



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

BESTIMMUNG, ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON ROGGENPENTOSANEN

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Stefanie Theiss
Matrikel-Nummer:	0206490
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. Emmerich Berghofer

Wien, im Oktober 2008

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der Durchführung meiner Diplomarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Berghofer für seine wertvollen Anregungen und die geduldige Betreuung meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Dipl. Ing. Julia Schmidt und Ute Innerkofler für die Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

Bei Viola Zahlner und Severin Huemer für die Unterstützung im Labor, bei Markus Hofinger für die tatkräftige Hilfe in technischen Belangen und Prof. Novalin für seine Hilfe bei der Ultrafiltration.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, meiner gesamten Familie und meinen Freunden die mir in dieser Zeit immer zur Seite standen und mit aufmunternden Worten jedes Problem kleiner machten.

1 EINLEITUNG	1
2 ROGGEN, ROGGENBROT UND SAUERTEIG	3
3 ZÖLIAKIE UND GLUTENFREIE BACKWAREN	6
4 PENTOSANE	14
4.1 Allgemein	14
4.2 Aufbau der Pentosane	16
4.3 Methoden zur Bestimmung des Pentosangehalts	19
4.3.1 Photometrische Methoden	19
4.3.2 Chromatographische Methoden	19
4.3.2.1 Anionenaustauschchromatografie (HPAEC/PAD)	19
4.3.2.2 Gaschromatographie	19
4.3.3 Spektroskopische Methoden	20
4.4 Methoden zur Isolierung der Pentosane	20
4.4.1 Isolierung der Pentosane nach RAGAE et al. (2001)	20
4.4.2 Isolierung der Pentosane nach FAUROT et al. (1995)	22
5 AUFGABENSTELLUNG	26
6 MATERIAL UND METHODEN	27
6.1 Verwendete Rohstoffe	27
6.2 Analytische Methoden	28
6.2.1 Trockensubstanzbestimmung nach ICC 110/1	28
6.2.1.1 Prinzip	28
6.2.1.2 Durchführung	28
6.2.1.2.1 Trocknung nach Verreiben mit Seesand	28
6.2.1.2.2 Direkte Trocknung	29
6.2.2 Bestimmung des Wassergehalts mittels Infrarotmessgerät	30
6.2.3 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl	31
6.2.3.1 Prinzip	31
6.2.3.2 Durchführung	31
6.2.3.3 Berechnung	32
6.2.4 Bestimmung des Pentosangehalts nach Hashimoto et al. (1987)	33
6.2.4.1 Prinzip	33
6.2.4.2 Probenvorbereitung	33
6.2.4.3 Detaillierte Beschreibung	35
6.2.4.4 Erstellen der Eichgerade	37
6.2.4.5 Berechnung	40
6.3 Technische Methoden	42
6.3.1 Ultrafiltration	42
6.3.1.1 Prinzip	42
6.3.1.2 Ultrafiltration im Labormaßstab	46
6.3.1.2.1 Kleine Ultrafiltrationsanlage	46
6.3.1.2.2 Mittlere Ultrafiltrationsanlage	48
6.3.1.2.3 Ultrafiltrationsanlage im halbtechnischen Maßstab (Große Anlage)	49
6.3.2 Sprühtrocknung	51
6.3.2.1 Prinzip	51
6.3.2.2 Durchführung	52
6.3.3 Gefriertrocknung	52
6.3.3.1 Prinzip	52

6.3.3.2 Durchführung	53
7 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION	54
7.1 Pentosangehalt der Roggenmuster	54
7.1.1 Durchführung	54
7.1.2 Ergebnisse	54
7.1.3 Diskussion	56
7.2 Isolierung der Pentosane	59
7.2.1 Isolierung im Labormaßstab	59
7.2.1.1 Erster Versuchsdurchlauf im Labormaßstab	59
7.2.1.1.1 Durchführung	59
7.2.1.1.2 Ergebnisse und Diskussion	64
7.2.1.2 Zweiter Versuchsdurchlauf im Labormaßstab	66
7.2.1.2.1 Durchführung	66
7.2.1.2.2 Ergebnisse und Diskussion	69
7.2.2 Isolierung im halbtechnischen Maßstab	71
7.2.2.1 Erster Versuchsdurchlauf im halbtechnischen Maßstab	71
7.2.2.1.1 Durchführung	71
7.2.2.1.2 Ergebnisse und Diskussion	74
7.2.2.2 Zweiter Durchlauf	77
7.2.2.2.1 Durchführung	77
7.2.2.2.2 Ergebnisse und Diskussion	80
8 SCHLUSSFOLGERUNGEN	84
9 ZUSAMMENFASSUNG	85
10 SUMMARY	86
11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
12 LITERATUR	88

1 EINLEITUNG

Getreide gehört zu den ältesten Kulturpflanzen der Welt, welche schon erstmals 5000 v. Chr. in Asien planmäßig angebaut wurden. Auf Grund ihres hohen Nährstoffgehalts zählen Getreideprodukte zu den wichtigsten Grundnahrungsmitteln.

Weizen, als meistverzehrtetes Getreide, zeichnet sich durch eine gute Backfähigkeit, ein großes Teigvolumen und ein hohes Gashaltevermögen aus. Für diese Eigenschaften ist eine Proteinfraction, das Gluten (oder Kleber), im Weizenmehl verantwortlich, welches beim Anteigen einen viskoelastischen, kohäsiven Teig bildet. Der Kleber umgibt die Stärkekörner, gibt dem Teig die gewünschten rheologischen Eigenschaften und bewirkt die Bildung eines porösen, lockeren Brotes mit elastischer Krume.

Bei Roggenbrot spielt der Kleber eine untergeordnete Rolle. Hier übernehmen die Pentosane seine Funktion. Pentosane gehören zu den Ballaststoffen, ihr Anteil im Roggenmehl beträgt rund 6-8%. Die positive Wirkung bei der Teigbildung besitzen sie aber nur bei saurem pH-Wert. Deshalb wird Roggenbrot unter Sauerteigführung hergestellt, um das gewünschte Gashaltevermögen und die Quellfähigkeit der Pentosane zu erreichen. Pentosane sind in der Lage ein Vielfaches ihres Eigengewichts in Form von Wasser aufzunehmen. Auf diese Weise entsteht ein aromatisches und gut lagerfähiges Brot.

Durch die hohe Prävalenz der Zöliakie steigt der Bedarf an glutenfreien Backwaren. Eine lebenslange glutenfreie Diät ist die einzige Möglichkeit ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Die beiden Hauptfraktionen der Endospermspeicherproteine, die Prolamine und Glutenine sind Auslöser für die Immunantwort und den damit einhergehenden pathogenen Veränderungen im Dünndarm beim Verzehr von Weizen, Roggen, Gerste und teilweise bei Hafer. Viele im Handel erhältliche glutenfreie Backwaren sind den glutenhaltigen unterlegen, weshalb der Bedarf an sensorisch ansprechenden glutenfreien Backwaren groß ist.

Die oben erwähnten positiven Eigenschaften machen die Pentosane zu einem interessanten Backhilfsmittel. Der Einsatz von isolierten Pentosanen zur

Herstellung von glutenfreien Backwaren ist ein guter Ansatzpunkt und soll Thema dieser Arbeit sein.

2 ROGGEN, ROGGENBROT UND SAUERTEIG

Roggen (*Secale cereale* L.) stammt ursprünglich aus dem Kaukasusgebiet und zählt zur Familie der Gräser (*Poacea*). Von dort aus gelangte er um 1000 v. Chr. als „sekundäre Kulturpflanze“ nach Europa (EISENBRAND und SCHREIER, 2006). Während Roggen in Deutschland bis zur Mitte des vorherigen Jahrhunderts die Hauptgetreideart darstellte, haben sich die Anbaubedingungen zu Gunsten des Weizens verschoben. Europa ist mit einer jährlichen Produktion von 15,9 Millionen Tonnen das Hauptanbaugebiet von Roggen was 89% der Weltproduktion entspricht (BELITZ et al, 2002). Roggen hat eine hohe Standort- und Klimatoleranz und wächst auch auf nährstoffarmen Böden.

Bei Roggenmehl spielen die Proteine in der Strukturgebung des Teiges eine untergeordnete Rolle, weil die Pentosane die Bildung eines Glutennetzwerkes unterbinden (CAUVIN und YOUNG, 1998) und deren Eigenschaften übernehmen. Pentosane entfalten ihre Wirkung aber nur im sauren pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 4,3. Nach dem ansäuern sind deren Löslichkeit und Quelfähigkeit erhöht, weshalb Roggenbrot nur durch Sauerteigführung hergestellt werden kann. Bei der Teigherstellung quellen die Pentosane nach Zugabe von Wasser stark an. Dies führt zur Bildung einer hochviskosen Masse und beeinflusst die Rheologie, die Haltbarkeit und die Saftigkeit der Krume positiv. Weiters erhöht eine Sauerteigführung das Gashaltevermögen und bewirkt durch Gasbildung lockere Teige. Schon im Altertum war Sauerteig bekannt, seine Herstellung ist daher einer der ersten biotechnologischen Prozesse. In den letzten Jahren hat das traditionelle Sauerteigbrot neue Beliebtheit gefunden, weil der Bedarf an natürlichen, gesunden und schmackhaften Backwaren steigt.

Doch nicht nur die Textur der Backwaren wird verbessert: Sauerteig erhöht die Bioverfügbarkeit von Mineralstoffen, reduziert den Phytat-Gehalt und verringert den postprandialen Glucosewert (ARENDT et al., 2007) und hat somit hohe ernährungsphysiologische Qualität.

Bei der Sauerteigfermentation produzieren Milchsäurebakterien organische Säuren, Exopolysaccharide und Enzyme. Der Sauerteig enthält einerseits

Hefen, andererseits eine Vielzahl von Bakterien, deren Zusammensetzung einen großen Einfluss auf die Backeigenschaften haben. Durch enzymatische Prozesse entstehen charakteristische Geruchs- und Geschmackstoffe. Die Sauerteigführung kann auf verschiedenen Arten erfolgen (Abb. 2.1):

1. Die mehrstufige Führung beruht auf der Tatsache, dass Laktobazillen und Hefen bei verschiedenen Temperaturen ihr Wachs- und Wirkungsoptimum haben. Bakterien wachsen bei 35°C optimal, Hefen bei 26°C weshalb der Teig hier beide Temperaturstufen durchläuft. Durch diese Führung entstehen viele Aromastoffe, sie ist jedoch mit einem größeren Zeitaufwand verbunden (16-24 h).
2. Bei der reduzierten Führung wird auf die Entwicklung der Hefe keine Rücksicht genommen. Diese Teigführung verkürzt sich auf etwas drei Stunden. Dabei entsteht der gleiche säuerliche Geschmack wie bei mehrstufiger Führung, jedoch werden weniger Aromastoffe ausgebildet.

Durch Mikroorganismen und mehleigene Enzyme kommt es während der Fermentation zur Veränderung der Kohlenhydrat- und Proteinkomponenten. Die Ansäuerung beeinflusst weiters die strukturgebenden Bestandteile wie Gluten und Arabinoxylan. In saurem Milieu quillt und hydrolysiert die Stärke. Weiters werden auch die enzymatischen Bedingungen verändert. So ist z.B. die Amylaseaktivität stark vermindert, was von großem Vorteil ist, weil die Verkleisterungstemperatur von Roggenstärke (55-70°C) sich mit dem Aktivitätsbereich von α -Amylase überschneidet. Der Stärkeabbau wird dadurch verhindert.

Sauerteigführung wird zur Herstellung vieler Brotsorten eingesetzt. Bekannt sind unter anderem Roggen-, Weizen-, Dinkel- und Reissauerteige. Während bei Weizen der Sauerteig einer zusätzlichen Verbesserung des Geschmacks dient (Ciabatta), ist Roggenmehl, wie bereits oben erwähnt, ohne Ansäuerung nicht backfähig.

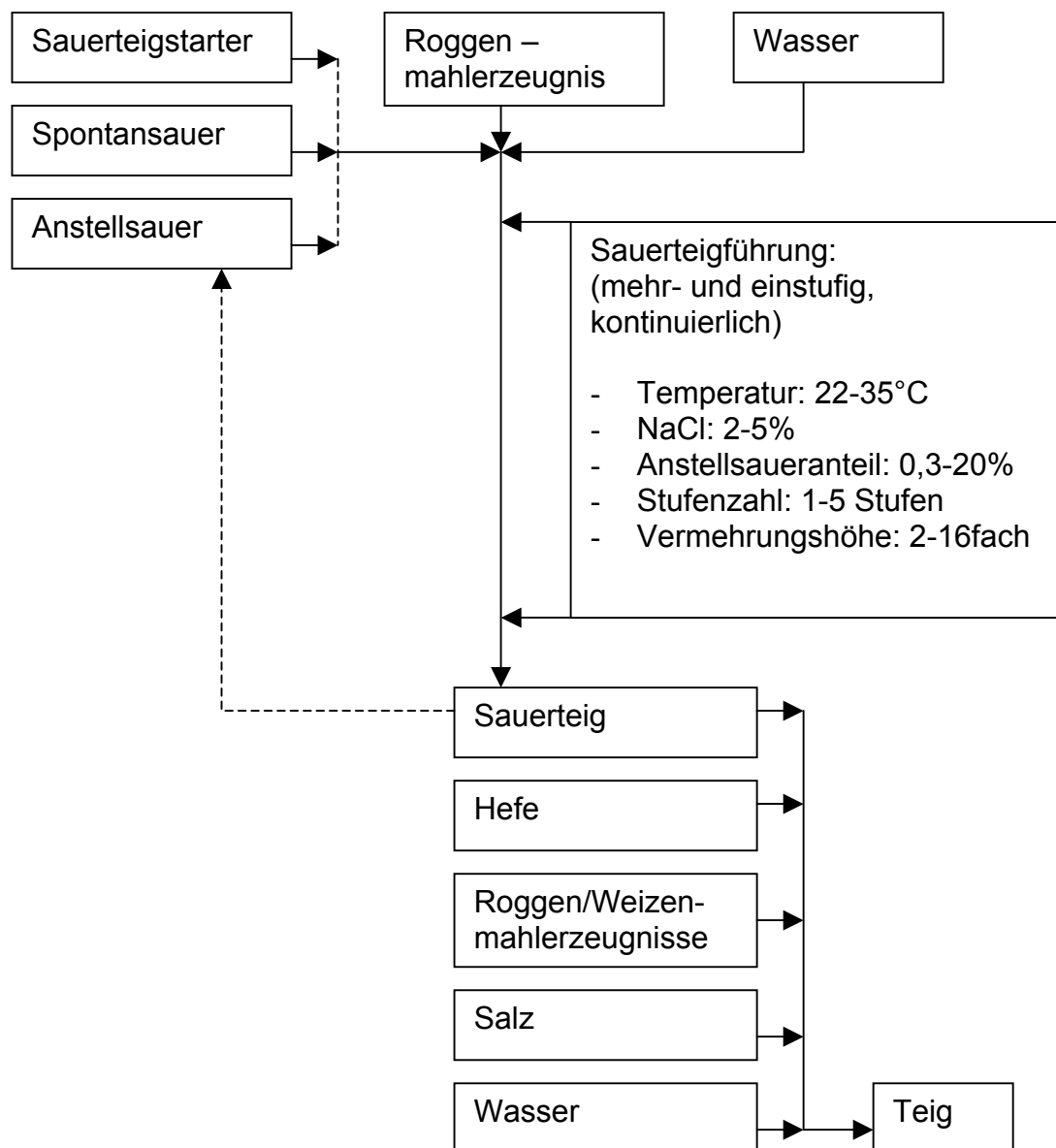


Abb. 2.1: Sauerteigführung nach GÄNZLE und BRANDT (2005)

3 ZÖLIAKIE UND GLUTENFREIE BACKWAREN

Zöliakie (engl.: coeliac disease, celiac disease (US)), auch „Einheimische Sprue“ genannt, ist eine chronische, pathogene Veränderung der Dünndarmmukosa, beruhend auf einer Immunantwort gegen Bestandteile der Kleberproteine von Gerste (Hordein), Roggen (Secalin), Weizen (Gliadin) und wahrscheinlich Hafer (Avenine). In der Dünndarmmukosa kommt es zu einer entzündlichen Reaktion, welche die Zerstörung der Epithelzellen zu Folge hat.

Gluten ist ein komplexes Gemisch aus heterogenen Proteinen, die nach ihrer Löslichkeit in Alkohol klassifiziert werden (Abb. 3.1). Die alkohollösliche Fraktion wird allgemein Prolamin genannt, da sie reich an den Aminosäuren Prolin und Glutamin ist. Die beiden Hauptfraktionen Prolamine und die Gluteline der Endospermspeicherproteine sind der Auslöser für die Immunantwort und den damit einhergehenden pathogenen Veränderungen im Dünndarm. Die Gluteline und die Prolamine der einzelnen Getreidearten sowie deren Anteil am Gesamtproteingehalt wird in Tab. 3.1 gezeigt (POMERANZ, 1988).

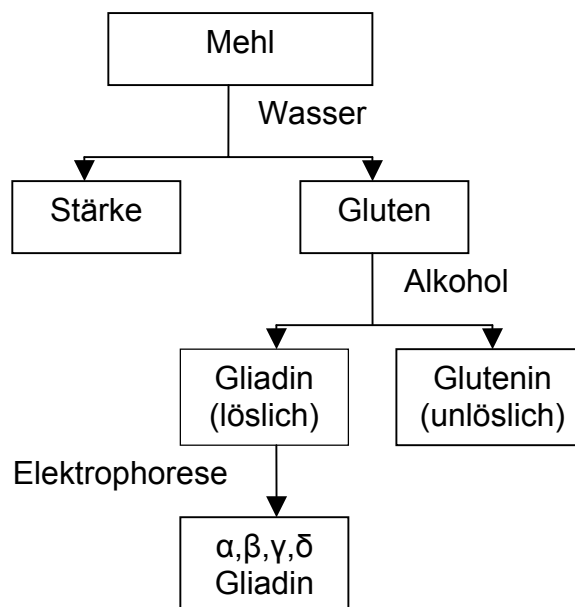


Abb. 3.1: Ausschnitt aus den OSBORNE-Fractionen der Weizenproteine

Tab. 3.1: Prolaminanteil am Gesamtproteingehalt verschiedener Getreidesorten

Getreideart	Glutelin	Prolamin	% Prolamin am Gesamtprotein
Weizen	Glutenin	Gliadin	69
Mais	Zeanin	Zein	55
Gerste	Hordenin	Hordein	40
Hirse		Kafirin	52
Roggen	Secalinin	Secalin	30 - 50
Hafer	Avenalin	Avenin	16
Reis	Orycenin	Orycin	5

1888 wurde erstmals der Zusammenhang zwischen Zöliakie und dem Verzehr von Getreideprodukten durch Samuel Gee beschrieben. Gluten im Speziellen wurde erstmals 1950 von Willem Dicke als Ursache genannt. Mitte der 50er Jahre wurden die ersten Dünndarmbiopsien durchgeführt, wodurch eine morphologische Beschreibung des Dünndarms bei Glutenunverträglichkeit möglich wurde. In den späten 70er Jahren wurden der Krankheit klinische Symptome wie Diarrhoe, Malabsorption und Gewichtsverlust zugeordnet (LOHI et al., 2007). Damals schätzte man die weltweite Prävalenz auf rund 0.03% (GREEN und JABRI, 2003). Mit Einführung und ständigen Verbesserung der serologischen Testverfahren wurden Screenings eines großen Bevölkerungskollektivs möglich und epidemiologische Studien konnten durchgeführt werden. Mit diesem medizinischen Fortschritt konnten mehr Krankheiten erfasst werden. Durch die sehr unspezifischen Symptome bleibt die Zöliakie häufig undiagnostiziert. Man spricht in diesem Zusammenhang vom Zöliakie-Eisberg (Abb. 3.2).

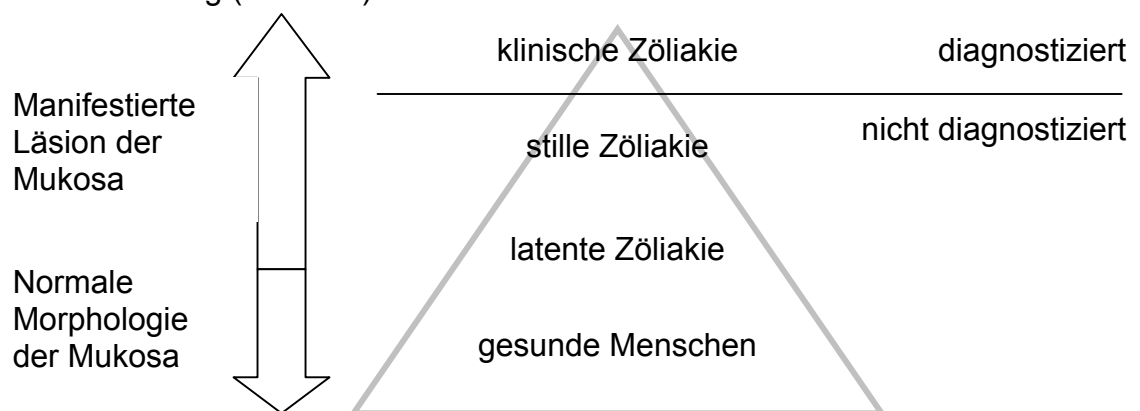


Abb. 3.2: Zöliakie-Eisberg (McLOUGHLIN et al., 2003)

Bei Verdacht auf Zöliakie werden serologische Screenings durchgeführt. Eine eindeutige Diagnose erhält man erst durch eine Endoskopie mit Gewebebiopsie und anschließender histologischer Untersuchung. Zöliakie zählt zu einer der häufigsten lebenslangen Funktionsstörungen in den westlichen Ländern. In Europa erkrankt etwa eine von 150-300 Personen (McLOUGHLIN et al., 2003), eine genaue Auflistung findet man in Tab. 3.2. Die Prävalenz steigt in Kombination mit chronischen Erkrankungen wie familiär bedingter Hypercholesterinämie, Diabetes Typ-1 und angeborenem Hypothyroidismus. Eine genaue Erfassung ist aber schwierig, da die Krankheit durch die unspezifischen Symptome oft nicht erkannt wird. Folgende Manifestationen können Hinweise auf Zöliakie sein: Verspätete Pubertät, geringe Körpergröße, Gewichtsverlust, Durchfall, Haarausfall, Malabsorption und damit verbundene Komplikationen wie Osteoporose oder Anämie.

Innerhalb Europas resultieren verschiedene Prävalenzen nicht zuletzt durch Schwankungsunterschiede bei statistischen Erhebungen. Zöliakie ist häufig bei Asiaten, die in Europa leben, vermutlich zurückzuführen auf den erhöhten Konsum von glutenhaltigen Lebensmitteln. Bei Schwarzen ist Zöliakie unbekannt. Risikofaktoren sind neben der genetischen Disposition das Geschlecht (die Prävalenz bei Frauen ist geringfügig höher) und die Ernährung. So ist bei Säuglingen, die während der Einführung von glutenhaltiger Beikost noch gestillt werden, das Risiko an Zöliakie zu erkranken signifikant geringer, als bei ungestillten Kindern während dieser Zeit. Weiters kann durch Verlängerung der Stilldauer das Erkrankungsrisiko ebenfalls verringert werden (IVARSSON et al., 2001). Auch Rauchen wird in Kontext mit Zöliakie gebracht (VAZQUEZ et al., 2001).

Tab. 3.2: Prävalenz der Zöliakie (McLOUGHLIN, 2003)

Land (Jahr)	Prävalenz
Ungarn (1999)	1 : 85
UK (2003)	1 : 100
Finnland (1998)	1 : 130
Schweiz (2002)	1 : 132
USA (2003)	1 : 133
Italien (1996)	1 : 210
Spanien (2000)	1 : 390

Zöliakie tritt häufig in Verbindung mit anderen Krankheiten auf. Bei Menschen mit Autoimmunerkrankungen kommt sie 3-10mal häufiger vor. Etwa 8-10% der Menschen mit Diabetes Typ 1 haben auch Zöliakie. Weiters tritt es häufiger bei Down Syndrom-Patienten (4-5%) und Patienten mit IgA-Defizit (Prävalenz zehnfach erhöht) auf (GREEN und JABRI, 2003). Schwere Krankheiten wie Anämie, Infertilität, Osteoporose und Lymphome können die Folge einer langen, unbehandelten Erkrankung sein. Als dermatologische Manifestation kann Dermatitis herpetiformis auftreten.

Den Grundstein der Zöliakie-Therapie bildet eine lebenslange glutenfreie Diät. Auf Weizen, Roggen, Dinkel, Gerste und wahrscheinlich Hafer muss vollständig verzichtet werden. Das „The Crossed Grain“ Symbol (Abb. 3.3) kennzeichnet europaweit Lebensmittel die unter 10 mg Gluten/ 100g enthalten und stellt somit eine große Hilfestellung für die richtige Produktauswahl dar, ist aber gesetzlich nicht vorgeschrieben.



Abb. 3.3: „The Crossed Grain“-Symbol

Eine gute Lebensmittelkennzeichnung ist sehr wichtig, da verstecktes Gluten immer noch ein großes Problem darstellt. Gluten ist, z.B. in Form von Weizenstärke in vielen Fertiggerichten wie Fertigsaucen, Fertigsuppen, Stabilisatoren, Kaugummis, in Puddingpulver, Konserven, aromatisierten Tees und Kartoffelchips aber auch in Medikamenten und Kosmetika wie Zahncreme und Lippenstift enthalten.

Neben der freiwilligen Kennzeichnung ist eine gesetzliche Verankerung notwendig. Sie ist im Codex Alimentarius im Kapitel B20, Absatz 63 definiert: „Gluten- (u.a. gliadin) freie Mahl- und Schälprodukte einschließlich Fertigmehle sind solche, die keine Bestandteile aus Weizen, Roggen, Triticale, Gerste und Hafer enthalten. Der Begriff „Gluten“ bezieht sich auch auf die Prolamine der Gerste (Hordein), des Hafers (Avenin) und die Prolamine der Kreuzungen aller in diesem Absatz genannten Getreidearten. Glutenfreie Mahl- und Schälprodukte werden aus glutenfreiem Getreide oder anderen geeigneten Produkten (z.B. Buchweizen) hergestellt.“ Weiters enthalten ist ein Beitzext für Produkte bei denen der Glutengehalt technologisch minimiert wurde: „Wird bei Produkten aus Weizen, Roggen und Triticale der Gehalt an Gluten durch technologische Maßnahmen (z.B. Trennverfahren) soweit verringert, dass Gluten nicht mehr nachweisbar ist, kann darauf in der Bezeichnung hingewiesen werden (z.B. „glutenbefreit“). Für Prolamine aus Gerste und Hafer gibt es derzeit keine ausreichend empfindliche Nachweismethode“.

Neben der Definition von glutenfreien Mahl- und Schälprodukten sind auch glutenfrei Backwaren genau definiert (Kapitel B18-Backerzeugnisse, Anhang II): „Gluten- (u.a. gliadin-) freie Backerzeugnisse enthalten lediglich glutenfreie Mahl- und Schälprodukte (Codexkapitel B 20 'Mahl- und Schälprodukte', Abs. 62) und sind auch frei von anderen gluten- (u.a. gliadin-) haltigen Beigaben.“ Der Codex Alimentarius bezeichnet Lebensmitteln die unter 200 ppm Gluten enthalten als glutenfrei. Es wird diskutiert die Grenzwerte für natürlich glutenfreie Lebensmittel auf 20 ppm zu reduzieren, eine gesetzliche Verankerung gibt es bisher nur in wenigen europäischen Ländern.

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Gluten in Lebensmittel werden molekularbiologische (PCR-Polymerase-chain-reaction) und

immunologische Verfahren eingesetzt (Immunelektrophorese, ELISA). Das Nachweisverfahren sollte einerseits in der Lage sein Gliadin in unverarbeiteten als auch in hitzebehandelten Lebensmitteln verlässlich nachzuweisen, andererseits soll er für eine Vielzahl von Lebensmittel einsetzbar sein (z.B.: Getreide, Sirup, Wurstwaren). Der von R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland) entwickelte, auf ein Sandwich-Immunoassay basierende Testkit Ridascreen® Gliadin, ist in der Lage in flüssigen und festen Lebensmitteln die Prolamine aus Weizen (Gliadin), Gerste (Hordein) und Roggen (Secalin) bis zu einer Bestimmungsgrenze von 2,5 ppm in flüssigen und festen Lebensmitteln zu deklarieren und wurde im Codex Alimentarius als „Type 1 Methode“ festgesetzt. Er zeichnet sich durch eine geringe Analysedauer (rund 3 Stunden), eine hohe Spezifität, eine hohe analytische Sensitivität und eine hohe Präzision aus.

Viele im Handel erhältliche, glutenfreie Brotsorten, sind den Glutenhaltigen unterlegen. Sie haben eine geringere Haltbarkeit, eine trockene und brüchige Krume sowie ein schlechtes Mundgefühl (GALLAGHER et al., 2003). Auf Grund der hohen Nachfrage und der damit verbundenen steigenden wirtschaftlichen Bedeutung, wird die Produktion von ansprechenden glutenfreien Backwaren immer wichtiger. Mögliche glutenfreie Rohmaterialien wären (BERGHOFER et al., 2008):

- Glutenfreie Getreidesorten (Hirse, Mais, Reis)
- Pseudocerealien wie Amaranth, Buchweizen oder Quinoa
- Stärkereiche Gemüsesorten (wie z.B. Bohnen, Erbsen)
- Andere Stärkereiche Rohmaterialien (wie z.B. Kochbananen, Kastanien und Nüsse)
- Wurzel und Knollen (wie z.B. Kartoffeln, Süßkartoffeln und Cassava)
- Isolierte und modifizierte Stärke (z.B. Kartoffeln, Süßkartoffeln und Tapioka)

Ein Überblick über die Stellung der Pseudocerealien und der einzelnen Getreidearten im Pflanzenreich und ihrer Eignung bei Zöliakie wird in Abb. 3.4 gezeigt.

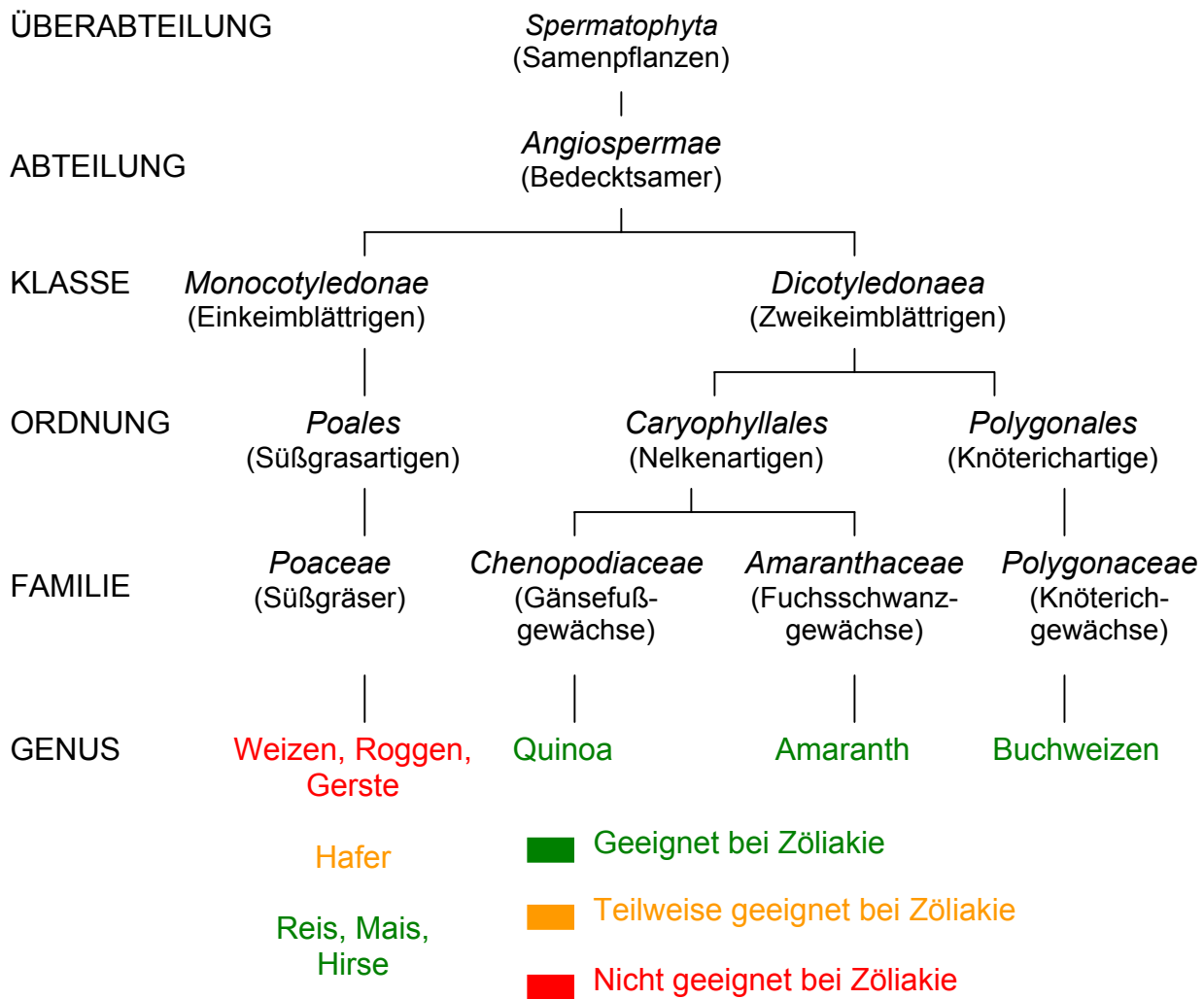


Abb. 3.4: Cerealien und Pseudocerealien im Pflanzenreich

Um bessere Backeigenschaften zu erzielen werden glutenfreien Backwaren

- verschiedene wasserbindende und filmformende Zutaten zugefügt wie z.B. Hydrokolloide oder Verdickungsmittel: Cellulose Derivate (Chydroxypropyl-methylcellulose (HPMC), Carboxymethylcellulose (CMC) (CATO et al., 2004), Guar Gummi, Carrageenate, Johannisbrotkernmehl, Xanthangummi oder Pentosane.
- verschiedene strukturgebende, volumenvergrößernde und geschmackgebende Zutaten beigemischt wie Proteine (wie z.B. Sojaprotein, Milchprotein, Fischprotein, Kartoffelprotein), modifizierte Proteine (wie z.B. die Verwendung von Transglutaminase zur Formung eines

Proteinnetzwerkes), Fett und niedermolekulare Kohlenhydrate (wie z.B. Inulin).

- oberflächenaktive Substanzen (Emulgatoren) zugefügt

4 PENTOSANE

4.1 Allgemein

Pentosane zählen zu den Ballaststoffen des Roggens und sind als Bestandteile der pflanzlichen Zellwand in sie miteingebunden. Der Ballaststoffgehalt von Roggenmehl wird in Tab. 4.1 gezeigt. Die Gewichtsprozent beziehen sich auf die Trockenmasse (mittlerer Wassergehalt von Roggen: 13%).

Tab. 4.1: Mittlere Zusammensetzung von Roggenmehl (BELITZ, 2002)

	Type				
	815	997	1150	1370	1740 (a)
	Ausmahlungsgrad (b)				
	69 - 72%	75 - 78%	79 - 83%	84 - 87%	90 - 95%
Stärke	74,8	73,5	71,3	71,1	68,6
Protein (Nx5,8)	7,5	8,03	9,6	9,6	11,7
Lipide	n.a.	1,3	1,5	1,7	1,8
Ballaststoffe (c)	7,6	10,1	9,3	10,5	16,2
Mineralst.(Asche)	0,82	1	1,15	1,37	1,74

(a) Weizenbackschrot

(b) ungefähre Angabe

(c) Unverdauliche Kohlenhydrate (wasserlöslich und – unlöslich), Lignin

n.a.: Nicht analysiert

Den Hauptbestandteil des Getreidekorns bildet die Stärke. Sie dient als Reservekohlenhydrat und ist im Endosperm in eine Proteinmatrix eingelagert. Roggenstärkekörner sind linsenförmig, ihr Durchmesser beträgt 12-40 µm. Die Verkleisterungstemperatur beträgt 57-70 °C. Der Stärkeanteil im Roggenmehl variiert je nach Ausmahlungsgrad zwischen 68,6 und 74,8%. Mit dem Ausmahlungsgrad steigt der Ballaststoffgehalt und mit ihm der Pentosangehalt. Ballaststoffe können nicht, oder nur unvollständig von den Enzymen im menschlichen Verdauungstrakt gespalten werden. Eine anschließende Resorption ist daher nicht möglich. Dennoch besitzen sie einen hohen ernährungsphysiologischen Wert. Sie verlängern das Sättigungsgefühl durch

die längere Verweildauer des Nahrungsbreis im Darm, regen die Darmtätigkeit in tieferen Darmabschnitten an und senken den Blutcholesterinspiegel. In der Pflanze dienen Ballaststoffe als Gerüstsubstanz der Zellwände und kommen in den äußeren Kornschichten in höherer Konzentration vor.

Als Ballaststoffe bezeichnet man pflanzliche Nicht-Stärke-Polysaccharide plus Lignin (ELMADFA, 1998). Eine genauere Einteilung nach SCHWEITZER (1980) wird in Abb. 4.1 dargestellt.

Stoffgruppe	Komponenten	Strukturelement
Kohlenhydrate	Cellulose	β-D- Glucane
	Hemicellulose	Arabinoxylane
		Arabinogalactane
		Glucuronoxylane
	Pektine	Glucofructane
		Galactomannane
		Glucomannane
		Galacturonane
Nicht-Kohlenhydrate	Lignin	Galacturonorhamnane
	Zellwandgebundene Substanzen	Phenylpropan
		Silikate
		Proteine
		Cutin
		Wachs

Abb. 4.1: Einteilung der Ballaststoffe nach SCHWEITZER (1980)

Bei den Getreideballaststoffen handelt es sich größtenteils um Hemicellulose (überwiegend Pentosane, Arabinogalactane und Glucofructane) und Cellulose (β-D-Glucane). Pentosane sind demnach der Gruppe der Hemicellulosen zuzuordnen. Unter den Getreidesorten gilt Roggen als besonders pentosanreich (6-8 %), Weizen hat einen Pentosangehalt von 2-3% (BELITZ, 2002). Eine von BENGTSSON und AMAN (1990) analysierte Roggensorte mit einem Ballaststoffgehalt von 16,5% in der Trockenmasse setzt sich aus 2,3% β-Glucan, 7,6% Arabinoxylan, 2,6% Cellulose und 3% Lignin zusammen. Nach einer kalten, nassen Anbauzeit und in kleinen Körnern ist der Gehalt höher (SAASTAMOINEN et al., 1989).

Man unterscheidet Pentosane nach ihrer Löslichkeit in Wasser. Nur die wasserlöslichen Pentosane beeinflussen die Brotherstellung positiv: Einerseits

durch die hohe Wasserbindungsfähigkeit, andererseits auf Grund der rheologischen Eigenschaften, die das Gasrückhaltevermögen und somit das Brotvolumen erhöhen (DELCOUR et al., 1991). Pentosane können wesentlich mehr Wasser binden (6-8 fach) als der Kleber des Weizenteiges (2-fach) (www.a-wiedemann.de). Laut BUSHUK (1966) beträgt die Wasserhaltekapazität sogar bis zu 15 g Wasser pro g Pentosan.

Die Zusammensetzung dieser Nicht-Stärke-Polysaccharide ist in der menschlichen und tierischen Ernährung von immer größerem Interesse. Nicht-Stärke-Polysaccharide im Allgemeinen und Pentosane im Besonderen haben immunmodulierende Eigenschaften, sie vermindern die Infektanfälligkeit und sind therapeutische Hilfe gegen maligne Tumore. Unter diesen Aspekten sind sie auch als Functional Food von Bedeutung (GHONEUM, 1998; MIYAZAKI et al., 1994). Während wasserlösliche Nicht-Stärke-Polysaccharide beim Menschen positive ernährungsphysiologische Eigenschaften haben, stellen sie als Bestandteil von Geflügelfuttermittel einen bedeutenden antinutritiven Faktor dar (CHOCT und ANNISON, 1990).

4.2 Aufbau der Pentosane

Pentosane sind Polysaccharide aus Pentosen. Die Definition der Pentosane ist widersprüchlich. Unter dem Begriff Pentosane sind meist der Hauptbestandteil Arabinoxylan und das in geringen Mengen vorhandene Arabinogalaktan zusammengefasst. Die Bezeichnung Schleimstoffe und Roggengummi sind weniger gängig. SANDSTEDT et al. (1939) berichteten erstmals in den vierziger Jahren von der möglichen funktionellen Eigenschaften der Biopolymere Arabinoxylan und Arabinogalaktan bei der Brotherstellung. Seither wurde viel Aufwand in diese Richtung betrieben, wobei das Hauptaugenmerk bei den Arabinoxylanen liegt. Die beiden Polysaccharide unterscheiden sich in ihrer Löslichkeit: Arabinoxylan ist im Gegensatz zu Arabinogalaktan in 80%-igem Ethanol unlöslich. Oft wird der Begriff Pentosane mit Arabinoxylanen gleichgesetzt. Auf Arabinogalaktan wird meist nicht näher eingegangen, weil es in Bezug auf die Backfähigkeit keine Rolle spielt.

Pentosane sind neben dem Arabinogalaktan aus dem linearen Polysaccharid Arabinoxylan aufgebaut. Betrachtet man Pentosane unter dem chemisch-analytischen Aspekt, ist die Bezeichnung Arabinoxylan in der Literatur gängig. Arabinoxylane bestehen aus einer linearen Kette aus D-Xylopyranose-Einheiten, deren OH-Gruppen in 2- und/oder 3-Stellung mit L-Arabinofuranose glycosidisch verknüpft sind (BELITZ, 2002). Wasserlösliche und wasserunlösliche Arabinoxylane unterscheiden sich durch den Grad der Verzweigung (SHOGREN et al., 1987). Das Verhältnis Arabinose zu Xylose (A/X ratio) ist dafür bezeichnend und ermöglicht gute Einblicke in die Struktur. Die Xylankette trägt auch andere Substituenten wie z.B. Glucuronsäure oder Galaktose (CARPITA und GIBEAUT, 1993). Das Substitutionsmuster mit L-Arabinose nimmt BENGTSSON (1990) zur Unterscheidung von zwei Arabinoxylan-Gruppen.

Die erste Gruppe bilden die Arabinoxylane I (Abb. 4.2): Hier ist ein hoher Anteil an 0-3 einfachsubstituierten und unsubstituierten Xylopyranosen vorherrschend. Das Verhältnis Arabinose (Ara)/Xylan (Xyl) ist mit rund 0,5 niedrig. Sie sind vollständig wasserlöslich.

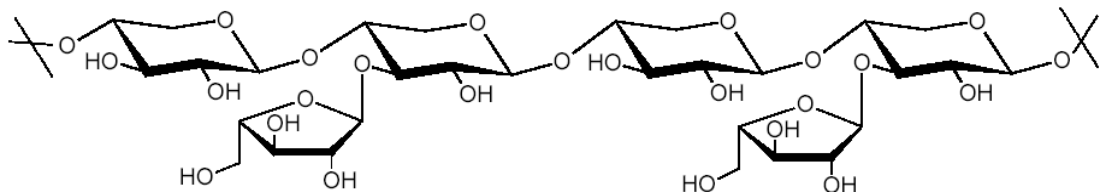


Abb. 4.2: Arabinoxylan I (BENGTSSON, 1990)

Die zweite Gruppe bilden die Arabinoxylane II (Abb. 4.3): Die Arabinoxylane II des Roggens sind stärker substituiert. Hier binden der 1- α Arabinofuranosylrest an O-2 und O-3. Das somit höhere Ara/Xyl Verhältnis steigt auf rund 1,4. Sie sind partiell wasserlöslich.

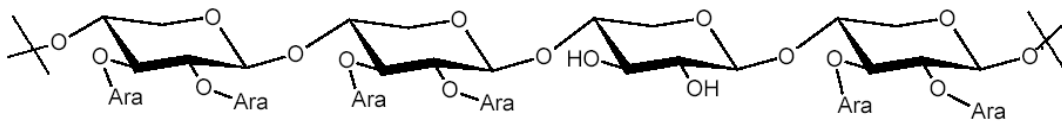


Abb. 4.3: Arabinoxylan II (BENGTSSON, 1990)

Rund 30% bis 40% der Gesamtpentosane sind wasserlöslich (HÄRKÖNEN et al., 1995). Wasserlösliche Pentosane sind mit kaltem Wasser extrahierbar, wasserunlösliche mit Alkali. Die wasserlösliche Fraktion enthält Arabinoxylane, aber auch eine kleine Menge an Arabinogalactan. Die Wasserlöslichkeit der Pentosane beruht neben dem A/X-ratio auch auf andere chemische Einflüsse. Substituenten, wie Phenolsäure, Acetylgruppen und Proteine spielen hier eine Rolle. Den größten Einfluss hat jedoch die Ferulasäure (3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure). Sie ist über O-5 mit der Arabinofuranose verestert (Abb. 4.4). Ferulasäure bewirkt eine Gelbildung bei Kontakt von Pentosanen mit oxidierenden Substanzen (H_2O_2 /Peroxidase). Es kommt zu Vernetzungen von zwei Arabinoxylanketten über die Ferulasäure. Pentosane sind über die Ferulasäure mit anderen Zellwandbestandteilen verestert und dadurch weniger wasserlöslich.

Die Molmasse der wasserlöslichen Pentosane beträgt, in Abhängigkeit von Getreideart, Getreidesorte und den Vegetations- und Erntebedingungen, zwischen 160 und 820 kD.

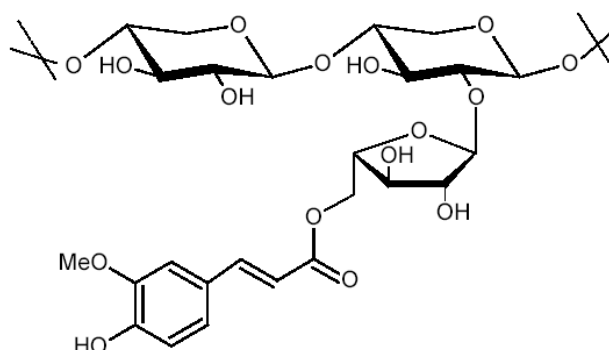


Abb. 4.4: Arabinoxylan mit Ferulasäure verestert (BELITZ 2002)

4.3 Methoden zur Bestimmung des Pentosangehalts

4.3.1 Photometrische Methoden

Bei der photometrischen Bestimmung der Gesamtpentosane wird das Roggenmehl hydrolysiert, die Glucose mit Hefe fermentiert und die verbleibenden Pentosen ergeben mit Orcin eine Grünfärbung. Die Extinktion der Probe wird photometrisch gemessen und auf Standardextinktionen bekannter Pentosankonzentrationen zurückgerechnet (HASHIMOTO et al., 1987). Neben dem Gesamtpentosangehalt ist eine Bestimmung der wasserlöslichen und der enzymatisch extrahierbaren Pentosane möglich. Die Methode zeichnet sich durch geringen materiellen Aufwand und einfache Handhabung aus. Dem steht aber der hohe zeitliche Aufwand gegenüber. Sie ermöglicht keine quantitative Aufschlüsselung der einzelnen Monosaccharide der Probe, sondern erfasst nur den Xylosegehalt. Diese Bestimmungsmethode wird in der Literatur dennoch oft zitiert, angewandt und modifiziert (DÖRFER, 1990).

4.3.2 Chromatographische Methoden

4.3.2.1 Anionenaustauschchromatografie (HPAEC/PAD)

Die Anionenaustauschchromatografie wird zur routinemäßigen qualitativen und quantitativen Bestimmung von Pentosanen eingesetzt. Sie zeichnet sich durch eine gute Wiederholbarkeit aus. Nach saurer Hydrolyse der Polysaccharide werden die freigesetzten Monosaccharide (Arabinose, Galaktose, Glucose und Xylose) per Hochleistungsanionenaustauscherchromatographie aufgetrennt und mittels gepulster amperometrischer Detektion (PAD) quantifiziert. Um das Ergebnis nicht zu verfälschen wird Glucose zuvor enzymatisch mittels Glucose-Oxidase zu Glucuronsäure umgesetzt (HOUBEN et al., 1997). Diese Methode löst die photometrische Methode immer mehr ab und wird in aktueller Literatur häufig zitiert.

4.3.2.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ist eine klassische Methode zur Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung. Trotz guter Ergebnisse stellt die

aufwendige Probenvorbereitung einen Nachteil dar. Nach saurer Hydrolyse aller glycosidischen Bindungen werden die Monosaccharide chemisch reduziert und die Hydroxylgruppen acetyliert (HARRIS et al. 1988).

4.3.3 Spektroskopische Methoden

Die „Near-infrared reflectance (NIR)“ oder „Near-infrared transmission (NIT)“-Spektroskopie stellt eine günstige, sichere und schnelle Analysemöglichkeit dar und ist daher einigen enzymatischen und chemischen Methoden überlegen. Sie zeichnet sich durch eine minimale Probenvorbereitung aus, die Anschaffungskosten sind jedoch hoch. Der Einsatz von NIR in der Getreideanalytik hat sich mittlerweile etabliert und wurde mit Arabinoxylanen erfolgreich durchgeführt (BLAKENEY und FLINN, 2005).

4.4 Methoden zur Isolierung der Pentosane

4.4.1 Isolierung der Pentosane nach RAGAE et al. (2001)

Bei der von RAGAE et al. (2001) beschriebenen Methode (Abb. 4.5) wird Roggenmehl durch ein 0,5 mm Sieb gefiltert und die Trockenmasse (AACC Methode 44-15a) bestimmt. Das Mehl wird 90 min bei 130°C zur Inaktivierung endogener Enzyme hitzebehandelt und anschließend mit Wasser extrahiert (1:10 Mehl/Wasser, w/v). Das Mehl wird mit deionisiertem Wasser am Magnetrührer (6,5 min⁻¹) für 90 min bei 25 °C zu einem Brei verrührt. Anschließend werden die wasserunlöslichen Bestandteile bei 3000 g für 10 min abzentrifugiert. Mit dem wasserlöslichen Überstand wird weitergearbeitet. Die wasserlösliche Fraktion wird mit α -Amylase (Fa. Sigma) (1,2 ml, 2900 units/ml) bei 90°C für 30 min inkubiert um die verbliebene Stärke zu hydrolysieren und die Proteine zu denaturieren. Das Gemisch wird auf 25°C gekühlt und zentrifugiert (3000 g, 15 min), der Überstand wird gesammelt und mit Amyloglucosidase (0,3 ml, 200 units/ml) (Fa. Sigma) bei 60°C für 12 Stunden inkubiert. Das Gemisch wird auf 25°C gekühlt und zentrifugiert (3000 g, 20 min). Der Überstand wird mit Lichenase (1,0 ml/50 units/ml)(β -glucan kit Bicon, Lexington, KY) für 2 h bei 40°C inkubiert. Es folgt die Dialyse bei 4°C für 48 h, um niedermolekulare Verbindungen abzuscheiden (Dialyse gegen deionisiertes

Wasser, MW cut-off level 6-8 kDa, Membranschlauch). Der Überstand wird mit Klärsuspension behandelt (Montmorillonite, Sigma), um die Proteine zu binden (15:1 clay to protein ratio w/w). Der pH-Wert des Überstands wird zuvor auf 3 eingestellt und 30 min mit dem Magnetrührer gerührt (siehe oben). Die Suspension wird neutralisiert (pH 7) und zur Entfernung des Proteinkomplexes zentrifugiert (10000 g, 30 min). Es liegen jetzt Arabinoxylan und Arabinogalactan vor. Durch Alkoholausfällung ist es möglich, das Arabinogalactan zu entfernen. Hier wird Ethanol (95%) zugefügt um eine Endkonzentration von 80% zu erreichen. Die Lösung wird 30 min gerührt, über Nacht bei 4°C stehen gelassen und zentrifugiert (10000g, 30 min). Das Sediment (überwiegend WEAX = mit Wasser extrahierbare Arabinoxylane) wird in Wasser gelöst (300 ml) und die WE-Arabinoxylane werden von den wasserlöslichen Arabinogalactanen (WEAG) durch Alkoholausfällung (Endkonzentration:65%) getrennt. Die abgetrennten WEAX werden zentrifugiert (10000g, 30 min), mit Ethanol und Aceton gewaschen und luftgetrocknet. Durch diesen Isolationsvorgang können zwischen 1,8-2,5 [%TM] wasserlösliche Arabinoxylane isoliert werden.

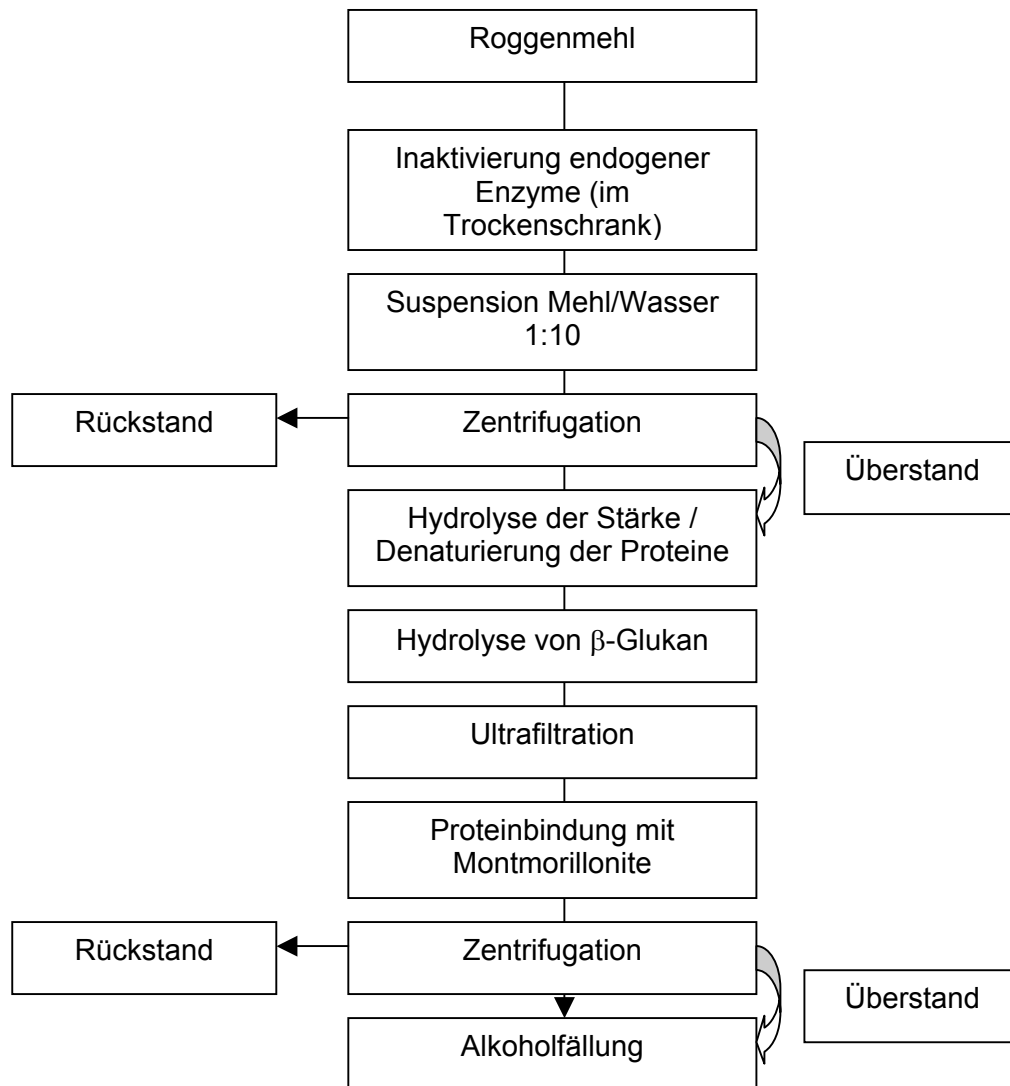


Abb. 4.5: Fließdiagramm der Versuchsanordnung nach RAGAEE et al. (2001)

4.4.2 Isolierung der Pentosane nach FAUROT et al. (1995)

Diese Methode zur Isolation von Pentosanen aus Weizenmehl (Abb. 4.6) beschreibt die Gewinnung von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Pentosanen in einem größeren Maßstab mit 50 kg Mehl. Das Mehl wird in Wasser gelöst und die Suspension wird zuerst zentrifugiert und anschließend erfolgt der Protein- und Stärkeabbau durch Enzyme.

50 kg Mehl werden mit 250 l Wasser für 30 min bei Raumtemperatur verrührt. Die Feststoffe und der Überstand werden grob mittels Horizontal-Zentrifugen-Dekanter (Westfalia separator CA 220, 5100 min⁻¹) abgetrennt. Der

Überstand wird mit der Vertikalzentrifuge weiterbearbeitet, der feste Rückstand wird nach zweimaligem zentrifugieren gesammelt.

Hier beginnt die Isolation der wasserlöslichen Arabinoxylane. Der Überstand wird 10 min bei 100 °C erwärmt. Durch das Erhitzen sollen wasserlösliche Proteine ausgefällt und endogene Pentosanasen (Xylanasen, Arabinofuranosidasen) inaktiviert werden. Nach Abkühlung auf rund 40 °C flocken die Proteine aus – sie werden abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird mit Amyloglucosidase 150 I (10 ml) versetzt und mittels cross - flow Ultrafiltration (cut-off 10 kDa, Fläche 1,6 m²) auf 20 I konzentriert. Das Retentat wird mit 50 I Wasser verdünnt und nochmals auf 15-20 I konzentriert. Der so erhaltene Überstand wird gefriergetrocknet. Diese Fraktion enthält die wasserlöslichen Pentosane, Galaktose (von Arabinoglactan), Glucose, Ferulasäure und Proteine. Eine höhere Reinheit könnte durch Ausfällung mit Ethanol erreicht werden.

Der Rückstand aus der Zentrifugation wird zur Isolierung der wasserunlöslichen Pentosane herangezogen. Der oben erhaltene unlösliche Rückstand wird mit Wasser gemischt (150 I). Er besteht zum größten Teil aus Proteine und Stärke, die im Laufe der nächsten Arbeitsschritte entfernt werden. Der pH-Wert wird mit 250 g/kg wässriger Ammoniaklösung auf 7,5 eingestellt. Dieses Gemisch wird bei 55 °C für 2 h unter Einwirkung von Alkalase® (Fa. Novo Nordisk, Dänemark) 2,4 I (150 ml) unter ständigem Rühren erwärmt und anschließend zentrifugiert. Der Rückstand wird im Wasser suspendiert (150 I) und nochmals zentrifugiert. Der proteinfreie unlösliche Rückstand wird mit Wasser suspendiert (130 I), Termamyl (Fa. Novo Nordisk, Dänemark) 120 I (100 ml) wird dazugegeben und bei 95°C unter ständigem Rühren für zwei Stunden erwärmt. In diesem Schritt wird die Stärke hydrolysiert. Das Gemisch wird zentrifugiert und der Rückstand wird dreimal mit Wasser (250 I) ausgewaschen und zentrifugiert. So erhält man die wasserunlöslichen Pentosane welche gefriergetrocknet werden. In dieser Fraktion findet man aber auch resistente Stärke, Cellulose, β -D-Glucan, Glucose und Proteine (wobei 97% der Glutenproteine entfernt wurden).

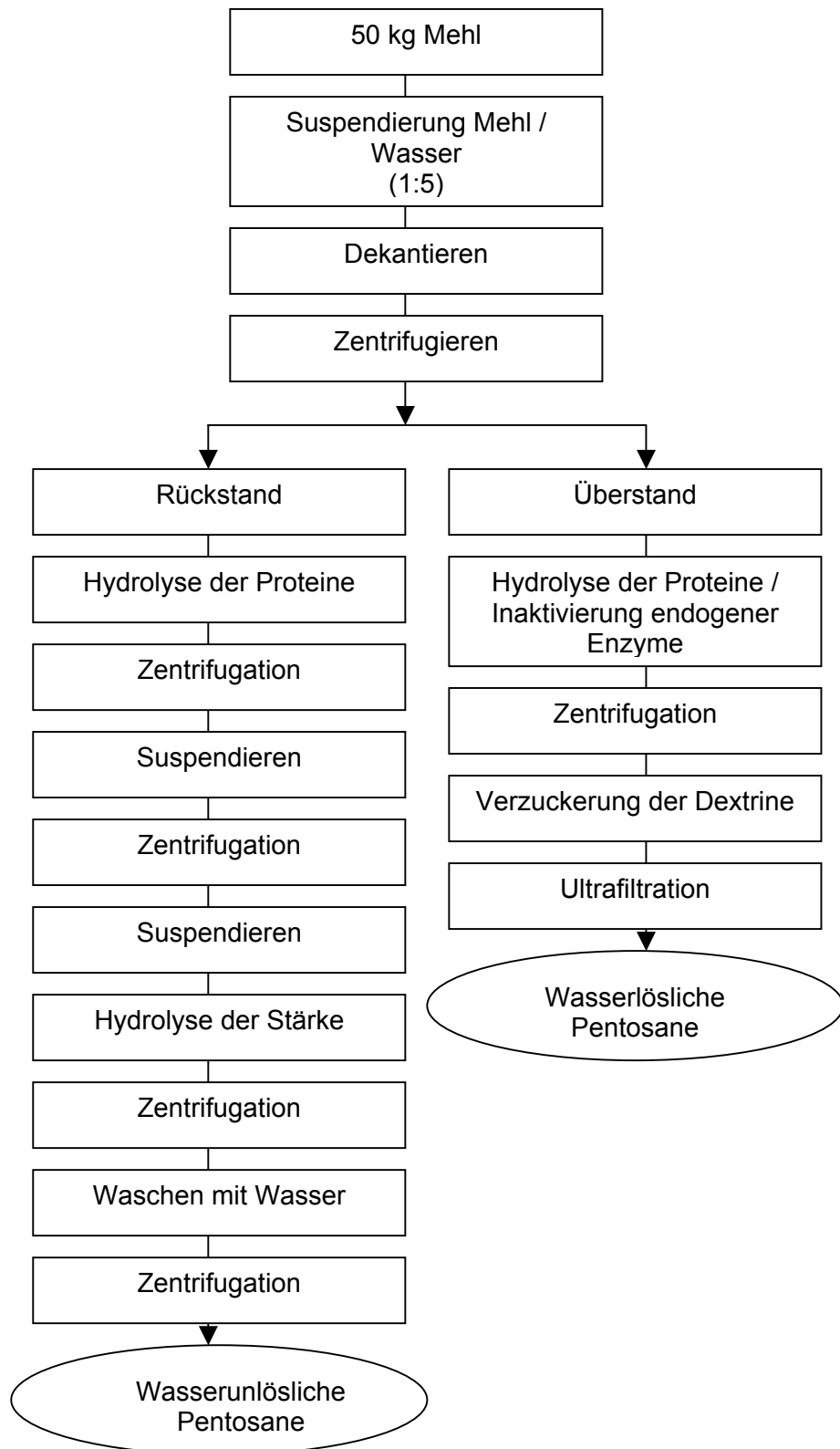


Abb. 4.6: Fließdiagramm der Versuchsanordnung nach FAUROT et al. (1995)

Diese Methode, ursprünglich mit Weizen durchgeführt, ist in einem größeren Maßstab angelegt, und ermöglicht die parallele Isolation von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Arabinoxylanen. Ausgehend von 50 kg Weizenmehl können 470 g wasserlösliche Pentosane (darin enthalten: 120-190 g lösliche Arabinoxylane) und rund 1 kg wasserunlösliche Pentosane (darin enthalten: 250-350 g wasserunlösliche Arabinoxylane) isoliert werden, die für weitere technologische Versuche gut geeignet sind.

5 AUFGABENSTELLUNG

Hauptziel dieser Arbeit war die Isolierung von Pentosanen aus Roggenmehl. und im Zuge dessen

- sollte eine ausführliche Literaturstudie über folgende Punkte durchgeführt werden
 - Charakterisierung und Eigenschaften von Roggenpentosanen
 - Erhebung der Methoden zur Pentosanbestimmung
 - Pentosangehalt von Roggen
 - Isolierung von Roggenpentosanen im Labormaßstab und im technischen Maßstab
- Aufbauend auf der Literaturrecherche sollte eine Methode zur Bestimmung des Pentosangehalts in Roggenmehl, bzw. in den während der Isolierung anfallenden Proben, etabliert werden.
- Mit dieser Methode sollten 31 Roggenmuster auf ihren Pentosangehalt untersucht werden.
- Anschließend sollte ein geeignetes Verfahren zur Pentosanisolierung ausgewählt, und mittels Vorversuche im Labormaßstab umgesetzt werden.
- Der dadurch erhaltene Versuchsaufbau sollte anschließend im halbtechnischen Maßstab durchgeführt und weiterentwickelt werden.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Verwendete Rohstoffe

Die Versuche zur Pentosanbestimmung wurden mit 30 österreichischen Roggenproben und der Bio-Winterroggensorte „Nikita“ durchgeführt. Die in Plastiksäckchen verpackten Roggenproben wurden auf einer Labormühle des Typs ZM 1 der Fa. Retsch, Haan, Deutschland gemahlen (Abb. 6.1). Siebgröße: 0,25 mm. Um ein Heißlaufen der Labormühle zu verhindern, wurde der Roggen mittels Kaffeemühle zuvor grob zerkleinert. Die vorzerkleinerten Getreidekörner wurden mittels Zuteilgerät der Type DR kontinuierlich in die Mühle gefördert. Die gemahlenen Roggenmehle wurden in verschließbaren Plastikbechern bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Für die Isolierung der Pentosane im halbertechnischen Maßstab wurde Roggenvollmehl der Firma Strobl Naturmühle (Linz-Ebelsberg) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei +4°C im Kühlraum. Während der einzelnen Schritte der Pentosanisolierung wurden Proben gezogen und Proteingehalt, Pentosangehalt und Trockenmasse bestimmt. Da sich die Isolierung über mehrere Tage erstreckt wurden die Proben tiefgefroren, und am Tag vor der Analyse aufgetaut und homogenisiert.



Abb. 6.1: Labormühle (Fa.Retsch)

6.2 Analytische Methoden

6.2.1 Trockensubstanzbestimmung nach ICC 110/1

6.2.1.1 Prinzip

Unter der Trockensubstanz wird die Summe aller nicht flüchtigen Bestandteile verstanden. Hierzu gehören im Wesentlichen die Lipide, Kohlenhydrate, Proteine und die Mineralstoffe. Die Trockensubstanz wird üblicherweise durch Trocknung der Probe und Wägung des Rückstands ermittelt. Die Differenz des Trockensubstanzgehalts zu 100% wird im Allgemeinen – nicht ganz korrekt – als Wassergehalt bezeichnet. Flüchtige Stoffe wie Kohlensäuren, Alkohole, ätherische Öle etc. täuschen einen höheren Wassergehalt vor und mindern die Genauigkeit.

6.2.1.2 Durchführung

Bei rieselfähigen Materialien kann direkt getrocknet werden, während bei pastösen, hautbildenden Proben zur Vergrößerung der Oberfläche mit Seesand verrieben wird (Seesandmethode).

6.2.1.2.1 Trocknung nach Verreiben mit Seesand

Bei schwer zu trocknenden, eine Oberflächenhaut bildenden Proben ist das Material zur Oberflächenvergrößerung und Auflockerung mit Seesand zu verreiben. Dazu wurde die Aluminiumschale mit 10-30 g Seesand und einem Glasstäbchen befüllt und im Trockenschrank bei 105 °C getrocknet, im Exsikkator ausgekühlt und abgewogen. Nach genauer Einwaage von rund $5 \pm 0,001$ g Probe wurde diese mit Hilfe des Glasstäbchens gleichmäßig verrieben. Nach Trocknung im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz wurde im Exsikkator abgekühlt und ausgewogen.

Prozentualer Trockensubstanzgehalt:

$$T[\%] = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

(Gl. 1)

m1	Leermasse von Aluminiumschale, getrocknetem Seesand und Glasstäbchen in g
m2	Masse von Aluminiumschale, getrocknetem Seesand, Glasstäbchen und Probe vor der Trocknung in g
m3	Masse von Aluminiumschale, Seesand, Glasstäbchen und Probe nach der Trocknung in g
(m2 – m1)	Probeneinwaage

Prozentualer „Wassergehalt“:

$$W[\%]=100[\%] - T[\%]$$

(Gl. 2)

Geräte und Hilfsmittel

- Analysewaage (Fa. Sartorius AG, Deutschland, Typ BP 2105, Genauigkeit 0,1 mg)
- Aluminiumschalen
- Umlufttrockenschrank (Fa. Heraeus Instruments, Deutschland, Typ BR 6000)
- Seesand (Fa. Applichem GmbH, Deutschland)
- Glasstäbchen
- Exsikkator mit Silicagel
- Tiegelzange

6.2.1.2.2 Direkte Trocknung

Rund $5 \pm 0,001$ g der rieselfähigen Probe (abhängig von Probemenge) wurden in Aluminiumschalen eingewogen und im Umluftschrank bei $105^{\circ}\text{C} \pm 2$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde die Aluminiumschale mit der Probe im Exsikkator abgekühlt und der Trocknungsverlust durch Wägung bestimmt.

$$T[\%]= \frac{m3 - m1}{m2 - m1} \times 100$$

(Gl. 3)

m1	Leermasse von Aluminiumschale in g, vorgetrocknet
m2	Masse von Aluminiumschale und Probe vor der Trocknung in g
m3	Masse von Aluminiumschale und Probe nach der Trocknung in g
(m2 – m1)	Probeneinwaage

Prozentualer „Wassergehalt“:

$$W[\%]=100[\%] - T[\%]$$

(Gl. 4)

Die Trockenmasse wurde in Dreifachbestimmung ermittelt.

Geräte und Hilfsmittel

- Analysewaage (Fa. Sartorius AG, Deutschland, Typ BP 2105, Genauigkeit 0,1 mg)
- Aluminiumschalen
- Umlufttrockenschrank (Fa. Heraeus Instruments, Deutschland, Typ BR 6000)
- Exsikkator mit Silicagel
- Tiegelzange

6.2.2 Bestimmung des Wassergehalts mittels Infrarotmessgerät

Die Bestimmung des Wassergehalts erfolgte mit dem Sartorius Thermo Control YTC 01L Infrarotmessgerät (Abb. 6.2) nach der Betriebsanleitung mit dem Programm Nr. 1. Gegenüber der Trockenschrankmethode werden hier nur geringe Probemengen benötigt. Einen weiteren Vorteil stellt die kurze Analysezeit dar.

Geräte und Hilfsmittel

- Infrarotmessgerät (Sartorius thermo control YTC 01 L mit Auto-Stop Trocknungsmechanismus und Abschaltmechanismus bei einer Gewichtsänderung von $< 0,1\%$), Temperatur 160°C
- Aluminiumschalen

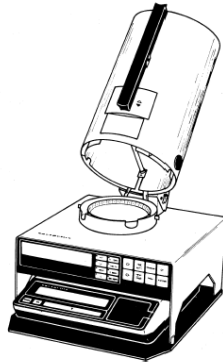


Abb. 6.2: Sartorius thermo control

6.2.3 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl

6.2.3.1 Prinzip

Die quantitative Rohproteinbestimmung erfolgte nach der Kjeldahl-Methode mit dem Büchi-System (Fa. Büchi Labortechnik AG). Die Probe wird mit konzentrierter Schwefelsäure aufgeschlossen und der darin enthaltene Stickstoff wird in Ammoniumsulfat umgewandelt. Nach Zugabe einer starken Base wird Ammoniak freigesetzt, in einer Säure aufgefangen und titrimetrisch bestimmt. Die ermittelten Stickstoffwerte werden nach dem ICC-Standard Nr. 105/2 mit dem Faktor 5,83 für Roggen umgerechnet.

6.2.3.2 Durchführung

Aufschluss: Rund $2 \pm 0,1$ mg der Probe (abhängig vom erwarteten Proteingehalt) wurden in einen Aufschlusskolben eingewogen und nach Zugabe von Kjeldahltabletten und einer Glaskugel mit 20 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Kolben werden in die Aufschlussapparatur gestellt und schrittweise auf 420°C erwärmt.

Destillation: Die abgekühlten Kolben wurden in die Destillationseinheit eingespannt, abdestilliert und in einer Vorlage aus 20 ml Borsäure (2%ig) und Indikator aufgefangen. Der ausgetriebene Ammoniak wird in basisches Ammoniumborat übergeführt.

Titration: Durch Titration mit 0,1 M HCl wurde die Ammoniakkonzentration bestimmt.

6.2.3.3 Berechnung

$$\frac{\text{Verbrauch HCl (ml)} \times 14,008 \times 0,1}{\text{Einwaage (g)} \times 1000} \times 5,83 \times 100 = \% \text{ Protein}$$

(Gl. 5)

Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert.

Der Proteingehalt wird in % Trockensubstanz angegeben.

Geräte und Hilfsmittel

- Büchi 412 Scrubber
- Büchi Digest System K-437
- Büchi Distillation Unit B-323
- Büchikolben
- Glaskugeln
- Analysewaage (Fa. Sartorius AG, Deutschland, Typ BP 2105, Genauigkeit 0,1 mg)
- Dosimat (Fa. Metrohm)

Chemikalien

- Schwefelsäure konzentriert
- Salzsäure 0,1 N
- Borsäure 2 %-ig
- Indikator

- Kjeldahl -Tabletten

6.2.4 Bestimmung des Pentosangehalts nach Hashimoto et al. (1987)

6.2.4.1 Prinzip

Bei der Methode nach HASHIMOTO et al. (1987) ist es möglich, wasserlösliche Pentosane, enzymatische extrahierbaren Pentosane und den Gesamtpentosangehalt zu bestimmen (ursprünglich im Weizenmehl). Die Bestimmung erfolgt in allen drei Fällen durch die Orcinol-HCl-Methode. Die Analysen unterscheiden sich aber in einigen Punkten und auch die spätere Berechnung ist unterschiedlich. Der hier beschriebene Ablauf bezieht sich auf den Gesamtpentosangehalt.

Roggenmehl wird mit starker Säure hydrolysiert. Die Pentosen der Arabinoxylane ergeben in einer Eisen(III)-chlorid Lösung und Orcin im sauren pH-Bereich einen grünen Farbstoff. Der hohe Glucoseanteil, welcher sich durch die Hydrolyse der Stärke ergibt, verfälscht die Messungen, weshalb die Glucose zuvor mittels Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) fermentiert wird. Die Extinktion wird kolorimetrisch gemessen. Bei einer Wellenlänge von 670 nm und 580 nm wird die Extinktionsdifferenz gegen Standard Xylose-Konzentrationen aufgetragen und somit eine Eichgerade erstellt, die als Grundlage für die Rückrechnung auf die Pentosankonzentration der Proben gilt. In dieser Arbeit wurde der Gesamtpentosangehalt von 31 Roggenmuster und von den bei der Isolierung der Pentosane entstandenen Zwischen- und Endprodukten in Dreifachbestimmung ermittelt.

6.2.4.2 Probenvorbereitung

Die 31 Roggenmuster wurden mit der Labormühle des Typs ZM 1 der Fa. Retsch, Haan, Deutschland gemahlen. Anschließend wurde die Trockenmasse bestimmt (ICC 110/1).

Geräte und Hilfsmittel

- Schüttelwasserbad (100°C) (GFL® 1086)
- Wasserbad (30°C) (HAAKE D8)

- Laborwaage (Sartorius, Genauigkeit 0,1 mg)
- Photometer (HITACHI U-1100 Spectrophotometer)
- Kleinschüttler (IKA® MS basic)
- Zentrifuge (Eppendorf-Centrifuge 5810)
- Makro-Küvetten (10x10x45) (Fa. Greiner bio-one)
- verschließbare Reagenzgläser
- Pipetten (Eppendorf)
- Alufolie

Chemikalien

- Salzsäure (HCl), rauchend, 37% (ROTIPURAN®, Fa. Carl Roth GmbH, Deutschland, Karlsruhe)
- Natriumphosphat (Na_2HPO_4), dibasisch, wasserfrei (Fa. Fluka Chemie, Schweiz)
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (Fa. VWR)
- Presshefe (Fa. Hagold Hefe GmbH, Österreich, Wien)
- Orcinol, 3,5 – Dihydroxytoluol ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{-1,3-(OH)}_2$), 97% (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland)
- D(+) Xylose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$) (Fa. Merck, Deutschland)
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3), wasserfrei (Fa. Merck, Deutschland)
- Eisen(III)-chlorid Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) (Fa. Fluka Chemie, Schweiz)

Verwendete Lösungen

- Salzsäure (HCl) 2 N: 166,5 ml (37 %) HCl wurden mit Aqua dest. in einem 1000 ml Messkolben aufgefüllt.
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3) 2 N: 53 ml wurde mit Aqua dest. in einem 500 ml Messkolben aufgefüllt.
- Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,0:
7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen (Lösung 1)
7,1 g Na_2HPO_4 auf 250 ml mit Aqua dest. auffüllen (Lösung 2)

120 ml von Lösung 1 und 189 ml von Lösung 2 wurden gemischt und der pH-Wert wurde gemessen (betrug dieser nicht 7 wurde gegebenenfalls mit Lösung 1 oder Lösung 2 korrigiert).

- Hefe-Phosphatpuffer Lösung: 2,5 g Hefe wurden in 100 ml Phosphatpuffer mittels Magnetprüher suspendiert.
- Orcin: 229,2 mg Orcin wurden mit Ethanol auf 20 ml aufgefüllt und in einer dunklen mit Alufolie umwickelten Laborglasflasche aufbewahrt.
- Eisen(III)-chlorid-Lösung: 334 mg FeCl_3 wurden mit HCl auf 250 ml aufgefüllt und in einer dunklen Laborglasflasche mit Alufolie umwickelt aufbewahrt.

Haltbarkeit

Die Salzsäure, das Natriumcarbonat und der Phosphatpuffer wurden einmalig gemischt und sind haltbar. Die Eisenchloridlösung und die Orcinlösung wurden für jede Messung neu hergestellt und rund eine halbe Stunde am Magnetprüher gerührt (Orcin- und Eisenchloridlösung unter Lichtausschluss). Die Hefesuspension musste an jedem Versuchstag neu zubereitet werden, um eine Autolyse der Hefezellen zu verhindern.

6.2.4.3 Detaillierte Beschreibung

Rund $10 \pm 0,1$ mg der Roggenmehlprobe wurden in eine Epruvette eingewogen und mit 2 ml 2N HCl versetzt. Die Epruvette wurden mit einem dichten Verschluss zugeschraubt und für 2,5 h in ein 100°C Schüttelwasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen (5 min in einem mit Leitungswasser gefüllten Behälter) folgte die Neutralisation mit 2 ml 2N Natriumcarbonatlösung und es wurde so lange gemischt bis keine Schaumbildung mehr auftrat. 2 ml der Hefelösung wurden dazu pipettiert und mehrere Sekunden gemischt. Zur Fermentation der Glucose wurden die Reagenzröhren 2 h bei 30 °C in das Wasserbad gestellt und alle 30 min geöffnet, gemischt und nach 2 h bei 4000 min^{-1} zentrifugiert. Die Mehlrückstände und die Hefe setzen sich am Röhrchenboden ab und 700 μl des klaren Überstands wurden in ein neues Röhrchen pipettiert. Der Überstand wurde mit 2,3 ml Aqua dest, 3 ml

Eisenchloridlösung und 0,3 ml Orcinlösung versetzt und mehrere Sekunden gut gemischt. Die gut verschlossen Epruvetten wurden für 30 min in das 100°C Wasserbad gestellt und anschließend 5 min in einem Behälter mit Leitungswasser abgekühlt. Es folgte die Messung der Extinktion der Proben gegen den Blindwert bei 580 nm und 670 nm. Der Versuchsablauf wird in Abb. 6.3 grafisch dargestellt.

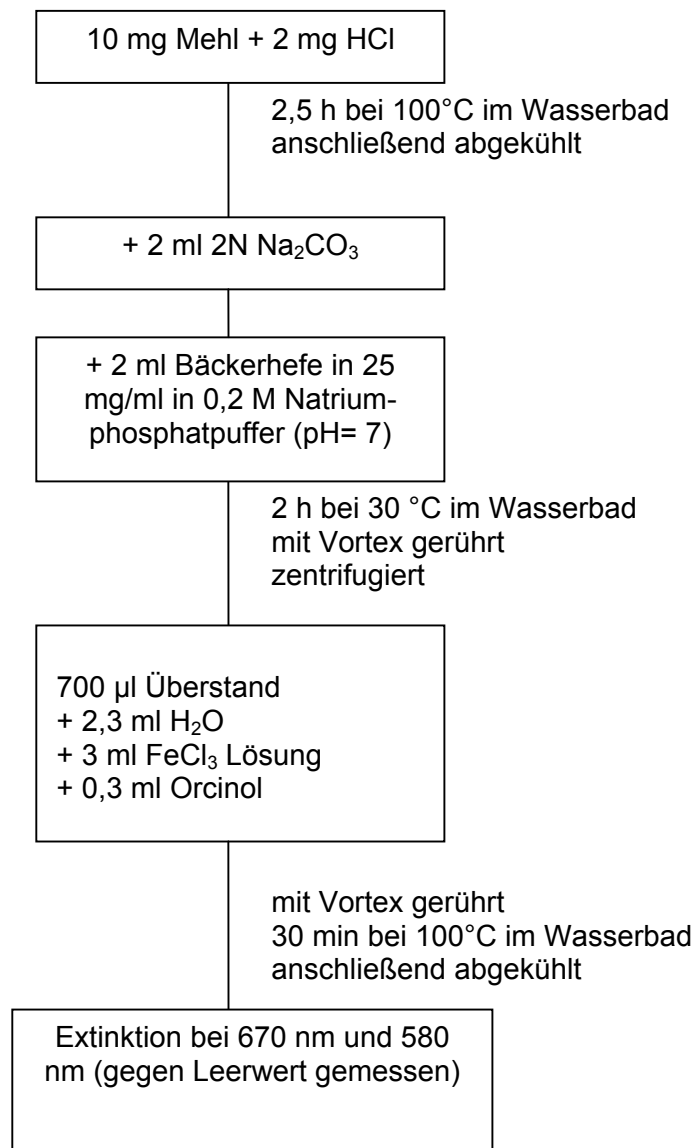


Abb. 6.3: Fließdiagramm zur Bestimmung des Pentosangehalts

Wird diese Methode bei weniger pentosanhaltigen Getreidesorten, wie z.B. Weizen, verwendet, kann auch 1 ml des Überstands nach der Zentrifugation

verwendet werden. Es werden dann allerdings nur 2 ml Aqua dest. zugefügt. Pentosanüberstand und Aqua dest. müssen gemeinsam immer 3 ml ergeben. Die Proben während der Isolationsschritte waren oft flüssig/breiähnlich. Die Bestimmung erfolgte wie bei den Mehlproben, die Probemenge variierte mit dem zu erwartenden Pentosangehalt. Hier war es sinnvoll bei flüssigen Proben verschiedene Konzentrationen gleichzeitig zu analysieren (100µl, 300µl, 700µl). Bei breiähnlichen Proben (z.B. nach der Zentrifugation) muss der hohe Wassergehalt berücksichtigt werden. Hier war eine Einwaage von 30 mg sinnvoll.

6.2.4.4 Erstellen der Eichgerade

Mittels Xylose wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 6.4): Die Extinktionsdifferenz (Extinktion bei 670 nm minus der Extinktion bei 580 nm) wurde gegen die Konzentration der einzelnen Xylose-Lösungen aufgetragen. Für die Stammlösung wurden 133,3 mg Xylose eingewogen und auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt ($c = 133,3 \text{ mg/l}$). Für die Verdünnungsreihe wurden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 ml der Stammlösung entnommen und auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt (Tab. 6.1). Je 3 ml der einzelnen Lösungen wurden mit 3 ml Eisenchloridlösung und 0,3 ml Orcinlösung vermischt und genau wie die Roggenproben 30 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Mit der Xylosekonzentration steigt die Intensität der Grünfärbung (Abb. 6.5). Nach dem Abkühlen folgte die Messung der Extinktion bei 580 nm und bei 670 nm gegen den Blindwert (Blindwert: 3 ml Aqua dest. Anstelle von 3 ml Xyloselösung, ansonsten gleiche Vorgehensweise). Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden die 5 ml, 25 ml und die 50 ml Lösungen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Konzentration und die Extinktion wurden zum Erstellen einer Eichgerade in eine Excel-Tabelle eingetragen. Anhand der Geradengleichung kann von der Extinktion der Probe auf die Xylosekonzentration rückgerechnet werden (Abb. 6.4).

Tab 6.1: Konzentrationen der Kalibrierlösungen

ml Xylose - Stammlösung	Konzentration der Kalibrierlsg [mg Xylose/l]	mg Xylose in 3 ml
5	6,665	0,019995
10	13,330	0,039990
15	20,000	0,059985
20	26,660	0,079980
25	33,330	0,099975
30	39,990	0,119970
35	46,660	0,139965
40	53,320	0,159960
45	59,990	0,179955
50	66,650	0,199950

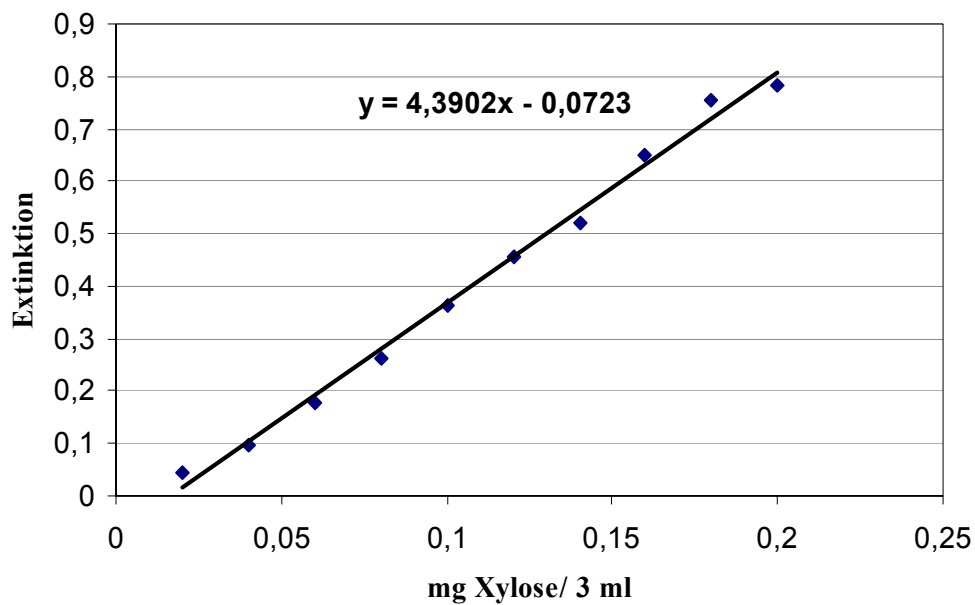


Abb. 6.4: Eichgerade mit Geradengleichung



Abb. 6.5: Verschließbare Epruvetten mit Kalibrierlösungen

Wichtige Hinweise

- Bei der Mehleinwaage kam es vor, dass etwas Mehl am Reagenzröhrenrand haften bleibt. Dieses wurde beim einpipetieren der Salzsäure mit hinunter gespült.
- Die Verschlüsse der Reagenzröhren müssen wasserdicht sein, da im Wasserbad ein Teil der Lösung verdampfen könnte.
- Das Natriumcarbonat dient zur Neutralisation der Salzsäure. Gleiche Volumina beider Lösungen müssten einen pH von 7 ergeben. Da aber auch bei sorgfältiger Lösungsvorbereitung die Lösung im sauren pH-Bereich lag, musste die Salzsäurelösung so lange mit Wasser verdünnt werden, bis sich ein pH-Wert von 7 ergab.
- Die Orcinlösung, das Wasser, der Überstand und die Eisenchloridlösung waren nicht gut mischbar. Das Gemisch muss deshalb einige Sekunden am Vortex gemischt werden bis keine Schlieren mehr sichtbar sind.
- Die 30 min im Wasserbad waren genau einzuhalten und auch die Abkühlzeit muss konstant sein.
- Im Wasserbad bildete sich auf der Innenseite der Epruvettenwand Kondenswasser. Dieses musste vor dem Überführen der Lösung in die Küvette durch Schwenken der verschraubten Epruvette dazugemischt werden.

6.2.4.5 Berechnung

Durch die Kalibriergerade erhielt man die Konzentrationen an Xylose, die den Extinktionsdifferenzen der Proben entsprachen. Für die Berechnung mussten die einzelnen Verdünnungsschritte berücksichtigt werden. Weiters war zu beachten dass sich die Xylose-Konzentrationen auf die Trockenmasse der Roggenproben bezogen.

$$\text{Xylose (g/100 g TS)} = \frac{x_p}{m} \times 100$$

(Gl. 6)

Xylose (g/100 g TS) Die den Pentosanen entsprechende Menge an Xylose in g pro 100 g TS

x_p mg Xylose/l aus der Kalibriergeraden (bezogen auf die 3 ml Lösung die zur Farbreaktion eingesetzt werden)

m Trockensubstanz in mg TS/l (bezogen auf die gleiche Lösung wie x_p)

Durch die Verdünnungsschritte im Versuchsablauf musste auf die Mehleinwaage/ Probeneinwaage zurückgerechnet werden:

$$m = E[\text{mg}] \times \frac{100-F}{100} \times \frac{1}{(2+2+2)\text{ml}} \times \frac{0,7 \text{ ml}}{(1+2,3)\text{ml}} \times 100 \left(\frac{\text{ml}}{\text{l}} \right)$$

$$m = E[\text{mg}] \times \frac{100-F}{100} \times 38,89 \times \frac{1}{1}$$

(Gl. 7)

F Feuchtigkeit in %

E Einwaage in mg

Bei dieser Pentosanbestimmungsmethode wurden Pentosane nicht als einzelne Pentosen sondern als Polypentosen (Arabinoxylane) berechnet. Man geht davon aus, dass formal bei der Kondensation einer Pentose zu einem

Polysaccharid pro Molekül Pentose ein Molekül Wasser abgespalten wird.
 Deshalb wurde mit dem Faktor 0,880 multipliziert ($\frac{150,1-18,0}{150,1}$).

Daraus ergab sich die endgültige Formel:

$$\text{Pentosan (g/100 g TS)} = \frac{x_p}{m} \times 100 \times 0,88$$

(Gl. 8)

6.3 Technische Methoden

6.3.1 Ultrafiltration

6.3.1.1 Prinzip

Umkehrosmose, Mikrofiltration, Ultrafiltration und Nanofiltration werden unter dem Begriff Membranfiltration zusammengefasst. Durch die Membranfiltration ist es möglich, Moleküle verschiedener Größe und verschiedener Eigenschaften zu trennen, wobei die treibende Kraft die Druckdifferenz ist. In der Natur findet man den Vorgang der Ultrafiltration in den Glomeruli der Nephronen in der Niere, wo das Blut „ultrafiltriert“ wird. Während bei der Umkehrosmose eine sehr dichte Membran alle löslichen Stoffe außer Wasser zurück hält, ist die Membranstruktur bei der Ultrafiltration lockerer. Abhängig von der Porengröße unterscheidet man zwischen Mikro-, Ultra- und Nanofiltration (Tab. 6.3 und 6.4). Je nach Porengröße passieren Salze, Zucker, organische Säuren, kleine Peptide etc. die Membran, während Eiweiß, Fett und Polysaccharide zurückgehalten werden (Tab. 6.2).

Bei der UF werden echt gelöste oder kolloidale Makromoleküle wie auch suspendierte oder emulgierte Teilchen zurückgehalten, Lösungsmittel und die Poren passierende niedermolekulare Stoffe werden mit dem Filtrat ausgespült, d.h. pH-Wert und Elektrolytkonzentration sind in Retentat und Permeat gleich. Der Druck variiert zwischen 1-10 bar. Ein begrenzender Faktor in der Anwendung kann die Gelbildung auf der Membranoberfläche sein. Dieser Effekt wird Fouling genannt, und wird durch hohe Strömungsgeschwindigkeiten an der Membran minimiert. Einerseits ist es möglich Stoffgemische zu trennen, andererseits sie zu konzentrieren. Bei der Pentosanisolierung ist das Retentat das Produkt – die mit dem Permeat ausgespülten Bestandteile werden verworfen. Die Ultrafiltration wird für Moleküle und Partikel mit Durchmessern zwischen 5 und $5 \cdot 10^2$ nm eingesetzt – der Übergang zur Mikrofiltration ist nicht streng abgegrenzt (NIELSEN, 2004).

Eine erweiterte/kombinierte Anwendung der UF stellt die Diafiltration dar. Sie wird angewendet, um die noch im aufkonzentrierten Retentat vorhandenen, niedermolekularen Bestandteile auszuspülen. Nach der Aufkonzentrierung des Retentats wird während dieses Vorgangs kontinuierlich mit Wasser gespült.

Tab. 6.2: Dimensionen von Molekülen

Substanz	Dimensionsbereich in nm
Pigmente	10 bis 10 000
Öl/Wasser-Emulsionströpfchen	100 bis 10 000
Polymerlatices	50 bis 5000
Bakterien	300 bis 10 000
Viren	30 bis 10 000
Proteine, Polysaccharide	2 bis 10
Zucker	0,8 bis 1,2
Anorganische Ionen	0,2 bis 0,4

Tab. 6.3: Unterschied UF,NF,MF und Zusammenhang zwischen Porengröße und Molekülmasse

Verfahren	Porengröße in μm	Molekülmasse
Umkehrosmose	< 0,001	< 100 Da
Nanofiltration	0,001 - 0,01	0,3 - 2 kDa
Ultrafiltration	0,01 - 0,1	1 - 500
Mikrofiltration	> 0,1	> 500

Tab. 6.4: Übersicht über Membranprozesse (TU Berlin)

Membran-prozess	Poren-größe [nm]	Druckbereich Δp [bar]	Permeabilitäts-bereich [L/(m ² h bar)]	Membrantyp	Anwendung
Mikrofiltration	50 - 5000	0,1 - 2	> 50	Porenmembran	Abtrennung suspen-dierter Stoffe
Ultrafiltration	2 – 200	1 - 5	10 – 50	Porenmembran	Konzentrieren, Frakti-onieren und Reinigen makromolekularer, wässriger Systeme
Nanofiltration	1 - 2	5 - 20	1,4 – 12	Nanoporöse Membran	Fraktionierung gelöster Stoffe in wässrigen Systemen
Umkehrosmose		10 - 100	0,05 – 1,4	Lösungs-Diffusions-Membran	Aufkonzentrieren gelöster Stoffe in wässrigen Systemen, Entsalzung

In Abb. 6.6 wird die Ultrafiltration an Hand der Anwendung in dieser Arbeit gezeigt. Niedermolekulare Stoffe wie z.B. Dextrine, Mono- und Disaccharide, Aminosäuren und Peptide sollen von den höhermolekularen Arabinoxylanen getrennt werden. Die niedermolekularen Substanzen passieren die Poren der Membran und werden ausgespült, Substanzen, deren Molekülmasse über dem cut-off level der angewendeten Membran liegt, werden zurückgehalten. Da auch Wasser die Membran problemlos passieren kann, kommt es zu einer Aufkonzentrierung der zurückgehaltenen Stoffe.

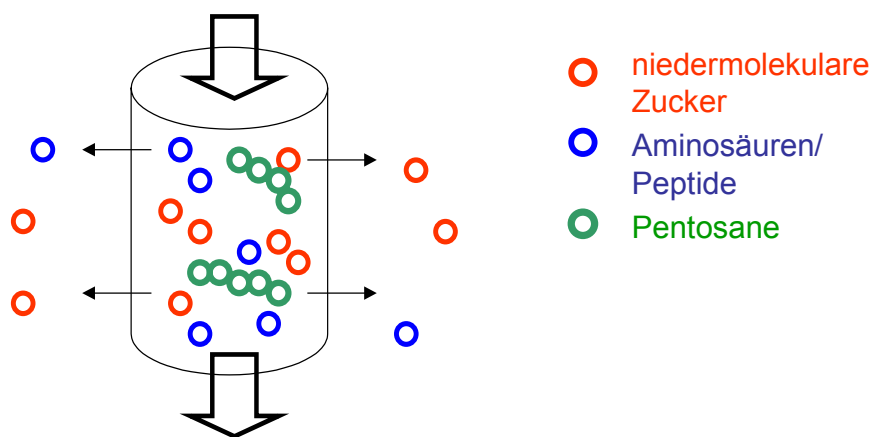


Abb. 6.6: Ultrafiltration durch eine keramische Membran

Neben der Membrandichte stellen der Konzentrationsfaktor und die Durchflussgeschwindigkeit die zwei maßgebenden Kriterien bei der Filtration von Flüssigkeiten dar, und bestimmen die Spezifikation einer Ultrafiltrationsvorrichtung. Die Durchflussgeschwindigkeit definiert sich als das Volumen des Permeats, welches pro Zeiteinheit durch eine gegebene Membranfläche hindurch tritt.

$$V_p = \frac{l}{m^2 h} \quad \text{oder} \quad \frac{m^3}{m^2 s} \quad (\text{SI-Einheit})$$

(Gl. 9)

V_p Durchflussgeschwindigkeit
 m^2 Membranfläche

Die Durchflussgeschwindigkeit steigt mit erhöhtem Druck und mit erhöhter Temperatur. Wenn die Temperatur der Flüssigkeit während der Ultrafiltration nicht konstant war, wurde die Menge des Permeats nachträglich zur Berechnung der Durchflussgeschwindigkeit korrigiert: Hier gilt: Erhöht oder vermindert sich die Temperatur um 1 °C, erhöht/vermindert sich die Permeatmenge um 2%. Das bedeutet, eine Permeatmenge von 100 ml/min bei 23°C entspricht 104 ml bei 25°C. Das Permeat wurde mittels Mensur aufgefangen und die Permeatmenge in definierten Zeitabständen gemessen. Zur graphischen Darstellung wurde die daraus errechnete V_p gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen.

Der Konzentrationsfaktor gibt an wie stark das Retentat im Laufe der UF aufkonzentriert wurde.

$$K_F = \frac{V_F}{V_R} \quad (\text{Gl. 10})$$

K_F	Konzentrationsfaktor
V_F	Volumen Feed
V_R	Volumen Retentat

Verwendete Membranen

- Keramische Membranen: Sie werden auch als anorganische oder mineralische Membran bezeichnet um sie von den organischen abzugrenzen. Ihr Vorteil liegt in der hohen Temperaturbeständigkeit und wird von organischen Lösungsmitteln nicht angegriffen. Ein Nachteil sind die hohen Anschaffungskosten, die durch die lange Lebensdauer wettgemacht werden (STAUDE, 1999). Diese Membran kam bei der Ultrafiltration im halbtechnischen Maßstab zum Einsatz (große Ultrafiltrationsanlage).
- Polysulfonbasierende Membran (Organische Membran): Polysulfon (PS) wird oft als Basispolymer für UF-Membranen genutzt. Die Struktur von Polysulfon charakterisiert sich durch sich wiederholende Diphenylen-Sulfongruppen und SO_2 -Gruppen, die beide zur Stabilität des Polymers beitragen (Abb. 6.7). Da sie hohen Hygiene- und Reinigungsanforderungen

entsprechen, sind sie in der Filtration von Milch und Molke sowie in der Enzym- und Proteinverarbeitung das gebräuchlichste Membranmaterial. Eine polysulfonbasierende Membran wurde bei beiden Ultrafiltrationen im Labormaßstab eingesetzt (kleine und mittlere UF-Anlage).

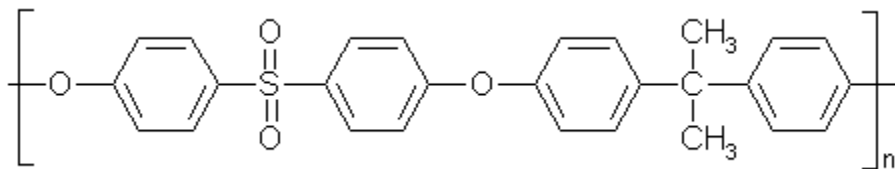


Abb. 6.7: Polysulfon

6.3.1.2 Ultrafiltration im Labormaßstab

6.3.1.2.1 Kleine Ultrafiltrationsanlage

Es handelt sich um eine Hochdruck-Zelle der Fa. Membrane Products-Kiryat Weizmann Ltd. (Israel) der Type FC-3/A (Pressure Cell for Flat Sheets) für Versuche im Labormaßstab (Abb. 6.9). Der benötigte Druck wurde in Form von Stickstoff angesetzt (Abb. 6.8). Das in die Zelle eingebaute Magnetrührstäbchen verhinderte die Polarisierung an der Membranoberfläche, weshalb wichtig war, dass die Zelle zentral am Magnetrührer stand. Die Temperatur wurde über ein Wasserbad mit Schlauch und Pumpe geregelt. Der um die Zelle gewickelte Schlauch erwärmte so das Retentat. Die technischen Daten der kleinen UF-Anlage werden in Tab. 6.5 dargestellt.

Geräte und Hilfsmittel

- Polysulfonbasierende Membran (Fa. Nadir Filtration, Deutschland, Type P010F (Flatsheet), cut-off level (=Ausschlussgrenze): 10 kDa)
- Modul/Zelle (Fa. Membrane Products-Kiryat Weizmann Ltd., Israel, Type FC 3/A (Pressure Cell for Flat Sheets))
- Magnetrührer (IKA Labortechnik, Modell MIDI MR1 digital)

Befüllung der Zelle:

- 1) Die Membran wurde in die korrekte Größe zugeschnitten

- 2) Die Zelle wurde geöffnet, die Membran und der Dichtungsring einlegen und anschließend wieder verschlossen.
- 3) 10 ml der zu filtrierenden Lösung wurden eingefüllt. Wenn sichergestellt wurde, dass der Magnetrührer rotiert wurde anschließend bis 30 ml aufgefüllt.
- 4) Die Zelle wurde sachgemäß verschlossen.
- 5) Druck wurde an der Anlage anlegen (der optimale Druck hängt von der Membran ab und war dem technischen Datenblatt der Membran zu entnehmen)
- 6) Das Permeat wurde gesammelt, wobei die ersten beiden ml verworfen wurden.
- 7) Zeit und Permeatmenge wurden notiert und für die spätere Berechnung der Durchflussmenge herangezogen.
- 8) Am Ende der Ultrafiltration wurde der Druck von der Anlage genommen, die Zelle geöffnet und das Konzentrat entleert.

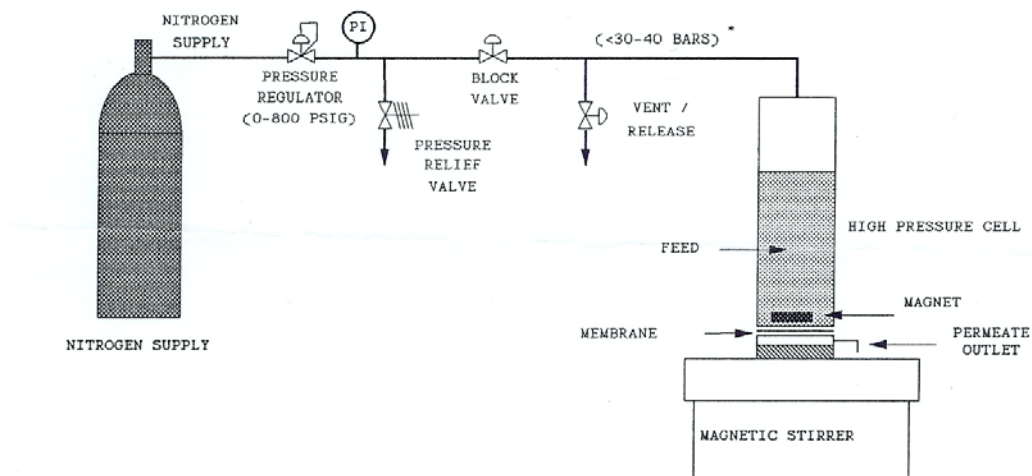


Abb. 6.8: Aufbau der kleinen Labor-Ultrafiltrationsanlage

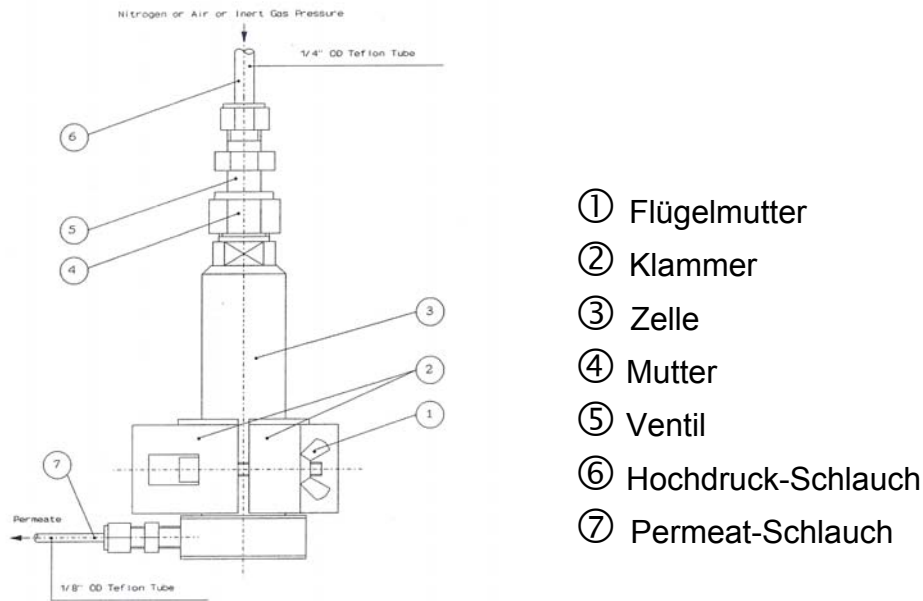


Abb. 6.9: Schema der kleinen Labor-Ultrafiltrationsanlage

Tab. 6.5: Technische Daten der Zelle

Membranparameter	
Außendurchmesser der Membran	29,5 - 29,7 mm
Effektiver Durchmesser der Membran	22 mm
Effektive Membranfläche	3,8 cm ²
Flußdichte Umrechnungsfaktor	3790 Liter / m ² .Tag
Betriebsparameter	
Maximaler Druck	30 bar
Maximale Temperatur	80 °C
Maximales Füllvolumen	30 ml
Totvolumen	2 ml
Zellparameter	
Zellaußendurchmesser	8 cm
Zellhöhe	17,3 cm
Zellgewicht	1,5 kg

6.3.1.2.2 Mittlere Ultrafiltrationsanlage

Hier handelte es sich um eine Zelle mit 1,8 l Fassungsvermögen mit einer flachen, organischen Membran am Zellenboden (Abb. 6.10). Um eine Ablagerung auf der Membranoberfläche zu vermindern, wurde das Retentat durch ein über der Membran fixiertes Magnetstäbchen in Bewegung gehalten. Die Zelle wurde zentral auf den Magnetrührer gestellt und so eine cross-flow

Ultrafiltration simuliert. Der Druck wurde mittels Stickstoff am Zellendeckel angesetzt.

Geräte und Hilfsmittel

- Polysulfonbasierende Membran (Fa. Nadir Filtration, Deutschland, Type P005 F (Flatsheet), cut-off level (=Ausschlussgrenze): 5 kDa, effektiver Durchmesser: 0,15 m, Membranfläche: 0,017 m²)
- Modul (Eigenbau BOKU)
- Magnetrührer (IKA Labortechnik, Modell MIDI MR1 digital)



- ① Zelle
- ② Membran

①

②

Abb. 6.10: Mittlere Ultrafiltrationsanlage (geöffnet), Eigenbau

6.3.1.2.3 Ultrafiltrationsanlage im halbertechnischen Maßstab (Große Anlage)

Hier handelte es sich um eine UF-Anlage mit einem Fassungsvermögen von (Abb. 6.12) 11 l. Die Filtration erfolgte über eine keramische Membran (Abb. 6.11). Das Retentat wurde mittels Pumpe im Kreis betrieben. Durch die Pumpleistung und das Ventil konnte der Membran-Eingangsdruck direkt und der Ausgangsdruck indirekt gesteuert werden. Die Temperatur wurde über ein Wasserbad geregelt. Kam es zu überhöhten Temperaturen (über 45°C) wurde mittels Kaltwasserschlauch vor der Pumpe gekühlt.



Abb. 6.11: Keramische Membran (Fa. TAMI Industries)



- ① Ventil
- ② Membran
- ③ Pumpe

Abb. 6.12: Ultrafiltrationsanlage, Fa. Aixom, Wien

Geräte und Hilfsmittel

- Keramikmembran „Sunflower“ (Fa. TAMI Industries)
Cut-off level (= Ausschlussgrenze): 8 kDa
Fläche: 0,35 m²
Äußerer Durchmesser: 25 mm
Anzahl der Kanäle: 23
Kanaldurchmesser: 3,6 mm
Membranlänge: 1,2 m
Organische Membran
- Ultrafiltrationsanlage (Fa. AIXOM, Wien)
- Pumpe (Fa. Hilge, Type Diuretta)

- Wasserbad (Fa. Lauda, Type Integra)
- Durchflussmesser (Fa. Endress + Hauser, Type Promag 30 F)
- Mensur
- Trichter

Reinigung der Membran

Nach jedem Versuchstag wurde die Membran je eine halbe Stunde mit 2% Salpetersäure und 2% KOH gespült (7 l). Anschließend wurde mit Wasser gereinigt.

6.3.2 Sprühtrocknung

6.3.2.1 Prinzip

Bei der Sprühtrocknung wird eine Lösung/Suspension in einen Heißluftstrom gesprüht und dadurch getrocknet. Das Wasser verdunstet – der Feststoff wird mittels Luftstrom weiter getragen und liegt als Pulver vor. Die Temperatur des Pulverpartikels kühlt durch die Wasserverdunstung unmittelbar ab und beträgt nur rund 60-80 °C. Die Sprühtrocknung zählt daher zu den schonenden Trocknungsverfahren. Eine Sprühtrocknung ist aber nur möglich, wenn das getrocknete Endprodukt sich als Feststoff verhält und nicht klebrig ist. In einer Düse wird die Lösung/Suspension in feinste Tröpfchen zerstäubt und mittels Heißluftstrom getrocknet. Der Ablauf wird schematisch in Abb. 6.13 dargestellt.

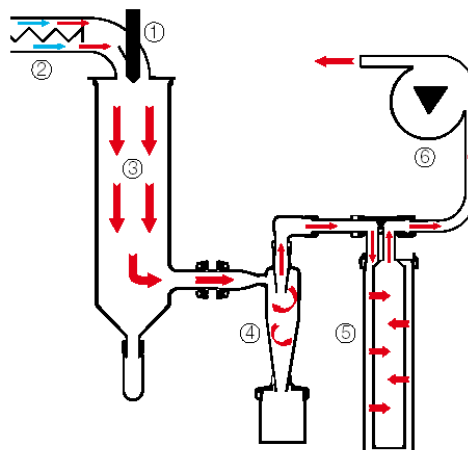


Abb. 6.13: Schema eines Sprühtrockners (Büchi, Homepage)

- ① **Düse** zum Versprühen der Flüssigkeit in feine Tröpfchen mittels Druckluft
- ② **Elektrische Erhitzung** des Mediums
- ③ **Sprayzylinder** für die Trocknung der Tröpfchen zu Feststoffen
- ④ **Zyklon** zur Separation der Partikel
- ⑤ **Austrittsfilter** um feine Partikel zu entfernen
- ⑥ **Aspirator** zur Streuung des Luftstroms

6.3.2.2 Durchführung

Getrocknet wurde bei einer Eingangstemperatur von 120 °C und einer Ausgangstemperatur von rund 60 °C.

Geräte und Hilfsmittel:

- Büchi 190 Mini Spraydryer (Abb. 6.14)



Abb. 6.14: Sprühtrockner (Fa. Büchi)

6.3.3 Gefriertrocknung

6.3.3.1 Prinzip

Das zu trocknende Gut wird tiefgefroren, evakuiert und getrocknet. Die Eiskristalle verdampfen ohne zuvor in den flüssigen Zustand überzugehen (Sublimation). Die Gefriertrocknung gilt als eine sehr schonende Trocknungsmethode. Bei diesem Prozess entfallen weitgehend enzymatische, bakterielle und chemische Veränderungen.

6.3.3.2 Durchführung

100 ml des zu trocknenden Materials wurden in einen 250 ml Rundkolben eingewogen und mittels Rotor im Kühlbad bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ so lange gekühlt bis der gesamte Inhalt durchgefroren war (Abb. 6.15). Die Kolben wurden auf den Vakuumaufsatz gesteckt und evakuiert. Die Trocknungsdauer betrug 24 h.

Geräte und Hilfsmittel

- Gefriertrocknungsanlage LABIN L05
- Rundkolben mit Schliff



Abb. 6.15: Gefriertrocknung des Retentats

7 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

7.1 Pentosangehalt der Roggenmuster

7.1.1 Durchführung

Bei 30 Roggenmuster und der Bio-Winterrogensorte „Nikita“ aus Österreich wurde der Pentosangehalt nach der Methode nach HASHIMOTO et al. (1978) bestimmt. Zehn Roggenmuster wurden pro Versuchstag in Dreifachbestimmung analysiert. Die Eisenchloridlösung und die Orcin-Ethanol Lösung wurden täglich neu gemischt, auch die Kalibriergerade wurde an jedem Versuchstag neu erstellt. Zur Ermittlung der Genauigkeit dieser Methode wurde das Roggenmuster Nr. 1 bei jedem Versuchstag erneut mitbestimmt (externer Standard). Der Blindwert wurde ebenfalls in Dreifachbestimmung ermittelt. Die Roggensorten Nr. 3,8,12,13 und 18 hatten eine erhöhte Standardabweichung und wurden daher ein zweites Mal analysiert.

7.1.2 Ergebnisse

Der mittlere Pentosangehalt bei Dreifachbestimmung (in % TM), die Trockenmasse und die Standardabweichung der 31 analysierten Roggenproben werden in Tab. 7.1 aufgelistet und in Abb. 7.1 als Balkendiagramm veranschaulicht.

Tab. 7.1: Pentosangehalt der Roggenmuster

Probennr.	Trockenmasse	% Pentosan MW	Standardabweichung
1	89,76	8,95	0,23
2	91,14	8,37	0,91
3	92,40	9,33	0,53
4	92,55	9,40	0,34
5	92,88	9,71	0,52
6	93,26	10,35	0,49
7	92,50	8,99	1,12
8	92,41	10,89	0,52
9	92,49	10,06	0,23
10	93,02	8,62	0,84
11	93,11	8,27	0,54
12	93,56	12,16	0,26
13	93,58	11,60	0,54
14	93,22	10,07	0,33
15	92,65	7,76	0,76
16	92,89	9,20	0,73
17	93,19	9,38	0,74
18	93,00	10,37	0,86
19	90,65	7,91	1,04
20	91,70	9,29	0,27
21	91,37	9,71	0,90
22	90,48	10,37	0,31
23	92,23	8,50	0,34
24	92,57	10,35	0,42
25	92,49	8,62	0,29
26	92,49	8,33	0,20
27	93,54	9,49	0,14
28	92,94	9,72	0,66
29	92,97	8,62	0,29
30	92,07	9,66	0,60
Nikita	89,27	7,35	0,56

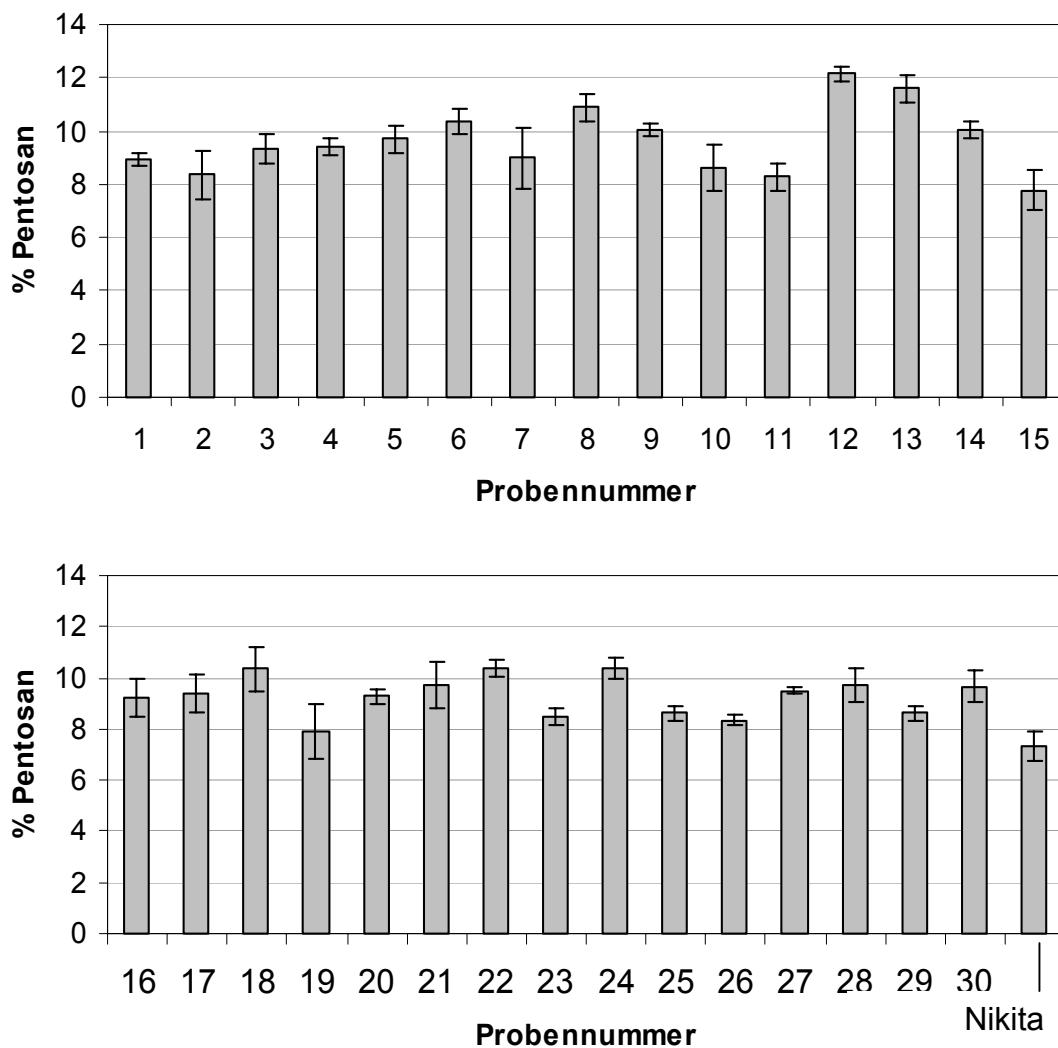


Abb. 7.1: Pentosangehalt der Roggenproben mit Standardabweichung

7.1.3 Diskussion

Die Standardabweichung der analysierten Roggenmuster ($n=31$) variierte zwischen 0,138 und 1,121%. Um die Präzision dieser Methode zu bestimmen, wurde die Roggenprobe Nr.1 an jedem Versuchstag mitbestimmt und diente somit als externer Standard. Die Messergebnisse wurden statistisch ausgewertet (Tab. 7.2 und Abb.7.2-7.3). Durch den Vergleich der Varianz innerhalb einer Probengruppe und der Varianz zwischen den Probengruppen lässt sich ermitteln ob sich die Gruppenmittelwerte signifikant von einander unterscheiden (F-Wert). Der F-Wert der 4 Standards betrug 1,35 was bedeutet dass sich die Gruppenmittelwerte signifikant von einander unterscheiden (bei

einem p-Wert von 0,33). Die Präzision dieser Methode ist daher als gering einzustufen.

Tab. 7.2: Statistische Auswertung der Standards

<i>PrNum</i>	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
1	3	8,5	0,511566	6,01843%	8,18	9,09	0,91
2	3	10,3767	2,18324	21,0399%	8,95	12,89	3,94
3	3	8,47333	0,57492	6,78505%	8,02	9,12	1,1
4	3	9,03667	1,31743	14,5788%	7,86	10,46	2,6
Total	12	9,09667	1,39312	15,3146%	7,86	12,89	5,03

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	7,15967	3	2,38656	1,35	0,3266
Within groups	14,1888	8	1,7736		
Total (Corr.)	21,3485	11			

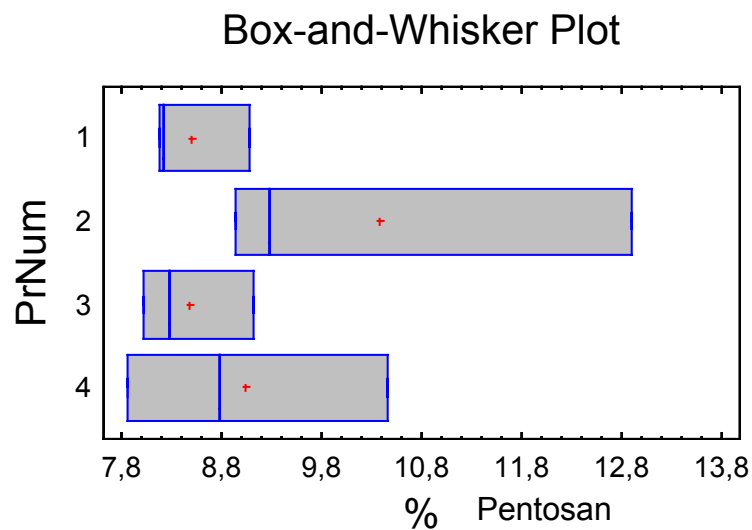


Abb. 7.2: Box-and-Whisker Plot der Standards

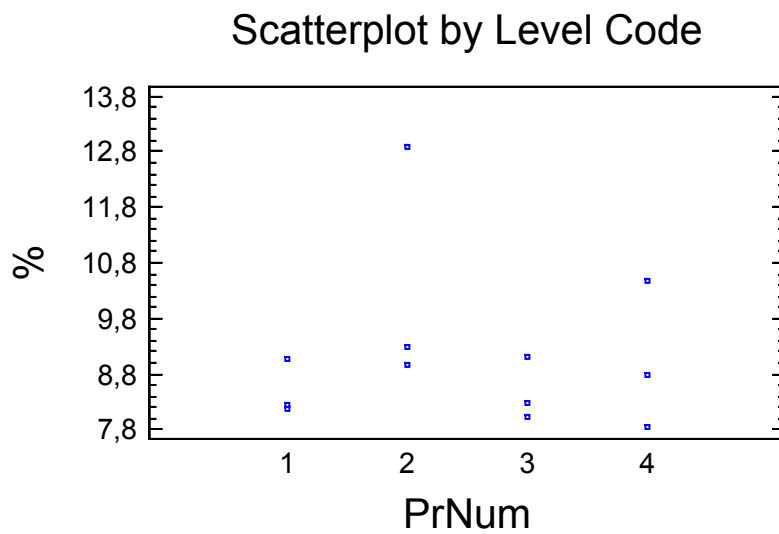


Abb.7.3: Streudiagramm der Proben

Einen Nachteil der photometrischen Pentosan-Bestimmung stellt der begrenzte Messbereich dar. Ist der Pentosangehalt in der Probe zu gering bzw. zu hoch, ist eine Messung nicht möglich. Deshalb ist (besonders bei den Proben während der Isolierung) der zu erwartenden Pentosangehalt zuvor zu überdenken bzw. müssen von einer Probe verschiedene Konzentrationen analysiert werden (z.B.: 300 µl, 700 µl und 1000 µl bei flüssigen Proben).

7.2 Isolierung der Pentosane

In Anlehnung an den Versuchsaufbau nach RAGAE et al. (2001) und FAUROT et al. (1995) wurde ein Ausgangsversuchsablauf im Labormaßstab erstellt, der auf die Zentrifugation einer Mehl/Wassersuspension mit anschließender enzymatischer Hydrolyse der Proteine und Polysaccharide beruht und im Laufe der Versuche schrittweise abgeändert wurde. Folgende Aspekte wurden berücksichtigt:

- Der wasserlösliche Pentosananteil sollte isoliert und angereichert werden, da dieser für die positiven Backeigenschaften verantwortlich ist.
- Der im Labormaßstab entwickelte Versuchsablauf sollte später technisch/halbtechnisch umsetzbar sein.
- Die Pentosane sollten möglichst rein isoliert werden. Das bedeutet, dass u.a. Stärke, Proteine und niedermolekulare Saccharide abgetrennt werden mussten.
- Insbesondere die Proteine sollten während des Isolationsvorgangs abgeschieden werden um, in Hinblick auf die spätere Verwendung, ein möglichst reines Endprodukt zu erhalten.
- Endogene Enzyme mussten zu Beginn inaktiviert werden, vor allem endogene Pentosanasen (Xylanase und Arabinofuranosidase), um einen Pentosanabbau während des Isolierungsvorgangs zu verhindern bzw. zu vermindern.

Um die Wirksamkeit der einzelnen Schritte zu bewerten, wurden während des Isolierungsvorgangs Proben gezogen und auf ihren Pentosan- und Proteinanteil in der Trockenmasse untersucht.

7.2.1 Isolierung im Labormaßstab

7.2.1.1 Erster Versuchsdurchlauf im Labormaßstab

7.2.1.1.1 Durchführung

- 1) Inaktivierung endogener Enzyme im Trockenschrank

Um einen Abbau der Pentosane durch Pentosanasen und andere unerwünschte enzymatische Nebenreaktionen zu verhindern/vermindern, wurden 0,5 kg Roggenmehl für 1,5 h bei 130°C im Trockenschrank (Fa. Memmert GmbH, Deutschland) erhitzt. Es ist vor allem eine Inaktivierung der Arabinoxylanasen wünschenswert, da diese im Isolationsablauf die Pentosane aufspalten würden. Das Mehl wurde, wie in Abb. 7.4 gezeigt, rund 2 cm hoch auf Platten aufgestreut, um ein schnelles Erreichen der Kerntemperatur zu gewährleisten.



Abb. 7.4: Erhitzung des Roggenmehls im Trockenschrank

2) Suspendierung

Das inaktivierte Mehl wurde im Verhältnis 1:10 in Wasser (Aqua dest.) in einem Becherglas am Magnetrührer (Fa. IKA Labortechnik, RCT basic) bei Raumtemperatur suspendiert (Abb. 7.5). Um eine Klumpenbildung zu vermeiden, wurde das Wasser vorgelegt und das Mehl langsam hineingestreut. Kam es dennoch zur Klumpenbildung, konnten diese mit einem Stabmixer aufgelöst werden. Der Brei wurde zusätzlich mit einem Stativmixer (Fa. Heidolph, Type 50204, Deutschland) gerührt. Die wasserlöslichen Pentosane gehen in diesem Schritt in Lösung über.



Abb. 7.5: Stativrührer mit Mehl / Wassersuspension

3) Erste Zentrifugation

Um die wasserunlöslichen Bestandteile (Stärke, wasserunlösliche Proteine, wasserunlösliche Pentosane) von den wasserlöslichen Bestandteilen (wasserlösliche Proteine, wasserlösliche Pentosane) abzutrennen, wurde die Mehl/Wasser-Suspension bei 6429 min^{-1} zentrifugiert (Sorvall®Evolution RC, Fa. Kendro mit Winkelrotor 6000 SLC Angle) (Abb. 7.6).



Abb. 7.6: Zentrifuge (Sorvall®Evolution)

Der Rückstand haftete fest an der Wand des Zentrifugationsbehälters weshalb der Überstand gut abgetrennt werden konnte. Der Feststoff wurde nach der Probenentnahme verworfen.

4) Hydrolyse der Stärke und Denaturierung der Proteine

Eventuelle Stärkerückstände wurden in diesem Schritt mittels α -Amylase enzymatisch abgebaut (Termamyl®, Fa. Novozymes, 0,45 ml). Die α -Amylase wurde hier gleich zu Beginn zugefügt und die Flüssigkeit wurde in einem Becherglas am Magnetrührer mit Heizplatte auf 90 °C erwärmt und die Temperatur 60 min gehalten. Durch die Erhitzung kommt es zum Ausfallen der Proteine, welche im nächsten Schritt abzentrifugiert wurden.

5) Zweite Zentrifugation

Nach dem Abkühlen der Lösung wurde 15 min bei 6000 min⁻¹ zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen, mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

6) Hydrolyse der Dextrine

Die Lösung wurde über Nacht bei 60 °C auf der Wärmeplatte / Magnetrührer erhitzt. Zur weiteren Verzuckerung der Dextrine wurde Amyloglucosidase zugefügt (AMG, Fa. Novozymes, 4,5 ml). Zuvor wurde der pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure auf 4,8 eingestellt.

7) Dritte Zentrifugation

Nach dem Abkühlen der Lösung wurde bei 5000 min⁻¹ für 15 min zentrifugiert.

8) Ultrafiltration

Für diese Ultrafiltration im Labormaßstab wurde die mittlere UF-Anlage herangezogen. In diesem Schritt werden niedermolekulare Substanzen abgeschieden. Um mikrobielles Wachstum während der UF zu verhindern, wurde Natriumazid zugesetzt (2g/l). Das Aufgabevolumen betrug 1,8 l und wurde während der UF auf 550 ml konzentriert (Volumen Permeat: 1130 ml, Konzentrationsfaktor: 3, Dauer: 18 h). Die Temperatur stieg während der Ultrafiltration und wurde zwischen 20 °C und 25 °C gehalten. Ein Druck von 10 bar wurde in Form von Stickstoff angelegt.

Hier handelte es sich nur um eine Ultrafiltration nicht aber um eine Diafiltration, weil nach der Aufkonzentrierung nicht mit Wasser gespült wurde.

Der Verlauf der Ultrafiltration wird in Abb. 7.7 dargestellt (V_p Werte nach Temperatur korrigiert).

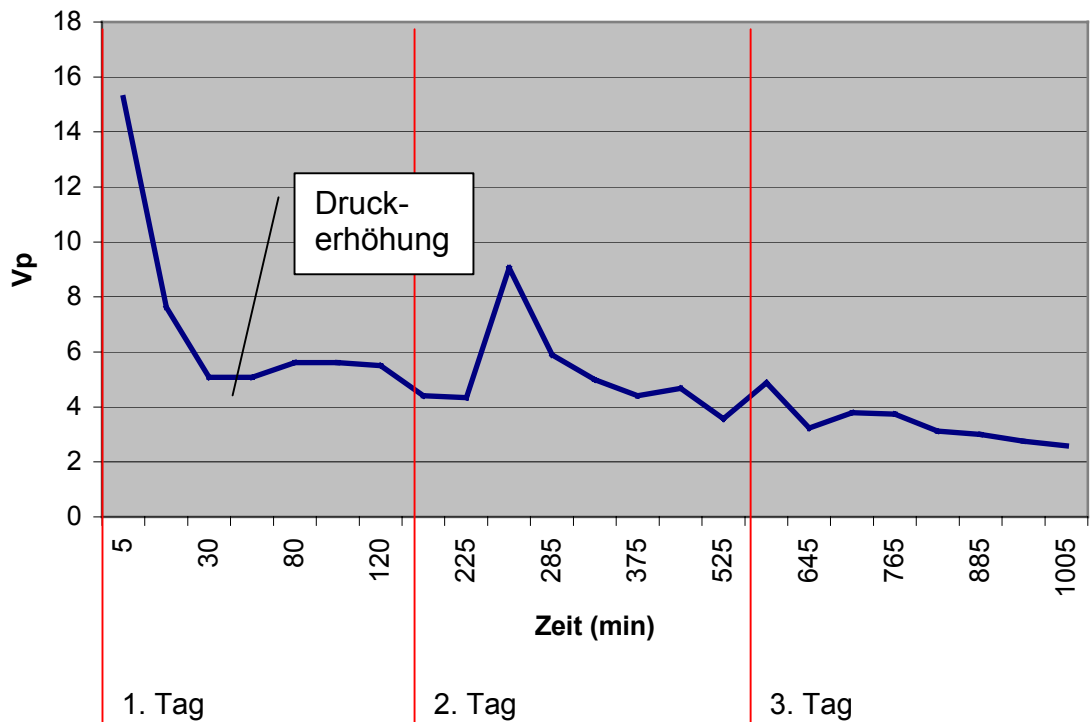


Abb. 7.7: Erstere UF im Labormaßstab (mittlere UF-Anlage)

9) Proteinentfernung/ Denaturierung

Um ein möglichst proteinfreies Endprodukt zu erhalten wurde ein Drittel des Retentats mittels Protease enzymatisch hydrolysiert (Alkalase®, Fa. Novozymes). Bei dem zweiten Drittel wurden die Proteine mittels Carrez-Lösung gefällt. Beim letzten Drittel wurden diese beiden Methoden kombiniert.

- a) Proteasebehandlung: Hierfür wurden 70 ml des Retentats mit Protease (Alkalase, Fa. Novozymes, 0,4 ml) versetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7 eingestellt und die Lösung 2 h bei 60°C inkubiert. Es kam weder zu einer Bildung von Niederschlag, noch trat eine Änderung der Farbe/ Konsistenz auf.
- b) Proteinfällung mit Carrez-Lösung:
Proteinfällung mit Carrez-Lösung wird oft in der LM-Analytik zur Proteinentfernung eingesetzt, um für nachfolgende Analysen eine

proteinfreie Lösung zu erhalten. Die Möglichkeit zum Einsatz im Retentat wurde wie folgt durchgeführt:

70 ml des Retentats wurden mit 15 ml Carrez 1-Lösung und 15 ml Carrez 2-Lösung versetzt (Carrez 1: 3,60 g $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$ (Fa. Merck, Deutschland) / 100 ml mit Aqua dest.; Carrez 2: 7,20 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ / 100 ml mit Aqua dest.).

c) Alkalase und Carrez-Lösung

30 ml des oben mit Alkalase behandelten Retentats wurde mit 6 ml Carrez 1 Lösung und 6 ml Carrez 2 Lösung versetzt (siehe oben).

10) Zentrifugation

Die beiden mit Carrez-Lösung versetzten Retentate wurden zentrifugiert.

7.2.1.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Der Pentosangehalt nach der ersten Zentrifugation betrug 7,2 [%TM] und wurde während der UF auf 14,8 [%TM] aufkonzentriert. Im Permeat waren keine Pentosane messbar. Das bedeutet dass das cut-off level von 10 kDa klein genug war um Pentosane zurückzuhalten.

Der Proteinanteil nach der ersten Zentrifugation betrug 20,1 [%TM] und wurde im Zuge der Erhitzung bei der Hydrolyse der Stärke (90°C, 60 min) denaturiert und bei den folgenden zwei Zentrifugationen abgetrennt. Der Proteinanteil nach der UF betrug 7,7 [%TM]. Bei der Hydrolyse der Proteine durch Protease änderte sich der Proteinanteil kaum. Es wäre sinnvoller die Protease vor der UF zuzufügen, um die dadurch erhaltenen Proteinbruchstücke bei der UF und Diafiltration auszuspülen. Die Fällungen mit Carrez-Lösung waren in beiden Fällen wirkungsvoll. Es war jedoch eine große Menge Carrez-Lösung nötig: Bei 0,2 ml Carrez 1+2 Lösung/ ml Retentat wurde der Anteil auf 1,7 [TM%] gesenkt (in Kombination mit Protease) bei alleiniger Carrez Fällung betrug der Proteinanteil 5,1 [%TM]. Die Zentrifugation nach der Hydrolyse der Dextrine war nicht sinnvoll, da die Rückstände minimal waren. Der Versuchsaufbau und die Ergebnisse sind in Abb. 7.8 dargestellt.

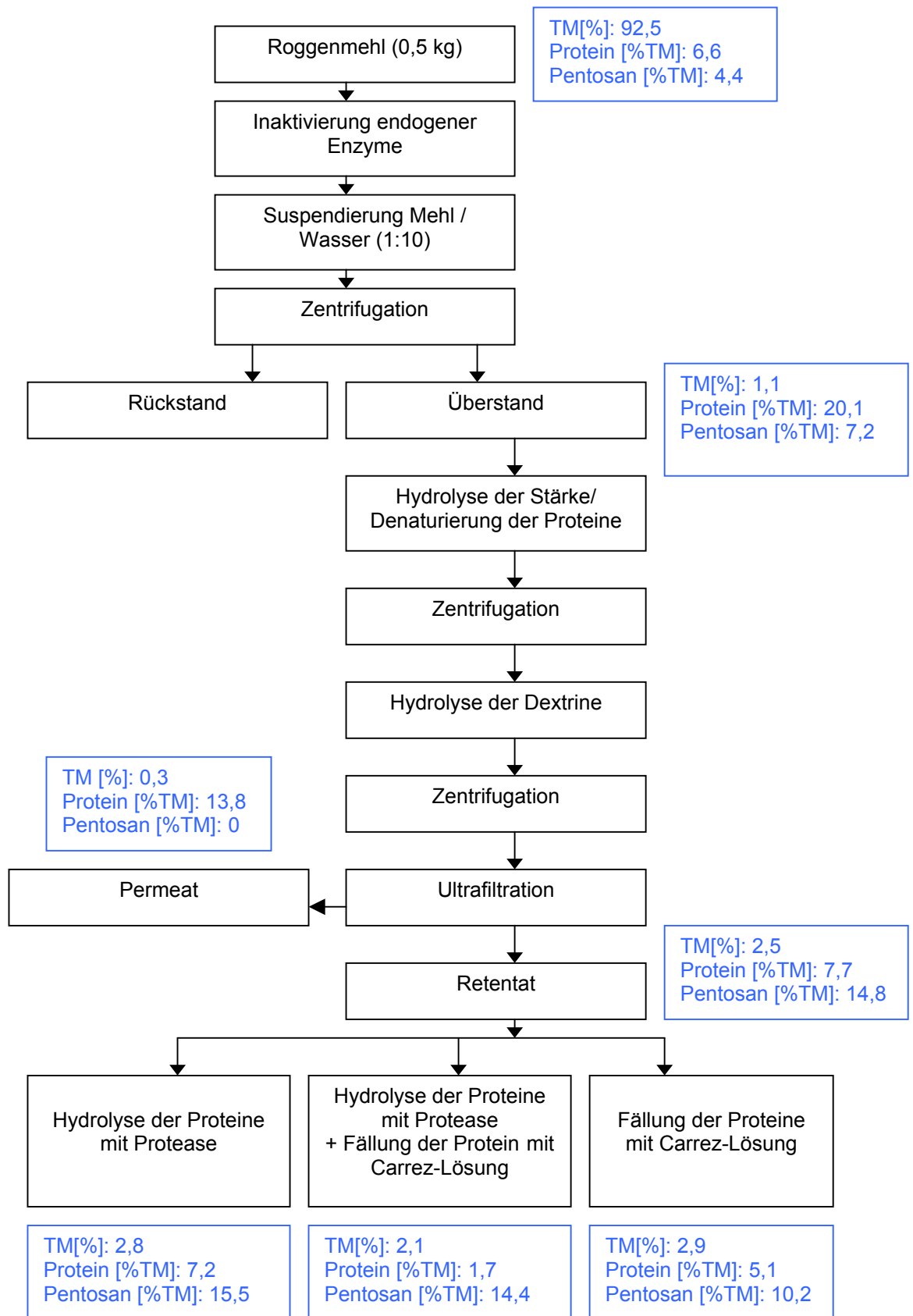


Abb. 7.8: Fließdiagramm der Versuchsanordnung mit Ergebnissen (1.Durchlauf im Labormaßstab)

7.2.1.2 Zweiter Versuchsdurchlauf im Labormaßstab

7.2.1.2.1 Durchführung

1) Inaktivierung endogener Enzyme

200 g Roggenmehl wurde im Trockenschrank (Fa. Memmert) auf Blechen für 60 min bei 130°C erhitzt.

2) Suspendierung

Mehl und Wasser wurden 1:10 mit Aqua dest. im Becherglas mit dem Stabmixer so lange gemischt bis keine Klumpen mehr sichtbar waren. Anschließend wurde mittels Magnetrührer und Stabmixer für 45 min bei Raumtemperatur gerührt.

3) Zentrifugation

Die Zentrifugation erfolgte bei 6000 min⁻¹ (Sorvall Evolution RC, Fa. Kendro) für 20 min bei 20°C. Mit dem wasserlöslichen Überstand wurde weiter gearbeitet, der Rückstand wurde verworfen.

4) Proteinfällung

Der Überstand wurde 10 min bei 100°C erhitzt, um die Protein zu fällen.

5) Hydrolyse der Stärke

Die Hydrolyse mit α -Amylase (Termamyl, Fa. Novozymes, 0,45 ml) erfolgte bei 95°C auf der Heizplatte/Magnetrührer. Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf 6,00 eingestellt und die Temperatur für 60 min gehalten.

6) Zentrifugation

Die Zentrifugation erfolgte bei 6000 min⁻¹ (Sorvall Evolution RC, Fa. Kendro) für 20 min bei 20°C. Mit dem wasserlöslichen Überstand wurde weiter gearbeitet, der Rückstand wurde verworfen.

7) Hydrolyse der Dextrine

Mittels Amyloglucosidase (AMG, Fa. Novozymes, 0,45 ml) wurden über Nacht bei 60°C die Dextrine hydrolysiert. Der pH-Wert von 4,8 wurde mittels HCl eingestellt.

8) Hydrolyse der Proteine/Peptide

Die Hydrolyse erfolgte mittels Protease (Alkalase, Fa. Novozymes, 0,45 ml) für 2 h bei 60°C. Da diese Protease aber nur eine pH-Stabilität von 5,5-10 aufweist wurde die Lösung mit NaOH (1N) auf pH 7 eingestellt.

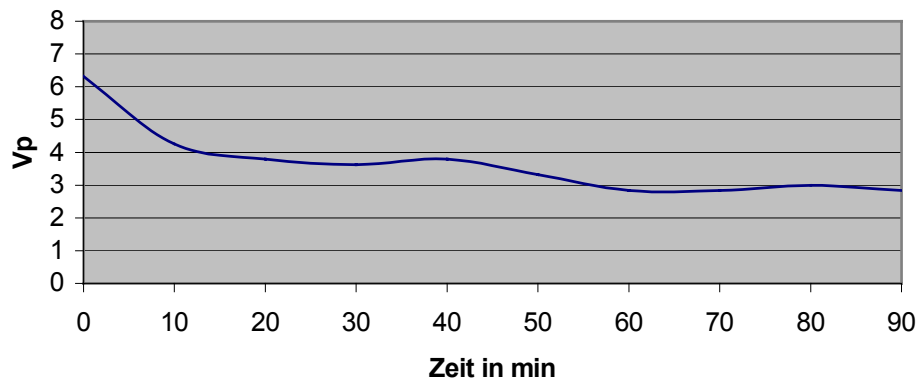
9) Fällung der Proteine mit Carrez-Lösung/Hydrolyse mit Protease

Dem halben Probenanteil wurden 0,3 ml Carrez I und Carrez II Lösung / ml Lösung zugefügt und anschließend wurde bei 6000 min⁻¹, 20 min, 20 °C abzentrifugiert. Die zweite Probenhälfte wurde nur mit Protease behandelt.

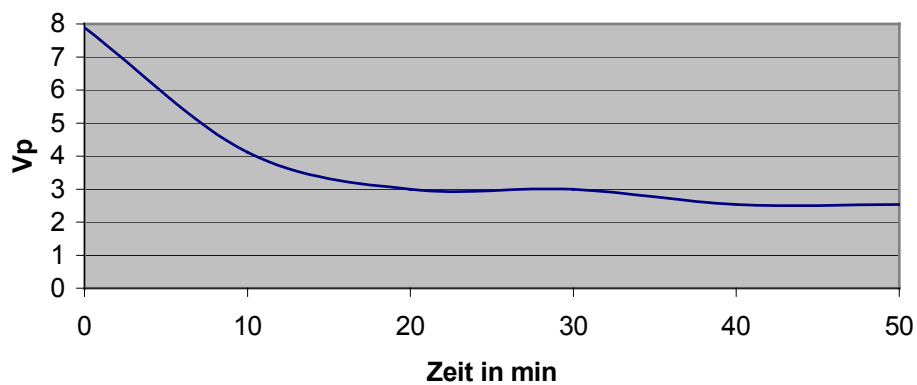
10) Ultrafiltration der mit Protease behandelten Lösung

Die Ultrafiltration im Labormaßstab wurde auf der kleinen UF Anlage durchgeführt. Die Temperatur wurde mittels Wasserbad und um die Zelle gewickelten Wasserschlauch bei 40°C gehalten. Der Druck wurde mittels Stickstoff angesetzt (8 bar). Die UF Anlage wurde mit 32 ml befüllt (Feed-Volumen) und während der Ultrafiltration auf 12,7 ml aufkonzentriert (Volumen Permeat: 19,3 ml, Konzentrationsfaktor: 2,5). Anschließend wurde zweimal mit je 10 ml Aqua dest. diafiltriert. Der Verlauf der Ultrafiltration und der Diafiltration wird in Abb. 7.9 grafisch dargestellt (V_p nach Temperatur korrigiert).

Ultrafiltration (32 ml Lösung)



Diafiltration 10ml Retentat + 10ml Permeat



Diafiltration 10ml Retentat (UF2) + 10 ml Aqua dest.

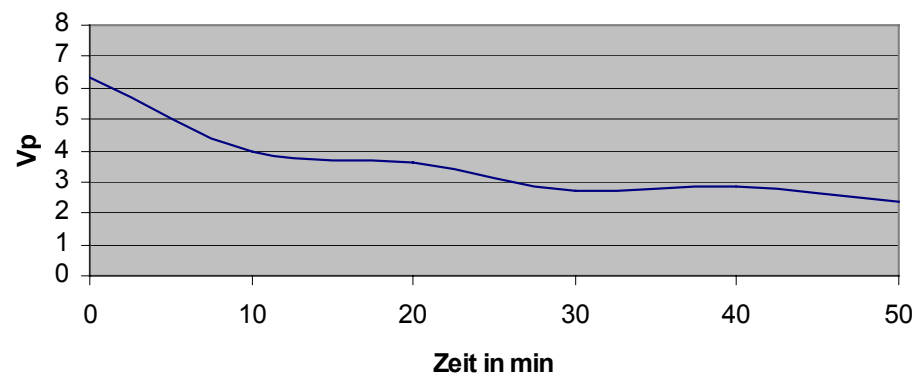


Abb.7.9: Ultrafiltration und Diafiltration (zweiter Durchlauf im Labormaßstab)

7.2.1.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Da hier die Retentatmenge nicht ausreichend war um die Trockensubstanz mit der Seesandmethode zu bestimmen wurde sie mit dem Infrarotmessgerät (Sartorius thermo control) gemessen. Rund 1 ml der Probe wurde aufgetragen und analysiert. Da der zu erwartende Wert der Trockenmasse sehr gering ist und die Genauigkeit dieser Methode, im Vergleich zur Bestimmung mit Verreibung mit Seesand niedriger ist, wurden teilweise Werte über 100% Feuchtigkeit angezeigt. Aus diesem Grund liegen für diesen Versuchsaufbau keine aussagekräftigen Werte für die Trockenmasse vor. Da die Trockenmasse grundsätzlich für die Angabe der Proteine und Pentosane in %TS nötig ist konnten auch diese beiden Fraktionen nicht rückgerechnet werden. Für diesen Versuchsdurchlauf liegen deshalb keine Protein- und Pentosangehalte vor.

Die Membran mit dem cut-off von 10 kDa ist klein genug um die Pentosane zurückzuhalten. Die erhaltenen Probemengen waren sehr gering weshalb keine weiteren Versuche auf dieser Zelle durchgeführt wurden. Der Versuchsaufbau wird in Abb. 7.10 dargestellt.

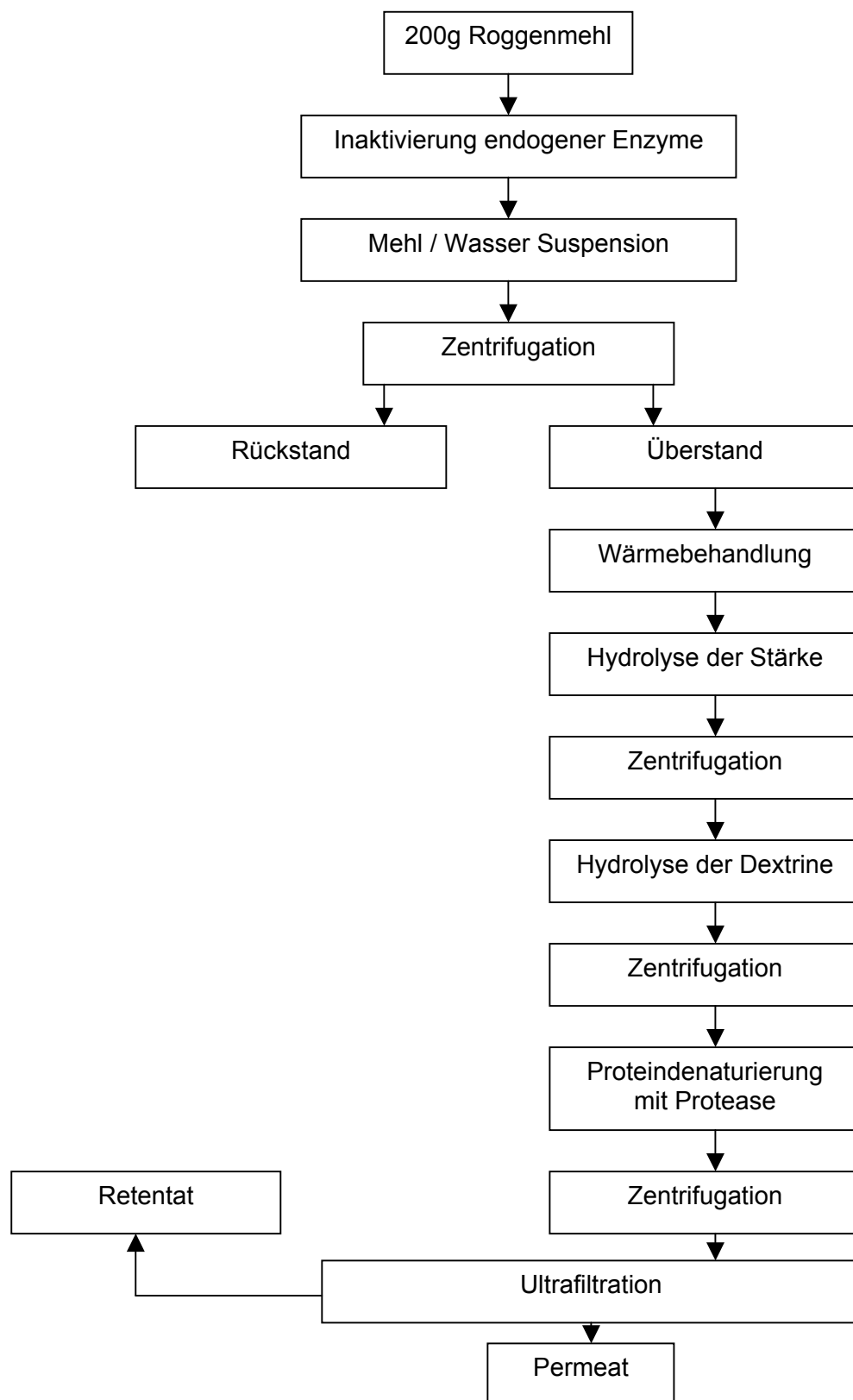


Abb.7.10: Fließdiagramm der Versuchsanordnung
(2. Durchlauf im Labormaßstab)

7.2.2 Isolierung im halbtechnischen Maßstab

7.2.2.1 Erster Versuchsdurchlauf im halbtechnischen Maßstab

7.2.2.1.1 Durchführung

Aus den beiden Vorversuchen im Labormaßstab ergab sich folgender Versuchsablauf zur Isolation wasserlöslicher Enzyme im halbtechnischen Maßstab:

1) Inaktivierung endogener Enzyme

Roggenmehl wurde auf Platten mit Backpapier im Trockenschrank (Fa. Memmert) bei 130 °C nach Erreichen der Endtemperatur für 2 h durchgetrocknet.

2) Suspendierung

15 kg des inaktivierten Roggenmehls wurden 1:10 mit Wasser im Rührkessel suspendiert (15 kg Mehl : 150 l Wasser). Hierfür wurde das Wasser mittels Heizring und Wasserdampf auf 40°C erwärmt und das Mehl schaufelweise dazugeschüttet. Die Rührzeit betrug 60 min, der pH-Wert 6,3 (bei 40 °C).

3) Hydrolyse der Proteine

Der Suspension wurden 20 ml Protease zugesetzt (Alkalase, Fa. Novozymes). Deren pH-Optimum liegt bei pH 7,0-7,5, ihre pH-Stabilität zwischen pH 5,5 und 10,0. Die Proteasen konnten deshalb bis zur Ansäuerung mit Milchsäure (in Schritt 8) wirken.

4) Dekantieren der Mehl-Wasser Suspension

Um vor der Zentrifugation die Feststoffe bereits grob abzutrennen, wurde mittels Dekantierzentrifuge dekantiert (SHARPLES Zentrifugationstechnik, Pennwalt Germany, Type P600). Hierfür wurde die Suspension vom Rührkessel abgelassen und mittels Pumpe mit Trichteraufsatz in den Dekanter befördert (Abb. 7.11). Die Differenzdrehzahl betrug zwischen 20 und 50 min⁻¹. Die Durchflussleistung bei einer Differenzdrehzahl von 40 min⁻¹ betrug 1,6 l/min. In diesem Schritt kam es zu einer starken Schaumbildung. Der feste Anteil wurde verworfen (nach Probenentnahme), der flüssige Anteil wurde zentrifugiert.



Abb. 7.11: Dekanter (Sharpels / Pennwalt, Deutschland) mit Trichterpumpe

5) Zentrifugation

Die Zentrifuge (GEA Westfalia Separator AG, Type: KB 6-86-078, Baujahr 2003) wurde parallel zum Dekanter betrieben und mittels Trichterpumpe gespeist. Die Durchlaufleistung bei 8630 min^{-1} betrug 1750 ml/min . Der Überstand wurde im Rührbehälter gesammelt, der Rückstand wurde nach Probenentnahme verworfen.

6) Hydrolyse der Stärke / Denaturierung der Proteine

Die nach der Zentrifugation nicht abgetrennte Stärke wurde in diesem Schritt verzuckert. Der Überstand wurde im Rührbehälter mittels Heizring auf 90°C erwärmt, mit $13,5 \text{ ml } \alpha\text{-Amylase}$ (Termamyl, Fa. Novozymes) versetzt und 90 min gerührt. Durch die Temperatureinwirkung kam es weiters zur Denaturierung der Proteine.

7) Zentrifugation

Wie bei der ersten Zentrifugation wurde die Zentrifuge mittels Trichterpumpe gespeist, der Rückstand nach Probenentnahme verworfen und der Überstand im Rührkessel gesammelt. Bei 8630 min^{-1} betrug der Durchlauf 1600 ml/min . Es kam zu einer sehr starken Schaumbildung während der Zentrifugation (Abb. 7.12 und 7.13)



Abb. 7.12: Zentrifuge (Westfalia)



Abb. 7.13: Schaumbildung
bei der Zentrifugation

8) Verzuckerung mit Amyloglucosidase

Im Rührbehälter wurde der pH-Wert mit rund 70 ml Milchsäure (Fa. Neuber's Enkel OHG, Wien) von 6,3 auf 4,8 gesenkt. 15 ml Amyloglucosidase (AMG, Novozymes) wurden dazugegeben und über Nacht bei 60°C gerührt. Der Rührkessel wurde mittels Wasserbad (Fa. Lauda, Edition 2000, RK 20 KS) beheizt.

9) Ultrafiltration

Die Ultrafiltration im halbtechnischen Maßstab wurde auf der großen UF-Anlage im Technikum durchgeführt. Die Temperatur wurde mittels Wasserbad (Fa. Lauda, Integra T 2200) und Kaltwasserschlauch geregelt und bei rund 45 °C gehalten. Der Eingangsdruck wurde während der UF von 3 auf 4 bar erhöht. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 3,2 m³/h.

Die Ultrafiltrationsanlage wurde mit 22,4 l befüllt (Feedvolumen). Das Retentat wurde während der UF auf 4,2 l konzentriert (Konzentrationsfaktor: 5,3). Es folgte die Diafiltration mit 6,2 l Wasser. Der Verlauf der Ultrafiltration ist in Abb. 7.14 - 7.15 grafisch dargestellt (V_p -Werte nach Temperatur korrigiert).

Die Kühlung zwischen den einzelnen Tagen an denen ultrafiltriert wurde, erfolgte, nach vorherigem absenken der Temperatur mit Kaltwasser, mittels Tauchkühler (Fa. Alpha-laval electronic) im Rührbehälter. Das Retentat wurde aus der Anlage abgelassen und im Kühlraum gekühlt.

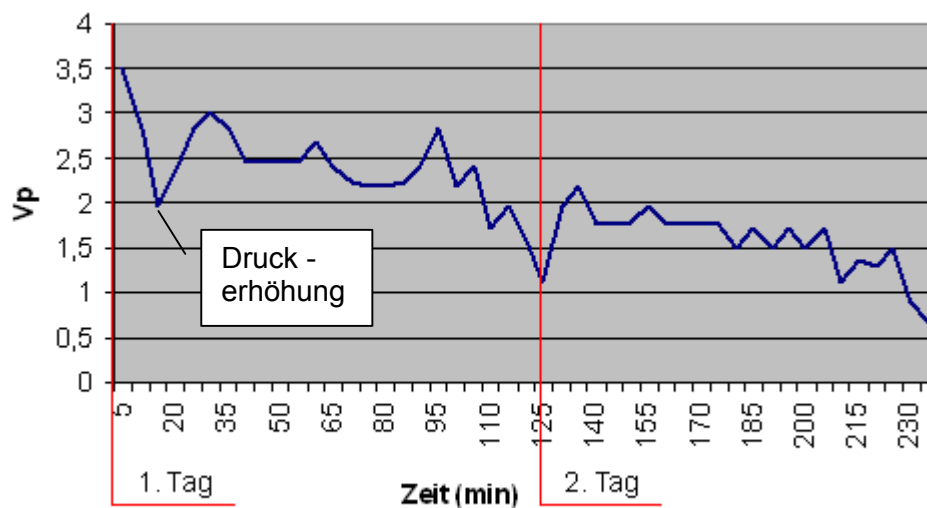


Abb. 7.14: Ultrafiltration (erster Durchlauf im halbtechnischen Maßstab)

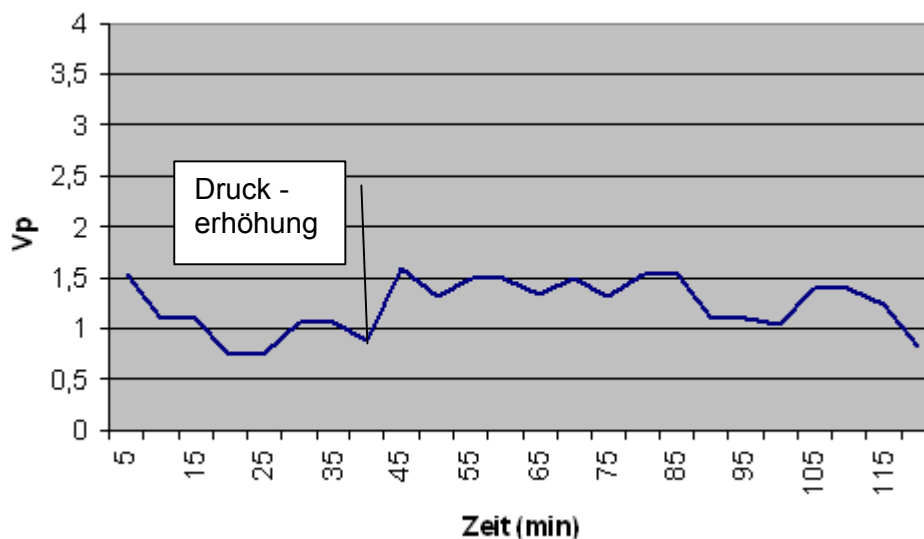


Abb. 7.15: Diafiltration (erster Durchlauf im halbtechnischen Maßstab)

7.2.2.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Pentosane wurden während der UF von 16,2 [%TM] auf 37,3 [%TM] aufkonzentriert. Im Permeat am Ende der DF waren 8,2 [%TM] Pentosane. Da die Vorversuche zeigten dass eine 10kDa Membran die Pentosane zurückhält, kann davon ausgegangen werden, dass die Pentosanasen unzureichend inaktiviert wurden. Zudem ist die Inaktivierung der endogenen Enzyme im Trockenschrank sehr zeitintensiv und bei größeren Mehlmengen problematisch.

Das Aufschütten des Mehls auf die Platten und die lange Aufwärmzeit bis zum Erreichen der Endtemperatur sind ungünstig, und wurden im nächsten Schritt durch Erhitzung des Mehl/Wassergemischs auf 90°C ersetzt. Die endogenen Enzyme wurden auf diesem Weg ebenso inaktiviert. Ein Teil der Pentosane blieb als Rückstand im Dekanter / in der Zentrifuge. Wahrscheinlich handelte es sich größtenteils um wasserunlösliche Pentosane. Dennoch ist davon auszugehen, dass auch ein Teil der wasserlöslichen auf diesem Weg verloren ging. Da nur der Gesamtpentosangehalt analytisch bestimmt wurde, war eine Unterscheidung nicht möglich.

Der Proteingehalt im Retentat betrug 22,7 [%TM] und war damit relativ hoch. Das kann bedeuten, dass einerseits mit einer zu geringen Menge Wasser diafiltriert wurde, andererseits die enzymatische Hydrolyse nicht effektiv war. Eine proteolytische Behandlung mit Alkalase und Neutrase bei dem pH-Wert der Mehl/Wasser Mischung (2 h, pH 6.0, Enzyme/Protein 30g/kg) zeigte, dass Neutrase 94,1% der Proteine eliminiert während Alkalase nur 75% der Proteine entfernte. Erfolgt die Proteolyse mit Neutrase vor der Amylase-Behandlung wurden 94,1% der Proteine eliminiert, wurde sie danach eingesetzt wurden nur 87,9% eliminiert (FAUROT et al., 1995). Im nächsten Versuchsdurchlauf wurde deshalb die Protease Alkalase mit der Protease Neutrase ergänzt.

Bei der UF wurde eine Höchstdurchflussgeschwindigkeit von 3,5 V_p erreicht und sank gegen Ende der UF auf rund 0,7. Bei der Diafiltration wurden Werte bis V_p 1,6 erreicht. Der Versuchsablauf und die Ergebnisse werden in Abb. 7.16 dargestellt.

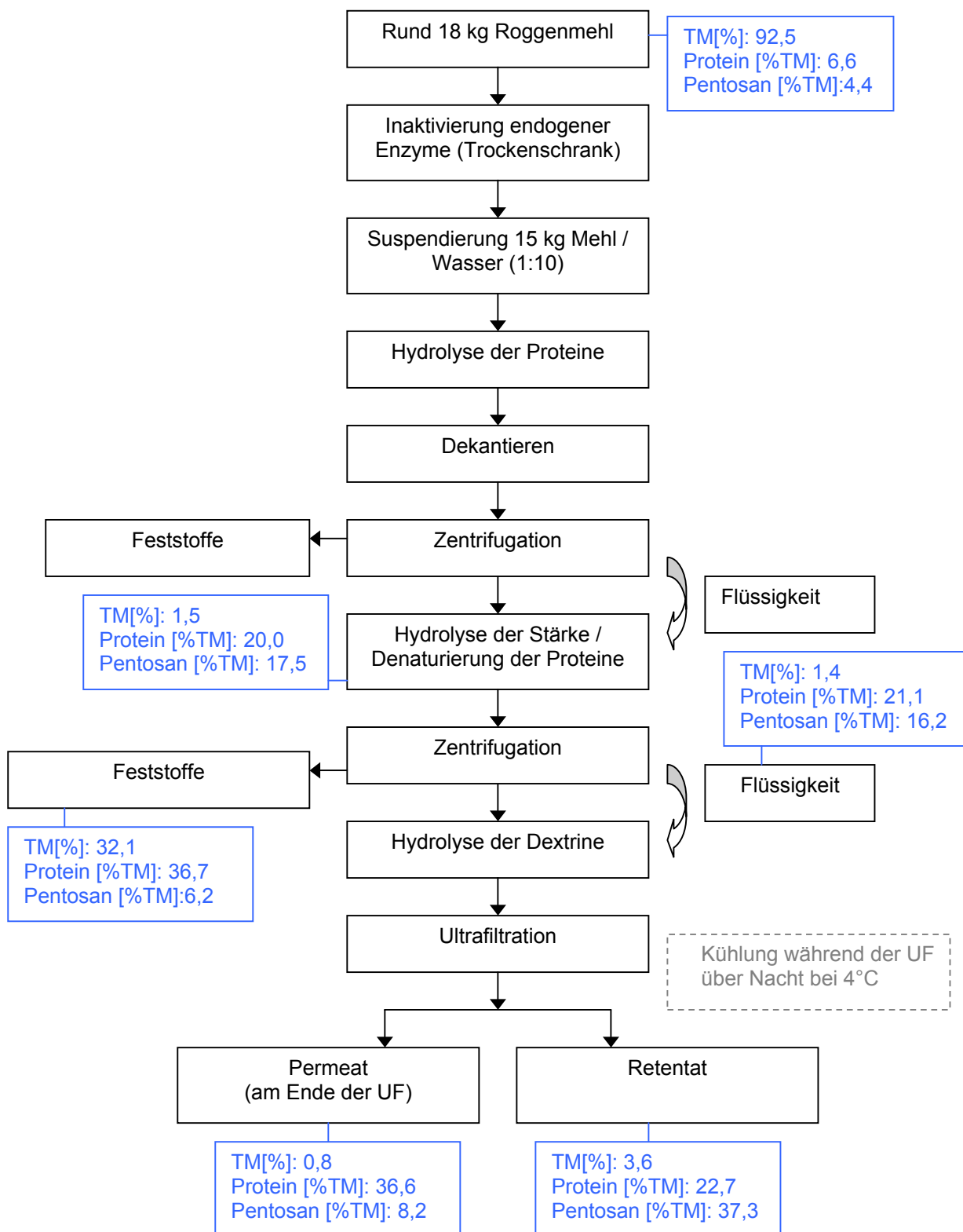


Abb. 7.16: Fließdiagramm der Versuchsanordnung mit Ergebnissen
(1. Durchlauf im halbtechnischen Maßstab)

7.2.2.2 Zweiter Durchlauf

7.2.2.2.1 Durchführung

Um die Trocknung im Trockenschrank zu umgehen, wurde ein Heißmaischverfahren angewendet. Hier wurde das Mehl nicht mit Wasser verrührt und anschließend abzentrifugiert, sondern die Stärke enzymatisch verzuckert. Nicht verzuckerbare Bestandteile wurden später dekantiert und zentrifugiert. In Vorversuchen wurde die Viskosität von Mehl/Wasser Suspensionen nach Beigabe von α -Amylase (Termamyl®, Fa. Novozyme) für den späteren Einsatz im halbtechnischen Maßstab getestet:

Mehl:Wasser= 1:5 + α -Amylase → Suspension war zu dickflüssig, konnte kaum gerührt werden

Mehl:Wasser= 1:10 + α -Amylase → Suspension konnte gut gerührt werden, Viskosität gering genug

Mehl:Wasser= 1:15 + α -Amylase → Suspension konnte gut gerührt werden, Viskosität gering genug

Durch die Vorversuche ergab sich ein passendes Mischverhältnis Mehl:Wasser von 1:7,5 für den folgenden Hauptversuch. Weiters wurde zusätzlich die Protease Neutrase® eingesetzt, welche wirkungsvoller als die Protease Alkalase® ist (beide Fa. Novozymes).

1) Suspendierung/ Warmmaischverfahren

100 l Wasser wurden im Rührbehälter mittels Wasserdampf auf 90°C erwärmt und 13,5 ml α -Amylase (Termamyl, Fa. Novozymes) wurden zugesetzt. Das Roggenmehl wurde eingestreut (15 kg) und 90 min im Rührbehälter gerührt. Der pH-Wert betrug 6,24 (bei 90°C). Der Rührkessel wurde anschließend mittels Kaltwasserkühlung auf rund 50°C gekühlt, weil höhere Temperaturen dem Dekanter schaden würden. In diesem Schritt wurden die Proteine denaturiert, die Pentosane ausgelaugt und die endogenen Enzyme inaktiviert.

2) Dekantieren

Die rund 50°C warme Flüssigkeit wurde aus dem Rührkessel abgelassen und mittels Trichterpumpe in den Dekanter (GEA Westfalia Separator AG, Type KB

6-86-078) befördert. Die Differenzdrehzahl betrug 50 min^{-1} , die Durchflussleistung betrug beim Feststoff 492 g/min, bei dem flüssigen Anteil 1400 ml/min. Es kam beim Dekantieren zu einer leichten Schaumbildung (rund 0,5 cm). Der Feststoff wurde nach Probenentnahme verworfen, die rund 90 l Flüssigkeit wurden im Rührkessel gesammelt.

3) Hydrolyse der Proteine

Im Rührbehälter wurde die Temperatur mittels Wasserbad auf 55°C erwärmt. Je 13,5 ml der Proteasen Alkalase und Neutrase (beides Fa. Novozymes, Dänemark) wurden zugefügt und 2 h bei 55°C im Rührbehälter gerührt. Der pH-Wert nach dem Dekanter betrug 6,4 (bei 60°C) und lag somit im pH-Wirkungsbereich der beiden Enzyme.

4) Verzuckerung mit Amyloglucosidase

Mittels Milchsäure (110 ml) (Fa. W. Neuber's Enkel OHG, Wien) wurde der pH-Wert auf 5,0 eingestellt und 13,5 ml Amyloglucosidase (AMG, Novozymes) wurden hinzugefügt. Über Nacht wurde die Flüssigkeit im Rührbehälter mittels Wasserbad (Fa. Lauda, edition 2000, RK 20 KS) auf 60°C gehalten.

5) Zentrifugation

Es kam zu einer starken Schaumbildung. Die Durchflussmenge betrug 1800 ml/min (bei rund 8630 min^{-1}). Der Feststoff wurde nach Probenentnahme verworfen, der flüssige Überstand wurde ultrafiltriert.

6) Ultrafiltration

Es folgte die Ultrafiltration im halbertechnischen Maßstab auf der großen UF-Anlage. Die Temperatur wurde bei rund 45°C gehalten und mittels Wasserbad (Fa. Lauda) und Kaltwasserschlauch an der Pumpe geregelt. Die keramische Membran hatte ein cut-off level von 8 kD. 25 l wurden ultrafiltriert und auf 4,5 l konzentriert (Konzentrationsfaktor: 5,6) (Abb.7.17). Anschließend folgte die Diafiltration mit 6,5 l Wasser (Abb. 7.18). Die V_p Werte der Ultrafiltration und der Diafiltration wurden auf 45°C korrigiert.

Um ein mikrobielles Wachstum zwischen den Ultrafiltrationen zu verhindern, wurde das Retentat abgelassen, über Nacht im Kühlraum gekühlt und mit 1% Kaliumsorbitat haltbar gemacht. Die Reinigung der UF-Anlage erfolgte jeweils am Ende des Versuchstages mittels 2% KOH und 2% Salpetersäure (jeweils 30 min).

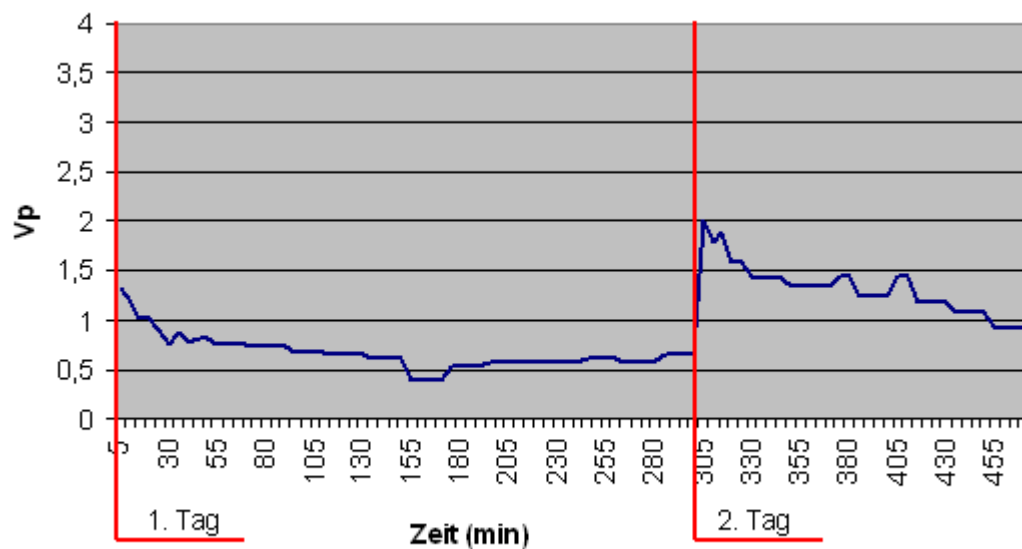


Abb. 7.17: Ultrafiltration (zweiter Durchlauf im halbtechnischen Maßstab)

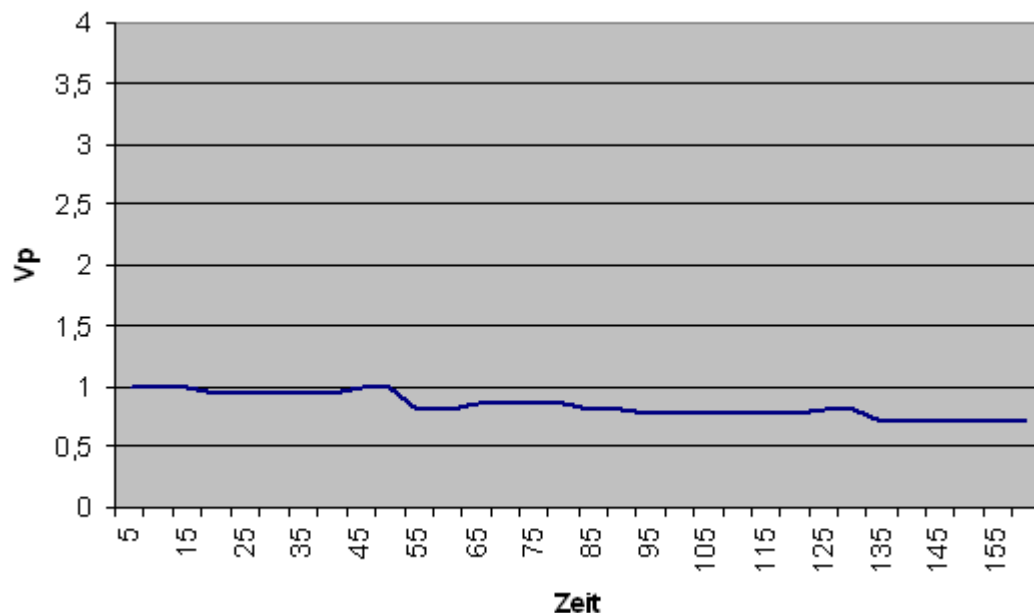


Abb. 7.18: Diafiltration (zweiter Durchlauf im halbtechnischen Maßstab)

7) Sprühtrocknung

Ein Teil des Retentats wurde nach der Ultrafiltration sprühgetrocknet (BÜCHI 190 Mini Spray Dryer).

Inlettemperatur: 120°C

Outlettemperatur: 80°C

8) Gefriertrocknung

Ein Teil des Retentats wurde gefriergetrocknet (LABIN L05)

7.2.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Das Warmmaischverfahren brachte eine Zeitersparnis mit sich, weil die Inaktivierung der Enzyme im Trockenschrank wegfiel. Die endogenen Enzyme wurden auf diesem Weg wirkungsvoller inaktiviert: der Pentosangehalt im Permeat betrug am Ende der Ultrafiltration nur 0,2 [%TM]. Die Trockenmasse des Retentats war mit 5,0 [%TM] relativ hoch, da ein Großteil der löslichen Stärke während der UF nicht eliminiert wurde. Der Pentosangehalt nach der Aufkonzentrierung der UF betrug 34,7 [%TM].

Der Proteinanteil im Retentat war mit 8,6 [%TM] deutlich geringer als im vorhergehenden Versuch (22,7 [%TM]).

Die Ultrafiltration war in diesem 2. Durchgang weniger effektiv als im ersten halbtechnischen Versuch. Die Höchstdurchflussgeschwindigkeit betrug 2 und sank während der UF auf unter 0,5 l/m²h. Auch die Effektivität der darauf folgenden Diafiltration war mit einer Ausgangs V_p von unter eins geringer. Möglicherweise kam es durch die lösliche Stärke früher und stärker zum Fouling als im vorhergehenden Versuchsdurchlauf (hier wurde ein Großteil der Stärke zuvor abzentrifugiert/abdekantiert). Die Membran war zu Beginn der UF noch frei von Ablagerungen und die Flüssigkeit war weniger viskos. Bei der zweiten UF war die Membran eventuell bereits verlegt und auch die Konzentration der Glucose in der Flüssigkeit war höher.

Mit dem Retentat wurden Trocknungsversuche durchgeführt. Bei der Sprühtrocknung kam es zu einer Verklebung im „Luftraum“ und im Zyklon. Das Trockengut war nicht rieselfähig und es gelangte nicht in den Becher. Eine

Sprühtrocknung war daher nicht möglich. Die Gefriertrocknung stellte eine gute Trocknungsmethode dar. Das getrocknete Permeat ist hygroskopisch und wird in verschließbaren Glasbehältern aufbewahrt. Der Versuchsaufbau und die Ergebnisse werden in Abb. 7.19 dargestellt.

In Abb. 7.20 und 7.21 werden die Zusammensetzungen der einzelnen Proben während der beiden Isolationen im halbtechnischen Maßstab verglichen um die Wirksamkeit der Abänderungen zu beurteilen. Die Ergebnisse der Proben nach der Ultrafiltration sind ebenfalls gut vergleichbar, da der Grad der Aufkonzentrierung bei der UF mit 5,3 und 5,6 ähnlich war und auch bei der Diafiltration mit 6,2 und 6,5 l ähnliche Wassermengen verwendet wurden.

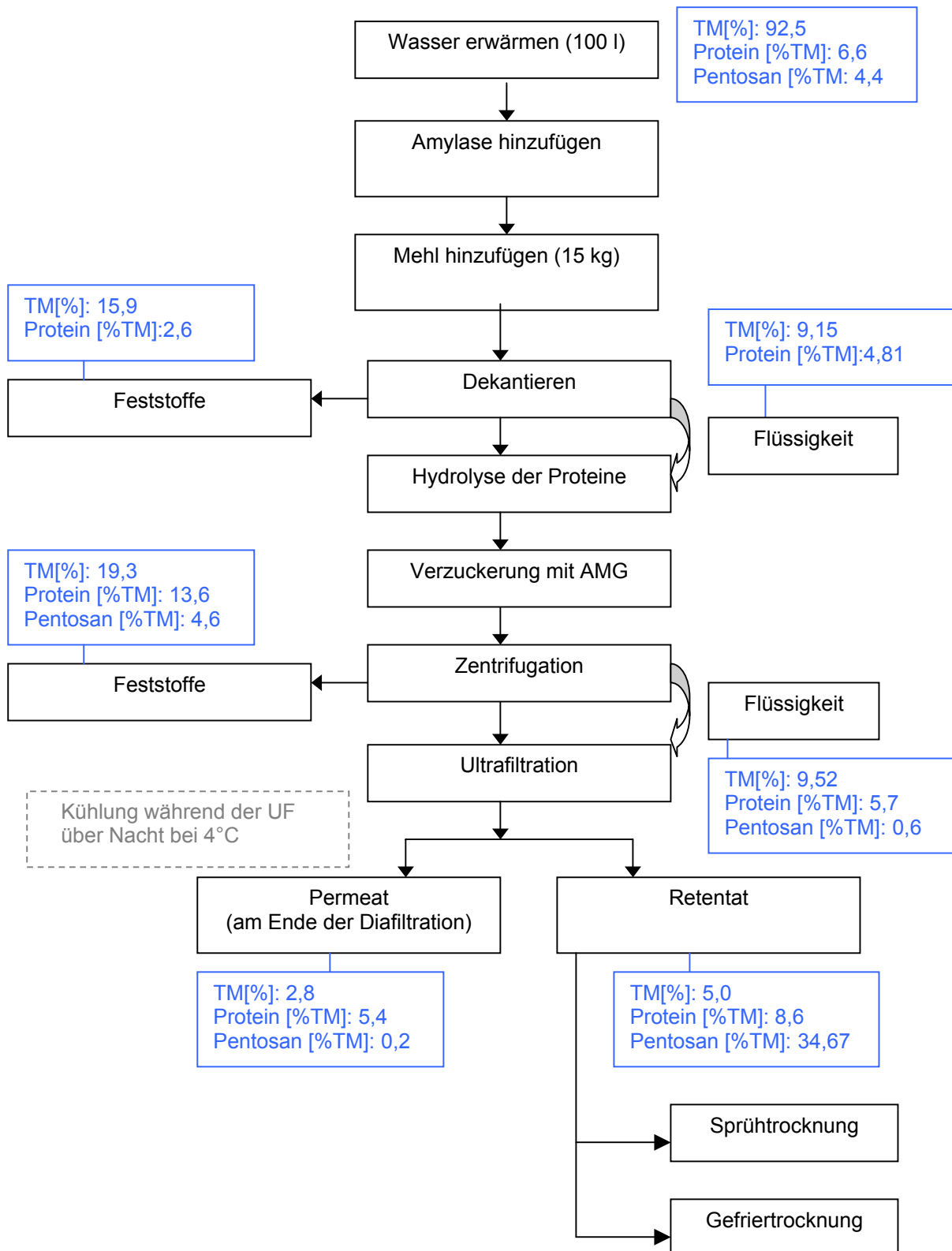


Abb. 7.18: Fließdiagramm der Versuchsanordnung mit Ergebnissen
 (2. Durchlauf im halbtechnischen Maßstab)

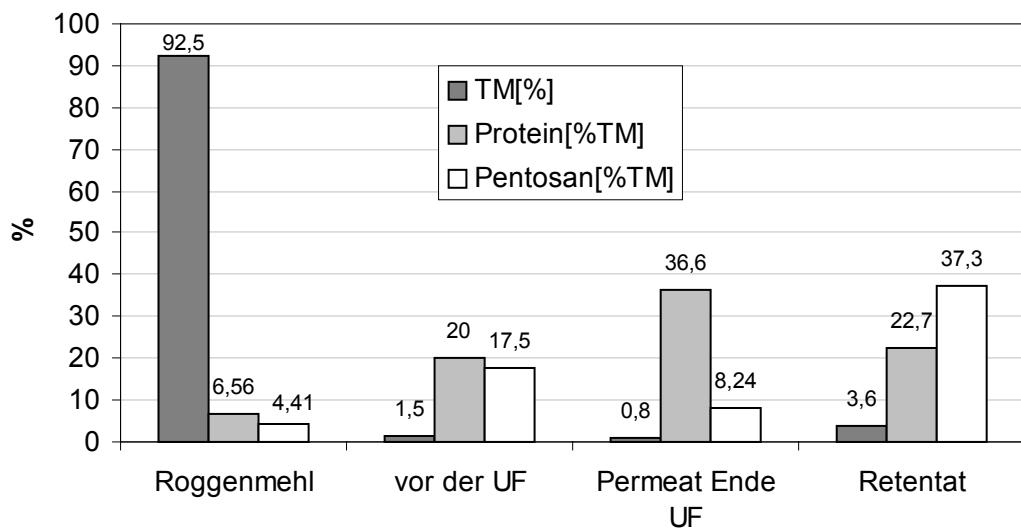


Abb. 7.20: Erster Versuchsdurchlauf im halbtechnischen Maßstab: Zusammensetzung der einzelnen Isolierungsschritte

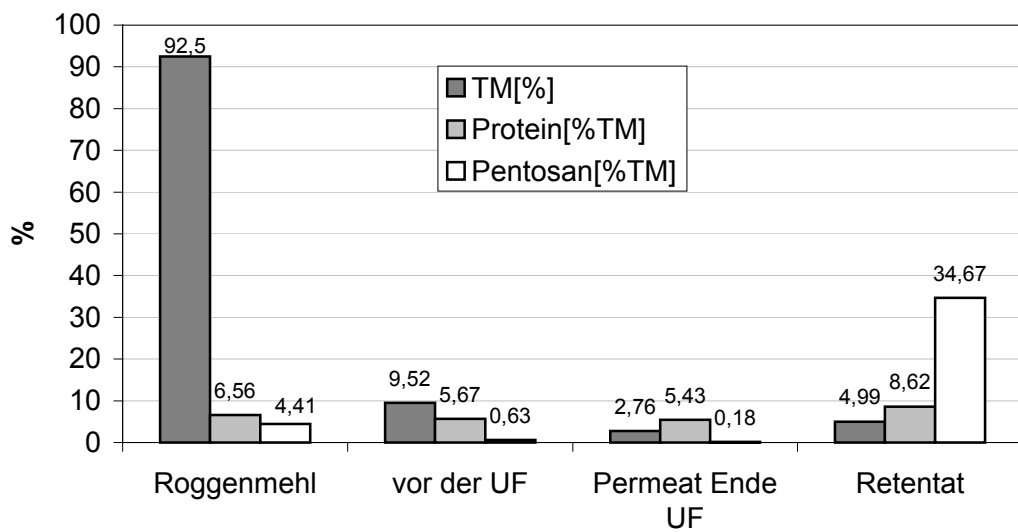


Abb. 7.21: Zweiter Versuchsdurchlauf im halbtechnischen Maßstab: Zusammensetzung der einzelnen Isolierungsschritte

8 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Bestimmung der Pentosane durch die photometrische Methode nach HASHIMOTO et al. (1987) war für diese Zwecke geeignet. Die Analysedauer ist lang, der materielle Einsatz gering und die benötigten Geräte entsprechen mit Ausnahme des Photometers der Standardausrüstung eines Labors. Angaben über das Arabinose/Xylose Verhältnis können aber nicht getroffen werden. Weiters muss die zu erwartende Pentosanmenge schon im vornhinein geschätzt werden, da zu geringe und zu hohe Konzentrationen außerhalb des mit dem Photometer messbaren Bereichs lagen. Dies spielte vor allem bei den Proben im Laufe der Pentosanisolierung eine große Rolle, da beispielsweise die Pentosankonzentration im Retentat sehr hoch war und dadurch nur Die 31 analysierten Roggenmuster variierten in ihrem Pentosangehalt zwischen 7,35 [%TM] und 12,16 [%TM], die Standardabweichung variierte zwischen 0,14-1,12%.

Die Pentosanisolierung mittels Warmmaischverfahren, enzymatischer Hydrolyse der Proteine und Ultrafiltration (10 kDa cut-off) stellte sich als eine gute Methode heraus, um die Pentosane zu isolieren und zu konzentrieren. Für die darauf folgende Diafiltration wäre eine größere Wassermenge notwendig gewesen, als tatsächlich eingesetzt wurde, um Proteine und andere niedermolekulare Bestandteile herauszuspülen, und so die Reinheit des Endprodukts zu verbessern. Die Reinheit der isolierten Pentosane ist für Backversuche geeignet, der Einsatz in glutenfreien Mehlen aber noch nicht möglich. In dieser Arbeit wurden zur Proteinabtrennung die Ausfällung durch Erhitzen, die Fällung mittels Carrez-Reagenz und die enzymatische Hydrolyse durchgeführt. Weitere Alternativen stellen die ethanolische Fällung, die Bindung der Proteine an Montmorillonite mit anschließendem Abzentrifugieren oder die Fällung mittels ethanolischer Gerbsäurelösung (Almen's Reagens) dar. Eine saure Fällung mittels Sulfosalicylsäure oder Trichloressigsäure wäre denkbar, mögliche Rückstände im Retentat aber unerwünscht. Weiters könnten die isolierten Pentosane (Arabinoxylane und Arabinogalaktane) mittels Ethanol fraktioniert werden und somit die Reinheit des Endprodukts erhöhen.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit beschäftigte sich mit den Pentosanen im Allgemeinen, deren Bestimmung und späteren Isolierung. Pentosane zählen zu den Nicht-Stärke-Polysacchariden in der Zellwand von Getreide und werden in wasserlöslich und wasserunlöslich unterteilt. Roggen gilt als besonders pentosanreiches Getreide und stellt daher den Mittelpunkt dieser Arbeit dar.

Um den Pentosangehalt von Roggenmehl zu bestimmen, wurde die photometrische Methode nach HASHIMOTO et al. (1987) etabliert. Anschließend wurden 31 österreichische Roggenproben auf ihren Pentosangehalt in Trockenmasse geprüft. Der Pentosangehalt der Roggensorten variierte zwischen 7,35 [%TM] und 12,16 [%TM]. Weiters wurden mittels externem Standard die Präzision dieser Bestimmungsmethode bewertet. Der Mittelwertsvergleich zeigte hier einen signifikanten Unterschied der Gruppenmittelwerte was auf eine geringe Präzision der Methode schließen lässt.

Es folgte die möglichst reine Isolierung wasserlöslicher Pentosane aus Roggenmehl, wobei hier besonders die Proteinentfernung zu berücksichtigen war. Es wurden Vorversuche im Labormaßstab durchgeführt. Daraus ergab sich der spätere Versuchsaufbau im halbtechnischen Maßstab. Dieser bestand aus einer Verzuckerung der Stärke, enzymatischem Proteinabbau, Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration und Reinigung der aufkonzentrierten Pentosane durch Diafiltration. Am Ende der Diafiltration konnte ein Retentat mit einem Pentosananteil von 34,6 [%TM] und einem Proteinanteil von 8,6 [%TM] gewonnen werden das anschließend gefriergetrocknet wurde.

10 SUMMARY

This diploma thesis is about Pentosans in general, their determination and their isolation. Pentosans are Non-Starch Polysaccharides in the cell walls of cereals and are subdivided into watersoluble and waterinsoluble. Rye is one of the cereals which is very rich in pentosans and because of this fact the center of this work.

In order to determinate the pentosan content, the photometric method of HASHIMOTO et al. (1987) was established. Afterwards the pentosan content of 31 rye samples, cultivated in Austria, was analysed. The pentosan content of these ryesamples vary between 7,35 (in dry matter) and 12,16 (in dry matter). The accuracy of this method was evaluated by an external standard. A mean comparison test showed significant differences in the mathematical means which stand for a low accuracy of this method.

Afterwards, pre-trials were made in bench-scale for the isolation of the water-soluble pentosans whereas the purity, particularly the protein-removal, plays an important role. The isolation consists of enzymatic saccharification of starch, enzymatic protein degradation and concentration and purification by ultrafiltration and diafiltration. At the end of diafiltration the pentosan content was 34,6% (in dry matter), the protein content with 8,6% (in dry matter) was very high. The product was preserved by freeze-drying.

11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AX	Arabinoxylan/e
Da	Dalton
DF	Diafiltration
h	Stunde/n
MF	Mikrofiltration
min	Minute/n
MW	Mittelwert/ Molekulargewicht
NF	Nanofiltration
PS	Polysulfon
s	Sekunde/n
TM	Trockenmasse, Trockensubstanz
UF	Ultrafiltration

12 LITERATUR

- ARENDT, E.K.; L.A.M. RYAN and F. DA BELLO: Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24 (2007) 165-174.
- BELITZ, H.D.; W. GROSCH und A. SCHIEBERLE: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag (2002).
- BENGTTSSON, S. and P. AMAN: Isolation and characterization of water-soluble arabinoxylans in rye grain. *Carbohydrate Polymers* 12 (1990) 267-277.
- BERGHOFER, E.; R. SCHÖNLECHNER and S. SIEBENHANDL: Pseudocereals, Chapter 7, p.151-190. In: ARENDT, E.K. and F. DA BELLO: *Gluten free cereal Products and Beverages*. Food Science and Technology Series. Elsevier (2008).
- BLAKENEY, A.B. and P.C. FLINN: Determination of non-starch polysaccharides in cereal grains with near-infrared reflectance spectroscopy. *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (2005) 546-550.
- BUSHUK, W.: Distribution of water in dough and bread. *Baker's Dig.* 40 (1966) 38.
- CATO, L.; J.J. GAN, L.G.B. RAFAEL and D.M. SMALL: Gluten free breads using rice flour and hydrocolloid gums. *Food-Australia* 56 (2004) 75-78.
- CARPITA, N.C. and D.M. GIBEAUT: Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3 (1993) 1-30.
- CAUVIN, S.P. and L.S. YOUNG: *Technology of Breadmaking*. Blackie Academic and Professional London (1998) 330-346.
- CHOCT, M. and G. ANNISON: Antinutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *British Poultry Science* 31 (1990) 811-821.
- DELCOUR, J.; S. VANHAMEL and R. HOSENEY: Physiochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. *Cereal Chemistry* 68 (1991) 72-76.
- DÖRFER, J.: *Zur Analytik von Pentosanen (Arabinoxylanen) in Getreideprodukten*. Institut für Lebensmitteltechnologie II, TU Berlin.
- ELMADFA, I.: *Ernährung des Menschen*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1998).

EISENBRAND, G. und P. SCHREIER: Römpp Lexikon Lebensmittelchemie. Thieme Verlag (2006) .

FAUROT, A.L.; L. SAULNIER, S. BÉROT and J.F. THIBAUT: Large Scale Isolation of water- soluble and water-insoluble Pentosans from Wheat flour. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 28 (1995) 436-441.

GALLAGHER, E.; T.R. GORMLEY and E.K. ARENDT: Crust and crumb characteristics of gluten free breads. Journal of Food Engineering 56 (2003): 153-161.

GÄNZLE, M. und M. BRANDT: Handbuch Sauerteig. Behr's Verlag (2005).

GHONEUM, M.: Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinoxylan from rice bran. Int. J. Immunother. 14 (1998) 89-99.

GREEN, P.H. and B. JABRI: Coeliac disease. Lancet 362 (2003) 383-391.

HÄRKÖNEN, H.; P. LEHTINEN, T. SUORTTI, T. PARKKONEN, M. SIIKA-AHO and K. POUTANEN : The Effects of Xylanase and β -Glucanase from *Trichoderma reesei* on the non-starch polysaccharides of whole meal rye slurry. Journal of Cereal Science 21 (1995) 173-183.

HARRIS, P.J.; A.B. BLAKENEY, R.J. HENRY and B.A. STONE: Gaschromatographic determination of the monosaccharide composition of plant cell wall preparations. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 71 (1988) 272-275.

HASHIMOTO, S.; M.D. SHOGREN and Y. POMERANZ: Cereal pentosans: Their estimation and significance. Cereal Chem. 64 (1987) 30.

HOUBEN, R.; C.F. DE RUIJTER and K. BRUNT: Determination of the Pentosan Content of Wheat Products by Hydrolysis, Glucose Oxidase Treatment and Analysis by HPAEC/PAD. Journal of Cereal Science 26 (1997) 37-46.

IVARSSON, A.; O. HERNELL, H. STENLUND and L.A. PERSSON: Breast-feeding protects against celiac disease. Am J Clin Nutr 75 (2002) 914-921.

LOHI, S.; K. MUSTALAHTI, K. KAUKINEN, K. LAURILA, P. COLLIN, P. RISSANEN, E. BRAVI, M. GASPARIN, A. REUNANEN and M. MAKI: Increasing prevalence of coeliac disease over time. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 26 (2007) 1217-1225.

McLOUGHLIN, R. et al.: Coeliac Disease in Europe. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18 (2003) 45-48.

MIYAZAKI, H. et al.: *Int. J. Immunopharmacol.* 16 (1994) 163-170.

NIELSEN, W.: *Membranfiltration und verwandte molekulare Separationsverfahren.* Verlag Mann (2004).

OSBORNE, T. B.: The chemistry of the protein-bodies of the wheat kernel. Part I. The protein soluble in alcohol and its glutaminic acid content. *American Journal of Physiology* 13 (1905) 35-44.

POMERANZ, Y.: *Wheat: Chemistry and technology.* Amer. Assoc. of Cereal Chemists (1988).

RAGAE, S.M.; G.L. CAMPBELL, G.J. SCOLES, J.G. McLEOD and R.T. TYLER: Studies on Rye (*Secale cereale* L.) Lines Exhibiting a Range of Extract Viscosities. 1. Composition, Molecular Weight Distribution of Water Extracts, and Biochemical Characteristics of purified Water-Extractable Arabinoxylan. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2437-2445.

SAASTAMOINEN, M.; S. PLAAMI and J. KUMPULAINEN: Pentosan and β Glucan content in Finish winter rye varieties as compared with rye of six other countries. *Journal of Cereal Science* 10 (1989) 199-207.

SANDSTEDT, R.M.; C.E. JOLITZ and M.J. BLISH: Starch in relation to some baking properties of flour. *Cereal Chem.* 16 (1939) 780-792.

SCHWEIZER, T. F.: Die Bestimmung von Ballaststoffen. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 71 (1980) 25-37.

SHOGREN, M.D.; S. HASHIMOTO and Y. POMERANZ: Cereal Pentosans: Their Estimation and Significance. II. Pentosans and Breadmaking Characteristics of Hard Red Winter Wheat Flour. *Cereal Chem.* 64 (1987) 35-38.

STAUDE, E.: *Membrane und Membranprozesse-Grundlagen und Anwendungen.* WILEY-VCH Verlag (1999).

VAZQUEZ, H.; E. SMECULON and D. FLORES: Relation between cigarette smoking and celiac disease: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 96 (2001) 798-802.

Internet:

www.a-wiedemann.de/fachliteratur/grundlagen/backgrundlagen.html (Dezember 2007)

www2.tu-berlin.de/~ivtfg1/lehre/MembranVL/K02_Grundlagen.pdf (Mai 2008)

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Stefanie Theiss
Adresse	Währingergürtel 59/13, 1180 Wien Hauptstraße 74, 4484 Kronstorf
Geburtsdatum	07. Juli 1984
Geburtsort	Steyr

AUSBILDUNG

2002 - 2008	Diplom - Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
1994 – 2002	Bundesrealgymnasium Steyr
1990 – 1994	Volksschule Kronstorf

BERUFSERFAHRUNG

März – Juni 2007	Praktikum im Adipositas Rehazentrum Bischofswiesen, Deutschland
Mai 2005	Praktikum am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Wien
Juli 2005	Praktikum bei den Diätferien der Caritas Linz
Juli 2004	Praktikum bei den Diätferien der Caritas Linz
Juli 2003	Ferialarbeit Firma Backaldrin Österreich GmbH, Asten