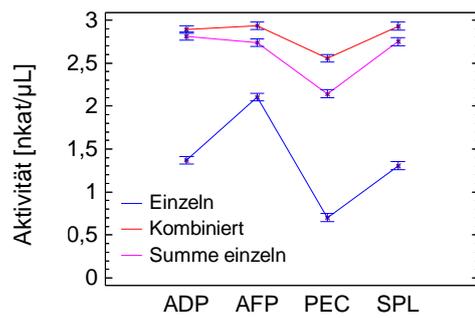


Abb. 86: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzympräparate und der Enzymkombination auf die Aktivität (n = 96)

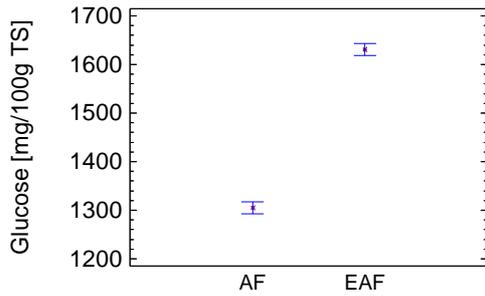


Abb. 87: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Faserart auf den Glucosegehalt (n = 96)

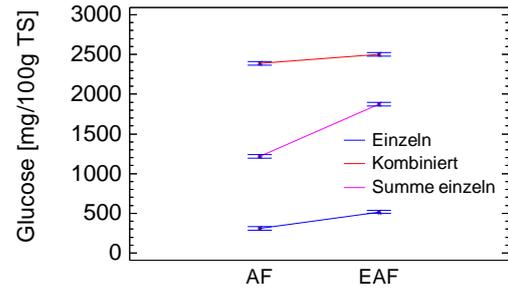


Abb. 88: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzymkombination auf den Glucosegehalt (n = 96)

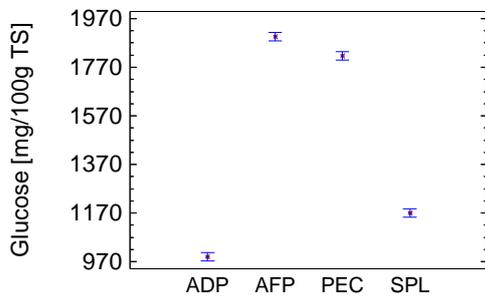


Abb. 89: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzympräparate auf den Glucosegehalt (n = 96)

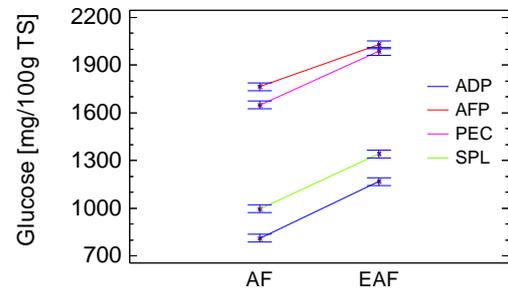


Abb. 90: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Faserart und Enzympräparate auf den Glucosegehalt (n = 96)

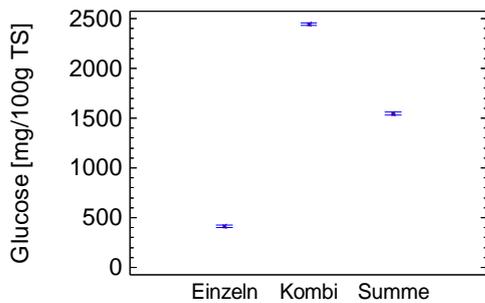


Abb. 91: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf den Glucosegehalt (n = 96)

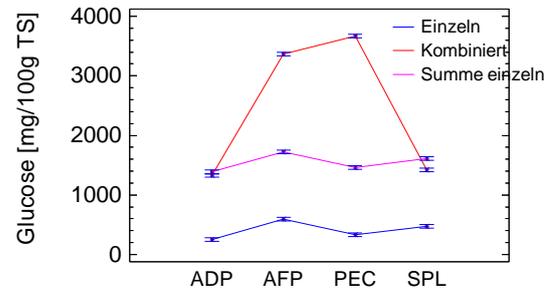


Abb. 92: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzympräparate und Enzymkombination auf den Glucosegehalt (n = 96)

## 12.6.2 Statistik – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester

### 12.6.2.1 Standardaufschluss

Tab. 31: Versuchsplan – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Standardaufschluss)

Faktor			Variable
Enzym	Kombination	Zeit	(n = 144)
ADP	Einzel	0 h	Reduzierende Zucker
SPL	Kombi I	4 h	Glucose
AFP	Kombi II	24 h	
PEC			

Tab. 32: Signifikanzniveaus der Haupt- und Wechselwirkungseffekte – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Standard-Aufschluss)

	Reduzierende Zucker	Glucose
<b>Haupteffekte</b>		
Enzym	+++	+++
Kombination	+++	+++
Zeit	+++	+++
<b>Wechselwirkungseffekte</b>		
Enzym*Kombination	+++	+++
Enzym*Zeit	++	+++
Kombination*Zeit	+++	+++
Enzym*Kombination*Zeit	-	+++

- keine Signifikanz, +Signifikanz 95 %, ++ Signifikanz 99 %,

+++ Signifikanz 99,9 %

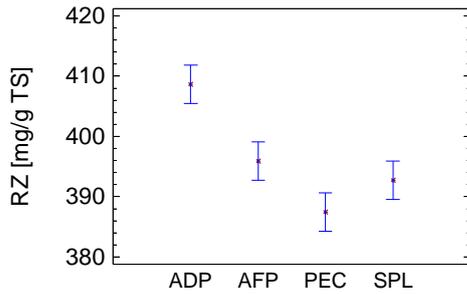


Abb. 93: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Enzyms auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144)

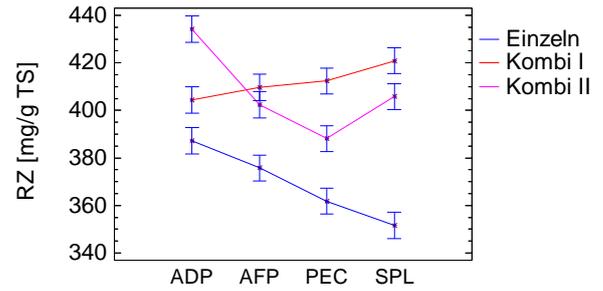


Abb. 94: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Enzymkombination auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144)

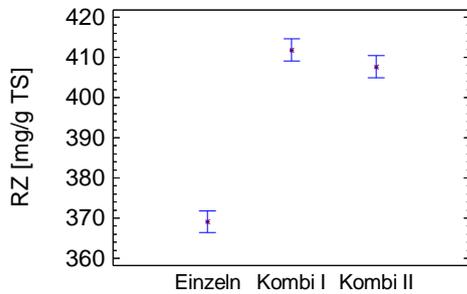


Abb. 95: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144)

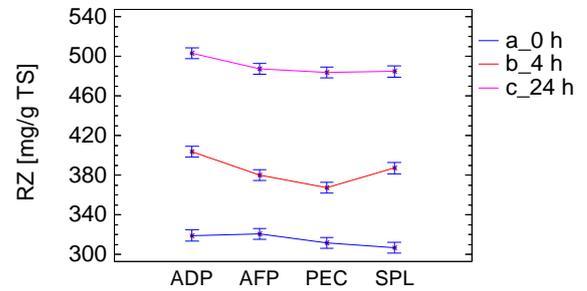


Abb. 96: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144)

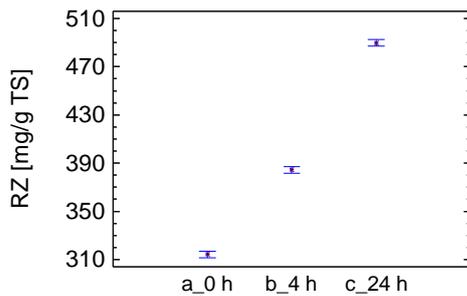


Abb. 97: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144)

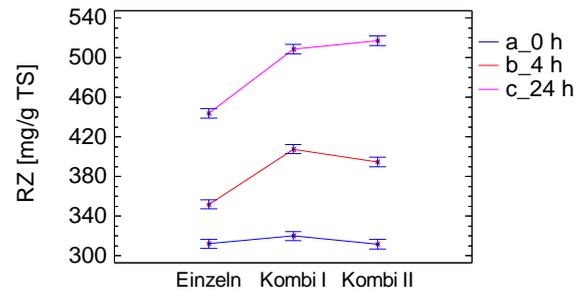


Abb. 98: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzymkombination und Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 144)

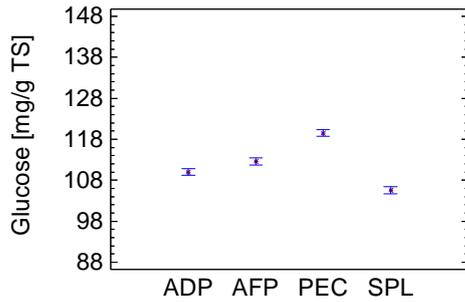


Abb. 99: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Enzyms auf den Gehalt an Glucose (n = 144)

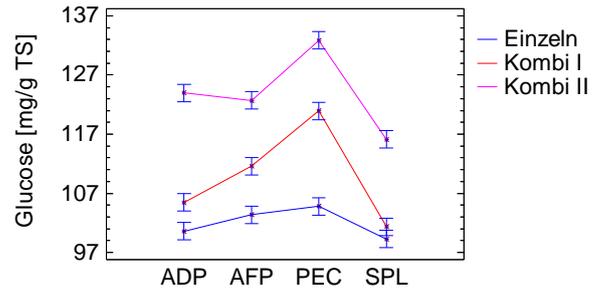


Abb. 100: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Enzymkombination auf den Gehalt an Glucose (n = 144)

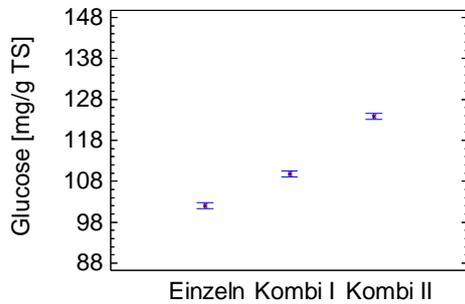


Abb. 101: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Enzymkombination auf den Gehalt an Glucose (n = 144)

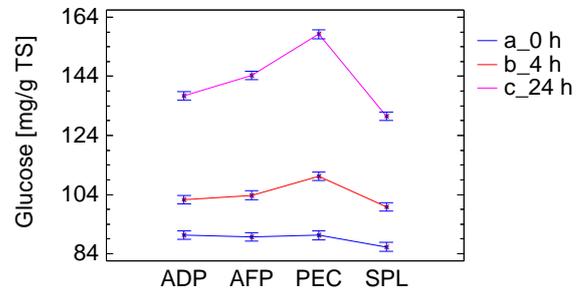


Abb. 102: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Enzyms und der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 144)

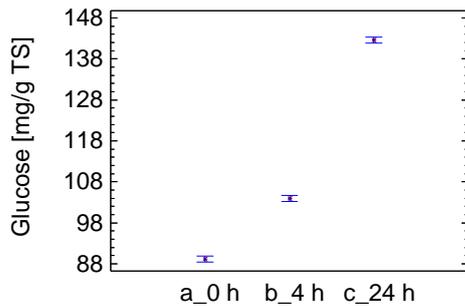


Abb. 103: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 144)

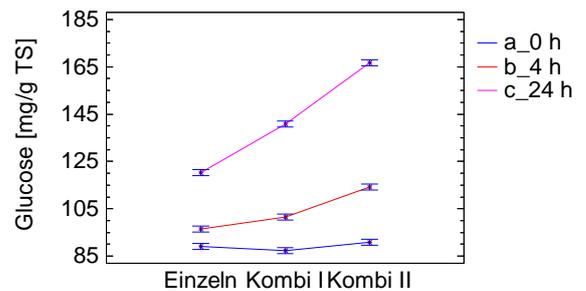


Abb. 104: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss der Enzymkombination und Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 144)

### 12.6.2.2 Physikalische Vorbehandlung

**Tab. 33: Versuchsplan – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Aufschluss)**

Faktor		Variable
Aufschluss	Zeit	(n = 72)
Standard	0 h	Reduzierende Zucker
US	4 h	Glucose
AK	24 h	
HOM 4D		
HOM 8D		
HOM 12D		

**Tab. 34: Signifikanzniveaus der Haupt- und Wechselwirkungseffekte – Enzymaktivitäten gegenüber Apfelnasstrester (Aufschluss)**

	Reduzierende Zucker	Glucose
<b>Haupteffekte</b>		
Aufschluss	+++	+++
Zeit	+++	+++
<b>Wechselwirkungseffekte</b>		
Aufschluss*Zeit	+++	+++

- keine Signifikanz, +Signifikanz 95 %, ++ Signifikanz 99 %,

+++ Signifikanz 99,9 %

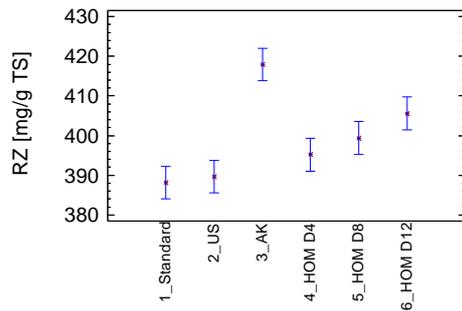


Abb. 105: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Aufschlusses auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 72)

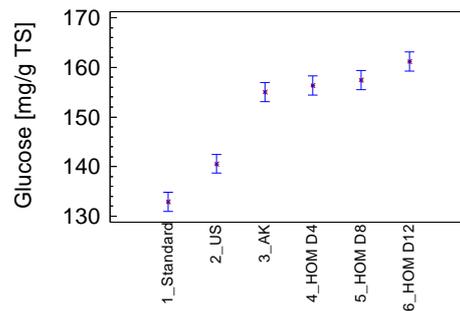


Abb. 106: Mittelwertdiagramm – Einfluss des Aufschlusses auf den Gehalt an Glucose (n = 72)

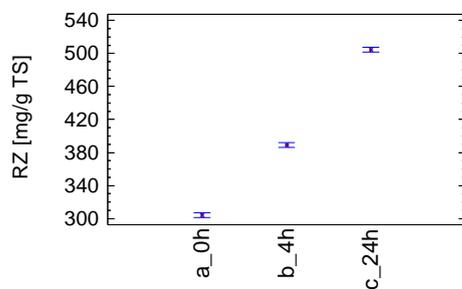


Abb. 107: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 72)

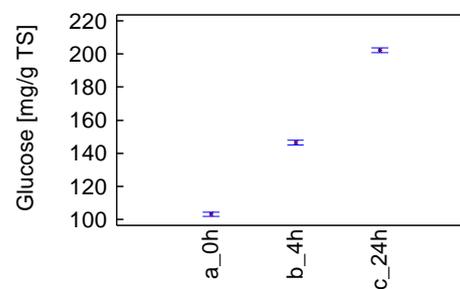


Abb. 108: Mittelwertdiagramm – Einfluss der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 72)

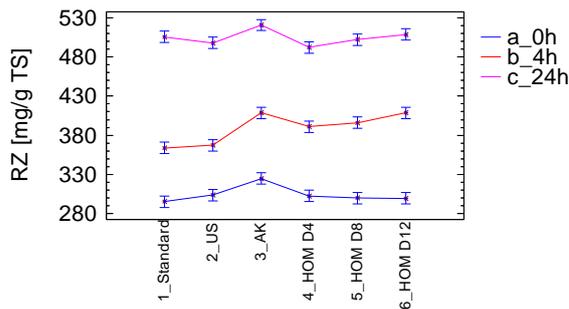


Abb. 109: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Aufschlusses und der Zeit auf den Gehalt an reduzierenden Zuckern (n = 72)

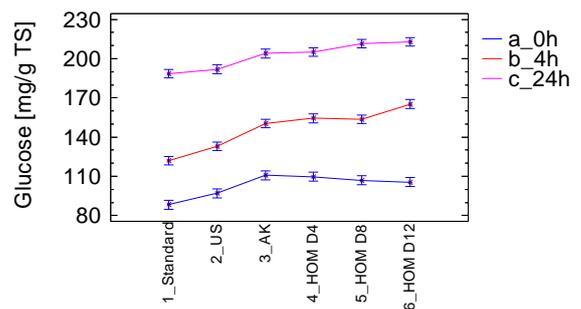


Abb. 110: Mittelwertdiagramm – Wechselwirkungseinfluss des Aufschlusses und der Zeit auf den Gehalt an Glucose (n = 72)

## PRÄSENTATIONEN UND VERÖFFENTLICHUNGEN

Schalow, S., Kunzek, H. (2004)

The influence of predrying treatment and of suspension solution conditions on the rehydration of apple cell wall materials. *European Food Research & Technology* 219, 329-340.

Schalow, S., Kabbert, R., Kunzek, H., Senge, B. (2006)

Poster: „Aktivitäten kommerzieller zellwandabbauender Enzyme gegenüber Modellsubstraten und komplexen Substraten (Apfeltresterfasern)“

Regionalverbandstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Berlin,  
23. - 24. März 2006

Kabbert, R., Schalow, S., Marchev, A., Slavov, A. (2006)

Präsentation: „Liquefaction of apple pomace for the production of alcohol“.

2<sup>nd</sup> International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries,  
Saltillo, Coahuila, Mexico,  
16. – 18. Oktober 2006

Schalow, S., Kabbert, R., Marchev, A., Slavov, A. (2006)

Apple pomace liquefaction by enzymatic and mechanical treatments for the production of alcohol. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium „Ecological approaches towards the production of safety food“ Plovdiv, Bulgaria, pp. 281-286

19. – 20. Oktober 2006

Schalow, S., Kabbert, R. (2007)

Workshop zum Thema „Innovatives Verfahren zur alkoholischen Vergärung von Obstrestern“ am Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin,  
29. Januar 2007

Schalow, S. (2007),

Poster: „Nutzung von Apfeltrester als Reststoff der obstverarbeitenden Industrie für die Erzeugung hochwertiger Spirituosen (Apfeltresterbrand)“

Lange Nacht der Wissenschaften, Foyer der Humboldt-Universität zu Berlin,  
09. Juni 2007

Schalow, S., Kabbert, R. (2008)

Präsentation: „Developing a technical process for the production of apple pomace brandy“.

Scientific Conference: Food Science, Engineering and Technologies 2008.

University of Food Technologies (UFT) Plovdiv, Bulgaria

24. – 25. Oktober 2008

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Sebastian Schalow

Geboren am 02. Mai 1976 in Berlin

Verheiratet, zwei Kinder

### Bisherige Tätigkeiten

- Seit März 2007    Wissenschaftlicher Mitarbeiter am  
Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-  
Universität zu Berlin
- 2004 - 2007        Stipendiat am  
Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-  
Universität zu Berlin
- 2003 - 2004        Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Technischen Universität Berlin,  
Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie,  
Fachgebiet Lebensmittelqualität und Materialwissenschaft

### Hochschulausbildung

- 1997 - 2003        Studium der Lebensmitteltechnologie an der  
Technischen Universität Berlin
- Abschluss als Dipl.-Ing. Lebensmitteltechnologie
- Titel der Diplomarbeit:  
„Der Einfluss der Milieu-Bedingungen bei der Vortrocknung und beim Re-  
hydratisieren auf die Eigenschaften von Apfelzellwandmaterialien“
- Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie,  
Fachgebiet Lebensmittelqualität und Materialwissenschaft
- Wissenschaftliche Betreuung:        Prof. Dr. H. Kunzek

### Zivildienst

- 1995 - 1996        Deutsches Rotes Kreuz, Sozialstation Berlin-Karlshorst

### Schulausbildung

- 1988 - 1995        Ernst-Abbe-Oberschule (Gymnasium), Berlin-Neukölln,  
Allgemeine Hochschulreife
- 1982 - 1988        Oskar-Heinroth-Grundschule, Berlin-Neukölln