



Doctoral Thesis

## Characterisation of pectic substances from hemicellulose fractions of apples

**Author(s):**

Lutz, Marc Valentin

**Publication Date:**

2003

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004555078> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 15069

# Characterisation of Pectic Substances from Hemicellulose Fractions of Apples

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Marc Valentin Lutz  
Dipl. Chem. University of Zurich  
born January 6, 1973  
citizen of Basel (BS) and Thal (SG), Switzerland

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. R. Amadò, examiner  
Prof. Dr. A. G. J. Voragen, co-examiner

Zurich 2003

# Summary

Fractions rich in hemicelluloses were extracted from the depectinated residue of two different apple varieties ('Glockenapfel' and 'Golden Delicious') at three stages of ripeness (unripe, ripe and stored). The fractions extracted with a 4M sodium hydroxide solution were characterised by high performance size exclusion chromatography, uronic acid and neutral sugar determination and methylation analysis. Substantial amounts of galacturonic acid could be detected indicating the presence of pectic substances. The objectives of the present work were to isolate and characterise these pectic substances and to identify possible cross-links between hemicelluloses and pectins.

A degradation of the xyloglucan (hemicellulose) with a specific  $\beta$ -1,4-glucanase was necessary prior to the characterisation. The degradation products were removed by ultrafiltration. The enzyme resistant material was further degraded with enzymes specific to pectic components (arabinans, galactans, rhamnogalacturonan I). Degradation products were then removed again by ultrafiltration. All retentates were freeze-dried and analysed by high performance size exclusion chromatography to verify if separation was successful. Methylation analysis was performed to obtain information about the structure of the pectic substances. A model of the pectin present in the hemicellulose-rich fraction of ripe 'Glockenapfel' consisting of different regions was developed. Both smooth (homogalacturonan) and hairy regions (rhamnogalacturonan I and xylogalacturonan) are present in a ratio of 1 to 11. The rhamnogalacturonan I backbone consists of an equal number of galacturonic acid (1,4-GalAp) and rhamnose residues (1,2-Rhap and 1,2,4-Rhap). About 70% of the rhamnose residues are branched and carry neutral sugar side chains. Highly ramified arabinans with a (1 $\rightarrow$ 5)-linked backbone are present as side chains. In addition, two galactose containing units are found: a long (average dp 28) and a short galactan (average dp 3), which are both (1 $\rightarrow$ 4)-linked. Most of the galactan side chains are branched at the C-6 of a galactose residue located close to the rhamnogalacturonan backbone. Furthermore, xylogalacturonan is found, which was assumed to be present as a side chain. It consists of 1,4-GalAp, 1,3,4-Galp, 1,4-Xylp and T-Xylp.

The presence of cross-links between pectin and xyloglucan was indicated by fractions containing both pectins and xyloglucans, which eluted on an anion exchange column as one acidic fraction. However, the existence of this linkage was not proven conclusively.

Fractions at three stages of ripeness were analysed to obtain information about changes related to the ripening process. For the pectins present in the hemicellulose-rich fractions, an extensive degradation of the long (1→4)-linked galactan chains during ripening and storage was observed. The short galactan side chains were not degraded during ripening but a degradation occurred during storage. These changes probably have taken place due to the action of an endogenous galactanase.

Several structural differences between 'Glockenapfel' and 'Golden Delicious' apples were identified. The most marked difference was the degradation of galactan side chains which was found for both varieties during ripening and storage, however, fractions from 'Golden Delicious' apples experienced a larger galactose loss than those from 'Glockenapfel'. Since the hemicellulose-rich fraction accounted for about 10% of the alcohol-insoluble residue and the pectic polymers represented only a minor part of it, the influence of these polysaccharides on the texture of apple fruit was assumed to be low.

# Zusammenfassung

Hemicellulose-reiche Fraktionen wurden aus dem entpektinisierten Rückstand zweier Apfelsorten ('Glockenapfel' und 'Golden Delicious') in drei Reifestadien (unreif, reif und gelagert) extrahiert. Die durch Extraktion mit 4M Natronlauge gewonnenen Fraktionen wurden mittels Hochleistungs-Grössenausschlusschromatographie, Uronsäure- und Neutralzuckerbestimmung sowie mittels Methylierungsanalyse charakterisiert. Die Anwesenheit von Uronsäuren im Hemicellulose-reichen Extrakt zeigte das Vorhandensein von Pektinen an. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung dieser Pektine. Weiter sollte eine möglicherweise vorhandene Verknüpfung zwischen Hemicellulosen und Pektinen identifiziert werden.

Ein Abbau des Xyloglucans (Hemicellulose) mit Hilfe einer spezifischen  $\beta$ -1,4-Glucanase war vor der Charakterisierung der Pektine nötig. Die Abbauprodukte wurden mittels Ultrafiltration entfernt. Das enzymresistente Material wurde anschliessend mit Hilfe von Enzymen, welche spezifisch auf Pektinkomponenten (Arabane, Galactane, Rhamnogalacturonan I) wirken, abgebaut und die Abbauprodukte wiederum mittels Ultrafiltration entfernt. Alle Retentate wurden gefriergetrocknet und die Entfernung der Abbauprodukte mittels Hochleistungs-Grössenausschlusschromatographie überprüft. Anschliessend wurden die Proben mittels Methylierungsanalyse untersucht, um Hinweise zur Struktur der Pektine zu erhalten. Aufgrund dieser Informationen wurde ein Modell zur Struktur der mit Hemicellulosen assoziierten Pektine entwickelt. Sowohl lineare (Homogalacturonan) als auch verzweigte Bereiche (Rhamnogalacturonan I und Xylogalacturonan) liegen vor, in einem Verhältnis von 1:11. Das Rückgrat von Rhamnogalacturonan I besteht aus alternierenden Galacturonsäure- (1,4-GalAp) und Rhamnoseeinheiten (1,2-Rhap und 1,2,4-Rhap). Ungefähr 70% der Rhamnosebausteine sind verzweigt und tragen Neutralzuckerseitenketten. Als Seitenketten sind stark verzweigte Arabane mit einer (1 $\rightarrow$ 5)-verknüpften Hauptkette vorhanden. Zudem liegen Galactane in zwei verschiedenen strukturellen Einheiten vor: als lange (durchschnittlicher Polymerisationsgrad 28) und als kurze Seitenketten (durchschnittlicher Polymerisationsgrad 3). Sie sind beide (1 $\rightarrow$ 4)-verknüpft. Die meisten Galactanseitenketten besitzen eine Verzweigung am C-6 eines Galactosebausteines, der sich in der Nähe des Rhamno-

galacturonan Rückgrates befindet. Zusätzlich ist Xylogalacturonan vorhanden, das als Seitenkette vorliegt. Es besteht aus den Bausteinen 1,4-GalAp, 1,3,4-Galp, 1,4-Xylp und T-Xylp.

Fraktionen, die sowohl Xyloglucan als auch Pektine enthielten, wurden mittels Anionenaustauschchromatographie isoliert und zeigten eine mögliche kovalente Verknüpfung dieser beiden Polysaccharide an, was jedoch nicht bewiesen werden konnte.

Zur Identifizierung von durch den Reifungsprozess verursachten Veränderungen wurden Fraktionen in drei Reifestadien untersucht. Für die Pektine der Hemicellulose-reichen Fraktion wurde ein starker Abbau der langen linearen Galactane beobachtet. Die kurzen Galactanseitenketten erfuhren während der Reifung keinen Abbau, wohl aber im Verlauf der Lagerung. Diese Veränderungen wurden wahrscheinlich durch fruchteigene Galactanasen verursacht.

Einige strukturelle Unterschiede zwischen 'Glockenapfel' und 'Golden Delicious' Äpfeln wurden gefunden. Die deutlichste Veränderung war der Abbau der Galactanseitenketten während der Reifung und Lagerung, wobei Fraktionen von 'Golden Delicious' Äpfeln einen stärkeren Galactoseverlust als jede von 'Glockenapfel' aufwiesen. Da die Hemicellulose-reichen Fraktionen etwa 10% des Alkohol-unlöslichen Rückstands ausmachen und die Pektine nur einen geringen Teil dieser Fraktion bilden, wurde der Einfluss dieser Polysaccharide auf die Textur als gering eingeschätzt.