

**Entwicklung chromatographischer und spektroskopischer
Profilingmethoden zur Analyse komplexer Strukturelemente
neutraler Pektinseitenketten**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

Daniel Wefers

aus

Tett nang

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2016

Meiner Familie

"Freude am Schauen und Begreifen ist die schönste Gabe der Natur."

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der pflanzlichen Zellwand	1
1.2	Strukturen von Zellwandpolysacchariden	2
1.2.1	Cellulose	3
1.2.2	Xyloglucane	4
1.2.3	Xylane	4
1.2.4	Andere Polysaccharide	5
1.3	Strukturen von Pektinen	5
1.3.1	Galacturonane	6
1.3.1.1	Homogalacturonan	6
1.3.1.2	Substituierte Galacturonane: Xylogalacturonan	7
1.3.1.3	Substituierte Galacturonane: Rhamnogalacturonan II	7
1.3.2	Rhamnogalacturonan I	8
1.3.3	Arabinane	9
1.3.4	Galactane	10
1.3.5	Ferulasäure	11
1.3.6	Gesamtstruktur des Pektins	13
1.4	Analyse von Pektinen	14
1.5	Eigenschaften von Pektinen	16
1.5.1	Pflanzenphysiologische Eigenschaften	16
1.5.2	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	17
1.5.3	Lebensmitteltechnologische Eigenschaften	18
2	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Ausgangsmaterialien	21
3.2	Aufarbeitung der pflanzlichen Rohstoffe	22
3.2.1	Ballaststoffisolierung	22
3.2.2	Isolierung der Nicht-Stärke-Polysaccharide	23
3.2.3	Extraktionsmethoden	24
3.3	Charakterisierung von Nicht-Stärke-Polysacchariden	25
3.3.1	Monosaccharidzusammensetzung	25
3.3.2	Methylierungsanalyse	26

3.3.3	Ferulasäurebestimmung	27
3.4	Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden	28
3.4.1	Freisetzung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden	28
3.4.2	Isolierung und Aufreinigung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden	29
3.4.3	Freisetzung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden	31
3.4.4	Isolierung und Aufreinigung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden . . .	32
3.5	Strukturcharakterisierung und Analyse von Oligosacchariden	33
3.5.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung von Oligosacchariden	33
3.5.2	Analyse mittels Massenspektrometrie	34
3.5.3	Analyse mittels NMR-Spektroskopie	35
4	Ergebnisse und Diskussion	39
4.1	Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe	39
4.1.1	Lösliche Polysaccharide	39
4.1.2	Unlösliche Ballaststoffe	41
4.1.2.1	Apfel	41
4.1.2.2	Amaranth	43
4.1.2.3	Quinoa	44
4.1.2.4	Buchweizen	45
4.1.2.5	Zuckerrübenschnitzel	47
4.1.2.6	Sojaextraktionsschrot	48
4.1.3	Lösliche Ballaststoffe	50
4.1.4	Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide (vor und nach Lagerung)	51
4.2	Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen	53
4.2.1	Isolierung und Charakterisierung von Arabinan-Oligosacchariden	53
4.2.1.1	<i>endo</i> -Arabinanase-Spaltung von Arabinan-Polysacchariden . . .	54
4.2.1.2	<i>endo</i> -Arabinanase-Spaltung von unlöslichen Rotkleesprossen- Ballaststoffen	55
4.2.1.3	<i>endo</i> -Arabinanase-Spaltung von unlöslichen Amaranth-Ballast- stoffen	56
4.2.1.4	<i>endo</i> -Arabinanase-Spaltung von unlöslichen Quinoa-Ballaststof- fen	57
4.2.1.5	Driselase-Spaltung von Arabinan-Polysacchariden	59
4.2.2	Isolierung und Charakterisierung von Galactan-Oligosacchariden	60
4.2.2.1	Driselase-Spaltung von Galactan-Polysacchariden	60
4.2.2.2	<i>endo</i> -Galactanase-Spaltung von unlöslichen Sojaextraktionsschrot- Ballaststoffen	64
4.2.3	Isolierung und Charakterisierung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden	65
4.2.3.1	Einfach Ferulasäure-substituierte Oligosaccharide	66

4.2.3.2	Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide	66
4.2.3.3	Zweifach Ferulasäure-substituiertes Oligosaccharid aus Zucker- rübe	68
4.2.3.4	<i>p</i> -Cumarsäure-Oligosaccharid aus Quinoa	69
4.3	Chromatographisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden	71
4.3.1	Konzentrationsbestimmung der Standardsubstanzen	72
4.3.2	Chromatographische Analyse	73
4.3.2.1	Analyse mittels HPAEC-PAD	73
4.3.2.2	Analyse mittels HPLC-MS	74
4.3.2.3	Quantifizierung	75
4.3.2.4	Matrixeinflüsse	78
4.3.3	Enzymatische Freisetzung	80
4.3.4	Anwendung der Methode	82
4.3.4.1	Unlösliche Ballaststoffe	82
4.3.4.2	Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide (vor und nach Lagerung)	85
4.3.4.3	Lösliche Polysaccharide	87
4.4	NMR-spektroskopisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Strukturelementen	89
4.4.1	Aufarbeitung der pflanzlichen Materialien	89
4.4.2	NMR-spektroskopische Analyse	91
4.4.2.1	Markersignale der Arabinan-Oligosaccharide	92
4.4.2.2	Markersignale der Galactan-Oligosaccharide	95
4.4.2.3	Markersignale zur Analyse von Polysacchariden	98
4.4.3	Anwendung der Methode	100
4.4.3.1	Arabinan-Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe	100
4.4.3.2	Ethanol-fällung zur Aufkonzentrierung der Hydrolysate	103
4.4.3.3	Galactan-Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe	105
4.4.3.4	Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide (vor und nach Lagerung)	107
4.4.3.5	Lösliche Polysaccharide und lösliche Ballaststoffe	108
4.5	Chromatographisches Profiling von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden	112
4.5.1	Probenaufarbeitung	112
4.5.2	Chromatographische Analyse	115
4.5.3	Anwendung der Methode	117
4.6	Zusammenfassende Diskussion	118
5	Zusammenfassung	123
6	Literaturverzeichnis	127
7	Chemikalien und Instrumente	143
7.1	Chemikalien	143

7.2	Instrumente	147
8	Arbeitsvorschriften	151
8.1	Ausgangsmaterialien	151
8.1.1	Ballaststoffisolierung	152
8.1.2	Isolierung der Nicht-Stärke-Polysaccharide	153
8.2	Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe	154
8.2.1	Monosaccharidanalyse	154
8.2.1.1	Schwefelsäurehydrolyse	155
8.2.1.2	Methanolyse	156
8.2.2	Methylierungsanalyse	156
8.2.3	Phenolische Säuren/Dehydrodiferulasäuren	157
8.3	Isolierung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden	160
8.3.1	Enzymatische Freisetzung	160
8.3.2	Gelpermeationschromatographie	163
8.3.3	Chromatographische Aufreinigung	163
8.4	Isolierung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden	165
8.4.1	Enzymatische Freisetzung und Vorreinigung	165
8.4.2	Gelpermeationschromatographie	166
8.4.3	Chromatographische Aufreinigung	167
8.5	Charakterisierung der Standardsubstanzen	169
8.5.1	Monosaccharidanalyse	169
8.5.1.1	Monosaccharidzusammensetzung mittels HPAEC-PAD	169
8.5.1.2	Bestimmung der Konfiguration der Monosaccharide mittels GC-MS	169
8.5.2	HPLC-MS Analyse	170
8.5.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung	172
8.6	Chromatographisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden	173
8.7	NMR-spektroskopisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Strukturelementen	175
8.8	Chromatographisches Profiling von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden	176
9	Anhang	179
9.1	Methylierungsanalyse der löslichen Ballaststoffe	179
9.2	Methanolyse der Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide vor und nach der Lagerung	180
9.3	NMR-Daten der Standardsubstanzen	180
9.4	MS ² -Spektren der Standardsubstanzen	197
9.5	Zur Konzentrationsbestimmung verwendete NMR-Signale	208
9.6	HPLC-MS Retentionszeiten der Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide	209
9.7	Relative Responsefaktoren der NMR-Markernsignale	210
9.8	Unterschiede zwischen Signal 1 und Signal 1 V2	211

9.9 Retentionszeiten der Hydroxyzimtsäure- und Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide	211
10 Lebenslauf	213
11 Publikationsliste	215
12 Danksagung	217

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acetanilid (in Abbildungen und Tabellen)
AACCI	American Association of Cereal Chemists International
Ac	Acetyl (in Abbildungen und Tabellen)
AM	Amaranth (in Abbildungen und Tabellen)
AN	Arabinan
Ap	Apfel (in Abbildungen und Tabellen)
Ara	Arabinose
arom	aromatisch (in Abbildungen und Tabellen)
BW	Buchweizen (in Abbildungen und Tabellen)
c	cyclisch (in Abbildungen und Tabellen)
CDTA	1,2-Diaminocyclohexantetraessigsäure
COSY	Correlated Spectroscopy
DAD	Diodenarray-Detektor
DFS	Dehydrodiferulasäure
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELSD	Lichtstreuendetektor
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol (in Abbildungen und Tabellen)

FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Ferulasäure
Fru	Fructose
Fuc	Fucose
f	Furanose
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
GN	Galactan
GPC	Gelpermeationschromatographie
HG	Homogalacturonan
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPAEC-PAD	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HZS	Hydroxyzimtsäure (in Abbildungen und Tabellen)
KS	Kaffeesäure (in Abbildungen und Tabellen)
LBS	Lösliche Ballaststoffe
LOD	Nachweisgrenze (engl. Limit of Detection, in Abbildungen und Tabellen)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. Limit of Quantification, in Abbildungen und Tabellen)

Man	Mannose
Me	Methyl (in Abbildungen und Tabellen)
MS	Massenspektrometrie
nb	nicht bestimmbar (in Abbildungen und Tabellen)
nc	nicht-cyclisch (in Abbildungen und Tabellen)
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
nn	nicht nachweisbar (in Abbildungen und Tabellen)
nr	nicht-reduzierend (in Abbildungen und Tabellen)
NSPS	Nicht-Stärke-Polysaccharide
OS	Oligosaccharid
<i>p</i>	Pyranose
<i>p</i>-CS	<i>para</i> -Cumarsäure
PGC	Porous Graphitized Carbon
PMAA	partiell methylierte Alditolacetate
PS	Polysaccharid
Q	Quinoa (in Abbildungen und Tabellen)
Rha	Rhamnose
RI	Refractive Index
RG-I	Rhamnogalacturonan I
RG-II	Rhamnogalacturonan II
RP	Reversed-Phase
RRF	Relativer Responsefaktor
SES	Sojaextraktionsschrot
SiS	Sinapinsäure (in Abbildungen und Tabellen)

Sp	Spuren (in Abbildungen und Tabellen)
SPE	Solid-Phase Extraction
t	terminal (in Abbildungen und Tabellen)
THF	Tetrahydrofuran (in Abbildungen und Tabellen)
tr	<i>trans</i> (in Abbildungen und Tabellen)
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
TFA	Trifluoressigsäure
UBS	Unlösliche Ballaststoffe
Xyl	Xylose
XGA	Xylogalacturonan
ZRS	Zuckerrübenschnitzel

1 Einleitung

Pflanzliche Lebensmittel stellen einen wichtigen Teil der menschlichen Ernährung dar. Sie dienen dabei als Lieferant für viele wichtige Nährstoffe und werden generell als förderlich für die Gesundheit angesehen. In ihrer aktuellen Ernährungsempfehlung rät die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) dazu, einen großen Teil der Energiezufuhr aus pflanzlichen Lebensmitteln zu beziehen (DGE, 2016). Die wichtigsten Gruppen pflanzlicher Lebensmittel sind dabei Getreide, Obst und Gemüse. Diese werden sowohl roh als auch in Lebensmittelzubereitungen verzehrt und liefern neben verfügbaren Kohlenhydraten, Vitaminen und Mineralstoffen auch eine hohe Menge an Ballaststoffen. Die Ballaststoffe entstammen dabei zu einem großen Teil der pflanzlichen Zellwand und stellen eine sehr heterogene Gruppe von Stoffen dar. Die American Association of Cereal Chemists International (AACCI) definiert Ballaststoffe als "essbare Bestandteile von Pflanzen oder analoge Kohlenhydrate, die gegenüber Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden" (AACCI, 2001). In diese Definition sind auch die gesundheitlichen Wirkungen der Ballaststoffe integriert, wie zum Beispiel die Regulierung des Blutzuckerspiegels. Ein für die positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften aller Voraussicht nach entscheidender Faktor sind die im Magen und Dünndarm nicht spaltbaren Polysaccharide (PS) der pflanzlichen Zellwand. Diese können die Magen-Darm-Passage anderer Nahrungsbestandteile wie verdaubarer Mono- und Disaccharide beeinflussen und werden zudem im Dickdarm fermentiert. Die Zusammensetzung und die molekularen Strukturen der PS variieren dabei beträchtlich zwischen verschiedenen Pflanzenarten, jedoch auch zwischen verschiedenen Reifestadien. Aufgrund dieser Heterogenität konnten bisher zwar die Wirkungen verschiedener PS-Gruppen untersucht werden, jedoch keine eindeutigen Beziehungen zwischen bestimmten Strukturelementen und gesundheitlichen Wirkungen hergestellt werden. Die PS der pflanzlichen Zellwand nehmen zudem Einfluss auf die Lebensmittelqualität, da sie die Textur pflanzlicher Lebensmittel entscheidend beeinflussen können. Um die ernährungsphysiologischen und pflanzenphysiologischen Eigenschaften zu verstehen, ist eine genaue Kenntnis und Analyse dieser komplexen Polymere unerlässlich.

1.1 Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Die pflanzliche Zellwand besitzt eine sehr heterogene Struktur, die von Pflanze zu Pflanze verschieden sein kann. Unter anderem spielen das Alter der Pflanze, das Pflanzengewebe und

der Zellwandtyp eine Rolle (McDOUGALL ET AL., 1996). Daher existiert keine allgemeingültige Zusammensetzung, jedoch lassen sich für die verschiedenen Pflanzen und Zellwandarten gewisse Hauptmerkmale feststellen.

Grundsätzlich werden pflanzliche Zellwände in drei Bereiche eingeteilt: Die Mittellamelle, die Primärwand und die Sekundärwand. Die Mittellamelle befindet sich in den Interzellularräumen benachbarter Zellen und besteht hauptsächlich aus Pektinen. Ihr wird eine große Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion zugeschrieben (DAHER & BRAYBROOK, 2015). Der Mittellamelle aufgelagert ist die Primärwand. Diese besteht aus Cellulose-Mikrofibrillen, die in ein komplexes Netzwerk aus PS und Proteinen eingebettet sind. Während des Pflanzen- bzw. Zellwachstums können diese Matrix-PS modifiziert sowie auf- und abgebaut werden, um zum Beispiel die nötige Flexibilität der Zellwand zu gewährleisten (CARPITA & GIBEAUT, 1993). Der Aufbau der Primärwand variiert beträchtlich zwischen verschiedenen Pflanzen. So enthält die Primärwand von monokotylen Pflanzen innerhalb der Commeliniden neben Cellulose hauptsächlich Xylane und nur geringere Mengen an anderen PS. Die anderen monokotylen sowie die dikotylen Pflanzen enthalten hauptsächlich Pektine und Xyloglucane, allerdings nur geringere Mengen an Xylanen (HARRIS & SMITH, 2006). Nach Beendigung des Wachstums wird zum Zellinneren hin die Sekundärwand aufgelagert, die meist deutlich dicker ist als die Primärwand. Sie enthält neben einem hohen Celluloseanteil häufig auch Lignin, das zu einer weiteren Verfestigung der Zellwand beiträgt (HARRIS & SMITH, 2006). Der Anteil von Primär- und Sekundärwand ist stark abhängig vom Pflanzengewebe. Generell werden die Gewebetypen Parenchym, Sklerenchym und Collenchym unterschieden. Die meisten als Lebensmittel verzehrten Pflanzen wie Obst, Gemüse und Getreide enthalten einen hohen Anteil an parenchymatischen Zellen, welche wiederum fast ausschließlich aus Primärwänden bestehen (McDOUGALL ET AL., 1996). Nur spezialisierte Zelltypen bestehen aus sklerenchymatischen Zellen und enthalten dadurch größere Mengen an Sekundärwänden, wie zum Beispiel die Steinzellen im Birnenfruchtfleisch (HARRIS & SMITH, 2006).

1.2 Strukturen von Zellwandpolysacchariden

Die in PS vorliegenden Monosaccharide können theoretisch in ihrer α - oder β -Form sowie als Pyranose (*p*) und/oder als Furanose (*f*) vorkommen. Zusätzlich kann jedes Monosaccharid in seiner L- oder D-Konfiguration vorliegen. Dadurch ergeben sich sehr viele theoretisch mögliche Strukturen; allerdings kommt bei den meisten Monomeren nur eine Ringform bzw. Konfiguration vor. Die wichtigsten Monosaccharide der pflanzlichen Zellwand sind in Abbildung 1.1 gezeigt. Bis auf Arabinose (Ara) und die Desoxyhexosen Fucose (Fuc) und Rhamnose (Rha) kommen alle Monosaccharide bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich, in der D-Form vor. Zudem ist die *p*-Form die bevorzugte Ringform aller aufgeführten Monosaccharide, dennoch kommt Ara oft in

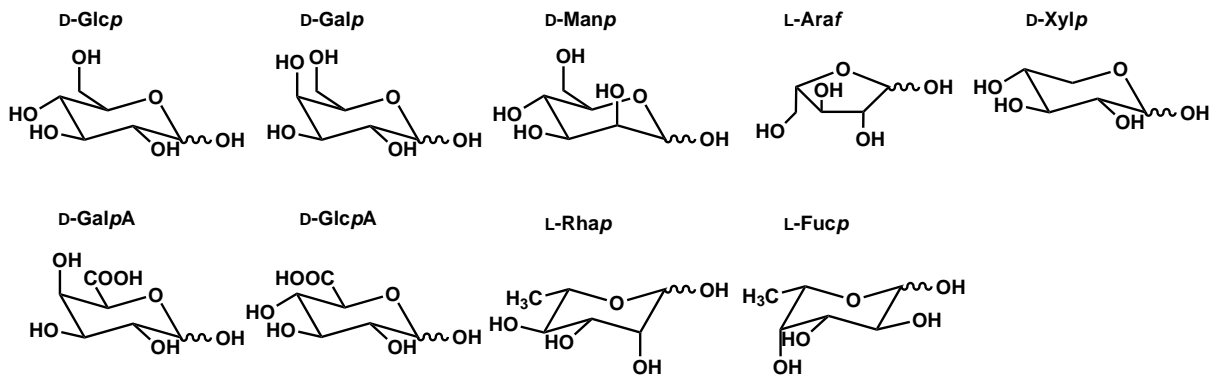


Abbildung 1.1: Strukturen der für die pflanzliche Zellwand bedeutendsten Monosaccharid-Einheiten. Glcp = Glucopyranose, Galp = Galactopyranose, Manp = Mannopyranose, Araf = Arabinofuranose, Xylp = Xylopyranose, GalpA = Galactopyranuronsäure, GlcpA = Glucopyranuronsäure, Rhap = Rhamnopyranose, Fucp = Fucopyranose.

seiner *f*-Form vor (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

Bei der Untersuchung von PS ist es essentiell, die molekulare Struktur und insbesondere die dominierenden Verknüpfungstypen der einzelnen Monosaccharide, zu kennen. Um eventuelle Interaktionen zwischen mehreren PS erkennen zu können, sind zudem auch die Eigenschaften der einzelnen Strukturelemente von Bedeutung. Im Folgenden wird ein Überblick über die verschiedenen PS-Klassen gegeben, wobei die Struktur der Pektine wird in Abschnitt 1.3 gesondert behandelt wird.

1.2.1 Cellulose

Cellulose ist ausschließlich aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfter D-Glucose (Glc) aufgebaut und kommt ubiquitär in allen Pflanzen vor. Durch die hochlineare Struktur und die Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbildung können sich die bis zu 15000 Reste langen Cellulose-Ketten zu Mikrofibrillen zusammenlagern. Diese aus bis zu 200 Ketten bestehenden Mikrofibrillen sind sehr widerstandsfähig, wasserunlöslich und bilden das Gerüst zum Aufbau der pflanzlichen Zellwand. Dabei werden sie durch ein Gerüst aus anderen PS zusammengehalten. In Pflanzen kann Cellulose entweder kristallin in verschiedenen polymorphen Formen oder in einer amorphen Form vorkommen. Die strukturellen Details dieser amorphen Bereiche sind jedoch noch nicht abschließend geklärt (O'SULLIVAN, 1997).

1.2.2 Xyloglucane

Xyloglucane sind die für dikotyle Pflanzen mengenmäßig bedeutendsten Hemicellulosen und besitzen wie Cellulose ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Glc-Einheiten. Diese können an Position O6 mit Xylose (Xyl) substituiert sein, welche wiederum mit anderen Monosacchariden an Position O2 substituiert sein kann. Unter diesen Monosacchariden ist Galactose (Gal) ein häufiger Vertreter, jedoch kommt auch Ara vor. Weiterhin kann auch Fuc an die Gal-Reste gebunden sein, wodurch sich eine Vielfalt an möglichen Strukturen ergibt. Die Anzahl und Art der Seitenketten variiert stark je nach Herkunft der Pflanze und ist teilweise charakteristisch für bestimmte Pflanzen. Mit unterschiedlicher Substitution ergeben sich voneinander abweichende Eigenschaften. So steht beispielsweise die Löslichkeit von Xyloglucanen in Zusammenhang mit der Substitution des Rückgrats (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

1.2.3 Xylane

Wie bereits beschrieben, sind Xylane die dominierenden Hemicellulosen und Nicht-Cellulose-PS in commeliniden Monokotyledonen und kommen nur in kleineren Mengen in dikotylen Pflanzen vor (HARRIS & SMITH, 2006; SCHELLER & ULVSKOV, 2010). Sie besitzen ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Xyl-Einheiten, welche an den Positionen O2 und/oder O3 mit verschiedenen Substituenten verzweigt sein können. Häufig sind die Xylane in sekundären Zellwänden von dikotylen Pflanzen mit Glucuronsäure (GlcA) substituiert, weshalb hierbei oft von Glucuronoxylanen gesprochen wird. Zudem können Acetylgruppen an Position O3 oder Position O2 der Xyl vorliegen. Ein weiterer wichtiger Substituent ist Ara_f; in diesem Zusammenhang wird oft der Begriff Arabinoxylane verwendet (SCHELLER & ULVSKOV, 2010). Vor allem in manchen Getreidesorten können die Xylane stark mit Ara_f substituiert sein. Ein hoher Substitutionsgrad geht mit einer erhöhten Wasserlöslichkeit einher, da die Seitenketten die Interaktion mit Cellulose verringern. Die Ara-Seitenketten können in commeliniden Monokotylen an Position O5 mit Hydroxymethylsäuren wie Ferulasäure (FS) und *para*-Cumarsäure (*p*-CS) verestert sein (HARRIS & TRETHERWEY, 2010). Durch radikalische Dimerisierung der Hydroxymethylsäuren, insbesondere der FS, können verschiedene Arabinoxylane miteinander verknüpft werden, was mit einem erhöhten Molekulargewicht und potentiell unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften einhergeht (BUNZEL, 2010). Die Bedeutung von Hydroxymethylsäuren als Strukturelemente von Ballaststoffen monokotyler und dikotyler Pflanzen wird in Abschnitt 1.3.5 genauer behandelt.

1.2.4 Andere Polysaccharide

Mannane kommen oft als Speicher-PS vor, sind jedoch teilweise auch Bestandteil von pflanzlichen Zellwänden und werden dabei den Hemicellulosen zugerechnet. Neben linearen Mannanen existieren auch andere Formen, welche jedoch alle ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfter Mannose (Man) besitzen. Wenn Glc-Reste im Rückgrat enthalten sind, werden die Mannane als Glucomannane bezeichnet. Sind an Position O6 einzelne α -Gal-Reste gebunden, wird die Bezeichnung Galactomannane verwendet. Das Einführen von Substituenten hat eine Erhöhung der Löslichkeit zur Folge (MOREIRA & FILHO, 2008).

Je nach Isolierungsmethode können verschiedene Speicher-PS mit Zellwand-PS vergesellschaftet vorkommen. Stärke besteht hauptsächlich aus α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Glc-Ketten und ist somit durch Pankreas-Amylasen enzymatisch abbaubar. Jedoch kann sie aus verschiedenen Gründen als resistente Stärke vorliegen, zum Beispiel durch enzymatische Unzugänglichkeit oder nach Retrogradation. Durch die Verwendung von thermostabilen α -Amylasen bei erhöhten Temperaturen kann resistente Stärke größtenteils abgebaut werden (CHAMP ET AL., 2003b). Einige Pflanzen, wie zum Beispiel Zwiebeln oder Chicorée, können Fructane oder Fructose (Fru)-Oligosaccharide (OS) enthalten. Diese bestehen entweder aus β -(2 \rightarrow 6)-verknüpften Fru-Einheiten (Levan-Typ) oder β -(2 \rightarrow 1)-verknüpften Fru-Einheiten (Inulin-Typ). Fructane werden den Ballaststoffen zugerechnet, da sie im Magen und Dünndarm ebenfalls unverdaulich sind und im Dickdarm fermentiert werden (ROBERFROID & DELZENNE, 1998).

1.3 Strukturen von Pektinen

Pektine werden allgemein definiert als PS, die α -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Galacturonsäure (GalA) enthalten. Die vorkommenden Strukturen sind sehr komplex, deshalb werden Pektine häufig in verschiedene Strukturgruppen eingeteilt. Die dabei quantitativ bedeutendsten PS sind Homogalacturonan (HG) und Rhamnogalacturonan I (RG-I) mit seinen neutralen Seitenketten. Diese beiden dominierenden PS-Gruppen unterscheiden sich grundsätzlich in der Struktur ihres Rückgrats. Weitere bekannte Strukturelemente sind Xylogalacturonan (XGA) und Rhamnogalacturonan II (RG-II), welche dasselbe Rückgrat wie HG besitzen und oft Minorkomponenten in der pflanzlichen Zellwand darstellen (VORAGEN ET AL., 2009). Häufig werden diese Strukturelemente auch als substituierte Galacturonane zusammengefasst (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

1.3.1 Galacturonane

1.3.1.1 Homogalacturonan

Innerhalb der Pektine ist HG mit einem Anteil von bis zu 60 % oft das dominierende Strukturelement und besteht ausschließlich aus α -(1→4)-verknüpften GalA-Einheiten. Die Säuregruppen der GalA-Reste können frei oder mit Methanol verestert vorliegen. Zudem können an den Positionen O2 und/oder O3 Acetylgruppen gebunden sein (VORAGEN ET AL., 2009). Diese estergebundenen Gruppen können die Eigenschaften des HGs stark beeinflussen, vor allem die Fähigkeit zur Gelbildung. Es wird zwischen zwei von der Methylveresterung abhängigen Gelbildungsmechanismen unterschieden. Bei HG mit einem niedrigen Veresterungsgrad von 25 - 50 % können größere unveresterte, negativ geladene Bereiche durch Komplexbildung mit Ca^{2+} -Ionen miteinander verknüpft werden (THAKUR ET AL., 1997). Die dadurch entstehenden Gele werden oft mit dem sogenannten "egg-box" Modell beschrieben, welches in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt ist (GRANT ET AL., 1973).

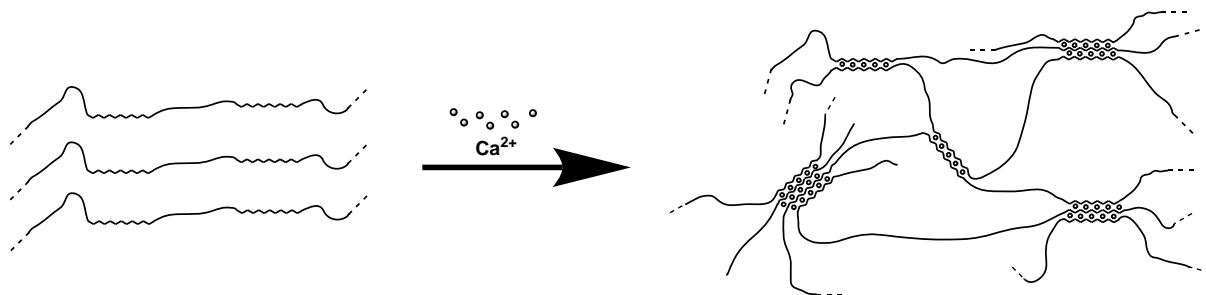


Abbildung 1.2: Gelbildung nach dem "egg-box" Modell: Verknüpfung von unveresterten Galacturonsäure-Resten durch Calcium-Ionen.

HG mit einem hohen Veresterungsgrad (50 - 80 %) kann bei niedrigem pH-Wert und in Gegenwart von hohen Konzentrationen an Mono- oder Disacchariden ebenfalls Gele ausbilden. Die Verbindungspunkte zwischen den HG-Ketten sind hierbei die veresterten Säuregruppen, welche sich aufgrund ihres unpolaren Charakters zusammenlagern und so die Wechselwirkung mit Wasser reduzieren (THAKUR ET AL., 1997). Durch die Solvatation der zugegebenen Saccharose kann zudem weniger Wasser mit dem Pektin wechselwirken, wodurch die Gelstärke erhöht wird. Aufgrund dieser Gelbildungseigenschaften besitzt HG bisher die größte Bedeutung für die Lebensmittelindustrie. Neben der für Kohlenhydrate häufig verwendeten sauren Hydrolyse kann HG auch bei neutralem bzw. basischem pH gespalten werden. Der zugrundeliegende Mechanismus ist eine β -Eliminierung, deren Ablauf in Abbildung 1.3 gezeigt ist (ALBERSHEIM ET AL., 1960).

Das Ausmaß und die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist von vielen Faktoren abhängig, wobei

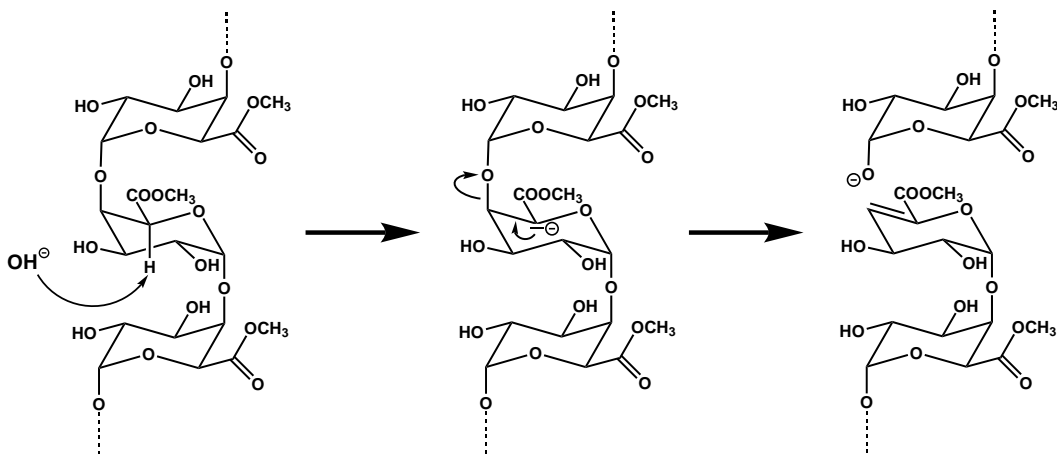


Abbildung 1.3: Mechanismus der Spaltung von methylveresterten Galacturonsäure-Resten des Homogalacturonans durch β -Eliminierung.

der Grad der Methylveresterung den bedeutendsten darstellt. So werden hochveresterte Pektine deutlich stärker depolymerisiert als niederveresterte (ALBERSHEIM ET AL., 1960; ROMBOUTS & THIBAUT, 1986). Die Temperatur, der pH-Wert und das Vorhandensein von Puffersalzen sind weitere wichtige Faktoren, die Einfluss auf die Spaltung haben (KRAVTCHENKO ET AL., 1992).

1.3.1.2 Substituierte Galacturonane: Xylogalacturonan

XGA besitzt wie HG ein Rückgrat aus α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften GalA-Resten, welche an Position O3 mit einzelnen Xyl-Resten substituiert sein können. Dies wurde bereits für diverse Pflanzensorten wie Äpfel, Erbsen oder Kartoffeln gezeigt (SCHOLS ET AL., 1995a; LE GOFF ET AL., 2001; ZANDLEVEN ET AL., 2006; CAFFALL & MOHNEN, 2009). Des Weiteren gibt es Hinweise auf die Bindung von (1 \rightarrow 2)- bzw. (1 \rightarrow 4)-verknüpften Xyl-Disacchariden und Xyl-OS (LE GOFF ET AL., 2001; NAKAMURA ET AL., 2002a; ZANDLEVEN ET AL., 2006). Unabhängig von der Xyl-Substitution, können die GalA-Reste im XGA an Position O6 mit Methylgruppen verestert sein (SCHOLS ET AL., 1995a).

1.3.1.3 Substituierte Galacturonane: Rhamnogalacturonan II

RG-II besitzt mehrere komplexe Seitenketten, die an den Positionen O2 und O3 eines α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften GalA-Rückgrats gebunden sind. Dabei kommen 12 verschiedene Monosaccharide vor, die über 20 verschiedene glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Die vorliegenden Strukturen sind über viele Pflanzenfamilien hochkonserviert und trotz ihrer Komplexität weitestgehend aufgeklärt. Einige der in den Seitenketten enthaltenen Monosaccharide sind sehr

selten und kommen fast ausschließlich in RG-II vor, wie zum Beispiel D-Apiose. Zudem können RG-II-Moleküle über Borat-Diester-Brücken miteinander verknüpft werden, was auf eine wichtige Rolle für die Zellwandfestigkeit hindeutet (O'NEILL ET AL., 2004).

1.3.2 Rhamnogalacturonan I

Das Rückgrat des RG-I besteht aus alternierenden α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften GalA- und α -(1 \rightarrow 2)-verknüpften Rha-Einheiten. An Position O4 der Rha-Einheiten können neutrale Seitenketten aus Ara (Arabinane (AN)) und Gal (Galactane (GN)), deren Strukturen in späteren Abschnitten genauer behandelt werden, gebunden sein (LAU ET AL., 1985). Ein schematischer Aufbau sowie die molekularen Grundstrukturen des RG-I und seiner Seitenketten sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

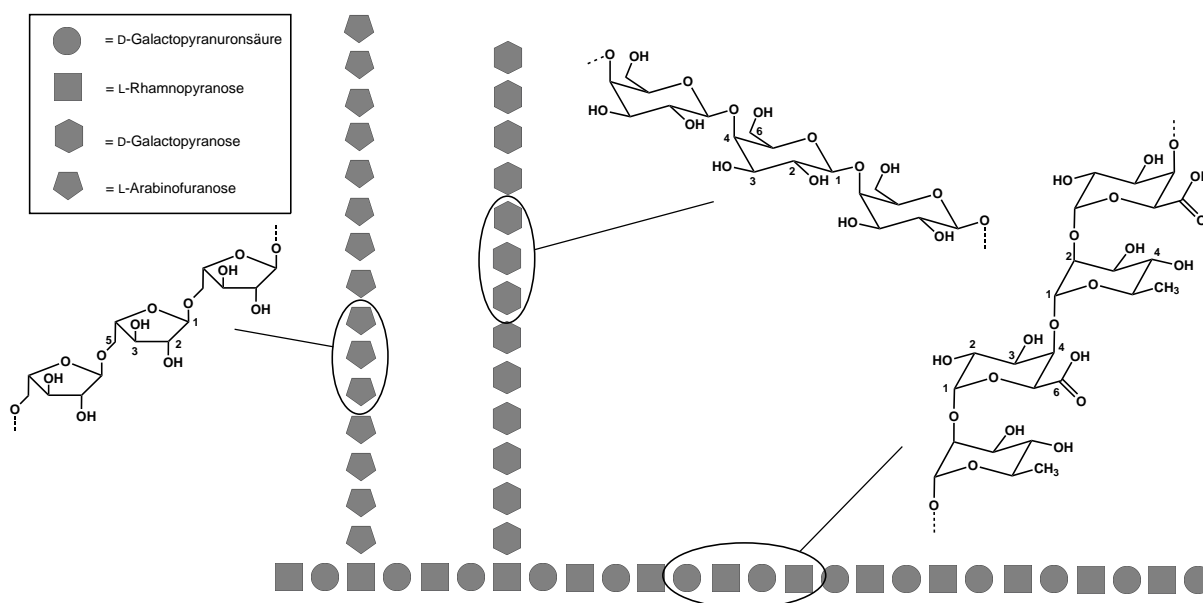


Abbildung 1.4: Vereinfachter Aufbau und grundsätzliche molekulare Strukturen des Rhamnogalacturonan I.

Die Struktur des Rückgrats wurde durch Isolierung und Charakterisierung von RG-I-OS aus diversen Pflanzenmaterialien eindeutig gezeigt (LAU ET AL., 1985; AN ET AL., 1994b; SCHOLS & VORAGEN, 1994; SCHOLS ET AL., 1994; RENARD ET AL., 1995). Durch chemische und enzymatische Spaltung des RG-I-Rückgrats konnten zudem OS isoliert werden, welche die Bindung von AN und GN an Position O4 der Rha zeigen (LAU ET AL., 1987; COLQUHOUN ET AL., 1990; SCHOLS ET AL., 1994). RG-I hat sich unter Bedingungen, die zu einer β -Eliminierung führen sollten, stabil gezeigt (SCHOLS ET AL., 1990). Daraus wird oft geschlossen, dass die GalA-Reste des RG-I nicht methyliert sind. Im Widerspruch dazu wurde in einer RG-I-Fraktion aus Flachs ein hoher

Methylveresterungsgrad gezeigt (RIHOUEY ET AL., 1995). Im Gegensatz zur Methylveresterung wurde eine Acetylierung der GalA-Reste im RG-I durch die Isolierung entsprechender OS eindeutig bewiesen, wobei die Bindung der Acetylgruppen an den Positionen O3 und/oder O2 der GalA-Reste erfolgte (KOMALAVILAS & MORT, 1989; LEROUGE ET AL., 1993; ISHII, 1997). Für die Pektine aus Okraschoten konnte gezeigt werden, dass auch die Rha-Reste an Position O3 acetyliert sein können (SENGKHAMPARN ET AL., 2009). Weiterhin konnten RENARD ET AL. (1999a) nachweisen, dass die GalA-Einheiten in Rübenpektinen an Position O3 mit β -GlcA substituiert sein können. Zudem wurde für eine RG-I-Fraktion aus Flachssamen vermutet, dass L-Gal an Position O3 gebunden vorliegt (NARAN ET AL., 2008).

1.3.3 Arabinane

Wie in Abbildung 1.4 gezeigt, besitzen AN ein Rückgrat aus α -(1 \rightarrow 5)-verknüpften L-Araf, welche an den Positionen O2 und/oder O3 mit L-Araf verzweigt sein können. In frühen Studien zu AN-Strukturen aus verschiedenen Pflanzen wurden oft "reine" AN isoliert und als eigenes PS betrachtet (REES & RICHARDSON, 1966; SIDDIQUI & WOOD, 1974; LARM ET AL., 1975; JOSELEAU ET AL., 1977). Dabei wurden jedoch häufig mehrere Extraktionsschritte bei teilweise erhöhten Temperaturen durchgeführt, was zu einer Abspaltung der AN vom RG-I-Rückgrat geführt haben könnte. Seit der Etablierung von AN als Seitenketten des RG-I (DE VRIES ET AL., 1982; THIBAUT, 1983; LAU ET AL., 1985) werden die AN jedoch meistens als Teil des Pektinkomplexes betrachtet. Generell sind die vorkommenden AN-Strukturen sehr heterogen. Oft wird Position O3 als Hauptverzweigungspunkt des Rückgrats beschrieben (CARDOSO ET AL., 2002; WESTPHAL ET AL., 2010b; CORDEIRO ET AL., 2012). Jedoch wurde ebenso gezeigt, dass die AN mancher Pflanzen hauptsächlich an Position O2 verzweigt sind, während eine doppelte Substitution des AN-Rückgrats eher selten beschrieben ist (ERIKSSON ET AL., 1996; NAVARRO ET AL., 2002; PUSTJENS ET AL., 2013). Die beschriebenen Araf-Verzweigungen an den Positionen O2 und/oder O3 konnten bereits von WESTPHAL ET AL. (2010a) durch die Isolierung und Charakterisierung entsprechender OS aus Zuckerrüben-AN bestätigt werden. Dabei konnten auch OS isoliert werden, bei denen benachbarte Ara-Einheiten substituiert sind (Abbildung 1.5A). Ähnliche Strukturelemente wurden auch von DOURADO ET AL. (2006) für die AN aus Mandeln vermutet. Neben der Verzweigung mit einzelnen Araf wurden zusätzlich bereits kompliziertere Strukturen beschrieben.

So wurde zum Beispiel das Vorkommen von Arap in AN aus Straucherbsen und Eibisch vermutet (CAPEK ET AL., 1983; SWAMY & SALIMATH, 1991). ISHII ET AL. (2005a) konnten zudem zeigen, dass in Hypokotylen der Mungbohne eine β -(1 \rightarrow 3)-Arabinopyranosyltransferase-Aktivität vorliegt. Dadurch konnten β -Arap auf Position O3 α -(1 \rightarrow 5)-verknüpfter AN-OS übertragen werden. Dies legt nahe, dass Arap Bestandteil mancher AN sind. Die Verzweigung des AN-Rückgrats mit Arabino-OS wurde bisher selten genauer beschrieben. ERIKSSON ET AL. (1996) konnten zei-

gen, dass das AN-Rückgrat an Position O2 mit dem in Abbildung 1.5B gezeigten, verzweigten OS substituiert sein kann. Weiterhin wurden α -(1→3)-verknüpfte Arabinobiosen als an Position O3 gebundene Seitenketten von Oliven-AN beschrieben (CARDOSO ET AL., 2002, 2007). Des Weiteren konnten die Autoren terminale, O5-gebundene β -Araf nachweisen (Abbildung 1.5C). Der Nachweis der beschriebenen komplexen Strukturelemente beschränkt sich jedoch meist auf eine Pflanzenspezies.

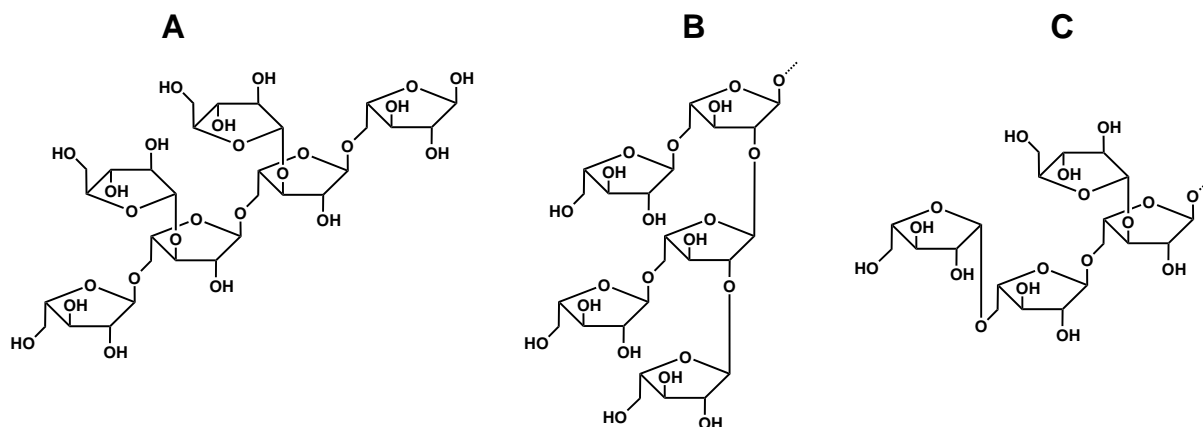


Abbildung 1.5: Strukturen der von WESTPHAL ET AL. (2010a) (A), ERIKSSON ET AL. (1996) (B) und CARDOSO ET AL. (2007) (C) beschriebenen Arabinan-Strukturelemente.

1.3.4 Galactane

Bei potentiell mit RG-I assoziierten GN wird oft eine Einteilung in verschiedene Strukturgruppen vorgenommen. Dabei werden lineare, unverzweigte, β -(1→4)-verknüpfte GN oft nur als "Galactane" bezeichnet. Ist Ara an dieses Rückgrat gebunden, wird meist die Bezeichnung "Arabinogalactan Typ I" verwendet, während für GN mit einem β -(1→3)-verknüpften Rückgrat entsprechend die Bezeichnung "Arabinogalactan Typ II" genutzt wird (CAFFALL & MOHNEN, 2009). Da eine Bindung von Ara analytisch schwer auszuschließen ist, wird im Rahmen dieser Arbeit für substituierte und unsubstituierte GN mit β -(1→4)-verknüpften Gal-Einheiten zur Vereinfachung der Begriff "Galactane" verwendet. β -(1→3)-verknüpfte GN werden dementsprechend als Typ II GN bezeichnet.

Oft werden Typ II GN als hochverzweigte PS beschrieben, wobei das β -(1→3)-verknüpfte Rückgrat an Position O6 substituiert ist. Als Seitenketten treten kürzere Ketten aus β -(1→6)-verknüpfter Gal auf, die an Position O3 weitere Substituenten wie α -(1→5)-verknüpfte und terminale Ara sowie terminale Rha enthalten können (GASPAR ET AL., 2001; REDGWELL ET AL., 2002; NUNES ET AL., 2008). Typ II GN kommen hauptsächlich als Bestandteil von Arabinogalactan-Proteinen vor, welche meist mit Pektinen vergesellschaftet sind. Jedoch konnte bisher noch nicht geklärt

werden, ob Typ II GN als Seitenketten an RG-I gebunden sind oder ob sie ausschließlich proteingebunden vorliegen und die entsprechenden Proteine mit Pektinen assoziiert sind (PELLERIN ET AL., 1995; OOSTERVELD ET AL., 2002; REDGWELL ET AL., 2002; IMMERZEEL ET AL., 2006).

β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte GN werden dagegen als Teil des RG-I betrachtet, da ihre Bindung durch die Isolierung entsprechender OS eindeutig gezeigt wurde (LAU ET AL., 1987). GN werden oft als eher lineare PS beschrieben, die an den Positionen O3 und O6 mit Gal, Ara und Ara-OS verzweigt sein können (WOOD & SIDDIQUI, 1972; HABIBI ET AL., 2004; SUN ET AL., 2010; CIPRIANI ET AL., 2009). Das Vorkommen dieser Strukturen wurde bisher nur durch verschiedenartige Analysen von isolierten PS gezeigt und es wurden noch keine vollständig charakterisierten OS beschrieben. Jedoch wurden einige andere spezielle Strukturelemente charakterisiert, wie zum Beispiel das Vorkommen einzelner, 1,3-substituierter β -Galp-Einheiten innerhalb der β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften GN-Ketten verschiedener Pflanzen (HINZ ET AL., 2005) (Abbildung 1.6 A). AN ET AL. (1994a) konnten zeigen, dass β -GlcA terminal an Position O4 der GN gebunden sein kann (Abbildung 1.6 B). Für die GN aus Sojabohne wurde das Vorkommen terminaler, O4-gebundener Arap beschrieben (Abbildung 1.6 C). Zudem wurden interne, 1,5-substituierte Araf-Einheiten innerhalb der GN-Ketten vermutet (HUISMAN ET AL., 2001a). Der enzymatische Transfer von Arap auf Galacto-OS durch Mungbohnen-Mikrosomen spricht ebenfalls für das Vorkommen von Arap als Strukturelemente von GN. Zudem finden sich auch vereinzelt Hinweise auf die Substitution der GN-Ketten mit anderen Monosacchariden, wie zum Beispiel Fuc (NAKAMURA ET AL., 2002b).

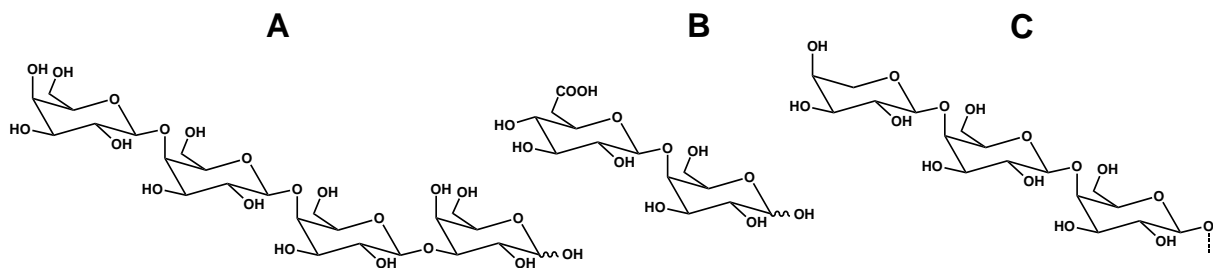


Abbildung 1.6: Strukturen der von HINZ ET AL. (2005) (A), AN ET AL. (1994a) (B) und HUISMAN ET AL. (2001a) (C) beschriebenen Galactan-Strukturelemente.

1.3.5 Ferulasäure

Wie bereits beschrieben, können die Hydroxyzimtsäuren FS und *p*-CS in der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) an Arabinoxylane gebunden vorliegen (HARRIS & TRETHERWEY, 2010). HARTLEY & HARRIS (1981) konnten zeigen, dass zellwandgebundene phenolische Säuren in dikotylen Pflanzen hauptsächlich in der Ordnung der Caryophyllales vorkommen. Hierbei liegt FS wahrscheinlich zu einem großen Teil an AN und GN gebunden vor. Dies konnte durch die Isolierung

und Charakterisierung von mit FS veresterten AN- und GN-OS aus Zuckerrüben, Spinat und Amaranth gezeigt werden (ISHII & TOBITA, 1993; COLQUHOUN ET AL., 1994; ISHII, 1994; RALET ET AL., 1994a; BUNZEL ET AL., 2005). In den isolierten OS ist die FS an Position O2 der AN bzw. an Position O6 der GN gebunden (siehe Abbildung 1.7). LEVIGNE ET AL. (2004a) konnten zudem zeigen, dass zwei benachbarte Ara-Einheiten mit FS substituiert sein können. Auf Basis von Massenspektrometrie (MS)-Experimenten wurde vermutet, dass die Ara-Einheiten an Position O5 und Position O2 verestert sind.

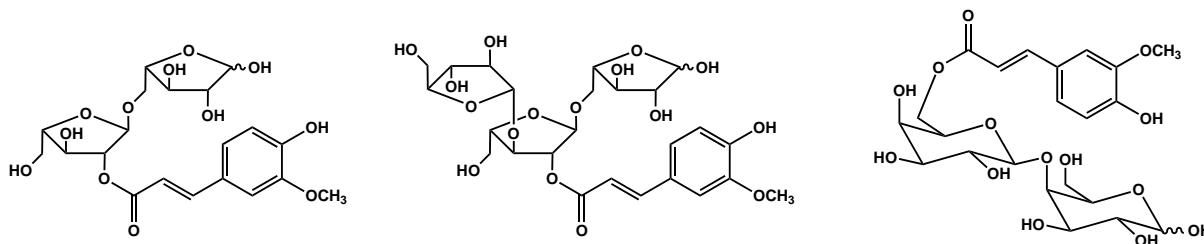


Abbildung 1.7: Strukturen der bisher aus dikotylen Pflanzen isolierten und charakterisierten Ferulasäure-Oligosaccharide (ISHII & TOBITA, 1993; COLQUHOUN ET AL., 1994; ISHII, 1994; RALET ET AL., 1994a; BUNZEL ET AL., 2005).

Zwei estergebundene FS können über oxidative, radikalische Kopplung zu einer Dehydrodiferulasäure (DFS) dimerisieren, die Bildung von Triferulasäuren und höheren Oligomeren ist ebenfalls möglich. Da FS-Radikale resonanzstabilisiert sind, ergeben sich die in Abbildung 1.8 aufgeführten DFS-Kopplungsprodukte (BUNZEL, 2010). Sowohl dikotyle Pflanzen wie Amaranth, Buchweizen oder Zuckerrübe als auch verschiedene monokotyle Getreidesorten enthalten signifikante Mengen an den gezeigten DFS (MICARD ET AL., 1997; DOBBERSTEIN & BUNZEL, 2010; JILEK & BUNZEL, 2013). Dabei ist bei den 8-5-gekoppelten DFS zu beachten, dass nur die 8-5c-DFS tatsächlich zellwandassoziiert vorkommt, während die offene und die in Abbildung 1.8 nicht gezeigte decarboxylierte Form während der Aufarbeitung aus der cyclischen Form entstehen. Daher sollte für den Gehalt der 8-5-DFS stets die Summe der drei Formen verwendet werden (BUNZEL ET AL., 2001). Von der in Abbildung 1.8 ebenfalls nicht gezeigten 4-O-5-DFS konnten nur Spuren in verschiedenen Getreidesorten nachgewiesen werden (BUNZEL ET AL., 2000). Durch die Bildung der DFS entstehen kovalente, inter- oder intramolekulare cross-links zwischen PS. Dies konnte für monokotyle Pflanzen bereits durch die Isolierung und Charakterisierung von DFS-OS gezeigt werden (ISHII, 1991; SAULNIER ET AL., 1999; ALLERDINGS ET AL., 2005; BUNZEL ET AL., 2008). Für dikotyle Pflanzen wurden bereits Hinweise auf AN-AN- bzw. AN-GN-cross-links gefunden. Dabei wurden OS aus Zuckerrübe isoliert, die sowohl AN- bzw. GN-OS als auch 5-5- bzw. 8-O-4-DFS enthielten. Jedoch konnten die genauen Verknüpfungspunkte zwischen den einzelnen Komponenten durch die verwendeten MS-Techniken nicht zweifelsfrei ermittelt werden (LEVIGNE ET AL., 2004b; RALET ET AL., 2005).

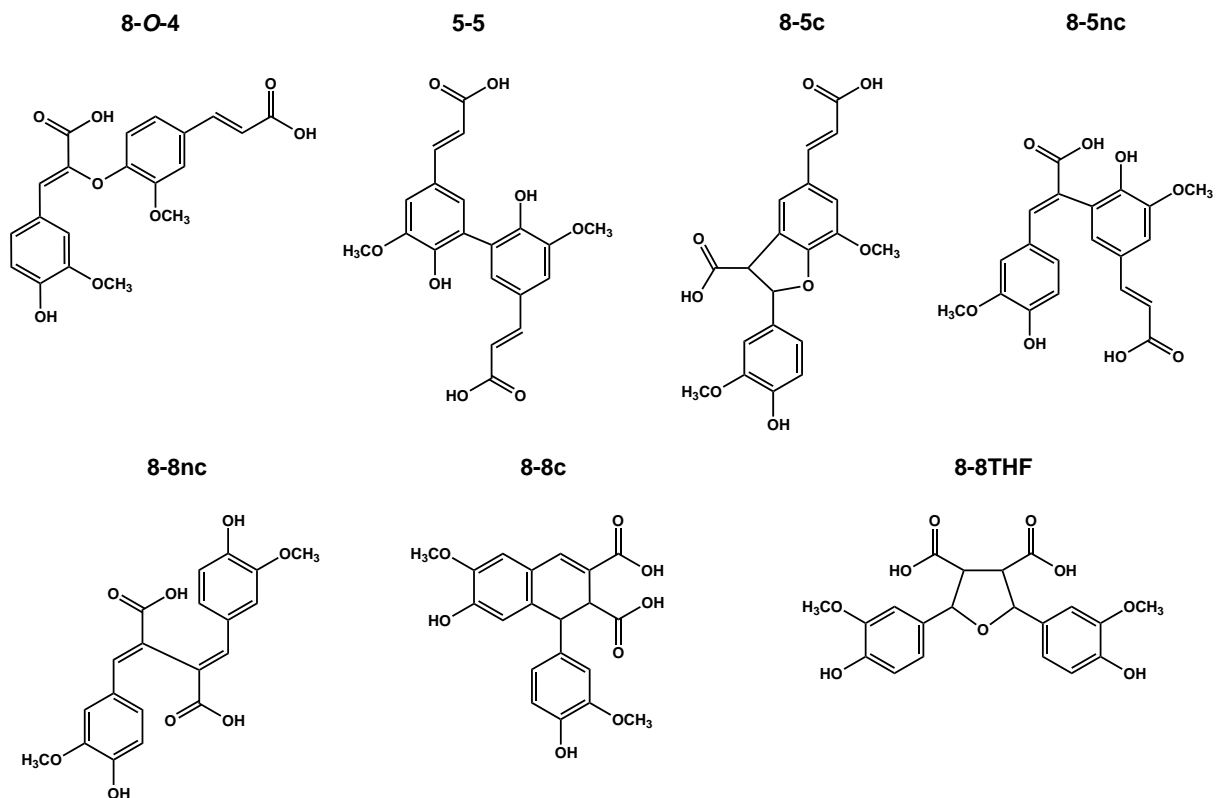


Abbildung 1.8: Strukturen der in verschiedenen Pflanzenmaterialien identifizierte Dehydroferulasäuren. c = cyclisch, nc = nicht-cyclisch, THF = Tetrahydrofuran (BUNZEL, 2010).

1.3.6 Gesamtstruktur des Pektins

Es wird allgemein angenommen, dass die verschiedenen Strukturelemente des Pektins ein komplexes Makromolekül bilden. Die Verbindung und die Gesamtorganisation der PS ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, da aufgrund der Heterogenität und der Molekülgröße eine Strukturaufklärung sehr schwierig ist. Aus der Beobachtung, dass die Neutralzucker nur in kleinen Abschnitten des Pektinmoleküls vorkommen, wurde das Modell der "smooth regions" und "hairy regions" entwickelt (DE VRIES ET AL., 1982). Dies ist das bekannteste Modell für die Beschreibung der Gesamtstruktur des Pektins. Demnach bestehen Pektinmoleküle aus alternierenden HG- ("smooth regions", da keine Verzweigung) und RG-I-Abschnitten ("hairy regions", aufgrund der abstehenden neutralen Seitenketten). Da sich RG-II enzymatisch aus HG-Abschnitten freisetzen lässt, wird vermutet, dass es in das HG-Rückgrat integriert ist (ISHII & MATSUNAGA, 2001).

Neuere Modelle schlagen vor, dass XGA sowie HG und RG-II komplett oder teilweise Seitenketten des RG-I sind (VINCKEN ET AL., 2003; YAPO, 2011). Mit diesen Modellen, welche bisher weder bestätigt noch komplett widerlegt werden konnten, wären einige der im Widerspruch zum

hairy-regions-Modell stehenden Daten erklärbar. Im Widerspruch zu diesen neueren Modellen steht die Isolierung von OS, die auf eine α -(1→2)-Verknüpfung zwischen HG bzw. XGA und den Rha-Resten des RG-I-Rückgrat hindeuten (COENEN ET AL., 2007). Da jedoch die Arten der glykosidischen Bindung teilweise nicht aufgeklärt wurden, konnte das alternative Modell nicht ausgeschlossen werden.

1.4 Analyse von Pektinen

Die beschriebenen Strukturen wurden meist durch eine Isolierung und detaillierte Charakterisierung der entsprechenden OS aus verschiedenen Pflanzenmaterialien etabliert. Eine eindeutige Strukturaufklärung kann meistens nur mittels Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie erfolgen, da durch die Anwendung von 2D-Experimenten die Bindungsverhältnisse eindeutig geklärt werden können (siehe auch Abschnitt 3.5.3). Aufgrund der Komplexität und des Zeitaufwands wird dieser Ansatz jedoch nicht sehr oft angewendet. Für die Charakterisierung von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSPS) wird häufig die Monosaccharidzusammensetzung nach Säurehydrolyse bestimmt, um auf die ursprünglich vorliegenden PS zu schließen. Teilweise können so zum Beispiel die Anteile an HG und RG-I abgeschätzt werden (PETTOLINO ET AL., 2012). Für die Bestimmung des Veresterungsgrades von Pektinen werden häufig die alkalisch freigesetzten Mengen an Methanol bzw. Essigsäure auf den photometrisch bestimmten GalA-Gehalt bezogen (BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973; VORAGEN ET AL., 1986). Bei mit FS veresterten Pektinen kann nach Verseifung zudem die Menge an FS bzw. die Art und Menge der DFS bestimmt werden (DOBBERSTEIN & BUNZEL, 2010; JILEK & BUNZEL, 2013). Zur Analyse der glykosidischen Bindungen von PS wird die Methylierungsanalyse als Standardmethode angewendet. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 1.9 skizziert.

Zunächst werden die freien Hydroxygruppen der PS permethyliert, wodurch Positionen, die nicht in Ringschlüsse oder glykosidische Bindungen involviert sind, mit einer Methylgruppe markiert werden. Nach säurehydrolytischer Spaltung wird eine Reduktion mit Natriumbordeuterid durchgeführt, wodurch an C1 Deuterium-markierte, partiell methylierte Zuckeralkohole erhalten werden. Abschließend werden die vorher besetzten Hydroxygruppen mit Acetanhydrid acetyliert, woraus partiell methylierte Alditolacetate (PMAAs) resultieren. Diese können anschließend mittels Gaschromatographie (GC) analysiert werden. Die Detektion erfolgt mittels MS nach Elektronenstoß-Ionisation (EI) und, wenn semiquantitative Informationen erhalten werden sollen, zusätzlich mittels Flammenionisationsdetektor (FID). Für viele PMAAs ergibt sich eine charakteristische EI-MS-Fragmentierung, da eine Spaltung bevorzugt zwischen zwei mit Methoxygruppen substituierten Kohlenstoffen stattfindet. Zudem ergeben sich teilweise charakteristische Sekundärfragmente, wodurch die verschiedenen PMAAs identifiziert und unterschieden werden können. Durch die Verwendung der korrigierten GC-FID-Flächen kann eine

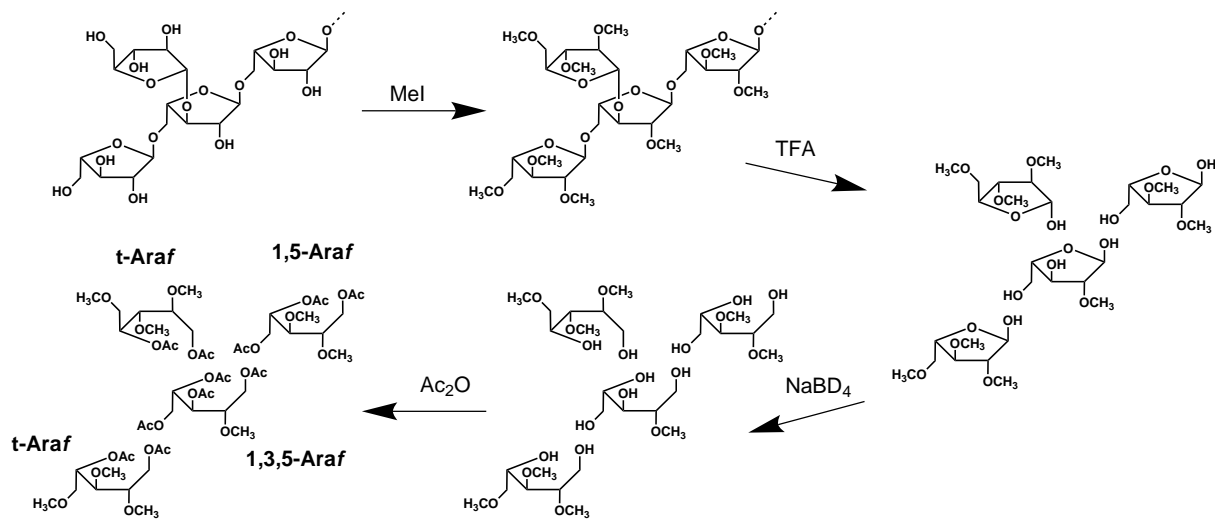


Abbildung 1.9: Schematischer Ablauf der Methylierungsanalyse an einem Arabinan-Strukturelement: Methylierung mit Methyljodid (MeI), Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA), Reduktion mit Natriumborodeuterid (NaBD₄) und Acetylierung mit Acetanhydrid (Ac₂O). t = terminal, Ara = Arabinose, f = Furanose.

semiquantitative Bestimmung der PMAAs durchgeführt werden, wobei eine Beschaffung bzw. Isolierung von Standardsubstanzen nicht zwingend erforderlich ist. Die erhaltenen Verhältnisse geben Auskunft darüber, wie hoch der Anteil des jeweiligen Bindungs- bzw. Substitutionstyps im PS war (PETTOLINO ET AL., 2012).

Die beschriebenen Methoden haben gemein, dass sie auf chemischer Spaltung und anschließender Analyse der Monomereinheiten beruhen. Der Informationsgehalt der erhaltenen Daten ist jedoch teilweise stark begrenzt. So ist es nicht möglich, einzelne Monosaccharide ausschließlich einer einzigen Gruppe von PS zuzuordnen. Durch die Analyse der glykosidischen Bindungen kann diese Zuordnung zwar teilweise erfolgen, jedoch wird keinerlei Aussage über die Struktur von Seitenketten erhalten. Ebenso liefert die Analyse der durch Natriumhydroxid freigesetzten Hydroxyzimtsäuren keine Information über die ursprüngliche Bindung dieser Komponenten. Demzufolge können die in den Abbildungen 1.5, 1.6 und 1.7 gezeigten Strukturelemente durch die beschriebenen Methoden nicht eindeutig identifiziert werden. Dies ist nur durch eine Analyse der intakten Strukturelemente möglich.

Bisher wurden Ansätze, die auf der Analyse von intakten OS oder PS basieren, hauptsächlich für das HG- bzw. RG-I-Rückgrat beschrieben. So verwendeten DAAS ET AL. (1998) die Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) bei pH 5, um GalA-OS mit verschiedenem Polymerisationsgrad und verschiedener Veresterung zu analysieren. Der neutrale pH-Wert ermöglicht den Erhalt der Base-labilen Methyl ester, jedoch muss das zur Detektion notwendige Natriumhydroxid durch Nachsäulenaddition zugeführt werden. Häufig wird auch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit verschiedenen Trennphasen zur Analyse von OS eingesetzt. Durch die Anwendung

der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) in Kombination mit einem Lichtstreuendetektor (ELSD) und MSⁿ konnten HG und RG-I-Rückgrat OS ebenfalls nachgewiesen und quantifiziert werden (LEIJDEKKERS ET AL., 2011; REMOROZA ET AL., 2012). Diese Ansätze erlauben detailliertere Aussagen über die HG- und RG-I-Strukturen, insbesondere über die Verteilung von Substituenten wie Methyl- oder Acetylgruppen. Die Analyse von AN- und GN-OS wurde bisher lediglich auf qualitativer Basis und mit einer limitierten Anzahl an Standardsubstanzen durchgeführt (WESTPHAL ET AL., 2010b,c; PUSTJENS ET AL., 2013). Teilweise wird auch die NMR-Spektroskopie zur Analyse von PS eingesetzt, meist zur Analyse vorher aufgereinigter Fraktionen (HABIBI ET AL., 2004; CARDOSO ET AL., 2007; CIPRIANI ET AL., 2009). Die Zuordnung erfolgt dabei meist durch die Verwendung verschiedener 2D-NMR-Korrelationen und mithilfe von Literaturdaten. Jedoch können sowohl die erhaltenen Korrelationen als auch Literaturdaten zu fehlerhaften Zuordnungen führen, beispielsweise durch Überschneidungen mit den Signalen anderer Bestandteile. Daher ist für eine eindeutige Identifizierung einzelner Strukturelemente eine Isolierung von niedermolekularen Standardsubstanzen von besonderer Bedeutung.

1.5 Eigenschaften von Pektinen

1.5.1 Pflanzenphysiologische Eigenschaften

Pektinen wird ein entscheidender Einfluss auf die Physiologie der pflanzlichen Zellwand zugeschrieben. Zum Beispiel wurden Veränderungen des Pektin Gehalts bzw. der Pektinstrukturen bei vielen Früchten in Zusammenhang mit Texturveränderungen gebracht (BRUMMELL, 2006). Oft beschriebene Vorgänge sind dabei die Demethylierung oder Depolymerisation von HG, welche mit einer verringerten Zell-Zell-Adhäsion korreliert werden. Jedoch scheinen auch die AN und GN eine entscheidende Rolle zu spielen, da während des Wachstums bzw. der Reifung oft ein Verlust an Ara und Gal beobachtet werden kann. So konnte für Apfel und Pfirsich gezeigt werden, dass während des Wachstums hauptsächlich ein GN-Verlust stattfindet, während bei der Reifung die AN abgebaut werden (BRUMMELL ET AL., 2004; PENA & CARPITA, 2004). Mittels Methylierungsanalyse konnten PENA & CARPITA (2004) zeigen, dass bei der Reifung hauptsächlich die AN-Verzweigungen abgebaut werden. Auch während der Reifung von Oliven konnten Modifikationen der vorliegenden AN-Strukturen festgestellt werden (CARDOSO ET AL., 2007). Der Verlust von GN konnte ebenfalls in Zusammenhang mit der Reifung vieler Früchte gebracht werden (REDGWELL ET AL., 1997). Der Abbau der PS erfolgt dabei wahrscheinlich durch Enzyme wie β -Galactosidase und α -Arabinofuranosidase, deren Aktivitäten im Verlauf der Fruchtreifung zunehmen (BONGHI ET AL., 1996; GOULAO ET AL., 2007; WEI ET AL., 2010).

Der Einfluss estergebundener FS auf die Zellwandphysiologie wurde für dikotyle Pflanzen bisher kaum untersucht, konnte jedoch bereits bei einigen monokotylen Pflanzen beobachtet werden.

So wurde bei der Lagerung von Spargel, welche auch mit einer Verfestigung der Textur einhergeht, eine Zunahme zellwandassoziierter FS und DFS beobachtet (RODRIGUEZ-ARCOS ET AL., 2004; JARAMILLO ET AL., 2007). Zudem wurde festgestellt, dass FS bzw. DFS einen Einfluss auf die Textur der chinesischen Wasserkastanie haben (PARKER & WALDRON, 1995; PARKER ET AL., 2003). Von entscheidender Bedeutung scheint hier die Verknüpfung verschiedener PS-Ketten durch DFS zu sein, welche in dikotylen Pflanzen ebenfalls stattfinden könnte.

1.5.2 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Positive ernährungsphysiologische Eigenschaften von Ballaststoffen konnten zwar in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, die detaillierten Mechanismen sind aufgrund der Heterogenität und Komplexität der Ballaststoffe jedoch weitestgehend unverstanden. Einige Effekte wie die Erhöhung des Stuhlvolumens oder die Senkung des postprandialen Glucosespiegels werden auf die Wasserbindungsfähigkeit und die Viskosität der Ballaststoffe, also auf die physikochemischen Eigenschaften, zurückgeführt (CHAMP ET AL., 2003a; KENDALL ET AL., 2010). Die physikochemischen Eigenschaften sind für die verschiedenen PS-Gruppen verschieden und können zudem auch durch die Strukturen der PS beeinflusst werden. Die PS-Strukturen beeinflussen zudem maßgeblich die Fermentation der Ballaststoffe im Dickdarm. So werden zum Beispiel Inulin und Oligofructose zu kurzkettigen Fettsäuren fermentiert und fördern selektiv das Wachstum von Bifidobakterien, was als gesundheitsförderlich angesehen wird (CUMMINGS & MACFARLANE, 2002).

Für einzelne Pektin-PS- bzw. Pektin-OS-Mischungen wurde bereits gezeigt, dass sie von der menschlichen Mikrobiota verstoffwechselt werden (VAN LAERE ET AL., 2000; GULFI ET AL., 2007). Durch die Fermentation von HG- und RG-I-OS-Mischungen wurde teilweise das Wachstum von Bifidobakterien stimuliert, teilweise traten diese Effekte jedoch nicht auf (OLANO-MARTIN ET AL., 2002; GOMEZ ET AL., 2014; LEIJDEKKERS ET AL., 2014). HOLCK ET AL. (2011a) fanden außerdem Hinweise auf einen signifikanten Einfluss des Polymerisationsgrades von HG-OS auf das Wachstum verschiedener Bakterienstämme. Die Fermentation von AN-OS-Mischungen konnte in einigen Studien mit einer positiven Beeinflussung der Mikrobiota korreliert werden (AL-TAMIMI ET AL., 2006; VIGSNAES ET AL., 2011; GOMEZ ET AL., 2014). Für manche PS, wie zum Beispiel hochmolekulare, GN-reiche Pektine, konnte ebenfalls ein hoher bifidogener Effekt gezeigt werden (THOMASSEN ET AL., 2011). HOLCK ET AL. (2011b) stellten zudem fest, dass der bifidogene Effekt von AN-OS mit dem Polymerisationsgrad tendenziell ansteigt.

Für FS wurde eine Vielzahl an positiven, ernährungsphysiologischen Eigenschaften, wie beispielsweise eine antioxidative und eine antiinflammatorische Wirkung, postuliert (Ou & Kwok, 2004). Jedoch unterscheidet sich die Bioverfügbarkeit freier und gebundener FS beträchtlich. So wurde gezeigt, dass freie FS und DFS schnell im Magen und im Dünndarm aufgenommen werden, während polymergebundene Hydroxyzimtsäuren erst langsam nach Fermentation der

PS im Dickdarm freigesetzt werden (ZHAO & MOGHADASIAN, 2010). Zudem können FS und DFS von den im Darm ansässigen Mikroorganismen metabolisiert werden, wodurch Metaboliten mit potentiell anderer Wirkung gebildet werden (BRAUNE ET AL., 2009; ZHAO & MOGHADASIAN, 2010; SCHENDEL ET AL., 2015b). Das Ausmaß der FS-Freisetzung, welche wahrscheinlich hauptsächlich durch Feruloyl-Esterasen stattfindet, ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. Einerseits ist die Freisetzung von der Fermentierbarkeit der eingesetzten Ballaststoffe abhängig (KROON ET AL., 1997). Außerdem existieren verschiedene Formen der Feruloyl-Esterase, welche ebenso verschiedene Substratspezifitäten besitzen (RALET ET AL., 1994a; KOSEKI ET AL., 2009). Ein weiterer oft diskutierter Aspekt ist, ob die FS-Substitution die Fermentierbarkeit der Ballaststoffe herabsetzt. Entsprechende Hinweise konnten bereits mit einzelnen Enzymen bzw. OS gefunden werden (LUONTERI ET AL., 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass DFS-cross-links die Abbaubarkeit durch kommerzielle Enzymmischungen vermindern (GRABBER ET AL., 1998). Bei der Fermentation durch die humane Mikrobiota wurde jedoch kein Einfluss einer FS- oder DFS-Substitution festgestellt (FUNK ET AL., 2007). HOLCK ET AL. (2011b) konnten ebenfalls keinen negativen Einfluss der FS-Veresterung von AN-OS-Mischungen auf den bifidogenen Effekt feststellen.

1.5.3 Lebensmitteltechnologische Eigenschaften

Pektine finden in Lebensmitteln breite Anwendung als Gelbildner. Da sich die neutralen Seitenketten des Makromoleküls negativ auf die Gelbildung auswirken, werden hauptsächlich sehr HG-reiche Pektine verwendet (THAKUR ET AL., 1997). Jedoch können Pektine, die reich an mit FS veresterten Seitenketten sind, chemisch oder durch verschiedene Enzyme oxidativ quervernetzt werden. Die Pektine aus Zuckerrübe in Kombination mit Laccase bzw. H_2O_2 /Peroxidase sind hierfür besonders geeignet (MICARD & THIBAUT, 1999; OOSTERVELD ET AL., 2000, 2001). Durch Bildung von DFS entstehen PS-cross-links, die ein kovalent verknüpftes, sehr stabiles Gel ergeben. Dazu müssen die entsprechenden Pektine für diese Art der Gelbildung nur in einer geringen Konzentration vorliegen (1 - 3 %). Die Effektivität der Gelbildung ist dabei von der gebundenen FS, jedoch auch von den Strukturen und dem Molekulargewicht der AN und GN abhängig (GUILLON & THIBAUT, 1990; ABDEL-MASSIH ET AL., 2007; ZAIDEL ET AL., 2011). Für Pektine aus Zuckerrübe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie Öl/Wasser-Emulsionen stabilisieren können, wobei dieser Effekt abhängig von der Menge an assoziierten Proteinen ist (LEROUX ET AL., 2003; FUNAMI ET AL., 2011). ZAIDEL ET AL. (2013) konnten jedoch auch zeigen, dass sich die oxidative Quervernetzung zur Stabilisierung von Emulsionen nutzen lässt. Lineare AN können zudem polymorphe Mikrokristalle bilden, was sie als Fett-Mimetika interessant machen könnte (CHURMS ET AL., 1983; RADHA & CHANDRASEKARAN, 1997).

2 Zielsetzung

Pektine setzen sich aus diversen Strukturgruppen zusammen und gehören zu den komplexesten PS in der Natur. Während Strukturelemente wie HG und XGA eine eher geordnete und konservierte Struktur besitzen, zeigt RG-I vor allem aufgrund der neutralen Seitenketten, den AN und GN, eine hohe Heterogenität. Die Strukturen dieser komplexen PS und die Bindung von Hydroxyzimtsäuren an AN und GN sind sowohl für die pflanzenphysiologischen als auch die ernährungsphysiologischen und lebensmitteltechnologischen Eigenschaften der Pektine von Bedeutung. Jedoch werden die zum Nachweis dieser Eigenschaften verwendeten OS und/oder PS oft nur in ihren Grundzügen charakterisiert, beispielsweise durch Analyse der Monomereinheiten oder durch Methylierungsanalyse. Bei diesen Methoden findet aufgrund der unselektiven chemischen Spaltung ein Verlust einiger Strukturinformationen statt. So liefert die Analyse von Monomereinheiten keine Information über die genaue Herkunft der Monosaccharide oder der Hydroxyzimtsäuren. Durch die Anwendung der Methylierungsanalyse geht sämtliche Information über die Art an Seitenketten bzw. Substituenten und die anomere Konfiguration der Monosaccharideinheiten innerhalb der PS verloren. Es kann zudem nicht unterschieden werden, ob eine Hydroxygruppe durch Ringbildung oder eine glykosidische Bindung besetzt war. Dadurch ist das Wissen über die Feinstrukturen der neutralen Seitenketten ebenso wie die Möglichkeiten zu deren Analyse begrenzt. Für die relativ gut charakterisierten PS HG und RG-I existieren bereits Ansätze, bei denen durch die Verwendung von PS-spaltenden Enzymen ein Erhalt bestimmter Strukturelemente erreicht wird. Durch die Analyse solcher Produkte können viele Zusatzinformationen über die ursprünglichen Strukturen erhalten werden. Die für die neutralen Seitenketten angewandten Ansätze wurden jedoch nur qualitativ und mit einer begrenzten Anzahl an OS durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, unter Verwendung spezifischer Enzyme sowie moderner analytischer Techniken neue Methoden für die Analyse der AN und GN zu entwickeln und eine detaillierte Strukturaufklärung der Pektinseitenketten verschiedener Materialien durchzuführen. Die zu entwickelnden Profilingmethoden sollten sich sowohl durch einen erhöhten Informationsgehalt über die native Struktur, als auch durch eine deutliche Zeitersparnis auszeichnen.

Da die meisten AN- und GN-OS nicht kommerziell erhältlich sind, sollte zunächst ein breites Spektrum an Standardsubstanzen in ausreichender Menge und Reinheit isoliert und damit das Wissen über die in dikotylen Pflanzen vorhandenen Strukturen erweitert werden. Ein Fokus lag dabei darauf, möglichst viele verschiedene bekannte und unbekannte Strukturelemente der

PS abzudecken und mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie eindeutig zu charakterisieren. Zur Isolierung der Standardsubstanzen sollten daher sowohl aufgereinigte PS als auch verschiedene Ballaststoffe verwendet werden. Um Informationen über die verschiedenen Zellwandstrukturen zu erhalten und um die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden zu überprüfen, wurden die verwendeten Materialien zusätzlich mittels etablierten, konventionellen Methoden ausführlich charakterisiert.

Eine chromatographische Analyse der enzymatisch freigesetzten OS erlaubt die Detektion verschiedener Strukturelemente, auch solcher, die mit Standardmethoden der Kohlenhydratchemie nicht erfasst werden, und kann somit Hinweise auf die Strukturen der nativen PS geben. Zur Analyse von nicht veresterten OS ist die HPAEC-PAD sehr gut geeignet, da sie einerseits eine sehr gute Trennung, andererseits eine empfindliche Detektion bietet. Darüber hinaus sollten auch andere Trenntechniken wie zum Beispiel die Reversed-Phase (RP)-HPLC-MS auf ihre Eignung als Ergänzungs- oder Alternativmethoden geprüft werden. Für die Analyse von Hydroxycitronensäure-OS ist die RP-HPLC aufgrund der erhöhten Hydrophobizität und der UV-Absorption der Analyten ebenfalls sehr gut geeignet. Da diese Substanzen in kleineren Mengen und mit vielen Begleitstoffen vorkommen können, sollte durch die Verwendung von MS-Techniken eine eindeutige Identifizierung gewährleistet werden.

Durch Verwendung der NMR-Spektroskopie können bestimmte Strukturelemente sowohl innerhalb von OS als auch innerhalb von PS detektiert werden. Daher sollte auch diese Technik zur Analyse von nativen und enzymatisch freigesetzten AN- und GN-Strukturen verwendet werden. Aufgrund der Komplexität der Spektren oligo- bzw. polymerer Kohlenhydrate kommt es oft zu einer starken Überlagerung von Signalen bei Verwendung eindimensionaler NMR-Spektroskopie. Für die Analyse der verschiedenen Strukturen sollten daher charakteristische Markersignale in zweidimensional aufgelösten Spektren verwendet werden.

Abschließend sollten die entwickelten Profilingmethoden auf die vorher mittels konventionellen Analyseverfahren charakterisierten pflanzlichen Materialien angewendet werden. Dadurch sollte zum einen die Anwendbarkeit der Methoden evaluiert werden, zum anderen sollten weitere detaillierte Informationen zu den Rohstoffen erhalten werden.

3 Material und Methoden

3.1 Ausgangsmaterialien

Als Ausgangsmaterialien für die Isolierung von Standardsubstanzen sowie für die Anwendung der entwickelten Methoden wurden verschiedene pflanzliche Rohstoffe verwendet. Dabei wurden zum einen Rohstoffe gewählt, die potentiell größere Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung und Zellwandarchitektur zeigen (Apfel, Zuckerrübenschnitzel (ZRS), Sojaextraktionsschrot (SES)). Zum anderen wurden, um zu evaluieren, ob die entwickelten Methoden angewendet werden können und um Unterschiede in der Feinstruktur der NSPS zu analysieren, auch einander ähnliche Materialien verwendet (Amaranth, Quinoa, Buchweizen).

Für die Isolierung bekannter und unbekannter Strukturelemente wurden zunächst kommerziell erhältliche, lösliche AN- bzw. GN-PS der Firma Megazyme verwendet. Laut Herstellerangaben wurden die AN-PS bzw. die GN-PS durch basische Extraktion aus ZRS bzw. Kartoffeln gewonnen. Durch eine nachfolgende Aufreinigung bzw. enzymatische Behandlung enthalten die Präparationen nicht ausschließlich, jedoch größtenteils AN bzw. GN. Aufgrund der Wasserlöslichkeit besitzen sie zudem eine potentiell hohe Enzymzugänglichkeit. Dadurch eignen sich die Präparate zur enzymatischen Freisetzung großer Mengen verschiedener AN- und GN-OS und zur Anwendung der entwickelten Methoden.

Früchte besitzen oft eine einfache Zellwandarchitektur, da die parenchymatischen Zellen des Fruchtfleisches hauptsächlich Primärzellwände enthalten (McDOUGALL ET AL., 1996). Die NSPS des Apfels wurden als pektinreich mit relativ hohen Anteilen an AN und GN beschrieben (RENARD & THIBAUT, 1993; SCHOLS ET AL., 1995b; PENA & CARPITA, 2004). Aufgrund der einfachen Zellwandarchitektur sollten beide Polysaccharidgruppen eine gute enzymatische Zugänglichkeit bzw. Spaltbarkeit besitzen. Damit stellen Apfel-NSPS ein gutes Modellsupstrat für die Methodenentwicklung und Anwendung dar. Neben einer Apfelprobe zur Entwicklung und Anwendung der Profilingmethoden, wurde eine weitere Apfelprobe direkt nach Kauf sowie nach dreiwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur aufgearbeitet. Diese Proben wurden verwendet, um zu evaluieren, ob die bisher beschriebenen, lagerbedingten Strukturveränderungen der AN und GN (PENA & CARPITA, 2004) nach einer alternativen Aufarbeitung durch die entwickelten Methoden detektiert werden können. Von den verwendeten Äpfeln wurde jeweils nur das Fruchtfleisch ohne Schale und Kerngehäuse verwendet.

Amaranth, Quinoa und Buchweizen sind dikotyle Pflanzen mit stärkehaltigen Samen, weshalb sie als Pseudocerealien bezeichnet werden. Da die Samen kein Gluten, aber dennoch einen hohen Gehalt an Proteinen mit einer ernährungsphysiologisch günstigen Aminosäurezusam-

mensetzung besitzen, haben sie in den letzten Jahren ein verstärktes Interesse von Industrie und Verbrauchern erlangt (ALVAREZ-JUBETE ET AL., 2010). In verschiedenen Studien hat sich für Amaranth und Quinoa bereits angedeutet, dass höhere Mengen an AN bzw. GN vorhanden sind (BUNZEL ET AL., 2005; CORDEIRO ET AL., 2012; LAMOTHE ET AL., 2015), während über die Zellwandzusammensetzung von Buchweizen nichts genaueres bekannt ist. Amaranth und Quinoa gehören zur Familie der *Amaranthaceae* und Buchweizen zur Familie der *Polygonaceae*. Damit sind sie Teil der Ordnung der Caryophyllales und könnten größere Mengen pektingebundener FS enthalten (HARTLEY & HARRIS, 1981). Aus Amaranth-Samen konnten bereits einige FS-OS isoliert und charakterisiert werden (BUNZEL ET AL., 2005).

ZRS sind ein Restprodukt der Saccharosegewinnung aus Zuckerrübe, bei welcher die Zuckerrüben gehäckselt und mit heißem Wasser extrahiert werden. Dadurch wird die Saccharose herausgelöst und es bleiben hauptsächlich die pflanzlichen Zellwände zurück, weshalb ZRS einen hohen Gehalt an NSPS aufweisen. Die NSPS sind reich an Pektinen, welche einen hohen Anteil an AN und geringere Mengen an GN besitzen (RENARD & THIBAUT, 1993; MICARD ET AL., 1996; OOSTERVELD ET AL., 1996). Es wurde bereits gezeigt, dass ZRS-AN einen hohen Verzweigungsgrad und komplexere Strukturen aufweisen können (OOSTERVELD ET AL., 1996; WESTPHAL ET AL., 2010a). Zudem können, wie durch die Isolierung und Charakterisierung verschiedener FS-OS gezeigt, größere Mengen FS an die AN und GN der Zuckerrübe gebunden sein (COLQUHOUN ET AL., 1994; MICARD ET AL., 1996).

SES ist der nach der Sojaölgewinnung verbleibende Rückstand und stellt damit ebenfalls ein Restprodukt der Lebensmittelindustrie dar. Die NSPS von Sojabohnen wurden bereits in einigen Studien untersucht, wobei ein hoher Anteil an GN mit seltenen Strukturelementen wie terminalen Arap gefunden wurde (HUISMAN ET AL., 1998, 2001b).

Details zu den verwendeten pflanzlichen Rohstoffen und deren Vorbereitung für die Analyse sind in Abschnitt 8.1 beschrieben.

3.2 Aufarbeitung der pflanzlichen Rohstoffe

Die meisten pflanzlichen Rohstoffe enthalten im Rohzustand größere Mengen an Monosacchariden und/oder oligo- und polymeren Nicht-Zellwand-PS. Da diese Substanzen die nachfolgenden Analysen teilweise stören, müssen sie vor der Untersuchung der NSPS entfernt werden.

3.2.1 Ballaststoffisolierung

Zur Aufarbeitung der pflanzlichen Rohstoffe wurde einerseits die Isolierung der Ballaststoffe verwendet, da dies ein etabliertes Verfahren zur größtenteils zerstörungsfreien Isolierung

von NSPS darstellt. Bei dieser Methode werden Stärke und ein großer Anteil der Proteine durch einen enzymatischen Abbau und niedermolekulare Substanzen durch Waschen mit Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) entfernt. Meist wird, basierend auf der Löslichkeit in der für den enzymatischen Verdau verwendeten wässrigen Pufferlösung, eine Unterteilung in unlösliche Ballaststoffe (UBS) und lösliche Ballaststoffe (LBS) vorgenommen. Diese Einteilung ist jedoch nicht mit allgemein gültigen strukturellen oder funktionellen Eigenschaften der enthaltenen NSPS verknüpft.

Zu den Ballaststoffen werden alle PS gezählt, die gegenüber der Verdauung in Magen und Dünndarm resistent sind und positive ernährungsphysiologische Eigenschaften besitzen (AACCC, 2001). In den frühen Jahren der Ballaststoffforschung lag der Fokus auf den NSPS. Dementsprechend wurden Methoden entwickelt, bei denen Stärke möglichst vollständig abgebaut wird (TROWELL ET AL., 1976; PROSKY ET AL., 1988). Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass resistente Stärke ebenfalls die oben genannten Kriterien erfüllt und somit als Ballaststoffe klassifiziert werden kann (CHAMP ET AL., 2003b). Daher wurden neue Analysemethoden entwickelt, die darauf abzielen den Stärkeabbau im menschlichen Dünndarm zu imitieren und resistente Stärke sowie niedermolekulare OS mit zu erfassen (McCLEARY ET AL., 2010, 2015). Eine Erfassung dieser Bestandteile ist für die Charakterisierung der AN und GN jedoch nicht von Interesse. Daher wurde für eine präparative Isolierung der Ballaststoffe die von PROSKY ET AL. (1988) beschriebene Methode, jedoch mit größeren Mengen an pflanzlichen Ausgangsmaterialien und kostengünstigeren Enzympräparaten verwendet (siehe Abschnitt 8.1.1). Durch die bei diesem Verfahren verwendeten hohen Temperaturen in Kombination mit der thermostabilen α -Amylase sollte ein nahezu vollständiger Stärkeabbau erreicht werden, so dass lediglich die NSPS der pflanzlichen Zellwand zurückbleiben.

3.2.2 Isolierung der Nicht-Stärke-Polysaccharide

Zur Analyse der NSPS vor und nach der Lagerung von Äpfeln wurde ein weiterer Probenaufarbeitungsansatz erarbeitet und durch Anwendung der konventionellen und der entwickelten Methoden auf seine Eignung als alternative Methode der Probenaufarbeitung überprüft. Diese alternative Isolierungsmethode sollte für eine zeitsparende Durchführung und eine möglichst vollständige Analyse nativer NSPS-Strukturen optimiert werden, da die Ballaststoffisolierung diesbezüglich einige Nachteile aufweist. So könnte der bei der Ballaststoffisolierung verwendete Proteinabbau durch den Abbau von Strukturproteinen zwar die enzymatische Zugänglichkeit der NSPS verbessern, jedoch sollten sich die Proteine nicht störend auf die Strukturcharakterisierung der NSPS auswirken. Zudem können die bei der Ballaststoffisolierung verwendeten Enzyme sowie Puffersalze bei der Isolierung der LBS ausfallen, was in einem hohen Anteil an Begleitstoffen resultiert. Des Weiteren ist die Unterteilung von UBS und LBS für eine Strukturanalyse von NSPS nicht immer sinnvoll bzw. notwendig und die relativ langen Inkubationszeiten

könnten zu einer partiellen Depolymerisation mancher PS führen.

Um diese Faktoren zu berücksichtigen, wurde ein verkürzter modifizierter Stärkeabbau angewendet. Zunächst wurden, um eine Beeinflussung des pH-Werts im Inkubationsansatz zu minimieren, organische Säuren und andere niedermolekulare Bestandteile durch Waschen mit Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) entfernt. Anschließend wurde lediglich ein kurzer enzymatischer Verdau mit einer erhöhten Menge thermostabiler α -Amylase und Amyloglucosidase in Wasser durchgeführt, wobei Enzyme mit der höchstmöglichen Reinheit verwendet wurden. Die durch die Behandlung gelösten PS wurden durch Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) ausgefällt und der durch Zentrifugation erhaltene Rückstand wurde als NSPS verwendet (siehe Abschnitt 8.1.2).

3.2.3 Extraktionsmethoden

Nach Entfernung niedermolekularer Bestandteile bzw. nach einem Stärkeabbau liegt meist ein komplexes, größtenteils unlösliches PS-Netzwerk vor. Zur partiellen Solubilisierung der PS existiert eine Vielzahl an Extraktionsmethoden (REDGWELL & SELVENDRAN, 1986; REDGWELL ET AL., 1990; RENARD, 2005). Die Extraktion wird dabei oft schrittweise mit einer Reihe an wässrigen Extraktionsmitteln durchgeführt, wobei Chelatoren wie 1,2-Diaminocyclohexantetraessigsäure (CDTA), schwache Basen wie Na_2CO_3 und starke Basen wie KOH in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine möglichst vollständige Charakterisierung der NSPS angestrebt, weshalb eine Fraktionierung der NSPS mit mehreren Extraktionsmitteln nicht sinnvoll gewesen wäre. Zur Isolierung von Standardsubstanzen bzw. zur enzymatischen Spaltung der NSPS war jedoch beim Vorliegen sehr komplexer Zellwandstrukturen eine Auflockerung bzw. eine teilweise Hydrolyse des Zellkomplexes notwendig. Die zur Extraktion von Pektinen oft angewandte Extraktion mit schwachen Säuren wurde nicht verwendet, da sie zu einer partiellen Hydrolyse der AN-Ketten führt (GUILLON & THIBAUT, 1989). Eine Extraktion mit Chelatoren wie CDTA resultiert meist in einer sehr geringen Solubilisierung, während für die in sequentiellen Extraktionen meist als letzten Schritt angewandte basische Extraktion relativ hohe Ausbeuten an AN-PS beschrieben wurden (OOSTERVELD ET AL., 1996). Hierbei erfolgt die Freisetzung der Pektinseitenketten bzw. des RG-I wahrscheinlich aufgrund der β -Eliminierung der HG-Ketten. Daher wurde teilweise vor der enzymatischen AN-Hydrolyse eine $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Extraktion verwendet (siehe Abschnitt 8.3.1). Diese Methode wurde ebenfalls als sehr effektiv für die AN-Extraktion beschrieben (McCLEARY ET AL., 1991).

Die Verwendung stark salzhaltiger Lösungen in Kombination mit hohen Temperaturen hat jedoch den Nachteil, dass eine teilweise Modifikation mancher PS stattfinden kann und dass große Salzmengen in den Extraktionsansatz eingebracht werden. Die hohe Ionenkonzentration kann die Aktivität der zur Spaltung verwendeten Enzyme stark einschränken oder komplett verhindern. Zur Kohlenhydratanalytik oft verwendete chromatographische Techniken wie HPAEC-PAD sind ebenfalls anfällig gegenüber größeren Mengen an Fremdionen, da diese zu

Retentionszeitverschiebungen und einer Veränderung des Response führen können. Eine Entfernung der Ionen kann beispielsweise durch Dialyse erfolgen, wobei je nach Ausschlussvolumen ein Teil der PS verloren geht. Bei der Verwendung von Ionenaustauscherharzen ist es notwendig, den unlöslichen Rückstand zunächst durch Zentrifugation zu entfernen und nach Entsalzung wieder hinzuzufügen. Somit ist eine Entfernung von Ionen nur mit einem deutlich erhöhten Arbeitsaufwand möglich. Dagegen kann die von OOSTERVELD ET AL. (1996) beschriebene Autoklavenextraktion in Wasser durchgeführt werden und führt ebenfalls zu einer hohen Solubilisierung von PS. Bei dieser Extraktion werden die Proben in Wasser suspendiert und für 40 Minuten bei 121°C autoklaviert. Da die Probe vor weiteren Analyseschritten lediglich abgekühlt werden muss, ist diese Methode am besten für die Anwendung in Routinemethoden geeignet (siehe Abschnitt 8.6 und Abschnitt 8.7). Zudem wurde das Verfahren im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls im präparativen Maßstab zur Erhöhung der Ausbeute angewendet (siehe Abschnitt 8.3.1).

3.3 Charakterisierung von Nicht-Stärke-Polysacchariden

3.3.1 Monosaccharidzusammensetzung

Durch die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung lassen sich erste Rückschlüsse auf die vorhandenen PS ziehen. Zur Spaltung der glykosidischen Bindungen werden meist verschiedene saure Hydrolysemethoden angewendet, welche jeweils Vor- und Nachteile aufweisen. Durch die von SAEMAN ET AL. (1945) beschriebene Schwefelsäurehydrolyse können alle neutralen Polysaccharide inklusive kristalliner Cellulose hydrolysiert werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass durch diese Hydrolysemethode Polyuronsäuren und Desoxyhexosen teilweise unterbestimmt werden (DE RUITER ET AL., 1992; WILLFÖR ET AL., 2009). Da der Anteil an Uronsäuren wichtige Rückschlüsse auf die vorhandenen Pektinstrukturen liefern kann, wurde zusätzliche eine Methanolyse zur Spaltung der PS-Präparate eingesetzt. Für diese Methode wurde beschrieben, dass sie sehr gut zur Spaltung von löslichen, Uronsäure-enthaltenden PS geeignet ist (DE RUITER ET AL., 1992; WILLFÖR ET AL., 2009). Jedoch werden bei der Anwendung dieser Methode auf unlösliche Proben kristalline PS unterbestimmt (WILLFÖR ET AL., 2009). Daher wurde zur Analyse der unlöslichen PS-Präparate sowohl eine H₂SO₄-Hydrolyse als auch eine Methanolyse verwendet, während für die löslichen PS-Präparate lediglich eine Methanolyse verwendet wurde.

Die Analyse der freigesetzten Monosaccharide kann durch verschiedene chromatographische Methoden erfolgen, wobei die GC ein gut etabliertes Verfahren darstellt (ALBERSHEIM ET AL., 1967; BLAKENEY ET AL., 1983; PETTOLINO ET AL., 2012). Jedoch muss vor der GC-Messung eine zeitaufwändige Derivatisierung erfolgen. Zudem ist eine Analyse der Uronsäuren lediglich

nach einer vorherigen Reduktion der Carboxygruppe möglich, was einen weiteren Arbeitsschritt darstellt. Daher wurde für die Analyse der Hydrolysate die HPAEC-PAD gewählt, mit der underivatisierte Monosaccharide inklusive der Uronsäuren getrennt und empfindlich quantifiziert werden können (siehe Abschnitt 8.2.1). Bei Anwendung der H_2SO_4 -Hydrolyse können die Monosaccharide nach Neutralisation und Verdünnung direkt analysiert werden (siehe Abschnitt 8.2.1.1). Die durch die Methanolyse erhaltenen Methylglykoside müssen für die HPAEC-PAD-Analyse zu Monosacchariden gespalten werden. Dies wurde, wie von DE RUITER ET AL. (1992) vorgeschlagen, durch eine Hydrolyse mit 2 M Trifluoressigsäure (TFA) erreicht (siehe Abschnitt 8.2.1.2).

3.3.2 Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse, deren Prinzip in Abschnitt 1.4 beschrieben ist, hat sich als Standardmethode zur Betrachtung von PS-Bindungsverhältnissen etabliert. Eine Permethylierung von PS kann, jeweils unter Verwendung von Methyljodid, entweder mit Methylsulfinyl-Carbanionen in Dimethylsulfoxid (DMSO) nach HAKOMORI (1964) oder mit pulverisiertem Natriumhydroxid in DMSO nach CIUCANU & KEREK (1984) erfolgen. Die Verwendung des Methylsulfinyl-Carbanions ist methodisch aufwändig und resultiert in einer erhöhten Anzahl an Nebenprodukten. Zudem können aus dem Methylsulfinyl-Carbanion explosionsgefährliche Nebenprodukte entstehen (PETTOLINO ET AL., 2012). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methylierung mittels Methyljodid unter Verwendung von pulverisiertem Natriumhydroxid mit den von NUNES ET AL. (2008) beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Bei schlechter Quellbarkeit des zu methylierenden Materials kann es zu einer nicht vollständigen Methylierung der PS kommen. Diese Untermethylierung kann am Auftreten hoher Mengen vollacetylierter Zuckeralkohole in der GC-Analyse erkannt werden. Die Erfassung von Uronsäuren mittels Methylierungsanalyse ist zwar möglich, jedoch muss für jede Probe eine Reduktion der Carboxyfunktionen durchgeführt werden (KIM & CARPITA, 1992; PETTOLINO ET AL., 2012). Die GalA der Pektine liegen größtenteils (1→4)-verknüpft vor, lediglich Strukturelemente wie XGA und RG-II könnten 1,3,4-substituierte GalA-Reste enthalten. Da diese PS jedoch nicht im Fokus der Arbeit standen, wurde aufgrund des geringen Informationsgewinns auf eine Reduktion der Uronsäuren verzichtet. Zur Spaltung der permethylierten PS wurde 2 M TFA verwendet, da diese einerseits eine gute Hydrolysekapazität besitzt und andererseits durch Evaporation leicht wieder entfernt werden kann (ALBERSHEIM ET AL., 1967). Nach Entfernung der Säure kann somit direkt eine Reduktion mit Natriumborodeuterid erfolgen. Die durch die Reduktion mit Natriumborodeuterid eingeführte Deuteriummarkierung an C1 ist für die massenspektrometrische Unterscheidung mancher PMAAs notwendig. Beispielweise können durch die Deuteriummarkierung die koeluiierenden PMAAs der 1,2-substituierten Xylp und der 1,4-substituierten Xylp durch die charakteristischen, um eine Masseneinheit verschobenen, Fragmente unterschieden werden (Abbildung 3.1).

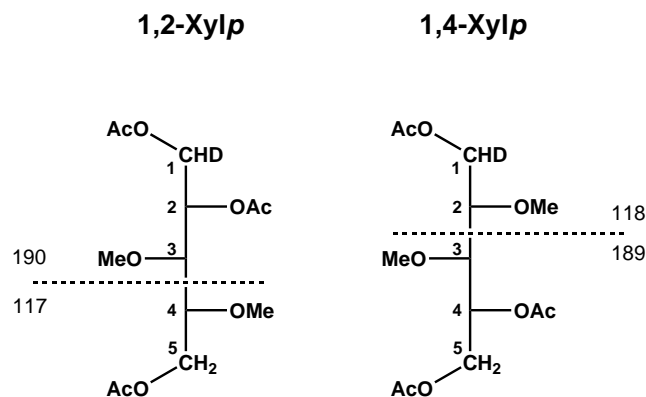


Abbildung 3.1: Entstehung der Hauptfragmente der partiell methylierten Alditolacetate 1,2-substituierter und 1,4-substituierter Xylopyranose (Xylp). Ohne Deuteriummarkierung an C1 würden sich jeweils Fragmente mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 117 und 189 ergeben. Me = Methylrest, Ac = Acetylrest.

Um die Acetylierung der partiell methylierten Zuckeralkohole ohne aufwändige Zwischenschritte durchführen zu können, wurde 1-Methylimidazol als Katalysator eingesetzt (BLAKENEY ET AL., 1983). Da für die Identifizierung der PMAAs keine Standardsubstanzen zur Verfügung standen, wurden die PMAAs durch ihre GC-Retentionszeit und ihre MS-Fragmentierung zugeordnet. Dies ist möglich, da eine Spaltung der PMAAs bevorzugt zwischen zwei Methoxygruppen-tragenden Kohlenstoffen bzw. Kohlenstoffen, die eine Methoxygruppe und eine Acetoxygruppe tragen, stattfindet. Zudem können aus den Primärfragmenten charakteristische Sekundärfragmente entstehen, wodurch sich je nach Substitution charakteristische Fragmentierungsmuster ergeben (BJÖRNDAL ET AL., 1967). Die Zuordnung der PMAAs erfolgte durch den Vergleich mit den durch die Analyse von bekannten OS bzw. PS erhaltenen Daten und mithilfe von Literaturdaten (BJÖRNDAL ET AL., 1967; CCRC, 2016). Durch eine GC-FID-Analyse unter gleichen chromatographischen Bedingungen wie bei der GC-MS und durch Verwendung der von SWEET ET AL. (1975) beschriebenen Korrekturfaktoren konnten schließlich die Verhältnisse der vorher identifizierten PMAAs errechnet werden. Die genaue Durchführung der Analyse ist in Abschnitt 8.2.2 beschrieben.

3.3.3 Ferulasäurebestimmung

Zur Freisetzung der zellwandassoziierten Hydroxyzimtsäuren und DFS hat sich eine Verseifung mit Natriumhydroxid als Standardverfahren etabliert. Dabei wird meist eine Hydrolyse mit 2 M NaOH verwendet, welche sich als geeignet zur Freisetzung estergebundener FS gezeigt hat (PARKER ET AL., 2005). Es existieren einige Methoden zur Analyse der freigesetzten Hydroxyzimtsäuren und DFS mittels GC, da durch die GC eine gute Trennung aller monomeren und

dimeren Substanzen erreicht wird (PACKERT & STEINHART, 1995; RENGER & STEINHART, 2000; BUNZEL ET AL., 2001). Jedoch erfordert die GC-Analyse eine Derivatisierung, während mittels HPLC ebenfalls eine gute Trennung ohne vorherige Derivatisierung erreicht wird. Daher wurde die von DOBBERSTEIN & BUNZEL (2010) beschriebene HPLC-Diodenarray-Detektor (DAD)-Methode verwendet. Bei dieser Methode werden die relativen Responsefaktoren (RRFs) der Hydroxymethylsäuren zu Kaffeesäure bzw. die RRFs der DFS zu monomethylierter-5-5-DFS verwendet, um die Gehalte an Hydroxymethylsäuren und DFS zu bestimmen. Falls das zu analysierende Probenmaterial keine Kaffeesäure enthält, können somit sowohl die monomeren Hydroxymethylsäuren als auch die DFS im selben Hydrolyseansatz bestimmt werden. Da jedoch in manchen Materialien kleinere Mengen an Kaffeesäure enthalten waren, wurde bei diesen Proben stattdessen *ortho*-Cumarsäure als interner Standard verwendet. Allerdings eluiert *ortho*-Cumarsäure sehr nahe an den 8-8-verknüpften DFS, weshalb bei Verwendung dieser Standardsubstanz getrennte Hydrolyseansätze durchgeführt werden müssen. Die Durchführung und die jeweiligen chromatographischen Bedingungen sind in Abschnitt 8.2.3 aufgeführt. Für die Angabe der Gehalte wurden die UBS um ihren Asche- bzw. Proteingehalt korrigiert (siehe Abschnitt 8.1.1).

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden

3.4.1 Freisetzung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

Da in den verwendeten Substraten bzw. Materialien eine Vielzahl an verschiedenen PS vorliegen, wurde eine enzymatische Behandlung für die Freisetzung von OS gewählt. Eine saure Hydrolyse würde in einer Vielzahl an zufälligen und teilweise chromatographisch nicht-trennbaren Produkten resultieren. Für die Freisetzung und Isolierung von AN-OS wurde von WESTPHAL ET AL. (2010a) bereits *endo*-Arabinanase in Kombination mit Arabinofuranosidasen bzw. *exo*-Arabinanasen verwendet. Durch diese Enzyme wurden Seitenketten- und Rückgrat-Ara teilweise abgespalten und die verbliebenen verzweigten Strukturen wurden charakterisiert (WESTPHAL ET AL., 2010a). Jedoch ist eine Abspaltung von Seitenketten- und/oder Rückgrat-Ara abhängig von den verwendeten *exo*-Enzymen und ist meist nicht komplett spezifisch für eine bestimmte glykosidische Bindung (ROMBOUTS ET AL., 1988; BELDMAN ET AL., 1993; KÜHNEL ET AL., 2010). Diese unspezifische Abspaltung von Ara-Einheiten stellt somit einen großen Nachteil des Einsatzes von *exo*-Enzymen in der Routineanalytik nativer Strukturelemente dar.

Für (1→4)-verknüpfte GN spaltende *endo*-Galactanasen wurde beschrieben, dass Typ II GN durch diese Enzyme nicht gespalten werden können (VAN DE VIS ET AL., 1991; YAMAGUCHI ET AL., 1995; LUONTERI ET AL., 2003). Daher sollten diese Enzyme zur spezifischen Freisetzung und Analyse von (1→4)-verknüpften GN geeignet sein. Durch die Verwendung von Kombina-

tionen aus *endo*-Galactanase und Galactosidase wurden bereits eine Vielzahl von potentiellen GN-OS freigesetzt (HUISMAN ET AL., 1999, 2001a). Dabei deutete sich ebenfalls ein zusätzlicher Abbau von GN-OS durch die Verwendung der Galactosidase an (HUISMAN ET AL., 1999).

Um den teilweise unspezifischen Abbau von Seitenketten oder anderen Substituenten durch *exo*-Enzyme zu vermeiden, wurden lediglich *endo*-Enzyme für die Spaltung und Analyse von AN- und GN-OS verwendet (siehe Abschnitt 8.6 und Abschnitt 8.7). Die Isolierung von geeigneten Standardsubstanzen für die zu entwickelnden Methoden erfolgte ebenfalls meist unter Verwendung von *endo*-Enzymen (siehe Abschnitt 8.3.1). Jedoch wurden teilweise auch *exo*-Enzyme für eine präparative Isolierung angewendet, da deren Verwendung teilweise in einer deutlichen Erhöhung der Ausbeute resultierte. Um die Entstehung von Nebenprodukten einzuschränken, wurden dabei allerdings Substrate mit entsprechender Reinheit verwendet. Teilweise wurden Anionenaustauscher angewendet um geladene Nebenprodukte wie HG-OS aus dem enzymatischen Hydrolysat zu entfernen (siehe Abschnitt 8.3.1).

3.4.2 Isolierung und Aufreinigung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

Durch die enzymatische Spaltung der verschiedenen Materialien werden Mischungen von Monosacchariden, OS und nicht gespaltenen PS erhalten. Nach Aufkonzentrierung der Hydrolyseansätze ergaben sich durch den hohen Gehalt dieser Substanzen meist Lösungen hoher Viskosität, welche daher nicht direkt mittels HPLC fraktioniert werden konnten. Durch eine Vorfraktionierung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) können die OS basierend auf ihrem Polymerisationsgrad in verschiedene Fraktionen aufgeteilt werden, welche anschließend mittels HPLC aufgereinigt werden können. Für eine Trennung von OS-Gemischen nach hydrodynamischen Volumen wird oft Bio-Gel P-2 als stationäre Phase verwendet, welches einen zur Trennung von OS geeigneten Trennbereich aufweist (HUISMAN ET AL., 2001a; HINZ ET AL., 2005; WESTPHAL ET AL., 2010a). So ist durch Verwendung dieses Materials eine grobe Trennung großer Mengen Hydrolysat in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 2000 - 200 Dalton möglich. Aufgrund der geringen Auflösung sind meist in allen Fraktionen mehrere Substanzen bzw. Verunreinigungen vorhanden, was eine weitere Aufreinigung mittels HPLC erfordert. Die zur GPC verwendeten Bedingungen sind in Abschnitt 8.3.2 beschrieben.

Eine Trennung von OS kann durch verschiedene HPLC-Techniken bzw. stationäre Phasen erreicht werden, jedoch eignen sich nur wenige Methoden auch für eine präparative Fraktionierung von AN- und GN-OS. Limitierend ist beispielsweise die Eignung bzw. die Verfügbarkeit von (semi)präparativen Säulen, die in ihrer Anschaffung meist sehr teuer sind. Alternativ können auch analytische Säulen zur Aufreinigung von Hydrolysaten bzw. OS verwendet werden. Dabei müssen aufgrund der geringeren Trennkapazität jedoch meist mehrere Injektionen vorgenommen werden. Durch die Verwendung eines Autosamplers und eines programmierten

Fraktionensammlern können solche Fraktionierungen mit einem angemessenen Zeitaufwand durchgeführt werden. Die semipräparative Fraktionierung von OS setzt zudem eine ausreichende Löslichkeit dieser im für die Injektion verwendeten Lösungsmittel(gemisch) voraus. So sind größere Mengen an OS bei höheren Anteilen an organischen Lösungsmitteln meist nicht mehr löslich. Werden geringere Probenmengen eingesetzt, müssen entsprechend empfindlichere Detektionsmethoden verwendet werden. Während eine Refractive Index (RI)-Detektion für große Mengen gut geeignet ist, können kleinere Mengen meist nur durch normalerweise nicht für präparative Zwecke geeignete Detektionsmethoden wie MS oder ELSD detektiert werden. Bei Verwendung dieser Techniken muss der Fluss vor dem Detektoreingang entsprechend geteilt werden. Die Mutarotation reduzierender OS kann ein weiterer wichtiger Faktor bei einer HPLC-Trennung von OS für viele stationäre Phasen sein. Insbesondere die α - und β -Anomere der bevorzugten Ringform der reduzierenden Einheit der OS können ein unterschiedliches Retentionsverhalten zeigen und so breite oder aufgespaltene Peaks verursachen.

Für eine Analyse von OS wird oft die HPAEC-PAD angewendet. Gründe hierfür sind die bis in einen hohen Molekulargewichtsbereich sehr gute Trennleistung und die gleichzeitig sehr empfindliche Detektion von OS. Da durch die stark basischen Bedingungen die Mutarotation an den reduzierenden Enden der OS sehr schnell verläuft, haben die α - und β -Anomere bei dieser Technik keinen Einfluss auf die Peakbreite und es werden in der Regel sehr schmale Peaks erhalten. Dennoch wird die HPAEC-PAD aufgrund einiger limitierender Faktoren nur selten zur präparativen Fraktionierung von OS verwendet (AN ET AL., 1994a; HUISMAN ET AL., 2001a). Einerseits stellen die durch die Eluenten generierten hohen Salzgehalte der Fraktionen einen großen Nachteil dar. Die Salze müssen entweder online durch entsprechende Entsalzermembranen oder nach der Fraktionierung durch Ionenaustauscherharze wieder entfernt werden. Zudem sind semipräparative HPAEC-PAD-Säulen oft sehr teuer in der Anschaffung. Eine Alternative stellt die Fraktionierung auf analytischen Säulen dar, welche jedoch aufgrund der geringen Kapazität der Säulen und der zusätzlich nötigen Entsalzung nur unter großem Zeitaufwand durchführbar ist. Daher wurde die HPAEC-PAD nicht für die Aufreinigung der Hydrolysate bzw. der OS verwendet. Jedoch wurde sie aufgrund der vielen Vorteile sowohl für das chromatographische Profiling von AN- und GN-OS (siehe Abschnitt 8.6) als auch zur Überprüfung der Reinheit von aufgereinigten OS verwendet.

Von HICKS & SONDEY (1987) wurde eine C18-Phase mit reinem Wasser als Eluenten für die semipräparative Isolierung von Malto-OS verwendet. Für viele AN- und GN-OS konnte durch Verwendung einer semipräparativen C18-Säule ebenfalls eine gute Trennung erreicht werden. Da die OS für diese Technik lediglich in Wasser ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln gelöst werden mussten, konnten größere Mengen an OS gelöst und getrennt werden. Dadurch war eine RI-Detektion möglich und die OS-Gemische konnten meist in nur einem Lauf fraktioniert werden. Das Elutionsverhalten der verschiedenen OS kann bei dieser Technik lediglich durch die Säulentemperatur beeinflusst werden. Für GN-OS war aufgrund der relativ niedrigen Retention meist eine niedrige Temperatur von 5 - 10°C notwendig, während AN-OS aufgrund

der höheren Retention bei 20 - 40°C getrennt wurden. Nachteile dieser Technik stellen die relativ breiten Peaks sowie die teilweise starke Auftrennung der α - und β -Anomere der OS dar. Manche Substanzen konnten durch die verwendete semipräparative C18-Säule nicht oder nur in unzureichender Reinheit getrennt werden, so dass für die Verwendung als Standardsubstanz eine weitere Aufreinigung nötig war. Eine andere Selektivität und etwas schmalere Peaks konnten durch Verwendung einer analytischen C18-Phase eines anderen Herstellers erhalten werden. Deshalb wurde diese Säule teilweise für die Fraktionierung von GN-OS verwendet, jedoch konnte für manche AN-OS auch mit dieser Säule keine Trennung erreicht werden. Die chromatographischen Bedingungen der Fraktionierung an C18-Säulen sind in Abschnitt 8.3.3 aufgeführt.

Die Verwendung von HILIC-Säulen wurde ebenfalls als gut geeignet zur Trennung verschiedener OS beschrieben (LEIJDEKKERS ET AL., 2011; REMOROZA ET AL., 2012). Jedoch müssen die zu trennenden OS in einer Mischung mit mindestens 50 % organischem Lösungsmittelanteil gelöst werden. Dadurch können aufgrund der teilweise schlechten Löslichkeit der OS in diesen Lösungsmittelgemischen keine größeren Konzentrationen aufgegeben werden, was den Einsatz als semipräparative Trenntechnik stark limitiert. Da zudem die bei den C18-Phasen auftretenden Trennprobleme durch die verfügbaren HILIC-Phasen nicht gelöst werden konnten, wurde auf die Verwendung dieser Trennsäulen verzichtet.

Zur Trennung von komplexen AN-OS und anderen OS wurde eine Porous Graphitized Carbon (PGC)-Phase als sehr gute Alternative zur HPAEC-PAD beschrieben (WESTPHAL ET AL., 2010b,c). Aufgrund der sehr starken Retention von OS durch das PGC-Material werden Gradienten aus Wasser und einem steigenden Anteil an organischem Lösungsmittel verwendet. Dadurch und aufgrund der niedrigen Flussraten ist die Verwendung von MS-Techniken zur Detektion ebenfalls sehr gut möglich. Daher wurde zusätzlich zur HPAEC-PAD eine PGC-Säule in Kombination mit MSⁿ zur Charakterisierung und zum chromatographischen Nachweis verschiedener OS verwendet (siehe Abschnitt 8.5.2). Für die GN-OS ergaben sich auf einer PGC-Säule im Vergleich zu den C18-Phasen sehr stark verbreiterte Peaks, wodurch der Einsatz als Aufreinigungsmethode für diese OS stark eingeschränkt war. Jedoch war die Verwendung der PGC-Phase für die Trennung bzw. Aufreinigung mancher AN-OS essentiell. Da präparative PGC-Trennsäulen sehr teuer in ihrer Anschaffung sind, wurde eine programmierte PGC-HPLC-ELSD-Fraktionierung auf einer analytischen PGC-Säule durchgeführt (siehe Abschnitt 8.3.3). Durch die Kombination der verschiedenen Trennphasen konnte für alle isolierten Standardsubstanzen eine angemessene Reinheit erzielt werden (mindestens 80 %, meistens > 90 %).

3.4.3 Freisetzung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden

Für eine Freisetzung von Hydroxyzimtsäure-OS werden meist schwache Säuren oder Multi-enzympräparate verwendet. Diese vergleichsweise unspezifischen Hydrolysemethoden kön-

nen angewendet werden, da die Hydroxyzimtsäure-OS aufgrund der unpolaren phenolischen Reste leicht von Monosacchariden oder nicht-veresterten OS abgetrennt werden können. Eine Spaltung der PS mit schwachen Säuren wird hauptsächlich für Arabinoxylane verwendet, da aufgrund der erhöhten Säurelabilität furanosidischer Bindungen die FS-enthaltenden Ara-Seitenketten abgespalten werden (SAULNIER ET AL., 1995; BUNZEL ET AL., 2002; ALLERDINGS ET AL., 2006). Bei Anwendung dieser Hydrolyse auf dikotyle Pflanzen wurden hauptsächlich Substanzen, bei denen die FS an eine Ara gebunden vorliegt, isoliert (COLQUHOUN ET AL., 1994; RALET ET AL., 1994b; BUNZEL ET AL., 2005). Dies ist wahrscheinlich auf eine vollständige Spaltung der AN und einer unvollständigen Spaltung der GN zurückzuführen. Aufgrund der weniger spezifischen und für *p*-gebundene Hydroxyzimtsäuren ineffektiven Freisetzung der Hydroxyzimtsäure-OS durch eine Säurehydrolyse wurde eine enzymatische Spaltung durchgeführt. Dabei wurde zum einen Driselase verwendet, durch welche bereits verschiedene AN- und GN-FS-OS freigesetzt und charakterisiert werden konnten (ISHII & TOBITA, 1993; COLQUHOUN ET AL., 1994; RALET ET AL., 1994a; BUNZEL ET AL., 2005). Dieses Multienzympräparat enthält diverse Zellwand-PS-spaltende Enzyme und gleichzeitig keine Esterase-Aktivität. Somit werden PS effektiv gespalten, während die Bindung zwischen den Hydroxyzimtsäuren und den freigesetzten OS erhalten bleibt. Für eine Hydrolyse sehr großer Mengen an pflanzlichen Ausgangsmaterialien wurde als Alternative zur Driselase das deutlich kostengünstigere Enzympräparat Viscozyme L verwendet. Für diese Enzymmischung wurde bereits eine hohe Effektivität für die Hydrolyse von Mais-Zellwänden sowie die Abwesenheit von Esterase-Aktivität beschrieben (GRABBER ET AL., 1998). In Vorversuchen konnte zudem eine hohe pektinolytische Aktivität und ebenfalls keine Esterase-Aktivität detektiert werden. Daher sollte Viscozyme L sehr gut geeignet sein, um große Mengen an Material zu hydrolysieren. Um die zeitaufwändige Isolierung großer Mengen an UBS zu vermeiden, wurde beim Einsatz von Viscozyme L entweder keine UBS-Isolierung durchgeführt oder ein deutlich vereinfachter Abbau von Stärke und Proteinen angewendet. Bei diesem vereinfachten Ansatz wurde der unlösliche Rückstand, welcher durch die Hydrolyse mit thermostabiler α -Amylase und Protease erhalten wurde, direkt mit Viscozyme L inkubiert. Somit konnten ein Amyloglucosidase-Abbau sowie die Wasch- und Trocknungsschritte eingespart werden. Die Bedingungen der durchgeführten Hydrolysen sind in Abschnitt 8.4.1 aufgeführt.

3.4.4 Isolierung und Aufreinigung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden

Für eine Abtrennung der durch die enzymatische Hydrolyse entstandenen Monosaccharide bzw. nicht-veresterten OS wird meist eine Amberlite XAD-2-Säulenchromatographie durchgeführt (SAULNIER ET AL., 1995; BUNZEL ET AL., 2002, 2005; RALET ET AL., 2005). Dabei wird zunächst eine Amberlite XAD-2-Säule mit dem Hydrolysat beladen, wobei die mit Hydroxyzimtsäuren bzw. DFS veresterten OS an das unpolare Säulenmaterial adsorbiert werden. Nach Aus-

waschung der abzutrennenden Verbindungen mit Wasser werden die adsorbierten OS meist schrittweise mittels Methanol- bzw. Ethanol-Wasser-Mischungen eluiert. Um möglichst alle adsorbierten Substanzen in einer Fraktion zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine Elution mit reinem Methanol durchgeführt (siehe Abschnitt 8.4.1). Zusätzlich wurde als Alternative zu Amberlite XAD-2 silicabasiertes C18-Material verwendet, da dieses Material eine gleichwertige oder bessere Adsorption von Hydroxyzimtsäure-OS gewährleisten sollte (siehe Abschnitt 8.4.1).

Eine Vortrennung der aufgereinigten Hydrolysate wird häufig mittels GPC durchgeführt. Dabei hat sich sowohl für Arabinoxylan-FS-OS als auch für Pektin-FS-OS das Material Sephadex LH-20 etabliert (ISHII & TOBITA, 1993; RALET ET AL., 1994a; SAULNIER ET AL., 1995; BUNZEL ET AL., 2002, 2005; ALLERDINGS ET AL., 2006). Dieses Material besteht aus einem Netzwerk hydroxypropylierter Dextrane. Dadurch basiert die Sephadex LH-20-Trennung einerseits auf der Molekülgröße, andererseits auf den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Material. Daher müssen relativ unpolare Substanzen wie DFS-OS mit Lösungsmittelgemischen aus Wasser und Methanol bzw. Ethanol eluiert werden (SAULNIER ET AL., 1999; LEVIGNE ET AL., 2004b; ALLERDINGS ET AL., 2005; RALET ET AL., 2005; BUNZEL ET AL., 2008). Teilweise werden für eine ergänzende GPC-Trennung Materialien wie Bio-Gel P-2 eingesetzt (RALET ET AL., 1994a; BUNZEL ET AL., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der meist sehr guten Trennung durch Sephadex LH-20 lediglich dieses Material verwendet (siehe Abschnitt 8.4.2). Zur Entfernung von Verunreinigungen wurden die Sephadex-Fractionen auf einer semipräparativen C18-Säule fraktioniert, welche bereits als gut geeignet zur Fraktionierung von Pektin-FS-OS beschrieben wurde (BUNZEL ET AL., 2005). Durch Anwendung der semipräparativen HPLC konnte somit eine deutlich schnellere Aufreinigung erzielt werden als durch eine erneute GPC-Trennung. Die zur Aufreinigung verwendeten chromatographischen Bedingungen sind in Abschnitt 8.4.3 aufgeführt. Aufgrund der guten Trennung wurde für das chromatographische Profiling der Hydroxyzimtsäure-OS ebenfalls eine RP-Säule verwendet (siehe Abschnitt 8.8).

3.5 Strukturcharakterisierung und Analyse von Oligosacchariden

3.5.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung von Oligosacchariden

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der HPAEC-PAD kann die Monosaccharidzusammensetzung von AN- und GN-OS nach Hydrolyse sehr kleiner OS-Mengen bestimmt werden. Zudem ist aufgrund der guten Löslichkeit und der Abwesenheit von Uronsäuren eine kurze Hydrolyse mit 2 M TFA zur Spaltung der AN- und GN-OS ausreichend. Jedoch wird mit dieser Methode keiner-

lei Information über die Konfiguration der Monosaccharide erhalten. Allerdings kann beispielsweise Gal sowohl in Arabinoxylanen als auch in RG-I in der L- und D-Konfiguration vorliegen (ALLERDINGS ET AL., 2006; NARAN ET AL., 2008). Daher wurde zusätzlich zur Monosaccharidzusammensetzung die Konfiguration der Monosaccharide bestimmt. Die Trennung der jeweiligen Enantiomere kann durch die Verwendung einer chiralen GC-Säule erreicht werden (ALLERDINGS ET AL., 2006). Alternativ können die Enantiomere durch Derivatisierung mit einem chiralen Reagenz in Diastereomere überführt werden, welche auf einer nicht-chiralen Säule getrennt werden können. Da die Derivatisierung sehr einfach mit einem Aliquot des TFA-Hydrolysats durchgeführt werden kann und um die Anschaffung einer chiralen GC-Säule zu vermeiden, wurde diese Variante gewählt. Als chirales Derivatisierungsreagenz wurde, wie bereits von LEONTEIN ET AL. (1978) beschrieben, (*R*)-2-Octanol verwendet. Zur GC-Analyse wurden die Octyl-Glykoside silyliert, da dies in einer besseren Trennung als eine Acetylierung resultierte. Die zur Monosaccharidanalyse von OS verwendeten Bedingungen sind in Abschnitt 8.5.1 beschrieben.

3.5.2 Analyse mittels Massenspektrometrie

Durch eine HPLC-MS-Analyse kann bei ausreichender Trennung zunächst auf das Molekulargewicht der OS geschlossen werden. Zusammen mit der Monosaccharidzusammensetzung sind so meist Rückschlüsse auf den Polymerisationsgrad und, falls vorhanden, auf das Molekulargewicht von Nicht-Kohlenhydrat-Substituenten möglich. Zudem können durch die Anwendung von MSⁿ-Experimenten erste Rückschlüsse auf die Verknüpfung zwischen den Monosaccharid-Einheiten gezogen werden. Generell ist die Fragmentierung von OS sowohl zwischen den Monosaccharid-Einheiten (Spaltung glykosidischer Bindungen) als auch durch die jeweiligen Ringe möglich, was meist in einer Vielzahl an Fragmenten resultiert (DOMON & COSTELLO, 1988). Das Fragmentierungsmuster der OS ist dabei von den verwendeten MS-Bedingungen sowie den bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) anwesenden Salzen abhängig. So ergeben sich beispielsweise für verschiedene Alkaliionen unterschiedliche Ausbeuten an Fragmentationen (CANCILLA ET AL., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lithiumaddukte der nicht-veresterten AN- und GN-OS gemessen. WESTPHAL ET AL. (2010b) konnten durch Messung dieser Addukte bereits zwischen linearen und verzweigten AN-Tetrameren unterscheiden. Dabei zeigten sich zwar stets die gleichen Fragmentationen, jedoch wurden teilweise deutliche Unterschiede in der relativen Intensität der Fragmente festgestellt. Auch bei der Messung der Lithiumaddukte verschieden verknüpfter Hexose-Disaccharide können durch die *m/z*-Verhältnisse der entstandenen Fragmentationen Informationen über die Art der glykosidischen Bindung erhalten werden (HOFMEISTER ET AL., 1991). Bei OS, die aus Hexosen und Pentosen bestehen, kann durch die entsprechenden Fragmentationen auf eine interne oder terminale Stellung der jeweiligen Monosaccharid-Einheiten geschlossen werden (HUISMAN ET AL., 2001a). So sollten terminale Einheiten als einzelne Fragmente abgespalten werden, während Monosaccharide innerhalb des OS

nur mit anderen Monosacchariden zusammen abspaltbar sein sollten. Die durch ein Stoßgas vermittelte MS-Fragmentierung der durch ESI im Negativ-Modus erhaltenen FS- bzw. DFS-OS-Molekülonen kann ebenfalls Rückschlüsse auf deren Struktur liefern (LEVIGNE ET AL., 2004b,a; QUEMENER & RALET, 2004; RALET ET AL., 2005). Für einige der bereits bekannten FS-OS wurde je nach Bindungsposition der FS ein voneinander abweichendes Fragmentmuster erhalten (QUEMENER & RALET, 2004). Durch die Kenntnis der entstandenen Fragmentmuster können somit die Strukturen bekannter OS bestätigt sowie eventuell auch erste Hinweise auf die Struktur unbekannter veresterter OS erhalten werden. Die für die HPLC-MS-Untersuchungen der OS verwendeten Bedingungen sind in Abschnitt 8.5.2 aufgeführt.

3.5.3 Analyse mittels NMR-Spektroskopie

Die Struktur eines OS kann meist nur durch die Verwendung der NMR-Spektroskopie eindeutig bestimmt werden. Durch Methylierungsanalyse bzw. MSⁿ-Analyse können üblicherweise weder alle Bindungsverhältnisse ermittelt noch Informationen über die anomere Konfiguration der einzelnen Monosaccharide erhalten werden. Häufig kann eine vollständige Strukturaufklärung nur durch Kombination von verschiedenen zweidimensionalen NMR-Experimenten und den beschriebenen chromatographischen und massenspektrometrischen Techniken erreicht werden. Für die NMR-Messung von OS ist die Wahl des Lösungsmittels von Bedeutung. AN- und GN-OS sind sowohl in D₂O als auch in DMSO-*d*6 löslich und können dementsprechend in beiden Lösungsmitteln gemessen werden. Bei Verwendung von D₂O werden die Protonen der leicht sauren Hydroxygruppen der OS durch Deuterium ersetzt, wodurch lediglich die Signale der an Kohlenstoffen gebundenen Protonen im ¹H-Experiment detektiert werden. Da der Austausch der Protonen der Hydroxygruppen in DMSO nicht bzw. deutlich langsamer stattfindet, werden hier komplexere Spektren erhalten. Jedoch können die zusätzlichen Signale der unsubstituierten Hydroxygruppen auch einen zusätzlichen Informationsgewinn ergeben, der zur Bestimmung von Substitutionspositionen beitragen kann. Substanzen wie DFS-OS zeigen dagegen oft eine schlechte Löslichkeit in reinen protischen Lösungsmitteln und werden daher meist in Lösungsmittelgemischen gemessen (SAULNIER ET AL., 1999; ALLERDINGS ET AL., 2005; BUNZEL ET AL., 2008).

Das ¹H-Spektrum von OS besitzt oft nur einen begrenzten Informationsgehalt. So ergeben sich für die Signale der meisten Protonen der Monosaccharid-Einheiten komplexe Multipletts, welche sich zusätzlich größtenteils überlagern. Jedoch weisen die Signale der anomeren Protonen häufig eine deutliche Tieffeldverschiebung auf und heben sich dadurch von den Signalen der anderen Protonen ab. Somit können oft die vicinalen Kopplungskonstanten der anomeren Protonen bestimmt werden, deren Größe vom Diederwinkel der koppelnden Protonen abhängig ist (KARPLUS, 1963). Wie in Abbildung 3.2 am Beispiel der α - und β -Galp gezeigt, kann durch die Kopplungskonstante somit eine erste Information über die Konfiguration der anomeren Proto-

nen erhalten werden.

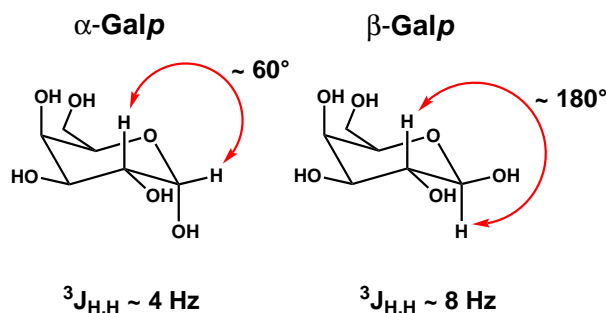


Abbildung 3.2: Kopplungskonstanten der anomeren Protonen von α - bzw. β -Galactopyranose (Galp) in Abhängigkeit vom Diederwinkel.

Da die reduzierende Monosaccharid-Einheit von OS jeweils als α - und β -Anomer vorliegt, wird für die anderen Protonen der reduzierenden Monosaccharid-Einheit jeweils ein α - und ein β -Signal erhalten. Diese Aufspaltung der Signale kann sich auch auf die an die reduzierende Einheit gebundene Monosaccharid-Einheit auswirken, was im Falle des anomeren Protons auch zu dessen Identifizierung genutzt werden kann. Bei Hydroxyzimtsäuren können durch die Kopplungskonstanten der Protonen ebenfalls wichtige Strukturinformationen erhalten werden. So kann durch die Größe der meist gut aufgelösten Kopplungskonstanten bestimmt werden, ob *trans*- bzw. *cis*-Isomere vorliegen und welche Position aromatische Protonen zueinander einnehmen (*ortho*, *meta*, *para*).

Aufgrund der Überlagerung vieler Signale im ^1H -Spektrum können koppelnde Protonen der verschiedenen Monosaccharid-Einheiten meist nur durch die Anwendung zweidimensionaler NMR-Experimente identifiziert werden. Durch die im Correlated Spectroscopy (COSY)-Spektrum auftretenden Kreuzsignale können Kopplungen zwischen benachbarten Protonen deutlich besser erkannt werden als über die Auswertung der Kopplungskonstanten im ^1H -Spektrum. In Abbildung 3.3 sind die in einem COSY-Spektrum theoretisch sichtbaren Kopplungen der mittleren Araf-Einheit eines linearen AN-Trimers gezeigt.

Da das anomere Proton der Monosaccharid-Einheiten aufgrund seiner Tieffeldverschiebung meist gut zu erkennen ist, können ausgehend von diesem Signal schrittweise die anderen Protonen zugeordnet werden. Falls sich jedoch die Signale mehrerer Protonen überlagern bzw. mehrere Kreuzsignale vorhanden sind oder die Kopplungskonstanten zu klein sind, ist diese Zuordnung meist nicht zweifelsfrei möglich. Bei überlagernden Kreuzsignalen kann die Zuordnung der Protonen mithilfe eines Total Correlated Spectroscopy (TOCSY)-Experiments erfolgen oder bestätigt werden, da in diesem Experiment alle Protonen eines Spinsystems miteinander korreliert werden. Im Fall von OS stellt jede Monosaccharid-Einheit ein in sich geschlossenes Spinsystem dar. So wären ausgehend vom anomeren Proton der Araf-Einheit Kreuzsignale zu allen anderen Protonen der Monosaccharid-Einheit zu sehen (siehe Abbildung 3.3).

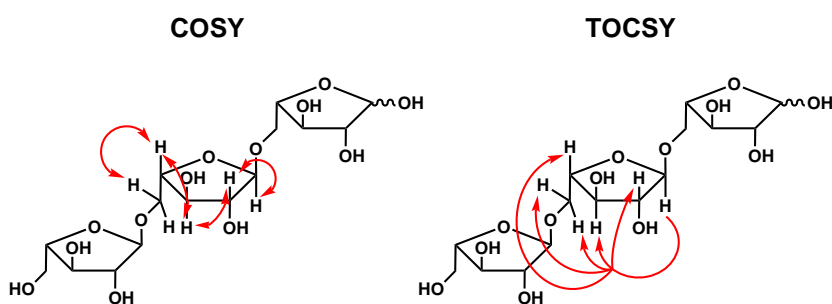


Abbildung 3.3: Beispiele für zur Strukturaufklärung bedeutende Correlated Spectroscopy (COSY)- bzw. Total Correlated Spectroscopy (TOCSY)-Korrelationen innerhalb eines linearen Arabinan-Trimers.

Da in OS an jedem Kohlenstoffatom ein Proton gebunden ist, können sämtliche ^{13}C -Verschiebungen der jeweiligen Kohlenstoffe durch Auswertung eines Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Spektrums bestimmt werden, in dem alle CH-Kopplungen über eine Bindung sichtbar sind ($^1J_{\text{C,H}}$). Die HSQC-Korrelationen werden über die Resonanzen der Protonen gemessen, weshalb ein HSQC-Spektrum in einer deutlich kürzeren Zeit als ein entkoppeltes ^{13}C -Spektrum gemessen werden kann. Um alle HSQC-Signale einer Monosaccharid-Einheit zu identifizieren, können diese durch ein HSQC-TOCSY-Spektrum miteinander korreliert werden. Ein HSQC-TOCSY-Spektrum hat zwar einen gegenüber einem homonuklearen TOCSY-Spektrum deutlich erhöhten Informationsgehalt, jedoch werden auch deutlich höhere Substanzmengen bzw. Messzeiten benötigt.

Eine Verknüpfung zwischen verschiedenen Monosaccharid-Einheiten wird meist bereits durch eine entsprechende Tieffeldverschiebung der Protonen bzw. Kohlenstoffe an der substituierten Position angedeutet. Für eine eindeutige Bestätigung kann ein Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC)-Spektrum aufgenommen werden, in welchem CH-Korrelationen über mehrere Bindungen sichtbar sind ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$). Beispielsweise kann somit für ein lineares AN-Trimer durch die in Abbildung 3.4 gezeigte Korrelation zwischen C5 der mittleren Einheit und H1 der terminalen Einheit eine (1 \rightarrow 5)-Verknüpfung nachgewiesen werden ($^3J_{\text{C,H}}$). Auch die Ringform der Araf-Einheiten ist durch eine Kopplung zwischen C4 und H1 einer Monosaccharid-Einheit ersichtlich ($^3J_{\text{C,H}}$, siehe Abbildung 3.4). Durch Auswertung eines HMBC-Spektrums können zusätzlich die ^{13}C -Verschiebungen von in Hydroxyzimtsäuren vorhandenen quartären Kohlenstoffen bestimmt werden. Außerdem kann durch eine Kopplung zwischen C9 der Hydroxyzimtsäure und dem Proton an der Substitutionsposition der Monosaccharid-Einheit die Bindungsstelle der Hydroxyzimtsäure eindeutig gezeigt werden ($^3J_{\text{C,H}}$, siehe Abbildung 3.4). Der Nachteil eines HMBC-Spektrums ist die relativ geringe Empfindlichkeit, wodurch ausreichende OS-Mengen und lange Messzeiten benötigt werden. Die zur Strukturaufklärung der verschiedenen OS verwendeten Lösungsmittel und NMR-Experimente sind in Abschnitt 8.5.3 aufgeführt.

Die ^1H -NMR-Spektroskopie kann zusätzlich zur Strukturaufklärung auch zur Konzentrations-

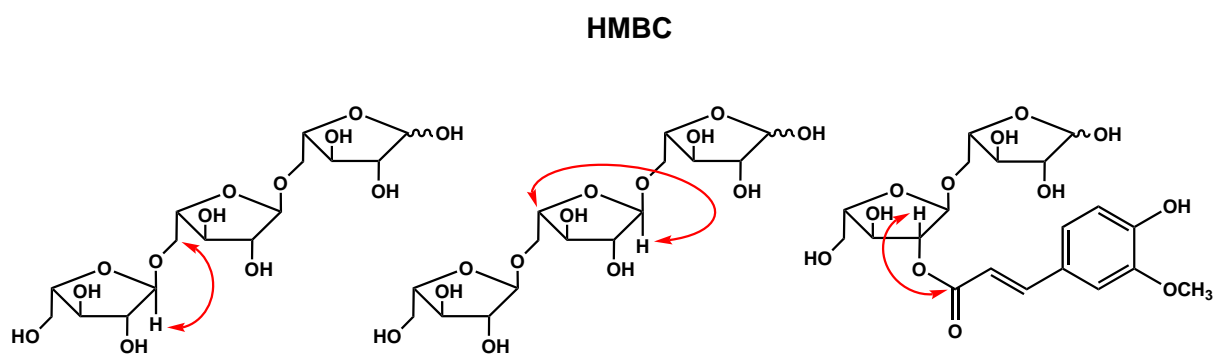


Abbildung 3.4: Beispiele für zur Strukturaufklärung bedeutende Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC)-Korrelationen innerhalb eines linearen Arabinan-Trimers und einer mit Ferulasäure veresterten Arabinobiose.

bestimmung von Substanzen genutzt werden. Die Quantifizierung der Analyten ist hierbei auf verschiedene Arten durchführbar. Zum Beispiel kann in der eindimensionalen ^1H -NMR-Spektroskopie eine externe Kalibrierung mit einem beliebigen Stoff durchgeführt werden, da die Signalintensität für ein Proton unabhängig von der chemischen Struktur ist. Die Nachteile dieses Ansatzes liegen bei der Messung mehrerer zusätzlicher Proben, zudem nimmt die Probenmatrix ebenfalls Einfluss auf die Intensität der Signale. Es kann jedoch auch eine interne Kalibrierung vorgenommen werden. Dazu wird eine bekannte Menge einer Standardsubstanz zur Probe gegeben und die relativen Intensitäten ausgewählter Signale der beiden Substanzen werden bestimmt. Ein zur Konzentrationsbestimmung verwendeter interner Standard sollte eine gute Löslichkeit im verwendeten Lösungsmittel besitzen und dabei für mindestens ein definiertes Proton einen gut integrierbaren Peak ergeben. Zudem sollte er chemisch stabil, nicht hygroskopisch und in sehr reiner Form erhältlich sein. Bei einer quantitativen Messung von NMR-Signalintensitäten ist eine ausreichend lange Relaxationszeit sehr wichtig, welche mindestens fünfmal so groß wie die höchste Relaxationszeit der Probe sein sollte (BHARTI & ROY, 2012). Aufgrund der einfachen Durchführung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein interner Standard zur Konzentrationsbestimmung mittels NMR-Spektroskopie verwendet. Die für die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie verwendeten Bedingungen sind in Abschnitt 8.6 beschrieben.

Bei Gemischen sehr ähnlicher Substanzen kann ein ^1H -Spektrum aufgrund der starken Signalüberlagerung meist nicht zur quantitativen Analyse verwendet werden. Jedoch ist durch die Verwendung zweidimensionaler Experimente eine semiquantitative Abschätzung verschiedener Strukturelemente möglich. Für Lignin wurden bereits einige Ansätze entwickelt, bei denen durch Aufnahme zweidimensionaler NMR-Spektren Aussagen über die Anteile verschiedener Strukturmerkmale getroffen werden können (BUNZEL & RALPH, 2006; MANSFIELD ET AL., 2012). Aufgrund der großen Verschiebungsdifferenzen im ^{13}C -Spektrum und der Erhöhung der Auflösung über die zweite Dimension ist ein HSQC-Spektrum für die Analyse verschiedener Strukturelemente besonders gut geeignet und wurde für die Entwicklung des NMR-spektroskopischen Profilings verwendet (siehe Abschnitt 8.7).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe

Eine erste Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe erfolgte durch HPAEC-PAD-Analyse der Monosaccharide nach Säurehydrolyse. Dabei wurden aufgrund der jeweiligen Vor- und Nachteile (siehe Abschnitt 3.3.1) sowohl die H_2SO_4 -Hydrolyse als auch die Methanolyse zur Spaltung der UBS und NSPS verwendet, während die löslichen PS und die LBS lediglich nach Methanolyse analysiert wurden. Zudem wurden die Verhältnisse der glykosidischen Bindungen mittels Methylierungsanalyse bestimmt, wodurch Rückschlüsse auf die vorhandenen PS und deren Grundstrukturen gezogen werden konnten. Bei den Pflanzen, die zur Ordnung der Caryophyllales gehören und damit potentiell zellwandgebundene FS enthalten, wurden die Hydroxyzimtsäure- und die DFS-Gehalte der UBS quantifiziert.

4.1.1 Lösliche Polysaccharide

Die Zusammensetzung der löslichen AN- und GN-PS ist sowohl für die Isolierung von Standardsubstanzen als auch für die Anwendung der Methoden von großer Bedeutung. Da die verwendeten PS aus AN- bzw. GN-reichen Materialien isoliert wurden (Zuckerrübe bzw. Kartoffel), ist zu erwarten, dass diese Strukturelemente einen Großteil der Präparate stellen. Jedoch könnten ebenso andersartige, mitfreigesetzte PS enthalten sein. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung der löslichen AN-PS.

Der Hauptanteil der PS besteht aus AN-Strukturelementen, während nur kleinere Mengen an (1→4)-verknüpften GN sowie Überreste des RG-I-Rückgrats vorhanden sind. Am Verhältnis zwischen dem PMAA der 1,5-substituierten Araf und den verzweigten Ara-PMAAs ist ersichtlich, dass die AN-PS einen hohen Anteil an Verzweigungen aufweisen, wodurch die gute Löslichkeit der AN-PS begründet sein könnte. Die Verzweigungen liegen hauptsächlich an Position O3 vor, während Substitutionen an Position O2 bzw. an den Positionen O2 und O3 des AN-Rückgrats lediglich in kleineren Anteilen vorkommen. Ein Großteil der terminalen Araf lässt sich auf die an Verzweigungen gebundenen Araf-Reste zurückführen, was auf relativ lange Ketten hindeutet. Da die AN-PS eine große strukturelle Vielfalt zeigen, sind sie sehr gut zur Isolierung von Standardsubstanzen sowie zur Anwendung der entwickelten Methoden geeignet.

Die in Tabelle 4.2 gezeigte Zusammensetzung der löslichen GN-PS weist ebenso einen hohen Anteil an RG-I-assoziierten Monosacchariden auf.

Tabelle 4.1: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse) und Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) der löslichen Arabinan-Polysaccharide. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal.

Monosaccharid	Methanolyse	PMAAs	
Fucose	-		
Rhamnose	6,2	1,2-Rhap	1,0
		1,2,4-Rhap	1,1
Arabinose	73,9	t-Araf	35,6
		1,5-Araf	27,3
		1,3,5-Araf	23,8
		1,2,5-Araf	1,5
		1,2,3,5-Araf	4,5
Galactose	14,1	t-Galp	2,4
		1,4-Galp	1,5
		1,6-Galp	1,2
Glucose	-		
Xylose	-		
Mannose	-		
Galacturonsäure	5,3		
Glucuronsäure	0,5		

Die kleinen Mengen an Glc bzw. Xyl sind hierbei wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Resten an Xyloglucanen begründet, da Xyl lediglich in seiner terminalen Form vorliegt. Neben den Monosacchariden des RG-I-Rückgrats sind laut Monosaccharidzusammensetzung hohe Mengen an Gal und deutlich niedrigere Mengen an Ara vorhanden. Mittels Methylierungsanalyse wurde dagegen ein relativ ähnliches Verhältnis an Ara- und Gal-PMAAs und damit ein zu geringer Gal-Anteil erhalten. Das ebenfalls sehr niedrige Verhältnis zwischen 1,4-substituierter Galp und terminaler Galp hätte eine GN-Kettenlänge von durchschnittlich vier bis fünf Resten zur Folge. Diese Daten deuten eine Unterbestimmung der 1,4-substituierten-Galp durch die Methylierungsanalyse an, was durch die Detektion zu niedriger Anteile dieses Strukturelements in anderen Analysen bestätigt werden konnte. Jedoch konnte durch die entsprechenden PMAAs gezeigt werden, dass lediglich (1→4)-verknüpfte GN und lineare AN-Strukturelemente vorhanden sind. Die kleinen Anteile an terminaler Arap könnten GN-gebunden vorliegen, was durch diese Analysen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden kann.

Tabelle 4.2: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse) und Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) der löslichen Galactan-Polysaccharide. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal.

Monosaccharid	Methanolyse	PMAAs	
Fucose	-		
Rhamnose	5,9	1,2-Rhap	1,6
		1,2,4-Rhap	3,6
Arabinose	10,4	t-Araf	3,9
		1,5-Araf	33,4
		t-Arap	1,8
Galactose	72,4	t-Galp	12,4
		1,4-Galp	42,3
Glucose	1,3		
Xylose	0,4	t-Xylp	1,0
Mannose	-		
Galacturonsäure	9,6		
Glucuronsäure	-		

4.1.2 Unlösliche Ballaststoffe

Aufgrund der großen Heterogenität der PS der pflanzlichen Zellwand ist eine vollständige bzw. eindeutige Zuordnung der Monosaccharide bzw. PMAAs in den UBS nicht immer möglich. Der Pektinkomplex ist ein wichtiger und auch oft quantitativ bedeutender Teil der dikotylen Zellwand und dementsprechend sind in UBS hohe Mengen an Pektinen zu finden. Zudem liegt aufgrund ihrer Unlöslichkeit oft ein hoher Anteil an Cellulose vor. Xyloglucane sind die dominierenden Hemicellulosen in dikotylen Pflanzen, dementsprechend werden sie oft in höheren Mengen gefunden. Zusätzlich können auch kleinere Mengen an Xylanen oder Mannanen vorhanden sein.

4.1.2.1 Apfel

Die Monosaccharidzusammensetzung bzw. die Analyse der PMAAs zeigt, dass neben Cellulose signifikante Mengen an Xyloglucanen in den Apfel-UBS vorhanden sind (Tabelle 4.3). Diesen PS, welche vor allem durch das PMAA der 1,4,6-substituierten Glcp erkannt werden können, ist wahrscheinlich auch ein Großteil der Xyl zuzuordnen, da diese hauptsächlich in terminaler Form vorkommt. Ein Teil der Xyl kann jedoch auch als XGA-Seitenketten bzw. als Xylane vorliegen, worauf vor allem das hohe Xyl/Glc Verhältnis in der Methanolyse hindeutet. Geringere

Tabelle 4.3: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H_2SO_4 -Hydrolyse und Methanolyse) und Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) der unlöslichen Apfel-Ballaststoffe. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal.

Monosaccharid	H_2SO_4	Methanolyse	PMAAs	
Fucose	1,7	3,1		
Rhamnose	1,4	5,0		
			1,2-Rhap	0,3
			1,2,4-Rhap	0,3
Arabinose	17,0	30,7		
			t-Araf	9,5
			1,5-Araf	7,6
			1,3,5-Araf	5,7
			1,2,5-Araf	0,4
			1,2,3,5-Araf	2,4
			t-Arap	0,5
Galactose	9,7	19,1		
			t-Galp	3,1
			1,4-Galp	1,1
			1,6-Galp	0,3
Glucose	43,5	4,1		
			t-Glcp	1,3
			1,4-Glcp	42,2
			1,4,6-Glcp	7,6
Xylose	14,1	17,7		
			t-Xylp	10,5
			1,4-Xylp	1,3
			1,2-Xylp	3,8
Mannose	5,3	2,6		
			t-Manp	0,2
			1,4-Manp	2,1
Galacturonsäure	7,3	17,2		
Glucuronsäure	-	0,5		

Anteile linearer, (1→4)-verknüpfter Mannane sind ebenfalls Bestandteil der Apfel-UBS. Das Verhältnis zwischen GalA und Rha in der Methanolyse deutet auf relativ RG-I-reiche Pektine hin, die zudem an rund 50 % der Rha-Reste mit Seitenketten substituiert sind, was am Verhältnis zwischen den 1,2,4- und 1,2-substituierten Rhap ersichtlich ist. Die als Seitenketten vorliegenden AN- und GN-PS stellen dabei selbst einen großen Teil der UBS. Die AN sind relativ stark verzweigt, wobei das Rückgrat hauptsächlich an Position O3 (1,3,5-Araf) und an den Positionen O2 und O3 substituiert ist (1,2,3,5-Araf). Die GN liegen dagegen hauptsächlich linear und (1→4)-verknüpft vor. Die hier ermittelten Anteile der PS bzw. der Strukturelemente sind vergleichbar mit den bereits für Apfel-NSPS beschriebenen Anteilen (RENARD & THIBAUT, 1993; SCHOLS ET AL., 1995b; PENA & CARPITA, 2004). Die detektierten Anteile an AN mit verschiedenen Strukturelementen und (1→4)-verknüpften GN zeigen, dass sich die Apfel-UBS gut zur Methodenentwicklung eignen.

4.1.2.2 Amaranth

Tabelle 4.4: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H_2SO_4 -Hydrolyse und Methanolyse), Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) und Gehalte an Hydroxycimtsäuren (HZS) bzw. Dehydrodiferulasäuren (DFS, bestimmt mittels HPLC nach Verseifung) der unlöslichen Amaranth-Ballaststoffe. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal, *KS* = Kaffeesäure, *p*-CS = *para*-Cumarsäure, *FS* = Ferulasäure, *c* = cyclisch, *nc* = nicht-cyclisch.

Monosaccharid	H_2SO_4	Methanolyse	PMAAs		HZS/DFS [$\mu\text{g/g}$]	
Fucose	-	0,9			KS	46,2
Rhamnose	2,0	5,9			<i>p</i> -CS	71,7
			1,2-Rhap	1,4	<i>cis-p</i> -CS	8,0
			1,2,4-Rhap	0,4	FS	1020,7
Arabinose	24,3	30,3			<i>cis</i> -FS	120,9
			<i>t</i> -Araf	9,4		
			1,5-Araf	17,0	Σ 8-5-DFS	85,7
			1,3,5-Araf	6,3	8-8c-DFS	56,1
			1,2,5-Araf	1,6	8-8nc-DFS	32,8
			1,2,3,5-Araf	0,7	5-5-DFS	48,1
Galactose	5,6	6,7			8- <i>O</i> -4-DFS	40,5
			<i>t</i> -Galp	1,3		
			1,4-Galp	1,0		
Glucose	48,6	20,1				
			<i>t</i> -Glc _p	3,4		
			1,4-Glc _p	42,3		
			1,4,6-Glc _p	3,9		
Xylose	12,7	10,4				
			<i>t</i> -Xyl _p	7,8		
			1,4-Xyl _p	1,6		
			1,2-Xyl _p	1,2		
Mannose	3,4	1,9				
			1,4-Man _p	0,8		
Galacturonsäure	3,4	22,2				
Glucuronsäure	-	1,7				

Äquivalent zu den Apfel-UBS liegen auch bei den Amaranth-UBS neben Cellulose größere Mengen an Xyloglucanen vor (Tabelle 4.4). Aufgrund des hohen Xyl-Anteils ist wiederum zu vermuten, dass zudem kleinere Mengen an Xylanen bzw. XGA vorliegen. Die Pektine zeigen einen relativ hohen RG-I-Anteil, wobei im Vergleich zu den Apfel-UBS eine geringere Substitution des Rückgrats vorliegt. Als RG-I-Seitenketten, welche wiederum einen hohen Anteil an den UBS haben, dominieren die AN, deren moderat verzweigtes Rückgrat hauptsächlich an Position *O*3 substituiert ist. Verzweigungen an Position *O*2 bzw. an den Positionen *O*2 und *O*3 können in kleinerem Ausmaß ebenfalls beobachtet werden. Der Anteil an (1→4)-verknüpften Galactanen ist dagegen deutlich geringer. Eine ähnliche Zellwandzusammensetzung wurde von LAMOTHE ET AL. (2015) für *Amaranthus caudatus* beschrieben, jedoch wurden hierbei höhere Anteile an

GalA und keine 1,2,5-substituierte Araf festgestellt.

Die Analyse der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren zeigt, dass die Amaranth-UBS neben kleineren Mengen an Kaffeesäure und *p*-CS signifikante Mengen an wahrscheinlich pektin gebundener FS enthalten. Der ermittelte FS-Gehalt ist etwas höher als der bereits für *Amaranthus caudatus* beschriebene (BUNZEL ET AL., 2005), jedoch deutlich niedriger als bei Getreide (Guo & BETA, 2013). Der Anteil an DFS ist ebenfalls niedriger als für andere Materialien beschrieben, jedoch zeigt sich ein ähnliches DFS-Profil (DOBBERSTEIN & BUNZEL, 2010). Trotz der etwas niedrigeren Gehalte ist zu vermuten, dass die FS und DFS bei PS-Bindung größere Auswirkungen auf die Zellwandarchitektur haben.

4.1.2.3 Quinoa

Sowohl hinsichtlich der PS-Zusammensetzung als auch der vorhandenen Strukturelemente weisen Quinoa-UBS (Tabelle 4.5) eine starke Ähnlichkeit zu Amaranth-UBS auf. Unterschiede zeigen sich in einem niedrigeren Cellulose- bzw. Xyloglucan-Anteil und einem höheren AN-Anteil. Weiterhin zeigen auch die AN-PMAAs leichte Unterschiede zwischen den beiden Pseudocerealien auf. Zwar ist das AN-Rückgrat beider Materialien hauptsächlich an Position O3 und zu jeweils kleineren Anteilen an den Positionen O2- bzw. O2- und O3 substituiert, jedoch weist Quinoa einen höheren Anteil an linearen Strukturelementen auf. Dagegen sind die Gehalte zellwandassoziiertes FS und DFS sowie die Anteile an DFS zwischen beiden Pseudocerealien vergleichbar.

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit Literaturdaten, so konnten LAMOTHE ET AL. (2015) ebenfalls nur kleinere Unterschiede bezüglich der Zellwandzusammensetzung von Amaranth und Quinoa feststellen. Diese Ähnlichkeiten könnten durch die nahe botanische Verwandtschaft der beiden Pflanzen begründet sein und in ähnlichen Eigenschaften der UBS resultieren. Die Analyse der Hydroxyzimtsäuren zeigt, dass signifikante Mengen PS-assoziiertes FS und DFS in den Samen der Pflanze vorliegen und einen Einfluss auf die Eigenschaften der PS haben könnten. Die PS-assoziierten Hydroxyzimtsäuren und DFS wurden bisher lediglich in anderen Pflanzengewebe von Quinoa untersucht, wobei sich ebenfalls höhere Gehalte zeigten (RENARD ET AL., 1999b).

Tabelle 4.5: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H_2SO_4 -Hydrolyse und Methanolyse), Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) und Gehalte an Hydroxycimtsäuren (HZS) bzw. Dehydrodiferulasäuren (DFS, bestimmt mittels HPLC nach Verseifung) der unlöslichen Quinoa-Ballaststoffe. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal, KS = Kaffeesäure, *p*-CS = *para*-Cumarsäure, FS = Ferulasäure, *c* = cyclisch, *nc* = nicht-cyclisch.

Monosaccharid	H_2SO_4	Methanolyse	PMAAs		HZS/DFS [$\mu\text{g/g}$]	
Fucose	0,6	0,8			KS	8,3
Rhamnose	2,6	4,9			<i>p</i> -CS	34,4
			1,2-Rhap	0,9	<i>cis-p</i> -CS	9,3
			1,2,4-Rhap	0,3	FS	942,1
Arabinose	35,3	43,3			<i>cis</i> -FS	70,2
			<i>t</i> -Araf	10,1		
			1,5-Araf	29,1	Σ 8-5-DFS	99,2
			1,3,5-Araf	9,3	8-8c-DFS	34,7
			1,2,5-Araf	0,7	8-8nc-DFS	42,5
			1,2,3,5-Araf	0,7	5-5-DFS	40,6
Galactose	4,4	5,7			8-O-4-DFS	35,3
			<i>t</i> -Galp	1,2		
			1,4-Galp	0,5		
Glucose	39,6	17,3				
			<i>t</i> -Glc p	1,2		
			1,4-Glc p	36,3		
			1,4,6-Glc p	2,7		
Xylose	6,9	7,5				
			<i>t</i> -Xyl p	4,6		
			1,4-Xyl p	1,1		
			1,2-Xyl p	0,9		
Mannose	2,6	2,6				
			1,4-Man p	1,2		
Galacturonsäure	8,1	17,2				
Glucuronsäure	-	0,8				

4.1.2.4 Buchweizen

Nach H_2SO_4 -Hydrolyse zeigen die Buchweizen-UBS (Tabelle 4.6) eine ähnliche Monosaccharidzusammensetzung wie Amaranth und Quinoa. Dagegen wurde nach Methanolyse ein im Vergleich höherer Anteil an Glc erhalten, was auf gut hydrolysierbare, nicht-kristalline Cellulose und/oder einen erhöhten Xyloglucan-Anteil hindeutet. Durch die Methylierungsanalyse zeigt sich wiederum, dass neben Cellulose hauptsächlich Xyloglucane und Pektine mit einem hohen AN-Anteil und einem geringeren Anteil an (1→4)-verknüpften GN vorliegen. Damit liegt insgesamt eine mit Amaranth und Quinoa vergleichbare Zusammensetzung bezüglich der vorhandenen PS vor. Deutliche Unterschiede bestehen jedoch in der Struktur der AN, welche in Buchweizen einen sehr hohen Grad an Verzweigungen aufweisen. Dabei findet die Substitution

des Rückgrats lediglich an Position O3 statt. Die PMAAs der 1,2,5-substituierten Araf und der 1,2,3,5-substituierten Araf konnten nicht detektiert werden.

Tabelle 4.6: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H₂SO₄-Hydrolyse und Methanolyse), Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) und Gehalte an Hydroxymethylsäuren (HZS) bzw. Dehydrodiferulasäuren (DFS, bestimmt mittels HPLC nach Verseifung) der unlöslichen Buchweizen-Ballaststoffe. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal, KS = Kaffeesäure, *p*-CS = *para*-Cumarsäure, FS = Ferulasäure, SiS = Sinapinsäure, *c* = cyclisch, *nc* = nicht-cyclisch.

Monosaccharid	H ₂ SO ₄	Methanolyse	PMAAs		HZS/DFS [µg/g]	
Fucose	-	0,8			KS	11,2
Rhamnose	2,9	2,9			<i>p</i> -CS	30,1
			1,2-Rhap	0,8	<i>cis-p</i> -CS	5,9
			1,2,4-Rhap	0,5	FS	44,2
Arabinose	34,0	27,7			<i>cis</i> -FS	9,3
			<i>t</i> -Araf	13,5	SiS	32,4
			1,5-Araf	12,3		
			1,3,5-Araf	12,1	Σ 8-5-DFS	-
Galactose	7,2	6,1			8-8c-DFS	-
			<i>t</i> -Galp	1,7	8-8nc-DFS	-
			1,4-Galp	0,9	5-5-DFS	-
Glucose	38,9	39,2			8-O-4-DFS	4,6
			<i>t</i> -GlcP	14,2		
			1,4-GlcP	32,9		
			1,4,6-GlcP	3,4		
Xylose	9,8	8,2				
			<i>t</i> -Xylp	5,8		
			1,4-Xylp	1,1		
			1,2-Xylp	0,7		
Mannose	1,6	2,3				
			1,4-Manp	0,2		
Galacturonsäure	5,6	10,7				
Glucuronsäure	-	1,3				

Ein weiterer Unterschied zu den anderen Pseudocerealien besteht in der Bindung von Hydroxymethylsäuren an Zellwandpolymere, wie aus den nur in geringen Mengen nachgewiesenen Monomeren sowie Spuren von 8-O-4-DFS zu schließen ist. Obwohl bereits höhere Mengen an FS in Callus-Zellen des Tatarischen Buchweizens (*Fagopyrum tataricum*) detektiert wurden (LOZOVAYA ET AL., 2000), wurden auch für andere Buchweizenmehle und Mehlfractionen ähnlich geringe Gehalte beschrieben (GALLARDO ET AL., 2006; HUNG & MORITA, 2008). Die von JILEK & BUNZEL (2013) für Buchweizenmehl beschriebenen DFS-Anteile und Gehalte liegen dagegen deutlich über den hier festgestellten Mengen. Jedoch wurde in dieser Studie ein Mehl verwendet, in dem Schalenfragmente vorhanden waren. Da die hier analysierten Buchweizensamen keine Schalen enthielten, ist es möglich, dass größere Mengen FS und DFS hauptsächlich in

den Schalen vorliegen. Die hier bestimmten Gehalte in den geschälten Samen deuten darauf hin, dass (Di-)Hydroxycimtsäuren nur einen geringen Einfluss auf die Zellwandarchitektur des Endosperms und der aufgelagerten Gewebe von Buchweizen haben.

4.1.2.5 Zuckerrübenschnitzel

Der niedrige Anteil an Glc nach Methanolyse sowie die geringen Mengen an Xyl bzw. Xyl-PMAAs deuten darauf hin, dass in den ZRS-UBS ein Großteil der Glc wahrscheinlich als kristalline Cellulose vorliegt (Tabelle 4.7). Der ebenso niedrige Gehalt an Mannanen spricht für einen insgesamt niedrigen Anteil an Hemicellulosen. Dagegen ist aus den Anteilen der Monosaccharide und der PMAA-Zusammensetzung ersichtlich, dass hohe Mengen an RG-I-reichen Pektinen vorliegen, in denen rund die Hälfte der Rha-Einheiten an Position O4 substituiert ist. Die neutralen Seitenketten stellen fast 50 % der ZRS-UBS dar, wobei wiederum weniger GN- als AN-Seitenketten vorliegen. Neben (1→4)-verknüpften GN konnten in den ZRS auch geringe Mengen an PMAAs, die 1,3- bzw. 1,6-substituierte Galp repräsentieren und auf Typ II GN hindeuten, detektiert werden. Die AN der ZRS weisen einen hohen Verzweigungsgrad auf, wobei die Substitution des Rückgrats wiederum hauptsächlich an Position O3 erfolgt. Jedoch wurden auch kleinere Anteile der PMAAs der 1,2,5- und 1,2,3,5-substituierten Araf detektiert. Sowohl die Anteile der PS als auch die in den einzelnen PS vorhandenen Strukturelemente zeigen eine gute Übereinstimmung mit bisher für ZRS publizierten Daten (RENARD & THIBAUT, 1993; MICARD ET AL., 1996; OOSTERVELD ET AL., 1996).

Für ZRS wurden ebenfalls hohe Gehalte an estergebundener FS beschrieben (RENARD & THIBAUT, 1993; MICARD ET AL., 1996; OOSTERVELD ET AL., 1996), was im Rahmen dieser Arbeit durch die mittels HPLC ermittelten Gehalte bestätigt werden konnte. So weisen ZRS-UBS einen im Vergleich mit Amaranth- und Quinoa-UBS deutlich höheren FS-Gehalt auf. Auch im Vergleich zu vielen Getreidesorten zeigen die ZRS einen hohen FS-Gehalt. Beispielsweise wurde für Weizen mit 3,5 mg/g UBS ein ungefähr halb so hoher FS-Gehalt beschrieben; lediglich in Mais konnte mit 8,3 mg/g UBS ein leicht höherer FS-Gehalt festgestellt werden (GUO & BETA, 2013).

Der hohe Gesamtgehalt an DFS (1,8 mg DFS / g UBS) ist vergleichbar mit dem von DOBBESTEIN & BUNZEL (2010) für Zuckerrüben-UBS beschriebenen DFS-Gehalt (1,6 mg DFS / g UBS). Ebenso zeigen sich ähnliche prozentuale Anteile der einzelnen DFS. Vermutlich ist ein Großteil der FS und DFS an die in hohen Mengen vorhandenen neutralen Pektinseiten gebunden. Die estergebundenen Substanzen beeinflussen daher vermutlich die Zellwandarchitektur der ZRS maßgeblich.

Tabelle 4.7: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H₂SO₄-Hydrolyse und Methanolyse), Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) und Gehalte an Hydroxyzimtsäuren (HZS) bzw. Dehydrodiferulasäuren (DFS, bestimmt mittels HPLC nach Verseifung) der unlöslichen Zuckerrübenschnitzel-Ballaststoffe. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal, *p*-CS = *para*-Cumarsäure, FS = Ferulasäure, *c* = cyclisch, *nc* = nicht-cyclisch.

Monosaccharid	H ₂ SO ₄	Methanolyse	PMAAs		HZS/DFS [μ g/g]	
Fucose	-	-			FS	7054,2
Rhamnose	2,2	6,8			<i>cis</i> -FS	155,3
			1,2-Rhap	0,9	<i>trans-p</i> -CS	21,3
			1,2,4-Rhap	0,8		
Arabinose	37,2	53,5			Σ 8-5-DFS	823,9
			<i>t</i> -Araf	21,1	8-8c-DFS	122,0
			1,5-Araf	15,4	8-8nc-DFS	246,5
			1,3,5-Araf	13,6	5-5-DFS	266,1
			1,2,5-Araf	1,0	8-O-4-DFS	344,3
			1,2,3,5-Araf	2,8		
			<i>t</i> -Arap	0,1		
Galactose	9,3	14,8				
			<i>t</i> -Galp	2,0		
			1,4-Galp	1,1		
			1,6-Galp	1,0		
			1,3-Galp	0,3		
Glucose	34,7	1,7				
			<i>t</i> -GlcP	0,5		
			1,4-GlcP	33,6		
			1,4,6-GlcP	1,1		
Xylose	3,6	3,6				
			<i>t</i> -Xylp	1,2		
			1,4-Xylp	1,5		
			1,2-Xylp	0,5		
Mannose	2,6	1,0				
			<i>t</i> -Manp	0,2		
			1,4-Manp	1,3		
Galacturonsäure	10,4	17,5				
Glucuronsäure	-	1,2				

4.1.2.6 Sojaextraktionsschrot

Wie am Glc-Anteil nach Methanolyse und am niedrigen Anteil 1,4,6-substituierter GlcP ersichtlich ist, weisen die SES-UBS äquivalent zu den ZRS-UBS einen hohen Anteil an kristalliner Cellulose auf (Tabelle 4.8). Jedoch sind deutlich höhere Anteile an Xyl enthalten, die sowohl terminal als auch 1,2- bzw. 1,4-substituiert vorliegen und damit mögliche Bestandteile von Xylanen und XGA sind. HUISMAN ET AL. (2001b) konnten mittels CDTA-Extraktion größere Mengen XGA und RG-I aus Sojabohnen freisetzen, was ebenso wie der hohe Anteil an terminalen Einheiten für

Tabelle 4.8: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H_2SO_4 -Hydrolyse und Methanolyse) und Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) der unlöslichen Sojaextraktionsschrot-Ballaststoffe. *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal.

Monosaccharid	H_2SO_4	Methanolyse	PMAAs	
Fucose	1,5	2,7		
Rhamnose	1,8	4,6		
			1,2-Rhap	1,1
			1,2,4-Rhap	0,7
Arabinose	15,1	25,8		
			t-Araf	14,9
			1,5-Araf	14,5
			1,3,5-Araf	4,1
			1,2,5-Araf	2,0
			1,2,3,5-Araf	3,3
			t-Arap	0,9
Galactose	16,9	31,4		
			t-Galp	3,9
			1,4-Galp	8,2
			1,6-Galp	0,6
Glucose	39,0	2,1		
			t-Glcp	0,8
			1,4-Glcp	23,4
			1,4,6-Glcp	2,5
Xylose	14,7	13,7		
			t-Xylp	7,9
			1,4-Xylp	3,4
			1,2-Xylp	4,4
Mannose	5,5	4,5		
			t-Manp	0,6
			1,4-Manp	2,8
Galacturonsäure	5,5	14,3		
Glucuronsäure	-	0,9		

das Vorhandensein von XGA spricht. Das GalA/Rha-Verhältnis deutet wiederum auf sehr RG-I-reiche Pektine hin und spricht ebenfalls für einen niedrigen Anteil an HG. Für die SES-UBS zeigen sich basierend auf der Monosaccharidzusammensetzung sehr ähnliche Anteile an AN und GN. Der Anteil der Gal-PMAAs ist dagegen deutlich niedriger, was wahrscheinlich aus deren Unterbestimmung resultiert (siehe Abschnitt 4.1.1). Aus den PMAAs ist jedoch ersichtlich, dass die GN zum Großteil (1→4)-verknüpft vorliegen. Zusätzlich wurden lediglich kleine Anteile an 1,6-substituierter Galp detektiert. Die vorhandenen AN zeigen deutliche Unterschiede zu den AN der anderen Rohstoffe. So liegt zum Beispiel ein eher niedriger Verzweigungsgrad des Rückgrats vor. Dabei sind hauptsächlich O3-Verzweigungen vorhanden, wobei jedoch der Anteil an 1,2,5-Araf höher als bei allen anderen Materialien ist. Die PS der Sojabohne wurden bereits als relativ GN-reich beschrieben (HUISMAN ET AL., 1998, 2001b), was mit den für SES erhaltenen Ergebnissen übereinstimmt. Zudem wurde von CIPRIANI ET AL. (2009) für ein aus Sojabohne

isoliertes PS ebenfalls ein höherer Anteil an O2-substituierten AN beschrieben.

4.1.3 Lösliche Ballaststoffe

Reine Pektine sind meist wasserlöslich und ihr teilweise hohes Vorkommen in den UBS ist wahrscheinlich durch die Einbindung in den Zellwandverband begründet. Jedoch können meist auch Teile der Pektine und anderer PS während der Ballaststoffisolierung herausgelöst werden und sich daher in der LBS-Fraktion befinden. Da die LBS im Rahmen dieser Arbeit lediglich zur Analyse der AN- und GN-Strukturelemente mittels NMR-Spektroskopie verwendet wurden (siehe Abschnitt 4.4.3.5), werden ihre Zusammensetzungen zusammengefasst erläutert. In Tabelle 4.9 sind die Monosaccharidzusammensetzungen der verschiedenen LBS zu sehen. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind in Abschnitt 9.1 gezeigt.

Tabelle 4.9: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse) der löslichen Ballaststoffe (LBS) von Apfel (Ap), Amaranth (AM), Quinoa (Q), Buchweizen (BW), Zuckerrübenschnitzel (ZRS) und Sojaextraktionschrot (SES).

Monosaccharid	Ap LBS	AM LBS	Q LBS	BW LBS	ZRS LBS	SES LBS
Fucose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	3,5	4,5	7,4	5,6	3,8	3,0
Arabinose	18,5	30,8	6,4	18,4	32,9	15,4
Galactose	16,6	13,2	24,1	12,1	21,4	27,9
Glucose	2,7	9,5	4,4	12,9	10,5	7,8
Xylose	1,4	15,5	12,1	3,2	-	2,8
Mannose	12,3	16,8	23,6	24,5	7,6	30,3
Galacturonsäure	43,1	7,9	15,8	22,1	22,0	12,8
Glucuronsäure	1,8	1,7	6,2	1,2	1,8	-

Generell zeigt sich in den LBS ein eher niedriger Gehalt an Glc, welche in allen LBS lediglich in terminaler und 1,4-substituierter Form vorliegt. Da dikotyle Pflanzen keine β -Glucane enthalten (SCHELLER & ULVSKOV, 2010), könnte es sich bei der vorhandenen Glc um Überreste des Stärkeabbaus handeln. Die meisten LBS zeigen ebenso einen niedrigen Anteil an Xyl. Größere Xyl-Mengen sind lediglich in Amaranth und Quinoa vorhanden, wobei der hohe Anteil an terminaler Xyl für das Vorliegen von XGA sprechen könnte. Bei fast allen LBS ist ein relativ hoher Man-Anteil zu beobachten, welcher lediglich im Fall der SES-LBS durch die Detektion 1,4- bzw. 1,4,6-substituierter Manp auf lineare und verzweigte Mannane zurückgeführt werden konnte. In den übrigen LBS konnte lediglich terminale Man detektiert werden, welche wahrscheinlich Bestandteil anderer Strukturelemente ist. Die GalA/Rha-Verhältnisse deuten darauf hin, dass eher HG-reiche Pektine in den LBS enthalten sind. Lediglich bei Amaranth und Quinoa scheint ein etwas höherer RG-I-Anteil vorzuliegen. Ara und Gal zeigen in allen LBS einen hohen Anteil. Auf Grundlage der PMAAs kann die Ara hauptsächlich AN-Strukturelementen und die Gal

hauptsächlich Typ II GN zugeordnet werden. Daher stammt die vorhandene Gal wahrscheinlich vor allem aus löslichen Arabinogalactan-Proteinen. Lediglich in den ZRS-LBS und den SES-LBS konnten kleinere Anteile an 1,4-substituierter Gal_p detektiert werden. Die AN zeigen im Vergleich zu den entsprechenden UBS eher lineare Strukturen, wobei die Verzweigungen auch hier hauptsächlich an Position O₃ vorliegen. Eine Ausnahme bilden die Amaranth-LBS, bei welchen größere Mengen an 1,2,5-substituierten Ara_f vorliegen. Aus den erhaltenen Zusammensetzungen wird ersichtlich, dass die Pektine meist einen großen Teil der LBS darstellen und somit wahrscheinlich auch maßgeblich deren Eigenschaften beeinflussen.

4.1.4 Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide (vor und nach Lagerung)

Da die löslichen PS bei der verwendeten Aufarbeitung nicht abgetrennt sondern wieder ausgefällt werden, sollten diese zusätzlich zu den UBS in den NSPS enthalten sein. Die Zusammensetzung der Apfel-NSPS vor und nach der Lagerung ist in Tabelle 4.10 zu sehen. Hierbei werden aus Übersichtsgründen lediglich die Ergebnisse der H₂SO₄-Hydrolyse und der Methylierungsanalyse dargestellt. Die Ergebnisse der Methanolyse lieferten dieselben Tendenzen und sind in Abschnitt 9.2 dargestellt.

Die aus den nicht-gelagerten Äpfeln isolierten NSPS zeigen sowohl in Bezug auf die Monosaccharidzusammensetzung als auch bezüglich der PMAA-Anteile eine den Apfel-UBS sehr ähnliche Zusammensetzung. Der etwas höhere GalA-Anteil in den NSPS kann wahrscheinlich auf die Mitbestimmung der LBS, welche einen hohen GalA-Anteil haben (siehe Tabelle 4.9), zurück geführt werden. Während der Lagerung kann zunächst ein deutlicher Ara-Verlust und ein leichter Gal-Verlust beobachtet werden. Die leichten Zunahmen der anderen Monosaccharide resultieren wahrscheinlich aus diesen relativen Abnahmen. Auch bei Betrachtung der PMAAs zeigt sich eine deutliche Abnahme der AN-Strukturelemente. Dabei kann eine stärkere Abnahme der verzweigten Strukturelemente beobachtet werden, so dass ein höheres Verhältnis zwischen dem PMAA der 1,5-substituierten Ara_f und den verzweigten PMAAs erhalten wird. Die anderen Strukturelemente zeigen eine schwache relative Zunahme. Lediglich das Verhältnis zwischen 1,2- und 1,2,4-substituierter Rha_p deutet auf eine Depolymerisierung der Seitenketten hin. Vergleichbare relative PMAA-Veränderungen konnten auch von PENA & CARPITA (2004) während der Reifung von Äpfeln festgestellt werden. Daraus zeigt sich, dass AN und GN eine große Rolle bei der Lagerung und vermeintlich auch bei der Texturentwicklung von Äpfeln spielen.

Tabelle 4.10: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach H_2SO_4 -Hydrolyse) und Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) der Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide vor (S1) und nach dreiwöchiger Lagerung (S2). *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal.

Monosaccharid	S1	S2	PMAAs	S1	S2
Fucose	1,5	1,7			
Rhamnose	1,5	1,8			
			1,2-Rhap	0,6	0,9
			1,2,4-Rhap	0,4	0,5
Arabinose	15,0	9,5			
			t-Araf	9,0	4,9
			1,5-Araf	7,1	5,3
			1,3,5-Araf	4,2	2,1
			1,2,5-Araf	0,5	0,3
			1,2,3,5-Araf	2,0	0,9
			t-Arap	0,4	0,4
Galactose	9,5	8,0			
			t-Galp	2,7	3,0
			1,4-Galp	1,1	0,9
			1,6-Galp	0,3	0,3
Glucose	43,4	46,9			
			t-Glcp	1,0	0,9
			1,4-Glcp	44,8	51,2
			1,4,6-Glcp	8,4	9,4
Xylose	11,8	13,5			
			t-Xylp	9,8	10,6
			1,4-Xylp	1,3	1,5
			1,2-Xylp	3,2	3,4
Mannose	5,8	5,7			
			t-Manp	1,0	0,7
			1,4-Manp	2,3	2,7
Galacturonsäure	11,6	12,9			
Glucuronsäure	-	-			

4.2 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

Zur Isolierung von Standardsubstanzen wurden, falls anwendbar, zunächst die kommerziell erhältlichen, löslichen PS verwendet, da diese einen sehr hohen AN- bzw. GN-Anteil und eine gute enzymatische Zugänglichkeit besitzen. Des Weiteren wurden die UBS der pflanzlichen Rohstoffe für die Isolierung der OS verwendet, um ein möglichst breites Spektrum an Standardsubstanzen zu erhalten. Teilweise wurden dabei zur Erhöhung der Ausbeute verschiedene Extraktionsmethoden wie eine Autoklavenextraktion oder eine Ca(OH)_2 -Extraktion angewendet. Da Nebenprodukte der enzymatischen Spaltung ebenfalls von Interesse für die späteren Methoden sein können, wurden diese, falls möglich, ebenfalls isoliert und charakterisiert. Um Rückschlüsse auf die Art der Monosaccharid-Einheiten zu ziehen, wurden die Monosaccharidzusammensetzungen der OS mittels HPAEC-PAD bestimmt. Zusätzlich wurde die absolute Konfiguration der jeweiligen Monosaccharide nach entsprechender Derivatisierung mittels GC-MS ermittelt, wobei stets L-Ara und D-Gal vorlagen. Alle isolierten OS wurden zur Ermittlung des Molekulargewichts mittels HPLC-MS analysiert. Dabei wurden auch MS^2 -Spektren der OS aufgenommen (siehe Abschnitt 9.4), aus welchen teilweise wichtige Strukturinformationen abgeleitet werden können. Zudem können diese Spektren für den Nachweis und die Unterscheidung der Substanzen in enzymatischen Hydrolysaten genutzt werden. Ein Schwerpunkt bei der Strukturcharakterisierung der Standardsubstanzen lag jedoch auf der Verwendung ein- und zweidimensionaler NMR-spektroskopischer Techniken. Meist kann nur durch die Anwendung dieser Techniken eine eindeutige Zuordnung von Ringform und Verknüpfungsart erreicht werden (siehe Abschnitt 3.5.3). Daher wurden nur Substanzen als Standardsubstanzen verwendet, die mittels NMR-Spektroskopie eindeutig charakterisiert werden konnten. Die chemischen Verschiebungen aller Standardsubstanzen sind in Abschnitt 9.3 aufgeführt.

4.2.1 Isolierung und Charakterisierung von Arabinan-Oligosacchariden

Die löslichen AN-PS wurden verwendet, um angemessene Mengen der Hauptprodukte der *endo*-Arabinanase-Spaltung freizusetzen. Zusätzlich wurden die UBS von Amaranth und Quinoa zur Isolierung neuartiger Strukturelemente mit *endo*-Arabinanase behandelt. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass Rotkleesprossen-UBS potentiell höhere Mengen mancher AN-OS enthalten, weshalb dieser Rohstoff ebenfalls verwendet wurde. Es war ebenfalls von Interesse, größere Mengen an Nebenprodukten, die durch eine α -Arabinofuranosidase-Aktivität entstehen würden, zu erhalten. Dazu wurden die löslichen AN-PS mittels Driselase, welche eine α -Arabinofuranosidase-Aktivität enthält, hydrolysiert. Durch die verwendeten enzymatischen Hydrolysen wurden Gemische aus OS mit verschiedenen Polymerisationsgraden erhalten. Diese wurden zur Vorreinigung zunächst mittels Bio-Gel P-2 nach ihrem hydrodynamischen Vo-

lumen fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Durch Verwendung einer C18 Phase mit 100 % Wasser als Eluent konnten die meisten AN-OS getrennt werden. Falls die Trennung nicht möglich war oder eine für die Charakterisierung bzw. die Verwendung als Standardsubstanz unzureichende Reinheit vorlag, wurden die AN-OS mittels einer PGC-Phase weiter aufgereinigt.

4.2.1.1 *endo*-Arabinanase-Spaltung von Arabinan-Polysacchariden

Durch die Spaltung der löslichen AN-PS konnten die in Abbildung 4.1 gezeigten OS isoliert und charakterisiert werden.

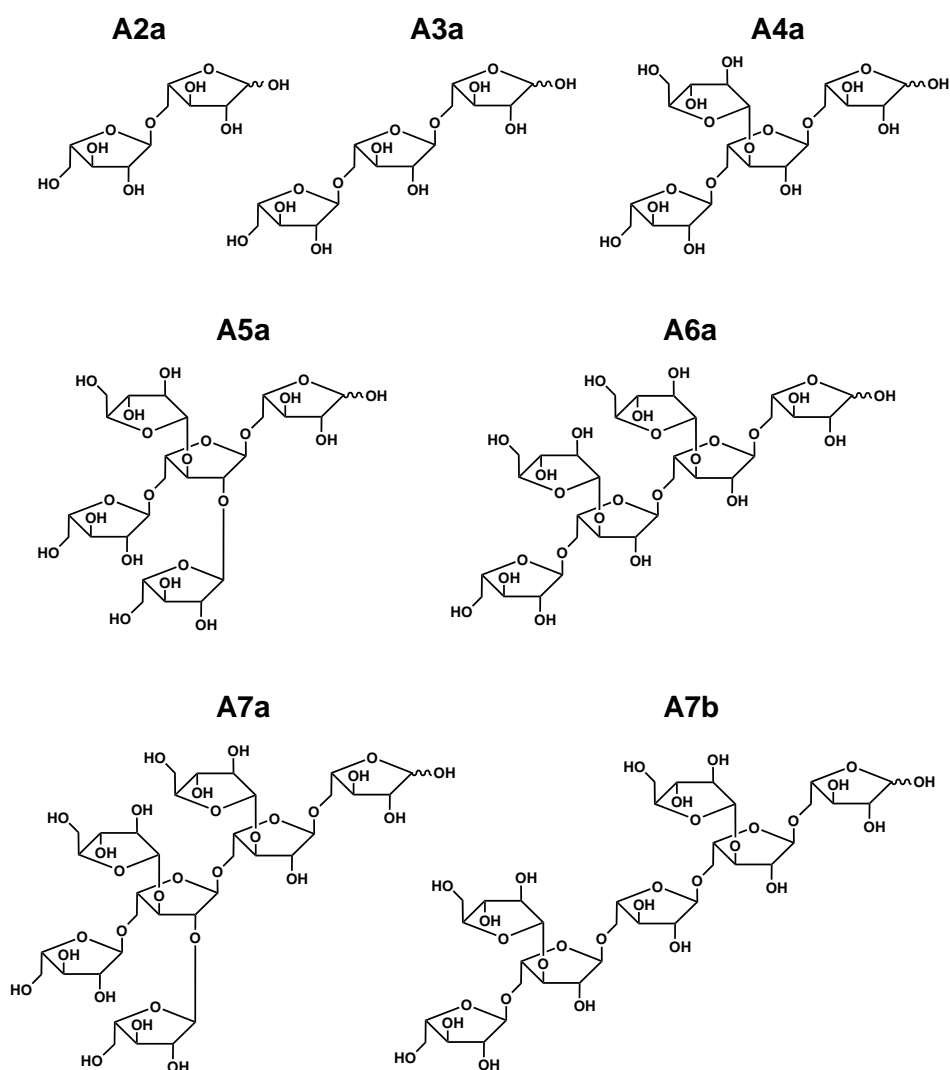


Abbildung 4.1: Strukturen der aus den enzymatischen Hydrolysaten der löslichen Arabinan-Polysaccharide isolierten Oligosaccharide.

Die hier charakterisierten AN-OS wurden allesamt bereits von WESTPHAL ET AL. (2010a) aus ZRS-AN isoliert. Lediglich das durch A7a repräsentierte Strukturelement wurde von WESTPHAL ET AL. (2010a) mit einer zusätzlichen Araf-Einheit am reduzierenden Ende isoliert. Die durch Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Spektren der isolierten OS erhaltenen chemischen Verschiebungen (siehe Abschnitt 9.3) zeigten eine gute Übereinstimmung mit den bereits publizierten Daten. Jedoch zeigten die ^{13}C -NMR-Daten konstant eine um 1 - 2 ppm höhere Verschiebung, was wahrscheinlich auf Unterschiede in der Spektrenkalibrierung zurückzuführen ist.

Die OS A2a und A3a resultieren aus der Spaltung des linearen AN-Rückgrats. Wie bereits von DUNKEL & AMADO (1995) beschrieben, konnte A3a durch *endo*-Arabinanase weiter zu Ara und A2a abgebaut werden und stellt damit nur ein Nebenprodukt dar, das durch einen unvollständigen Abbau der AN entsteht. Das Rückgrat der löslichen AN-PS weist hauptsächlich eine Verzweigung an Position O3 auf (siehe Abschnitt 4.1.1); dementsprechend konnten große Mengen an A4a isoliert werden. Da 1,2,3,5-substituierte Araf im Rahmen der Methylierungsanalyse auch durch Untermethylierung entstehen kann, besitzt A5a für den eindeutigen Nachweis einer doppelten Substitution des AN-Rückgrats besondere Bedeutung. Bei den verzweigten OS mit höherem Polymerisationsgrad weisen benachbarte Araf-Einheiten (A6a und A7a) oder durch eine 1,5-substituierte α -Araf-Einheit getrennte Araf-Einheiten (A7b) eine Substitution an Position O3 bzw. eine Substitution an den Positionen O3 und O2 auf. Diese OS können wichtige Rückschlüsse über die Komplexität der analysierten AN-PS liefern, da sie Hinweise auf die Häufigkeit stärker verzweigter Bereiche geben. Solche hochverzweigten Bereiche könnten durch die Beeinflussung der Löslichkeit und der PS-Spaltung durch die Dickdarm-Mikrobiota sowohl die physikochemischen Eigenschaften als auch die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Pektinen beeinflussen.

4.2.1.2 *endo*-Arabinanase-Spaltung von unlöslichen Rotkleesprossen-Ballaststoffen

Ein an Position O2 verzweigtes AN-Tetramer (A4b, siehe Abbildung 4.2) konnte nur in sehr kleinen Mengen in den Hydrolysaten der löslichen AN-PS detektiert werden, weshalb dieses nach $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Extraktion zur Steigerung der Ausbeute aus den UBS von Rotkleesprossen isoliert wurde. In den Hydrolysaten dieses Materials lagen die beiden verschieden verzweigten Tetramere A4a und A4b ungefähr in gleicher Menge vor. Jedoch können A4a und A4b durch Verwendung einer C18-Phase nicht getrennt werden, weshalb die Aufreinigung dieses OS durch eine PGC-Säule erfolgen musste (siehe Abbildung 4.2).

Zwar wurden teilweise bereits Strukturelemente von PS, die O2-substituierte Araf-Einheiten enthalten, charakterisiert, jedoch wurde noch keine vollständige Charakterisierung des isolierten OS vorgenommen (ERIKSSON ET AL., 1996; NAVARRO ET AL., 2002). Für A4b wurde eine starke Tieffeldverschiebung des C2/H2-Signals der mittleren Rückgrat-Araf-Einheit festgestellt (siehe Tabelle 9.6, Seite 185), was ebenfalls für die beschriebenen O2-substituierten Araf Struk-

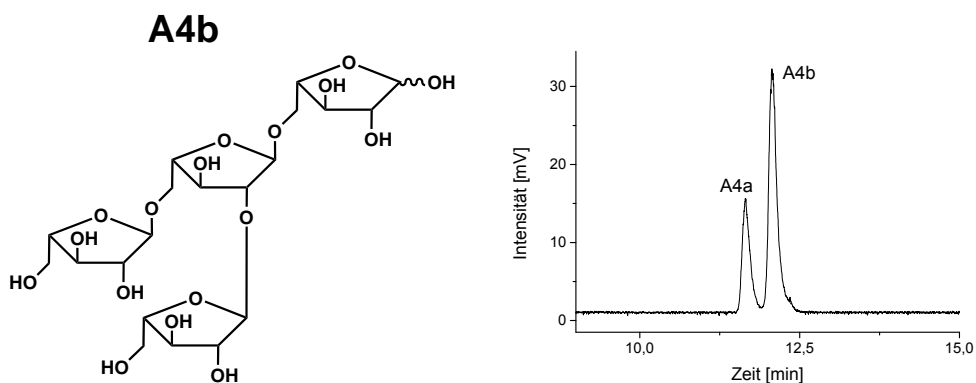


Abbildung 4.2: Struktur des aus den unlöslichen Rotklee sprossen-Ballaststoffen isolierten Oligosaccharids A4b und ein Chromatogramm der Trennung der Oligosaccharide A4a und A4b auf einer Porous Graphitized Carbon-Säule.

turelemente beschrieben wurde. Zudem konnte die O2-Substitution durch einen HMBC cross-peak zwischen dem H1-Proton der O2-gebundenen, terminalen Araf und dem C2-Kohlenstoff der Rückgrat-Araf-Einheit bestätigt werden. Um Materialien wie SES mit einer hohen O2-Substitution des AN-Rückgrats zu charakterisieren, ist A4b als Standardsubstanz essentiell. Des Weiteren kann dieses OS von Bedeutung sein, um die pflanzenphysiologischen und ernährungsphysiologischen Auswirkungen einer Substitution der AN an verschiedenen Positionen zu evaluieren.

4.2.1.3 *endo*-Arabinanase-Spaltung von unlöslichen Amaranth-Ballaststoffen

Aus dem *endo*-Arabinanase-Inkubationsansatz der Amaranth-UBS konnte ein zusätzliches Disaccharid (A2b, Abbildung 4.3) isoliert werden, bei welchem eine β -D-Xylp an Position O5 einer Araf-gebunden ist.

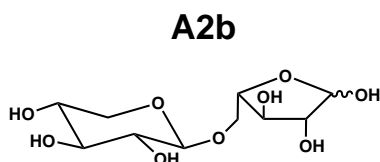


Abbildung 4.3: Struktur des aus unlöslichen Amaranth-Ballaststoffen isolierten Disaccharids.

Die Anwesenheit von Xyl konnte durch Analyse der Monosaccharidzusammensetzung gezeigt werden. Zudem waren die chemischen Verschiebungen (Tabelle 9.4, Seite 184) vergleichbar mit Daten für an Xyl-gebundene terminale β -Xyl-Einheiten (SCHENDEL ET AL., 2015a). Die (1→5)-Verknüpfung zwischen den beiden Monosaccharid-Einheiten konnte durch einen cross-peak

zwischen dem H1-Proton der Xyl und dem C5-Kohlenstoff der Ara bestätigt werden. Da *endo*-Arabinanase nur zwischen α -(1 \rightarrow 5)-verknüpften Araf-Einheiten spalten sollte, deutet die Freisetzung von A2b darauf hin, dass es Teil der AN in Amaranth war. Jedoch ist lediglich eine Araf-Einheit vorhanden. Daher kann aus der Isolierung dieses OS nicht eindeutig abgeleitet werden, ob terminale Xyl-Reste an AN-Ketten gebunden sind. Somit bleibt die Möglichkeit offen, dass A2b Teil anderer PS ist und/oder durch eine Nebenaktivität der Enzympräparation freigesetzt wird.

4.2.1.4 *endo*-Arabinanase-Spaltung von unlöslichen Quinoa-Ballaststoffen

Durch die *endo*-Arabinanase-Hydrolyse von Quinoa-UBS konnten zwei AN-OS isoliert werden, die eine komplexe, dimere Seitenkette enthalten (Abbildung 4.4).

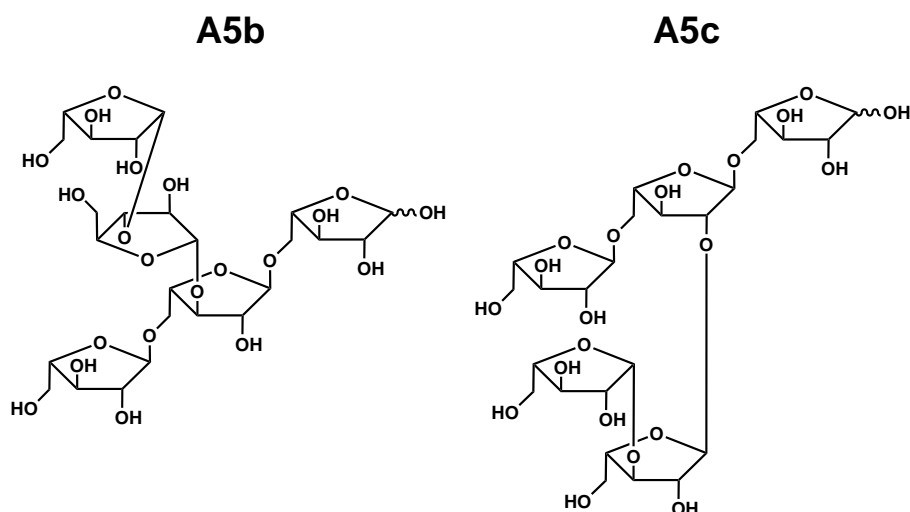


Abbildung 4.4: Strukturen der aus den unlöslichen Quinoa-Ballaststoffen isolierten Oligosaccharide.

Diese Seitenkette ist entweder an Position O3 (A5b) oder Position O2 (A5c) der mittleren Araf-Einheit eines α -(1 \rightarrow 5)-verknüpften AN-Trimers gebunden. Für die Araf-Einheiten des Rückgrats von A5b bzw. A5c wurden dabei sehr ähnliche chemische Verschiebungen wie bei den OS A4a bzw. A4b erhalten (siehe Abschnitt 9.3). Der an das Rückgrat gebundene Teil der Seitenkette wies jeweils charakteristische Verschiebungen im HSQC-Spektrum auf. So lag für die C3/H3-Signale eine Tieffeldverschiebung vor, während für die C5/H5-Signale eine für terminale Araf-Einheiten typische Verschiebung erhalten wurde. Die terminalen Einheiten der Seitenkette wiesen eine für α -Araf-Einheiten untypische chemische Verschiebung auf, welche jedoch mit für β -Araf publizierten Daten vergleichbar war (CARDOSO ET AL., 2002). Des Weiteren zeigten die C2/H2- und C3/H3-HSQC-cross-peaks ähnliche Verschiebungen wie die Signale der redu-

zierenden β -Araf. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass eine O3-gebundene β -Araf als terminales Ende der Seitenketten vorliegt. Die Strukturen der OS konnten durch die Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren bestätigt werden. In Abbildung 4.5 ist beispielhaft das HMBC-Spektrum der Verbindung A5b gezeigt.

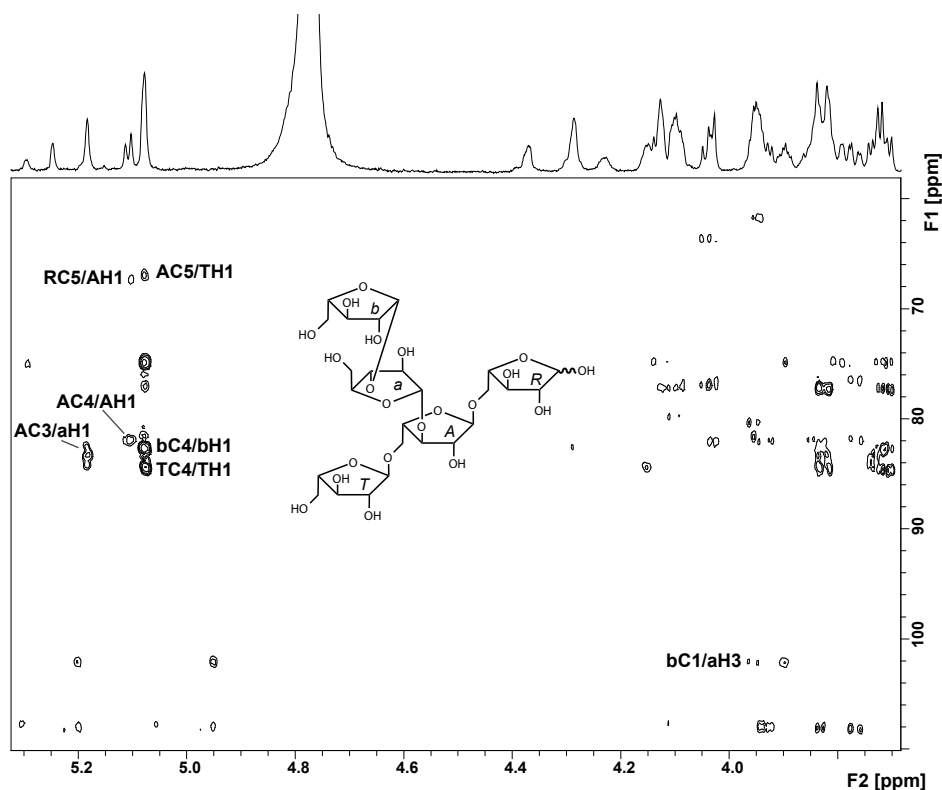


Abbildung 4.5: Struktur und HMBC-Spektrum des Pentasaccharids A5b. Für die Strukturbestimmung diagnostische Korrelationen sind entsprechend bezeichnet.

Durch die Interpretation dieses Spektrums konnten die Verknüpfungen des Rückgrats (RC5/AH1, AC5/TH1), die Ringformen der meisten Monosaccharid-Einheiten (AC4/AH1, TC4/TH1, bC4/bH1), die Bindungsposition der Seitenkette (AC3/aH1) sowie die glykosidische Bindung innerhalb der Seitenkette (bC1/aH3) bestätigt werden.

Bisher wurden β -(1 \rightarrow 3)-verknüpfte, dimere Seitenketten in der Literatur noch nicht als Strukturelemente von AN beschrieben. Dieses Strukturelement könnte eine wichtige Rolle in der Physiologie der pflanzlichen Zellwand spielen, da bestimmte zellwandmodifizierende Enzyme, wie zum Beispiel α -Arabinofuranosidase, keine β -Araf-Einheiten abspalten können. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Fermentation der AN im Dickdarm durch die β -Araf-Einheiten beeinflusst wird. Das zur Spaltung notwendige Enzym β -Arabinofuranosidase wurde bereits aus *Bifidobacterium longum* kloniert. Je nachdem, welche Darmbakterien ebenfalls in der Lage sind, dieses Enzym zu exprimieren, könnte ein bifidogener Effekt der AN durch dieses Strukturelement verstärkt werden.

4.2.1.5 Driselase-Spaltung von Arabinan-Polysacchariden

Bei verschiedenen Vorversuchen ergaben sich Hinweise darauf, dass das *endo*-Arabinanase-Präparat eine Arabinofuranosidase-Nebenaktivität enthält. Um die dadurch entstehenden Produkte identifizieren zu können, wurden die löslichen AN-PS mit Driselase inkubiert. Aufgrund der in Driselase enthaltenen Arabinofuranosidase-Aktivität wurden, neben den bereits beschriebenen OS, höhere Mengen potentieller Nebenprodukte erhalten. Drei dieser Nebenprodukte konnten isoliert und charakterisiert werden. Ihre Struktur ist in Abbildung 4.6 gezeigt.

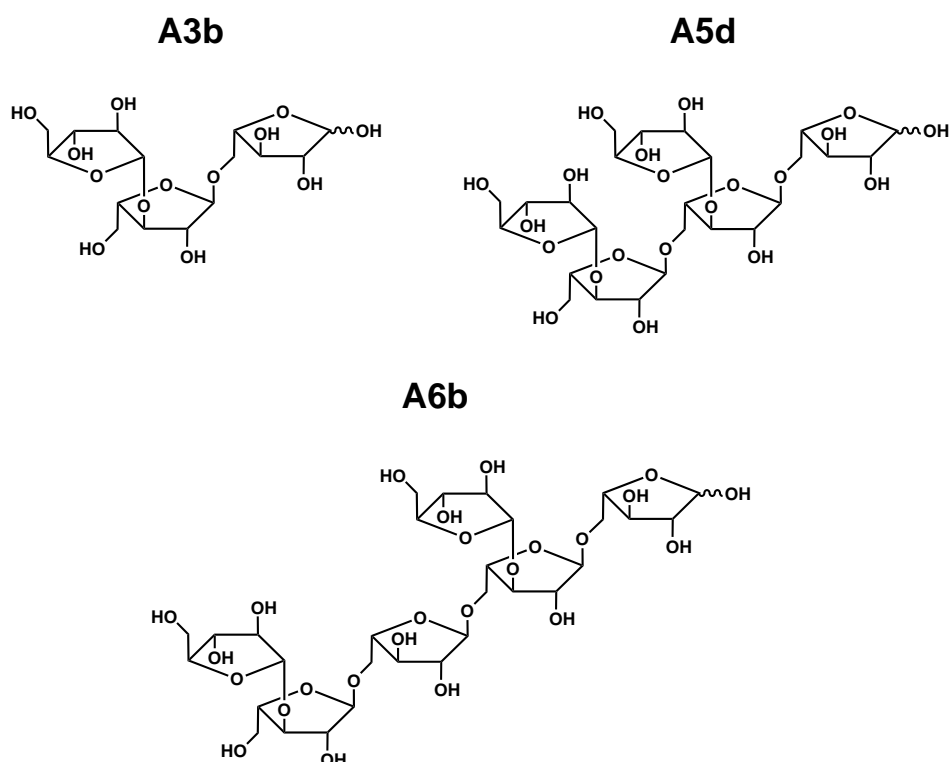


Abbildung 4.6: Strukturen der nach Driselase-Spaltung der löslichen Arabinan-Polysaccharide isolierten Oligosaccharide.

Die Strukturen der OS konnten durch Anwendung verschiedener zweidimensionaler NMR-Experimente aufgeklärt werden. Die dabei ermittelten chemischen Verschiebungen (siehe Abschnitt 9.3) waren wiederum mit den von WESTPHAL ET AL. (2010a) für die Verbindungen A3b und A5d beschriebenen Verschiebungen vergleichbar.

Die isolierten OS besitzen die gleiche Rückgrat-Substitution wie A4a (A3b), A6a (A5d) und A7b (A6b), jedoch fehlt die für die *endo*-Arabinanase-Spaltung charakteristische terminale, O5-gebundene Araf-Einheit. Dadurch stellen diese OS potentielle Nebenprodukte einer Arabinofuranosidase-Nebenaktivität dar. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie in manchen Materialien Teil der nativen AN-Strukturen sind. Die OS lagen allerdings stets nur in kleinen Anteilen, welche mit steigender Enzymmenge ebenfalls anstiegen, in den *endo*-Arabinanase-

eindeutig bestimmt werden und die chemischen Verschiebungen (siehe Abschnitt 9.3) zeigten eine gute Übereinstimmung mit bisher publizierten Daten (FRANSEN ET AL., 1998; LICHTENTHALER ET AL., 2001). Diese OS stellen lineare Abschnitte des GN-Rückgrats und somit die Hauptprodukte der Spaltung durch *endo*-Galactanase dar. Da G3a durch *endo*-Galactanase in Gal und G2a spaltbar ist, kann G3a als Nebenprodukt einer unvollständigen Spaltung deklariert werden. Aus den Driselase-Hydrolysaten der GN-PS wurden zudem zwei L-Ara-enthaltende GN-OS isoliert (Abbildung 4.8).

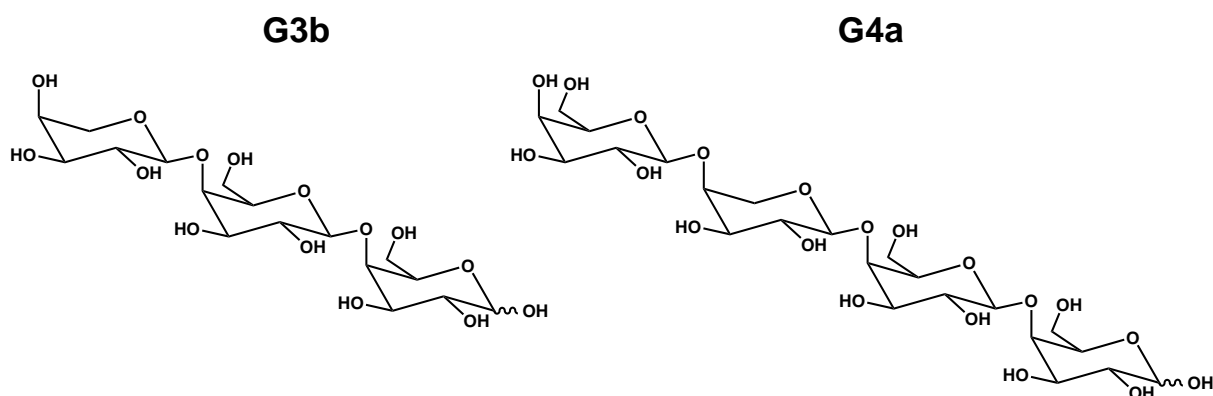


Abbildung 4.8: Strukturen der aus den löslichen Galactan-Polysacchariden isolierten, Arabinose-enthaltenden Galactan-Oligosaccharide.

Aus der Monosaccharidzusammensetzung konnte geschlossen werden, dass jeweils eine Ara-Einheit in den OS vorlag. Die MS²-Analyse der Lithium-Addukte lieferte erste wichtige Hinweise auf die Struktur. So konnte bei G3b die Abspaltung einer Anhydro-Ara (-132) beobachtet werden, bei G4a jedoch nicht (Abschnitt 9.4). Dies deutet darauf hin, dass die Ara-Einheit terminal (G3b) bzw. intern (G4a) vorliegt. Durch die Interpretation der NMR-Spektren konnte festgestellt werden, dass in beiden OS α -Ara_p-Einheiten vorliegen. Dies wurde aus den charakteristischen ¹H- und ¹³C-Verschiebungen (siehe Abschnitt 9.3), den Kopplungskonstanten der anomeren Protonen von ca. 8 Hz und durch den Vergleich mit Literaturdaten für α -Ara_p (ISHII ET AL., 2005b) abgeleitet. Der Kohlenstoff an Position 4 der Ara_p-Einheit zeigte für G4a eine Tieffeldverschiebung (Tabelle 9.23, Seite 193), was auf eine Substitution an dieser Stelle hindeutet. Durch die Interpretation der HMBC-Spektren konnte die Struktur der OS inklusive der Ringform und der Position der Ara_p-Einheiten eindeutig gezeigt werden (Abbildung 4.9). So wurden durch die jeweiligen C4/H1-Korrelationen die (1→4)-Verknüpfungen zur jeweils nächsten Monosaccharid-Einheit nachgewiesen. Außerdem wurde durch einen schwachen cross-peak zwischen dem C5-Kohlenstoff und dem H1-Proton der Ara_p-Einheit deren Ringform bestätigt.

Bisher wurden in der Literatur lediglich terminale Ara_p-Einheiten als Strukturelemente von β -(1→4)-verknüpften GN vermutet. So konnten ISHII ET AL. (2005b) durch die Verwendung mikrosomaler Membranen α -Ara_p auf GN-OS transferieren und die entstandenen OS mittels NMR-Spektroskopie charakterisieren. Zudem wurde terminale Ara_p als Strukturelement von

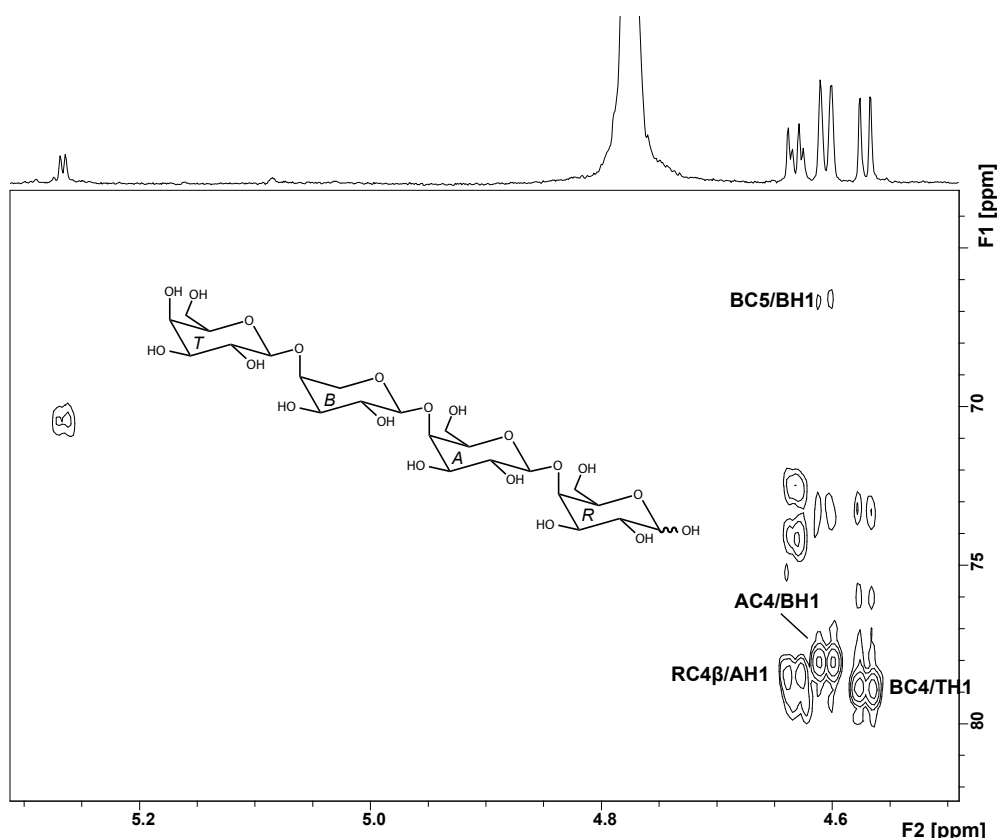


Abbildung 4.9: Struktur und HMBC-Spektrum des Oligosaccharids G4a. Die zur Strukturbestimmung bedeutenden Korrelationen sind entsprechend bezeichnet.

Sojabohnen-GN beschrieben, allerdings wurde dies auf Basis der Methylierungsanalyse gezeigt und nicht durch Isolierung und Charakterisierung eines entsprechenden OS (HUISMAN ET AL., 2001a). Daher wurde mit G3b im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein GN-OS, welches terminale *Ar_{ap}* enthält, aus pflanzlichem Material isoliert und vollständig charakterisiert. Die 1,4-substituierten α -*Ar_{ap}*-Einheiten innerhalb der GN-Ketten sind dagegen ein bisher nicht beschriebenes Strukturelement. Dieses Strukturmerkmal ist zudem sehr schwer nachweisbar, da es bei der Methylierungsanalyse dasselbe PMAA ergibt wie eine 1,5-substituierte *Ara_f*. Das Vorkommen der *Ar_{ap}*-Einheiten in GN hat potentielle Auswirkungen auf die Eigenschaften der GN-PS. Neben der Fermentation im Dickdarm könnte auch ein durch β -Galactosidase vermittelter Abbau der GN in der pflanzlichen Zellwand beeinflusst werden. Bei beiden Prozessen wären Enzyme notwendig, die glykosidische Bindungen zu α -*Ar_{ap}*-Einheiten spalten können.

Aus einem Driselase-Hydrolysat der löslichen GN-PS konnte das in Abbildung 4.10 gezeigte OS G4b isoliert werden. Aufgrund der geringen isolierten Menge erfolgte die Strukturaufklärung lediglich auf Basis des H,H-TOCSY-Spektrums und des HSQC-Spektrums (Abbildung 4.10). Durch die TOCSY-Korrelationen und den Vergleich der chemischen Verschiebungen mit de-

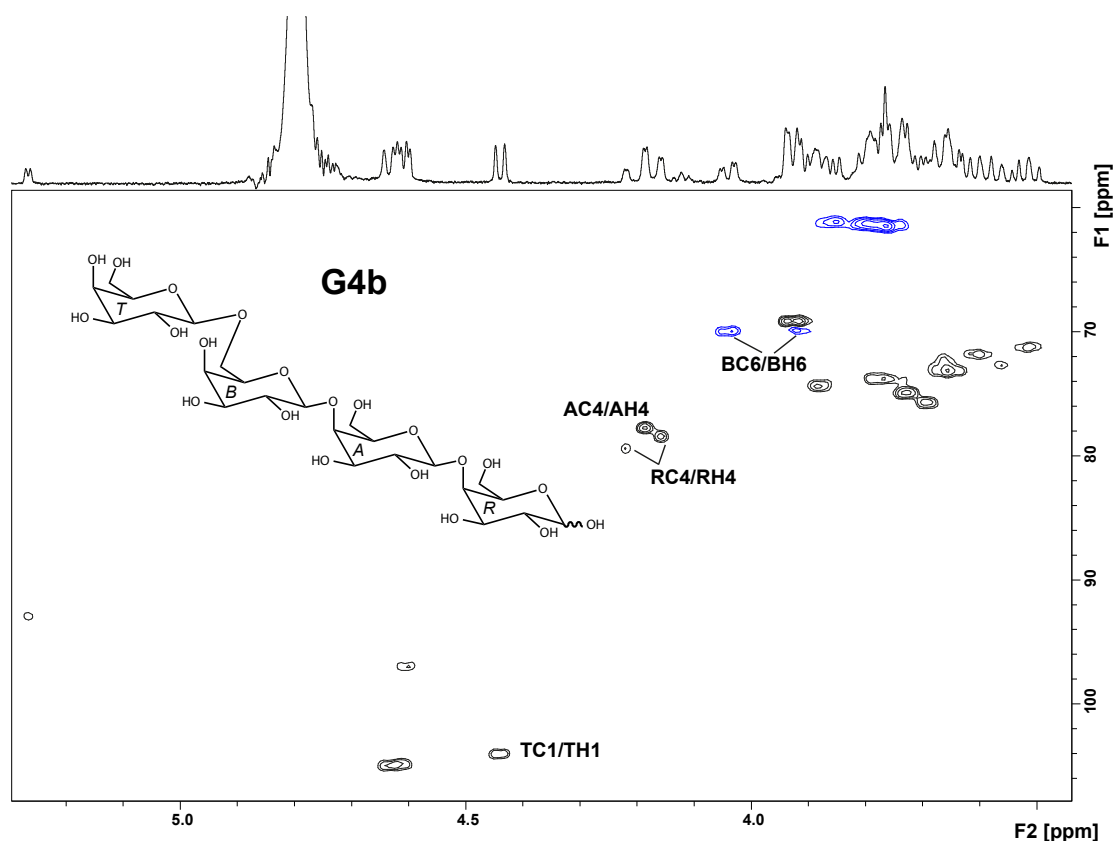


Abbildung 4.10: Struktur und HSQC-Spektrum des Tetrasaccharids G4b. Diagnostische Korrelationen sind entsprechend bezeichnet.

nen der bisher charakterisierten GN-OS konnten zunächst die HSQC-Peaks der reduzierenden, *O*4-substituierten Gal β - und der 1,4-substituierten β -Gal β -Einheit zugeordnet werden. Die mithilfe des TOCSY-Spektrums zugeordneten HSQC-Signale der dritten Gal β -Einheit wiesen diagnostische chemische Verschiebungen auf (Tabelle 9.24, Seite 193). So konnte für Position 4 keine, für eine Substitution an dieser Position charakteristische, Tieffeldverschiebung beobachtet werden. Dagegen lag für Position 6, deren HSQC-Peaks im phasensensitiven Experiment zusätzlich durch die Phasenverschiebung identifiziert werden können, eine ^{13}C -Tieffeldverschiebung von ca. 9 ppm vor (siehe Signal BC6/BH6 in Abbildung 4.10), woraus eine Substitution an dieser Position abgeleitet wurde. Aufgrund der *O*6-Bindung zeigte sich an Position 1 der terminalen Gal β eine charakteristische chemische Verschiebung (TC1/TH1 in Abbildung 4.10), während die Verschiebungen der restlichen Protonen bzw. Kohlenstoffe mit den Verschiebungen terminaler Gal β -Einheiten vergleichbar waren. Die Inkubation des isolierten OS mit *endo*-Galactanase resultierte in einem nicht vollständigen Abbau von G4b zu Gal und einem unbekanntem Peak. Dies bestätigt einerseits das Vorkommen eines β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Abschnitts innerhalb des OS und zeigt andererseits, dass G4b kein Endprodukt der enzymatischen Hydrolyse ist und daher als Nebenprodukt deklariert werden kann. Jedoch konnte das Endprodukt bzw. größere

Mengen der Verbindung G4b weder aus anderen Hydrolysaten isoliert werden, noch in *endo*-Galactanase-Hydrolysaten detektiert werden.

Die Bindung von Seitenketten über die Position O6 innerhalb (1→4)-verknüpfter GN wurde bereits in der Literatur beschrieben (WOOD & SIDDIQUI, 1972), wobei allerdings bis dato keine entsprechenden GN-OS isoliert und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden konnten. Da die O6-substituierte Gal-Einheit nicht weiter substituiert ist, können keine eindeutigen Rückschlüsse auf die native Struktur gezogen werden. So könnte G4b einerseits nach enzymatischer Abspaltung der O4-gebundenen Gal-Einheiten aus einem Verzweigungspunkt des Rückgrats entstanden sein, andererseits könnte eine O6-substituierte Gal-Einheit terminal an den Kettenenden oder innerhalb des Rückgrats vorliegen.

4.2.2.2 *endo*-Galactanase-Spaltung von unlöslichen Sojaextraktionsschrot-Ballaststoffen

Durch die *endo*-Galactanase-Hydrolyse der SES-UBS konnten drei weitere Arap-enthaltende GN-OS isoliert werden (Abbildung 4.11).

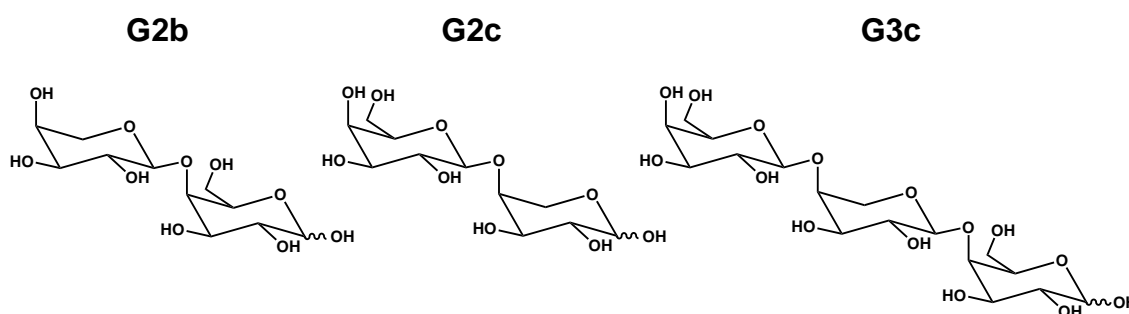


Abbildung 4.11: Strukturen der aus unlöslichen Ballaststoffen von Sojaextraktionsschrot isolierten, Arabinopyranose-enthaltenden Galactan-Oligosaccharide.

In allen isolierten OS liegen die Arap-Einheiten α -(1→4)-verknüpft vor. Der einzige Unterschied zu den bereits im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen OS G3b und G4a (Abbildung 4.8) liegt im Fehlen von Galp-Einheiten, was durch eine detaillierte Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie gezeigt wurde. Durch Inkubation der vorher isolierten Arap-enthaltenden OS G3b und G4a konnte evaluiert werden, dass G2b und G2c die Endprodukte und G3b und G4a die Nebenprodukte der *endo*-Galactanase-Hydrolyse darstellen. So wurde G3b durch eine weitere *endo*-Galactanase-Inkubation zu G2b und Gal abgebaut, während sich bei der Inkubation von G4a ähnliche Mengen an G2a (Abbildung 4.7) und G2c und kleinere Mengen an Gal und G3c bildeten. Dadurch konnte zusätzlich gezeigt werden, dass G3c ein Zwischen- bzw. Nebenprodukt der *endo*-Galactanase-Hydrolyse ist.

Durch die zur Spaltung der löslichen GN-PS verwendeten Mengen an *endo*-Galactanase bzw.

Driselase wurden neben den linearen GN-OS hauptsächlich die Nebenprodukte G3b und G4a freigesetzt. Dies liegt wahrscheinlich in der relativ zum GN-Anteil niedrigeren Aktivität an *endo*-Galactanase begründet. Bei einem chromatographischen Screening der enzymatisch freigesetzten OS erfolgt die Auswertung über die Anteile der durch die *endo*-Galactanase-Spaltung freigesetzten OS, wofür die Kenntnis der Endprodukte und der niedermolekularen Nebenprodukte essentiell ist. Für eine Bestimmung von NMR-Markernsignalen sind die Nebenprodukte von großer Bedeutung, um den Einfluss benachbarter Monosaccharid-Einheiten auf die chemische Verschiebung zu evaluieren.

4.2.3 Isolierung und Charakterisierung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden

Zur Isolierung verschiedener monomerer und dimerer Hydroxyzimtsäure-OS wurden die pflanzlichen Rohstoffe Quinoa und ZRS verwendet, welche signifikante Mengen gebundener Hydroxyzimtsäuren enthalten (siehe Abschnitt 4.1.2.3 und Abschnitt 4.1.2.5).

Die kommerziell erhältlichen, löslichen AN-PS werden durch basische Extraktion gewonnen, wodurch estergebundene FS größtenteils entfernt wird. Daher können die löslichen PS nicht zur Isolierung von Standardsubstanzen verwendet werden. Die enzymatische Spaltung erfolgte einerseits durch das hierfür oft verwendete Multienzympräparat Driselase, andererseits durch das deutlich kostengünstigere Multienzympräparat Viscozyme L. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass diese Enzymmischung wie Driselase eine sehr niedrige Esterase-Aktivität, dagegen aber hohe pektinolytische Aktivität besitzt. Um sehr große Rohstoffmengen hydrolysieren zu können, wurde die Verwendung dieses Enzymgemisches mit zeitsparenden Aufarbeitungen der Rohstoffe kombiniert. So wurde Quinoa nach enzymatischer Stärke- und Proteinhydrolyse bzw. ZRS ohne jegliche Aufarbeitung mit Viscozyme L hydrolysiert, während Driselase zur Hydrolyse der ZRS-UBS verwendet wurde. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung der Hydrolysate wurden die Hydroxyzimtsäure-OS mittels Sephadex LH-20-Chromatographie vorgetrennt. Hierbei findet einerseits eine Trennung nach Größe, andererseits auch nach sekundären Wechselwirkungen statt. Daher müssen sehr unpolare Substanzen wie zum Beispiel DFS-OS mit organischen Lösungsmitteln von der Säule eluiert werden. Zur weiteren Aufreinigung der OS wurde die RP-HPLC unter Verwendung semipräparativer und analytischer Säulen verwendet.

4.2.3.1 Einfach Ferulasäure-substituierte Oligosaccharide

Die in Abbildung 4.12 gezeigten FS-OS sind als Hauptprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Pektinen bekannt und wurden bereits aus Amaranth, Spinat und Zuckerrübe isoliert (ISHII & TOBITA, 1993; COLQUHOUN ET AL., 1994; BUNZEL ET AL., 2005).

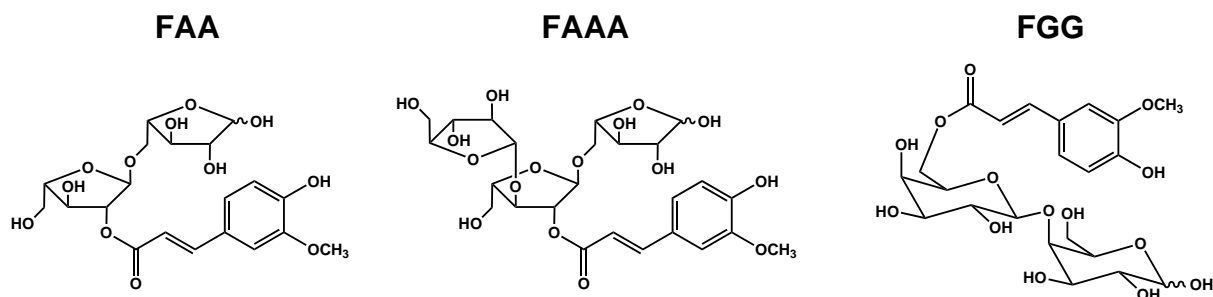


Abbildung 4.12: Strukturen der aus den unlöslichen Ballaststoffen von Zuckerrübenschitzeln isolierten Ferulasäure-Oligosaccharide.

Sowohl aus den ZRS als auch aus den ZRS-UBS konnten größere Mengen dieser FS-OS isoliert werden. Allerdings wurden die FS-OS je nach eingesetztem Enzympräparat in unterschiedlichem Ausmaß freigesetzt, was durch die Substratspezifität der Enzyme begründet werden kann (siehe Abschnitt 4.5.1). Die Struktur der OS konnte durch die Verwendung verschiedener NMR-Experimente und den Vergleich der chemischen Verschiebungen (Abschnitt 9.3) mit Literaturdaten eindeutig gezeigt werden (ISHII & TOBITA, 1993; COLQUHOUN ET AL., 1994; BUNZEL ET AL., 2005). Die MS²- bzw. MS³-Spektren der Standardsubstanzen (siehe Abschnitt 9.4) waren vergleichbar mit den von QUEMENER & RALET (2004) beschriebenen und können sehr gut zur Identifizierung verwendet werden.

Die drei isolierten FS-OS stellen die wichtigsten Hydrolyseprodukte der mit FS veresterten AN- und GN-PS dar und sind bedeutend, um Aussagen über die Anteile der veresterten Strukturelemente zu treffen.

4.2.3.2 Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide

Aus dem Viscozyme L-Hydrolysat des Quinoamehls konnten die zwei in Abbildung 4.13 gezeigten DFS-OS isoliert und charakterisiert werden. In den ZRS-Hydrolysaten wurden die beiden OS ebenfalls nachgewiesen.

Aufgrund seiner Symmetrie zeigte das OS 5-5-DFS(AA)₂ weniger komplexe NMR-Spektren. Die 5-5-DFS konnte durch das ¹H- und das H,H-COSY-Spektrum eindeutig identifiziert werden, da im phenolischen Bereich lediglich die jeweils miteinander koppelnden Signale für H7/H8 bzw. H2/H6 auftraten. Die im HSQC ermittelten entsprechenden ¹³C-Verschiebungen (Tabelle 9.31,

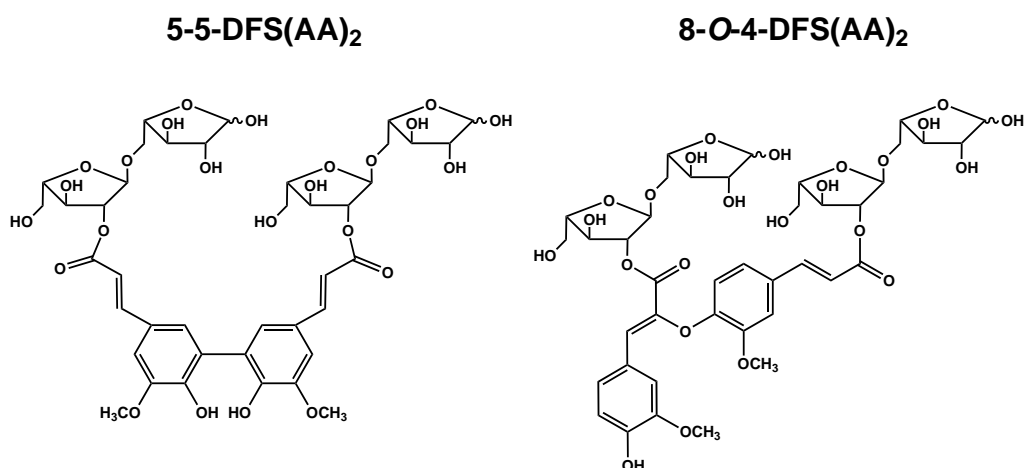


Abbildung 4.13: Strukturen der aus Quinoamehl nach enzymatischer Hydrolyse isolierten Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide.

Seite 196) zeigten eine gute Übereinstimmung mit bisher für estergebundene 5-5-DFS publizierten Daten (ISHII, 1991; SAULNIER ET AL., 1999). Die ¹³C-Verschiebungen der Ara-Einheiten waren vergleichbar mit denen von FAA (Abbildung 4.12). Die Struktur konnte durch eine HMBC-Kopplung zwischen dem C5-Kohlenstoff und dem H1-Proton der beiden Ara-Einheiten bzw. zwischen dem C9-Kohlenstoff der DFS und dem H2-Proton der nicht-reduzierenden Ara-Einheit bestätigt werden.

Durch das H,H-COSY-Spektrum von 8-O-4-DFS(AA)₂ (Abbildung 4.14) konnten erste Hinweise auf die Struktur dieses OS gewonnen werden.

Im phenolischen Bereich ist lediglich ein miteinander koppelndes Paar (Kopplungskonstante 16 Hz) an H7-/H8-Protonen vorhanden. Bei 5-5- bzw. 4-O-5-verknüpften DFS müssten zwei Paare vorhanden sein. Dies lässt auf eine an Position 8 substituierte DFS schließen. Da jeweils zwei H2-, H5- und H6-Protonen vorkommen, kann das verbleibende Singulett dem Proton H7 einer 8-O-4-DFS zugeordnet werden. Die durch Auswertung des HSQC-Spektrums zugeordneten ¹³C-Verschiebungen (Tabelle 9.30, Seite 196) zeigten eine gute Übereinstimmung mit den für estergebundene 8-O-4-DFS publizierten Daten (ALLERDINGS ET AL., 2005). Aufgrund der Asymmetrie der zentralen DFS zeigen die daran gebundenen Ara-Einheiten leicht unterschiedliche chemische Verschiebungen (siehe Abbildung 4.14), welche jedoch wiederum charakteristisch für eine an Position O2 substituierte, α-(1→5)-verknüpfte Arabinose sind. Die Zuordnungen konnten ebenfalls durch die Auswertung des HMBC-Spektrums bestätigt werden.

Mit 5-5-DFS(AA)₂ und 8-O-4-DFS(AA)₂ konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals zwei AN-DFS-OS isoliert und vollständig charakterisiert werden. Dabei konnte zudem die Positionen, an denen die DFS an die Ara-Einheiten gebunden ist, eindeutig bestimmt werden, was durch die in vorherigen Studien benutzten MS²-Techniken nicht möglich war (LEVIGNE ET AL., 2004b; RALET ET AL., 2005). Die Isolierung dieser OS lässt vermuten, dass DFS-cross-links zwischen AN-PS ebenfalls eine Rolle für die physikochemischen und funktionellen Eigenschaften dikoty-

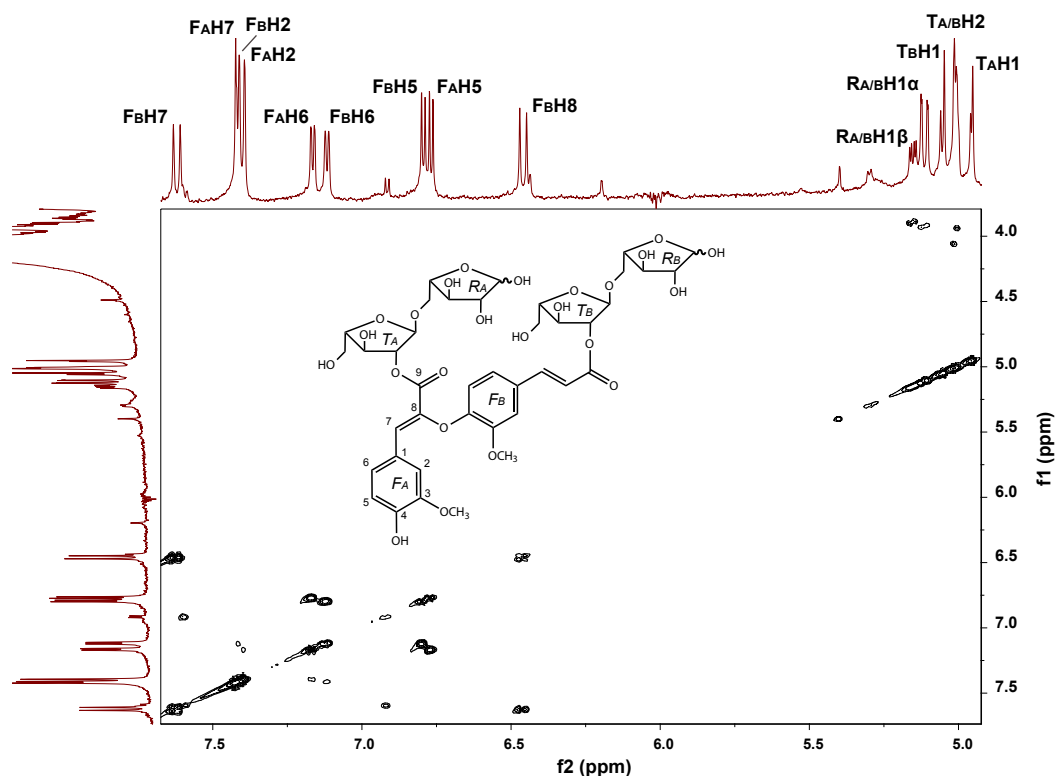


Abbildung 4.14: Struktur und H,H-COSY-Spektrum von 8-O-4-DFS(AA)₂. Die durch die Kreuzsignale zugeordneten ¹H-Signale sind entsprechend bezeichnet.

ler Pflanzenzellwände spielen. Vergleichbar zu deren Funktion in monokotylen Pflanzen können sie eine erhöhte Festigkeit der pflanzlichen Zellwand bewirken und damit auch die enzymatische Zugänglichkeit bzw. die Fermentierbarkeit beeinflussen. Darüber hinaus könnten sie durch eine Verknüpfung der PS zu einer erhöhten Viskosität dieser beitragen.

4.2.3.3 Zweifach Ferulasäure-substituiertes Oligosaccharid aus Zuckerrübe

Aus dem 70:30 Methanol/Wasser Sephadex-LH-20-Eluat des Viscozyme L-Hydrolysats der ZRS konnte das in Abbildung 4.15 gezeigte OS isoliert werden.

Die Signale im phenolischen Bereich des ¹H-NMR-Spektrums des isolierten OS konnten zwei *trans*-FS zugeordnet werden, welche sich bei gleichen ¹³C-Verschiebungen nur leicht in ihren ¹H-Verschiebungen unterscheiden (Tabelle 9.29, Seite 195). Gleiches wurde für die *Araf*-Einheiten festgestellt, da im anomeren Bereich neben den für reduzierende *Araf*-Einheiten charakteristischen Signalen je zwei Peaks einer an Position O2 substituierten *Araf*-Einheit vorlagen. Aufgrund der kleinen isolierten Menge konnte kein HMBC-Spektrum aufgenommen werden, so dass nicht eindeutig bestimmt werden konnte, welche FS-Einheit an welche *Araf*-Einheit gebun-

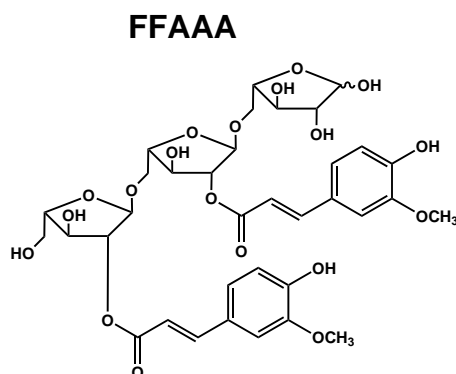


Abbildung 4.15: Struktur des aus dem enzymatischen Hydrolysat von Zuckerrübenschnitzeln isolierten, mit zwei Ferulasäuren substituierten Oligosaccharids.

den ist. Jedoch konnte, basierend auf den charakteristischen HSQC-Signalen, die in Abbildung 4.15 gezeigte Struktur bestimmt werden.

Ein mit zwei FS substituiertes AN-Trimer wurde bereits von LEVIGNE ET AL. (2004a) aus Zuckerrübe isoliert und durch MS²-Techniken charakterisiert. Als Substitutionsstellen wurden hierbei die Position O5 der terminalen Araf-Einheit und die Position O2 der mittleren Araf-Einheit bestimmt. Die für das OS beschriebene MS²-Fragmentierung zeigt signifikante Unterschiede zu der MS²-Fragmentierung von FFAAA (Abbildung 9.27, Seite 205), was für eine unterschiedliche Struktur der beiden OS spricht. Durch die Charakterisierung von FFAAA konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, dass zwei benachbarte Araf-Einheiten innerhalb des AN-Rückgrats mit FS substituiert sein können. Die erhöhte Substitution des AN-Rückgrats kann wiederum Einfluss auf die Aktivität von Feruloyl-Esterasen und damit auf die Abbaubarkeit und die Freisetzung der FS haben.

4.2.3.4 *p*-Cumarsäure-Oligosaccharid aus Quinoa

Bei der Aufreinigung der FAA-Fraktion des Viscozyme L-Hydrolysats des Quinoamehls konnten kleine Mengen eines OS isoliert werden, dessen Molekulargewicht (m/z 427) und Maximum im UV-Spektrum (315 nm) auf eine mit *p*-CS veresterte Arabinbiose hinwiesen. Im MS²-Spektrum des Quasimoleküls [M-H]⁻ des OS konnten Fragmente, die typisch für Ringspaltungen durch eine an Position O5 substituierte, reduzierende Araf sind (-60 und -90), detektiert werden (Abbildung 9.29, Seite 206). Zudem konnte die Abspaltung einer Anhydro-Ara (-132) detektiert werden. Ein MS³-Experiment mit diesem Fragmentation ergab m/z 187 als einziges intensives Fragment (Abbildung 9.29, Seite 206). Dieser Massenverlust von 108 wurde von QUEMENER & RALET (2004) als charakteristisch für eine an Position O2 mit FS substituierte Araf beschrieben. Diese Daten deuten auf eine α -(1→5)-verknüpfte Arabinbiose hin, die an Position O2 der nicht-reduzierenden Araf mit *p*-CS substituiert ist. Die in Abbildung 4.16 gezeigte Struktur

wurde durch Auswertung der zweidimensionalen NMR-Spektren bestätigt.

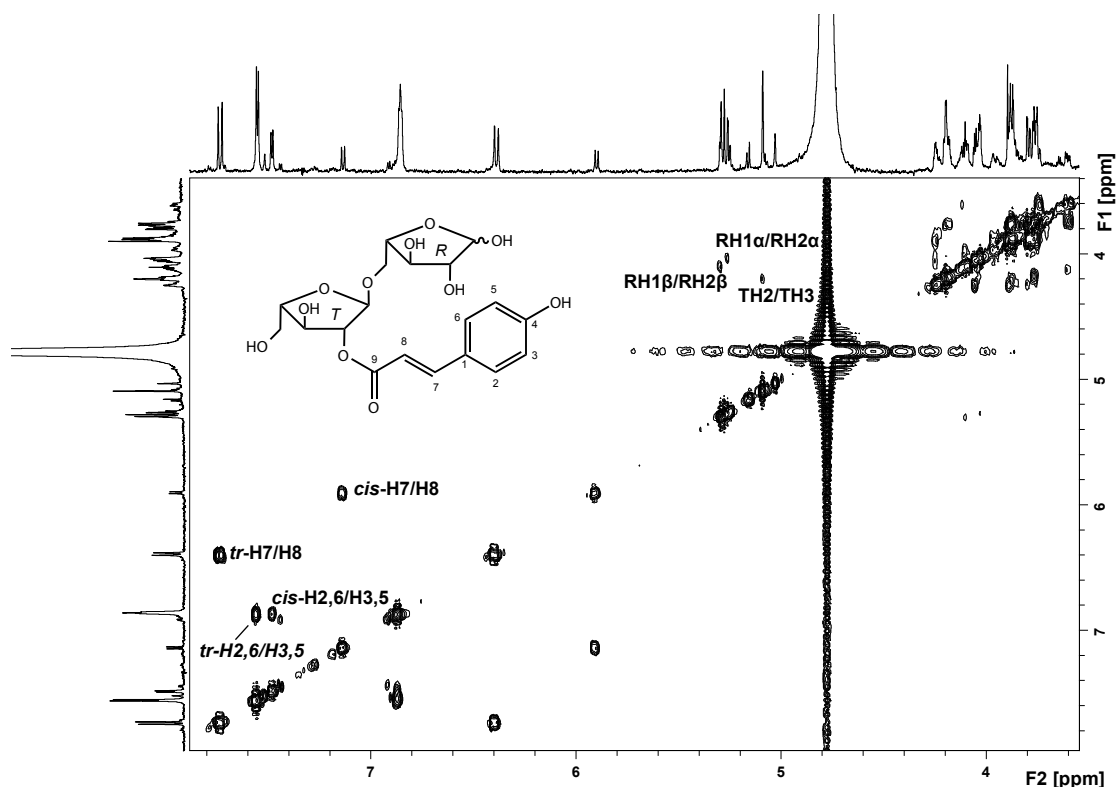


Abbildung 4.16: Struktur und H,H-COSY-Spektrum von CAA. Für die Strukturbestimmung bedeutende Korrelationen sind entsprechend bezeichnet. *tr* = *trans*.

Im H,H-COSY-Spektrum (Abbildung 4.16) wurden vor allem im phenolischen Bereich eine höhere Anzahl an Protonen-Signalen festgestellt als für eine *p*-CS-Einheit zu erwarten wären. Jedoch konnten durch die entsprechenden cross-peaks alle Signale zu einer *cis*- bzw. *trans*-*p*-CS zugeordnet werden. Die Isomere konnten über die H7/H8-Kopplungskonstanten eindeutig bestimmt werden (*trans*: 16 Hz, *cis*: 12 Hz). Es kann vermutet werden, dass das *cis*-Isomer durch Lichteinwirkung während der Probenaufarbeitung entstanden ist (BUNZEL ET AL., 2005). Die für die beiden Ara-Einheiten bestimmten ¹H-Verschiebungen zeigten im Vergleich mit FAA leichte Unterschiede (Abschnitt 9.3). Jedoch wurden für den Kohlenhydrat-Teil von CAA und FAA sehr ähnliche ¹³C-Verschiebungen erhalten, was die vermutete Struktur bestätigt. Durch charakteristische HMBC-Signale konnte die Ringform der terminalen Ara_f und die α-(1→5)-Verknüpfung zwischen den Ara_f-Einheiten bewiesen werden.

Die Bindung von *p*-CS an Arabinoxylane in monokotylen Pflanzen konnte bereits durch die Isolierung entsprechender OS gezeigt werden (MUELLER-HARVEY ET AL., 1986; ISHII & HIROI, 1990; ALLERDINGS ET AL., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass *p*-CS auch in dikotylen Pflanzen zellwandgebunden vorliegen kann und dabei an AN gebunden ist. Welche Bedeutung die Bindung von *p*-CS an AN hat, ist derzeit unbekannt.

4.3 Chromatographisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

Durch die Analyse von aus Zellwandmaterialien oder isolierten PS enzymatisch freigesetzten OS mit niedrigem Polymerisationsgrad können erste detaillierte Rückschlüsse auf die vorliegenden Strukturelemente gezogen werden. Da *endo*-Enzyme wie beispielsweise *endo*-Arabinanase und *endo*-Galactanase ausschließlich lineare PS-Abschnitte spalten können, sind sie sehr gut zur Analyse verzweigter Strukturelemente geeignet. Die für die Methode als Standardsubstanzen verwendeten AN- und GN-OS sowie ihre Einordnung als Haupt- oder Nebenprodukte der enzymatischen Hydrolyse mittels *endo*-Enzymen sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst. Die Strukturen der OS sind in den Abbildungen 9.2 und 9.3 zusammengefasst (Seite 182 und 183).

Tabelle 4.11: Für das chromatographische Profiling von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden verwendete Standardsubstanzen sowie ihre Einordnung als Haupt- oder Nebenprodukte der *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Hydrolyse. Die Strukturen der Oligosaccharide sind in Abbildung 9.2 auf Seite 182 und Abbildung 9.3 auf Seite 183 gezeigt.

Arabinane	Galactane
<i>Hauptprodukte</i>	
A2a	G2a
A2b	G2b
A4a	G2c
A4b	
A5a	
A5b	
A5c	
A6a	
A7a	
A7b	
<i>Nebenprodukte</i>	
A3a	G3a
A3b	G3b
A5d	G3c
A6b	G4a
	G4b

Die isolierten OS repräsentieren zum einen die Hauptstrukturelemente der PS und zum anderen neuartige, bisher unbekannte und schwer nachzuweisende Strukturmerkmale. Nebenprodukte

wurden ebenfalls in die Methode mit aufgenommen, da ihr Auftreten auf eine unzureichende Enzymaktivität bzw. Nebenaktivitäten der eingesetzten *endo*-Enzyme hinweisen kann. Des Weiteren könnten sie für die Analyse enzymatischer Abbaureaktionen von Bedeutung sein und in manchen Materialien teilweise als native Strukturelemente vorliegen. Mittels HPAEC-PAD können OS sehr empfindlich detektiert und quantifiziert werden, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, auch geringe Mengen verzweigter OS neben hohen Mengen an linearen Spaltprodukten zu erfassen. Zudem wurde das Potential der chromatographischen Trennung an einer PGC-Phase in Kombination mit der MS- bzw. ELSD-Detektion als Alternativ- bzw. Zusatzmethode evaluiert.

4.3.1 Konzentrationsbestimmung der Standardsubstanzen

Zur Entwicklung einer flüssigkeitschromatographischen Methode zum Screening der verschiedenen AN- und GN-OS werden Stammlösungen einer definierten Konzentration benötigt. Die isolierten Standardsubstanzen lagen jedoch teilweise in nur sehr geringen Mengen vor, so dass eine gravimetrische Mengenbestimmung nicht möglich war. Zudem sind vor allem die AN-OS stark hygroskopisch, was die Einwaage der Substanzen für Stammlösungen erschwert.

Aufgrund dessen wurden die Konzentrationen der OS mittels quantitativer ^1H -NMR-Spektroskopie nach Zugabe einer internen Standardsubstanz bestimmt, was eine einfache Durchführbarkeit und hohe Robustheit aufweist. Von RUNDLÖF ET AL. (2014) wurde Acetanilid als interne Standardsubstanz für die quantitative NMR-Spektroskopie vorgeschlagen, da es chemisch stabil, nicht hygroskopisch und in sehr reiner Form erhältlich ist. Dazu zeigt Acetanilid eine gute Löslichkeit in Wasser und ergibt ein Singulett-Signal bei 2,17 ppm (referenziert zu Aceton bei 2,22 ppm nach GOTTLIEB ET AL. (1997)). Die Substanz erfüllt daher alle Anforderungen an einen internen Standard für die Konzentrationsbestimmung von OS in wässriger Lösung. Eine Entfernung des Acetanilids nach der NMR-Messung ist nicht nötig, da es mittels HPAEC-PAD nicht detektiert wird. Dies wurde durch Injektion einer entsprechenden wässrigen Lösung evaluiert. Als Pulssequenz wurde das bei quantitativen ^1H -NMR-Messungen häufig verwendete "zg" Pulsprogramm mit einer Relaxationszeit von 60 s verwendet. In Abbildung 4.17 ist beispielhaft das Spektrum von A2a in einer 3,9 mM Acetanilidlösung in D_2O zu sehen.

Nach Phasen- und Basislinienkorrektur wurden mithilfe der HSQC-Spektren zur Integration geeignete ^1H -Signale bestimmt. Idealerweise sollte hierfür ein gut separiertes Signal für ein einzelnes Proton verwendet werden. Jedoch findet bei den analysierten OS des Öfteren eine Überlagerung mehrerer Protonensignale statt. In diesem Fall wurden die Signale zusammen integriert und dies bei der Berechnung der relativen Intensitäten berücksichtigt. Die zur Quantifizierung verwendeten Signale sind in Abschnitt 9.5 aufgeführt. Durch diesen Ansatz war es möglich, auch für die in sehr geringen Mengen vorliegenden OS eine Stammlösung definierter Konzentration zu erstellen.

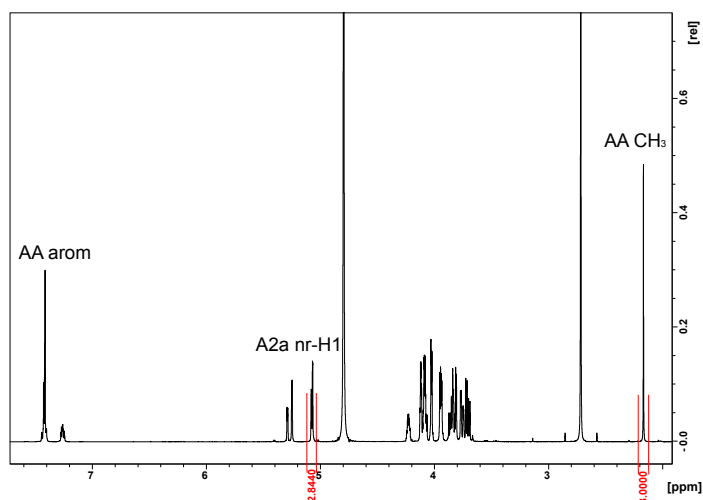


Abbildung 4.17: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung A2a (Abbildung 9.2, Seite 182) in einer 3,9 mM Acetanilidlösung. AA = Acetanilid, arom = aromatisch, nr = nicht reduzierend.

4.3.2 Chromatographische Analyse

4.3.2.1 Analyse mittels HPAEC-PAD

Zur HPAEC-PAD-Trennung der AN- und GN-OS wurde zunächst eine CarboPac PA100-Säule verwendet, wodurch fast alle Haupt- und Nebenprodukte der *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Hydrolyse getrennt werden konnten. Zusätzlich wurde eine CarboPac PA200-Säule getestet, da die beiden OS A4a und A4b, die für die Strukturbeschreibung von AN wichtig sind, auf der CarboPac PA100-Säule koeluierten (siehe Abbildung 4.18A). Durch Verwendung dieser Trennsäule konnte eine vollständige Trennung aller AN- bzw. GN-OS erreicht werden, auch wenn bei A4a und A4b keine Basislinientrennung erzielt werden konnte (siehe Abbildung 4.18B).

Generell werden AN-OS stärker retardiert als GN-OS, jedoch weisen manche Standardsubstanzen mit verschiedenen Polymerisationsgraden ähnliche Retentionszeiten auf. Zudem entstehen bei der *endo*-Galactanase-Hydrolyse viele Nebenprodukte (siehe Abschnitt 4.3.3), die mit AN-OS koeluierten. Daher wurden separate Gradientenprogramme für die AN- bzw. GN-OS entwickelt und die Inkubationen mit den jeweiligen Enzymen in separaten Ansätzen durchgeführt. Durch die separate Inkubation wird zudem ausgeschlossen, dass eine Modifikation der AN durch das *endo*-Galactanase-Präparat bzw. der GN durch das *endo*-Arabinanase-Präparat stattfindet, insbesondere durch mögliche Verunreinigungen der Enzympräparate.

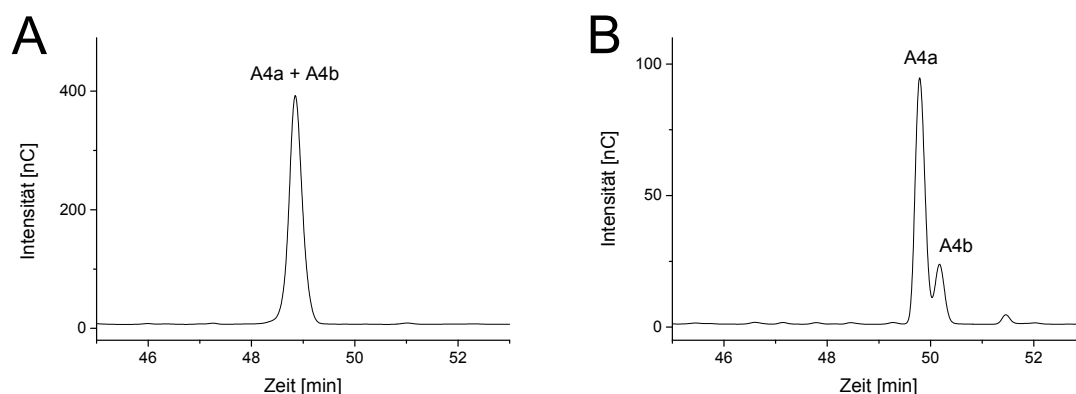


Abbildung 4.18: HPAEC-PAD-Trennung der Oligosaccharide A4a und A4b (Abbildung 9.2, Seite 182) auf einer CarboPac PA100-Säule (A) und einer CarboPac PA200-Säule (B).

4.3.2.2 Analyse mittels HPLC-MS

Durch die Verwendung einer PGC-Säule konnte ebenfalls eine gute Trennung der AN-OS erreicht werden. Hierbei konnten auch die beiden OS A4a und A4b eindeutig getrennt werden. Im Rahmen der Isolierung von Standardsubstanzen wurden zudem teilweise Mischungen aus A4a, A4b und einem linearen AN-Tetramer erhalten. Diese sollten zwar durch *endo*-Arabinanase vollständig gespalten werden, bei hoher Substratmenge oder niedriger Enzymaktivität könnten sie jedoch als Nebenprodukt vorhanden sein. Eine eindeutige Basislinientrennung dieser Verbindungen konnte nur durch Verwendung der PGC-Phase erreicht werden (siehe Abbildung 4.19).

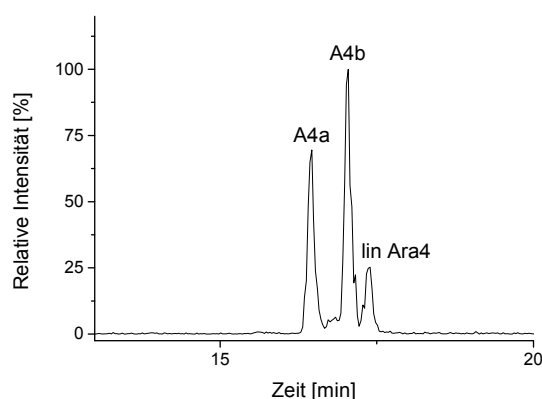


Abbildung 4.19: Trennung einer Mischung aus einem linearen Arabinan-Tetramer (lin Ara4) und den Arabinan-Oligosacchariden A4a und A4b (Abbildung 9.2, Seite 182) auf einer Porous Graphitized Carbon-Säule (Detektion durch MS²-Messung der Lithiumaddukte (m/z 553))

Eine vollständige Trennung der GN-OS war bei Verwendung der PGC-Phase jedoch nicht möglich, was hauptsächlich auf eine starke Peakverbreiterung durch die α - und β -Anomere zurückzuführen ist. Wie in Abbildung 4.20 zu sehen, zeigen zum Beispiel G2a und G2b sehr breite Peaks sowie eine sehr ähnliche Retentionszeit und können demnach lediglich durch ihre Masse unterschieden werden.

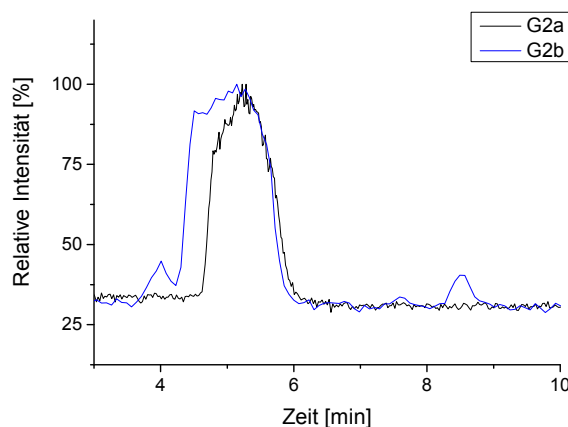


Abbildung 4.20: Totalionenstrom-Chromatogramme der Verbindungen G2a und G2b (Abbildung 9.3, Seite 183) auf einer Porous Graphitized Carbon-Säule.

Da eine Peakverbreiterung aufgrund des α -/ β -Anomerengleichgewichts bei den entsprechenden Zuckeralkoholen nicht auftreten kann, wurde eine Reduktion der OS nach PITSON ET AL. (1997) durchgeführt. Bei vielen der höhermolekularen Nebenprodukte wie zum Beispiel G3a, G3b und G3c konnte durch die resultierenden schmalen Peaks eine sehr gute Trennung erreicht werden. Jedoch konnte bei den OS G2a und G2b aufgrund der geringen Retention keine Trennung erzielt werden, während das OS G2c nach der Reduktion nicht mehr detektiert wurde. Dementsprechend wäre eine Analyse mittels HPLC-ELSD eventuell zur Quantifizierung von AN-OS geeignet, jedoch nicht von GN-OS. Daher wurde die HPAEC-PAD als Standardmethode zur Quantifizierung der AN- und GN-OS etabliert. Die HPLC-MS stellt jedoch eine sehr gute Zusatzmethode zur empfindlichen und eindeutigen Identifizierung von OS dar, da für diese neben der PGC-Retentionszeit (siehe Abschnitt 9.6) die MS²-Fragmentierung der OS (siehe Abschnitt 9.4) benutzt werden kann.

4.3.2.3 Quantifizierung

Es wurde in Vorversuchen festgestellt, dass sich der HPAEC-PAD-Response mit der Neubereitstellung von Eluenten verändert. Bei Anwendung einer externen Kalibrierung müsste dementsprechend nach jedem Eluentenwechsel neu kalibriert werden. Einige der OS lagen jedoch nur

in kleinen Mengen vor, und aufgrund von kleineren Verunreinigungen konnten nicht alle OS miteinander vermischt werden. Daher würde jede erneute Kalibrierung viel Messzeit kosten und größere Mengen an isolierten Standardsubstanzen verlangen. Deshalb wurden für die Quantifizierung die RRFs zu einem internen Standard verwendet. Ein geeigneter interner Standard ist eine Substanz, die in großer Menge und Reinheit sowie kostengünstig verfügbar ist, nicht in Pflanzenmaterialien vorkommt und sich in die chromatographische Trennung einpasst. Jedoch wurden bei vielen getesteten Monosacchariden oder OS Koelutionen mit Standardsubstanzen oder Matrixpeaks der *endo*-Arabinanase- oder *endo*-Galactanase-Hydrolysate festgestellt. Lediglich bei Raffinose fand keine Koelution statt, allerdings kann dieses OS in manchen Pflanzenmaterialien vorkommen. Da OS jedoch bei der üblicherweise verwendeten Aufarbeitung zur Gewinnung der Ballaststoffe bzw. Zellwände im Waschschrift mit Ethanol/Wasser (80:20, v/v) quantitativ entfernt werden, wurde Raffinose dennoch als interner Standard verwendet. Um eine Verschleppung von Raffinose in die PS-Präparate nachzuweisen, sollte jedoch stets eine Inkubation ohne Enzym- und Raffinosezugabe mitgeführt werden.

Eine Voraussetzung für die Verwendung der RRFs zu Raffinose zur Bestimmung der OS-Anteile ist, dass sie lediglich in einem Konzentrationsbereich verwendet werden, in dem der Response der OS linear verläuft. Bei der Injektion verschiedener Mengen der Verbindung A2a wurde festgestellt, dass der Response bei niedrigen Konzentrationen linear verläuft, bei höheren Konzentrationen jedoch stark abflacht (siehe Abbildung 4.21).

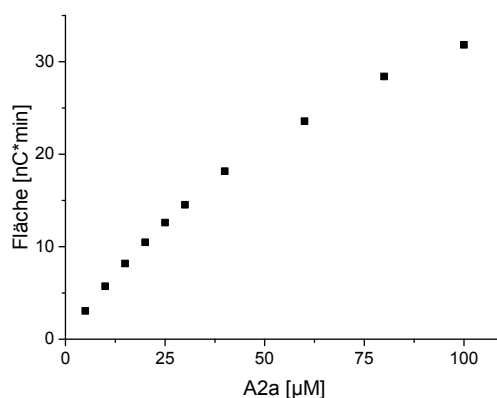


Abbildung 4.21: PAD-Response zu verschiedenen Konzentrationen der Verbindung A2a (Abbildung 9.2, Seite 182).

Im Falle des OS A2a lag eine ausreichende Linearität bis zu einer Konzentration von 30 µM vor. Liegt die A2a-Konzentration im analysierten Inkubationsansatz über 30 µM, muss dieser entsprechend verdünnt werden. Durch diese Verdünnung würde sich auch die Konzentration der als internen Standard zugegebenen Raffinose verändern, was sich wiederum auf den RRF des OS A2a auswirken könnte. Daher wurden die RRFs des OS A2a zu Raffinose in einer Konzentration von 10 bzw. 20 µM nach chromatographischer Trennung bestimmt. Dabei wurden je

nach Raffinosekonzentration verschiedene RRFs erhalten, weshalb für die Methode eine konstante Raffinosekonzentration von 10 μM gewählt wurde. Die Verwendung der RRFs zu einer konstanten Raffinosekonzentration hat zur Folge, dass Raffinose für jede Verdünnung des Hydrolysats neu zugegeben werden muss. Daher wurde die Zugabe der internen Standardsubstanz nach der Enzyminkubation vorgenommen, um eine zeitaufwändige Wiederholung dieser zu vermeiden. Um die Robustheit der RRFs zu überprüfen, wurden diese für das OS A2a mit zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellten Eluenten bestimmt. Obwohl die absoluten Flächen hierbei kleinere Änderungen zeigten, blieben die RRFs konstant. Daher bietet die Anwendung der RRFs zu Raffinose einen robusten und praktikablen Ansatz zur Bestimmung der Anteile der AN- und GN-OS.

Für die Bestimmung der RRFs der AN- und GN-OS wurden, soweit aufgrund kleinerer Verunreinigungen möglich, jeweils Mischungen mehrerer OS hergestellt. Von diesen Mischungen wurden mindestens sechs Konzentrationen in dem für A2a bestimmten linearen Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 30 μM mittels HPAEC-PAD gemessen. Bei OS, die in kleineren Mengen als Standardsubstanz vorlagen und ebenso auch in kleineren Mengen in den meisten Zellwandstrukturen vorkommen, wurden teilweise niedrigere Konzentrationsbereiche verwendet. Zur Ermittlung der RRFs und der linearen Konzentrationsbereiche wurde für jede Standardsubstanz eine Auftragung von $c_{\text{Analyt}} \cdot \text{Area}_{\text{Raffinose}}$ gegen $c_{\text{Raffinose}} \cdot \text{Area}_{\text{Analyt}}$ vorgenommen. Bei manchen OS war bereits ab niedrigeren Konzentrationen keine Linearität mehr gegeben. Deshalb und aufgrund der teilweise geringeren verwendeten Mengen sind in Tabelle 4.12 für manche OS niedrigere lineare Konzentrationsbereiche angegeben. Durch weitere Verdünnungen der OS-Mischungen und der Messung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses wurden zusätzlich die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der OS evaluiert (Signal-zu-Rausch-Verhältnis 3:1 bzw. 9:1). Die bei der Mehrfachinjektion der verschiedenen OS erhaltenen relativen Standardabweichungen der Flächen lagen meist unter 5 %, was eine gute Präzision der HPAEC-PAD-Messung zeigt. In Tabelle 4.12 sind die HPAEC-PAD-Retentionszeiten der AN- und GN-OS, ihre RRFs, deren Konzentrationsbereiche sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der OS aufgeführt.

Die RRFs der Monosaccharide und der früh eluierenden OS sind im Vergleich zu den später eluierenden OS etwas höher. Dies könnte mit der sich im Laufe des Gradientenprogramms verändernden Eluentenzusammensetzung zusammenhängen. Durch die entwickelte Methode können die AN- und GN-OS über weite Konzentrationsbereiche bestimmt werden, wodurch sich teilweise die Messung mehrerer Verdünnungen vermeiden lässt. Zudem kann bis in den niedrigen μM -Bereich quantifiziert werden, wodurch auch OS mit sehr niedrigen Anteilen bestimmt werden können.

Tabelle 4.12: Retentionszeiten (RT), relative Responsefaktoren (RRFs), lineare Konzentrationsbereiche der RRFs, Bestimmungsgrenzen (LOQ) und Nachweisgrenzen (LOD) der Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide (OS). Die Strukturen der OS sind in Abbildung 9.2 auf Seite 182 und Abbildung 9.3 auf Seite 183 gezeigt.

OS	RT	RRF	Konzentrationsbereich [μM]	LOQ	LOD
<i>Arabinan-Hauptprodukte</i>					
Raffinose	13,70	1,000	-	-	-
Ara	5,36	2,214	1,0 - 30,0	0,169	0,048
A2a	28,00	0,880	0,1 - 30,0	0,088	0,036
A2b	21,10	0,827	0,5 - 10,0	0,083	0,032
A4a	49,45	0,597	0,1 - 24,0	0,066	0,032
A4b	49,78	0,719	0,1 - 20,0	0,073	0,038
A5a	51,55	0,571	0,1 - 18,0	0,056	0,023
A5b	54,25	0,567	0,1 - 18,0	0,060	0,028
A5c	55,35	0,697	0,5 - 10,0	0,065	0,023
A6a	67,50	0,561	0,1 - 18,0	0,057	0,025
A7a	68,58	0,611	0,1 - 15,0	0,050	0,014
A7b	71,17	0,504	0,1 - 18,0	0,055	0,027
<i>Galactan-Hauptprodukte</i>					
Raffinose	17,15	1,000	-	-	-
Gal	6,92	1,134	0,5 - 18,0	0,163	0,081
G2a	19,28	0,874	0,5 - 24,0	0,116	0,049
G2b	15,35	1,134	0,5 - 24,0	0,108	0,040
G2c	12,19	0,780	0,25 - 12,0	0,067	0,013
<i>Arabinan-/Galactan-Nebenprodukte</i>					
A3a	38,60	0,616	0,1 - 24,0	0,073	0,036
A3b	40,15	0,659	0,1 - 24,0	0,062	0,024
A5d	62,10	0,593	0,1 - 20,0	0,077	0,042
A6b	68,80	0,655	0,1 - 15,0	0,082	0,047
G3a	35,15	0,578	0,1 - 24,0	0,061	0,023
G3b	33,10	0,596	0,1 - 24,0	0,075	0,040
G3c	30,84	0,598	0,1 - 24,0	0,071	0,028
G4a	40,24	0,686	0,1 - 24,0	0,060	0,019
G4b	37,45	0,690	0,1 - 20,0	0,056	0,024

4.3.2.4 Matrixeinflüsse

Enzymatische Reaktionen werden häufig in Puffersystemen durchgeführt, da die enzymatische Aktivität neben der Temperatur und Substrat- bzw. Enzymkonzentration (siehe Abschnitt 4.3.3) auch vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Ionenart abhängig ist. Für *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Inkubationen wurde die Verwendung von Natriumacetatpuffer (pH 4,8 bzw. 5,0) als geeignetes Puffersystem beschrieben (VAN DE VIS ET AL., 1991; DUNKEL & AMADO, 1994). Da ionenchromatographische Methoden anfällig gegenüber Fremdionen sind, wurde der Einfluss größerer Mengen an Puffersalzen auf die HPAEC-PAD-Analyse evaluiert. Dazu wurden die Stammlösungen verschiedener OS mit Natriumacetatpuffer (0,05 M, pH 5,0) verdünnt und

anschließend die RRFs der OS zu Raffinose bestimmt. Wie in Abbildung 4.22 zu sehen, wurden dadurch Doppelpeaks erhalten. Zudem wurden die Retentionszeiten und die RRFs signifikant beeinflusst.

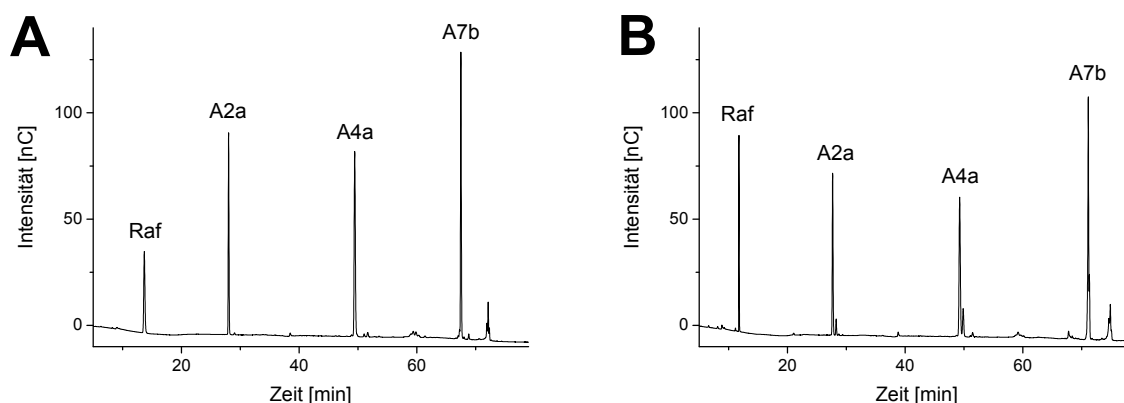


Abbildung 4.22: Chromatogramm einer Mischung, bestehend aus Raffinose (Raf) und den Verbindungen A2a, A4a und A7b (Abbildung 9.2, Seite 182), gelöst in Wasser (A) und in Natriumacetat-Puffer (B).

In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass die Verwendung eines Puffers im Vergleich zur Inkubation in Wasser zwar höhere Mengen an freigesetzten OS zur Folge hat, die Verhältnisse zwischen den OS jedoch vergleichbar sind. Aufgrund der starken Beeinflussung der chromatographischen Analyse und da durch die verwendeten unlöslichen bzw. salzfreien PS-Präparate keine Veränderung der Ionenstärke stattfinden sollte, wurde auf die Verwendung eines Puffers verzichtet. Eine absolute Quantifizierung der den freigesetzten OS entsprechenden Strukturelementen sollte sich ohnehin sehr schwierig gestalten, da auch eine komplexe Zellwandarchitektur bzw. Bereiche hoher Verzweigung die Effektivität der enzymatischen Spaltung negativ beeinflussen. Falls eine absolute Quantifizierung der den OS entsprechenden Strukturelementen durchgeführt wird, sollte bedacht werden, dass nur die unter den verwendeten Bedingungen zugänglichen PS gespalten und die darauf freigesetzten OS analysiert werden. Aufgrund der starken Unterschiede in der Zellwandarchitektur zwischen verschiedenen Materialien ist ein Vergleich der absolut freigesetzten Mengen zwischen diesen wahrscheinlich häufig nicht zielführend. Jedoch wäre dieser Ansatz eventuell gut anwendbar auf Proben mit sehr ähnlicher Zellwandarchitektur, was zum Beispiel bei der Analyse verschiedener Sorten oder bei Lagerungsversuchen der Fall wäre.

Im Hydrolysat der *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Inkubationsansätze sollten als probenbedingte Matrixbestandteile hauptsächlich lösliche OS bzw. PS vorhanden sein. Um deren Einfluss auf die HPAEC-PAD-Analyse zu evaluieren, wurde die Verbindung A2a mit verschiedenen OS- und PS-enthaltenden Lösungen verdünnt und anschließend der RRF bestimmt. Verwendet wurden dazu lösliche AN-PS, Malto-OS und andere AN-OS. Hierbei konnte kein si-

gnifikanter Einfluss auf den RRF festgestellt werden, was eine ausreichende Robustheit dieses Ansatzes zeigt.

Bei der Analyse der PS-Zusammensetzung der LBS ist des Weiteren zu berücksichtigen, dass bei der Ausfällung der LBS auch Begleitsubstanzen und Puffersalze mitgefällt werden können. Daher wurde evaluiert, ob ein Einfluss dieser Komponenten auf die enzymatische Spaltung und die HPAEC-PAD-Analyse vorliegt. Bei der *endo*-Arabinanase-Inkubation von Quinoa-LBS wurden nur kleine Mengen an AN-OS freigesetzt, was darauf hindeutet, dass die enzymatische Spaltung durch Matrixkomponenten teilweise inhibiert bzw. reduziert wird. Zudem wies das HPAEC-PAD-Chromatogramm diverse Matrixpeaks auf, die teilweise mit Standardsubstanzen koeluierten. Auch durch eine 24-stündige Dialyse (Molecular Weight Cut Off: 3500) konnten die Matrixpeaks nur teilweise entfernt werden. Daher wurden die LBS der pflanzlichen Rohstoffe nicht mit dieser Methode analysiert. Um die Eignung der Methode für lösliche PS zu evaluieren, wurden dementsprechend lediglich die kommerziell erhältlichen AN- und GN-Präparationen als Ausgangsstoffe verwendet. Diese sind komplett löslich und sollten frei von Salzen und anderen Begleitstoffen sein.

4.3.3 Enzymatische Freisetzung

Eine optimale Aktivität der *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase wurde für vergleichsweise hohe Temperaturen beschrieben (50 - 55°C), während die Enzyme meist nur bei niedrigeren Temperaturen (30 - 40°C) über längere Zeit stabil sind (ROMBOUTS ET AL., 1988; VAN DE VIS ET AL., 1991; DUNKEL & AMADO, 1994). Daher wurden mit einer Inkubationstemperatur von 40°C Bedingungen gewählt, bei denen sowohl eine ausreichende Aktivität als auch eine ausreichende Langzeitstabilität vorliegen sollte. Nach Festlegung der Inkubationstemperatur konnte bei Vorversuchen festgestellt werden, dass bei der Inkubation verschiedener Ballaststoffe mit *endo*-Galactanase Glc sowie eine große Menge an Spaltprodukten mit einer Retentionszeit zwischen 30 und 60 Minuten freigesetzt werden (siehe Abbildung 4.23).

Als monomere Bestandteile dieser Nicht-GN-OS wurden mittels Monosaccharidanalyse größere Mengen an Glc und Xyl neben kleineren Mengen an Fuc, Gal und Ara festgestellt. Dies deutet auf oligomere Bestandteile von Xyloglucanen und somit eine β -Glucanase-Nebenaktivität des *endo*-Galactanase-Präparats hin.

Neben dem pH-Wert des Mediums (siehe Abschnitt 4.3.2.4) und der Temperatur sind das Enzym-Substrat-Verhältnis sowie die Inkubationszeit wichtige Einflussfaktoren für die OS-Freisetzung. Für die Erarbeitung geeigneter Inkubationsbedingungen für UBS bzw. unlösliche Zellwandkomponenten wurden Apfel-UBS in einer festen Konzentration (10 mg/mL) mit verschiedenen Enzymaktivitäten für 24 h bzw. 48 h inkubiert.

Für die Evaluation der *endo*-Arabinanase-Inkubationsbedingungen wurden die Anteile der OS A3a und A3b gewählt. Da das lineare Trimer (A3a) bei ausreichender Enzymmenge zu dem

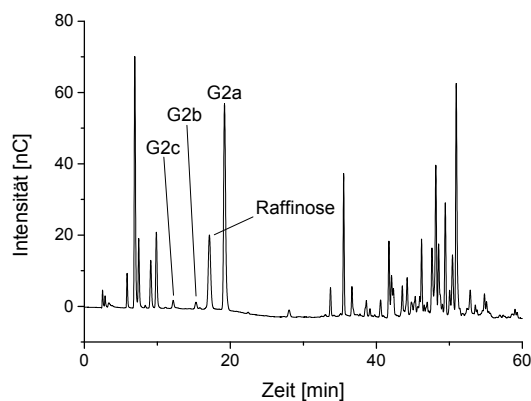


Abbildung 4.23: HPAEC-PAD-Chromatogramm des Hydrolysats eines *endo*-Galactanase-Inkubationsansatzes von unlöslichen Apfel-Ballaststoffen. Die freigesetzten Galactan-Oligosaccharide G2a, G2b und G2c (Abbildung 9.3, Seite 183) sind entsprechend bezeichnet.

Disaccharid A2a und monomeres Ara abgebaut werden kann, zeigen größere Mengen dieses OS nach der enzymatischen Umsetzung einen unvollständigen Abbau an. Das verzweigte Trimer A3b kann dagegen, je nach vorliegender Konzentration, auf eine überproportional hohe Arabinofuranosidase-Seitenaktivität hindeuten. Durch die quantitative Bestimmung dieser OS bei verschiedenen Inkubationsbedingungen konnte eine 24-stündige Inkubation mit 2 U *endo*-Arabinanase / 100 mg Apfel-UBS als am besten geeignet bestimmt werden. Bei niedrigeren bzw. höheren Konzentrationen wurden signifikante Mengen an A3a (1 U / 100 mg Apfel-UBS) bzw. A3b (5 U / 100 mg Apfel-UBS) detektiert. Eine 48-stündige Inkubation bei gleicher Enzymaktivität resultierte in einer verstärkten Bildung von A3b. Daher und aufgrund des geringeren Zeitaufwands wurde eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt.

Zur Bestimmung geeigneter *endo*-Galactanase-Inkubationsbedingungen wurden die Verhältnisse der Hauptprodukte G2a, G2b und G2c genutzt. Ab einer Enzymaktivität von 10 U / 100 mg Apfel-UBS wurde bei einer 24-stündigen Inkubation keine Veränderung der OS-Verhältnisse mehr detektiert. Bei einer verlängerten Inkubationszeit oder höheren Enzymaktivität zeigte sich ein leichter Anstieg der OS-Mengen. Um einem eventuellen Abbau der entstandenen Produkte oder der Entstehung hoher Mengen an Nebenprodukten entgegenzuwirken, wurde dennoch eine 24-stündige Inkubation mit 10 U / 100 mg Apfel-UBS durchgeführt.

Aufgrund des höheren AN- bzw. GN-Anteils ergibt sich bei den löslichen AN- und GN-PS eine deutlich höhere Substratkonzentration. Des Weiteren weisen die löslichen AN- und GN-PS eine bessere enzymatische Zugänglichkeit auf. Daher wurde zur Analyse dieser eine geringere, feste Substratkonzentration von 1 mg/mL gewählt. Zur Evaluierung der *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Inkubationsbedingungen für lösliche PS wurden die löslichen AN- bzw. GN-PS verwendet. Bei den für die UBS verwendeten Inkubationsbedingungen traten größere Mengen an A3a bzw. G3a, G3b und G4a auf, was auf einen unvollständigen Abbau der AN

bzw. GN hindeutet. Erst bei einer Enzymaktivität von 20 U *endo*-Arabinanase / 100 mg PS bzw. 200 U *endo*-Galactanase / 100 mg PS konnte eine vollständige *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Spaltung erreicht werden. Da die verwendeten Substrate einen sehr hohen AN- bzw. GN-Anteil haben, könnten diese Konzentrationen für Gemische von löslichen PS zu hoch sein. Dies würde in einer verstärkten Bildung an Nebenprodukten resultieren. Daher müssen die Inkubationsbedingungen für neues Probenmaterial bei einer entsprechend hohen Konzentration an Nebenprodukten erneut etabliert werden.

4.3.4 Anwendung der Methode

Generell wurden die als Nebenprodukte identifizierten OS nicht in die Auswertung der Hydrolysate mit einbezogen, da sie meistens nur in sehr kleinen Mengen vorlagen. Ara und Gal wurden ebenfalls nicht mit einberechnet, da diese auch durch Nebenaktivitäten der Enzympräparate entstehen können und dadurch nicht nur lineare Strukturelemente repräsentieren.

Ein direkter Vergleich der Daten mit der Methylierungsanalyse ist aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Methoden sehr schwierig. Bei der Analyse der AN-PMAAs wird vermutlich die Gesamtheit der AN-PS erfasst, während durch die enzymatische Spaltung lediglich Strukturelemente detektiert werden, die durch *endo*-Arabinanase in OS mit einem Polymerisationsgrad kleiner sieben gespalten werden. Dementgegen werden durch die freigesetzten OS detailliertere Aussagen über bestimmte Strukturelemente erhalten. Im Fall der GN können bei der Methylierungsanalyse Strukturelemente wie interne, 1,4-substituierte α -Ara_p nicht detektiert werden. Zudem werden Galactane wahrscheinlich unterbestimmt (siehe Abschnitt 4.1) und terminale Ara_p-Einheiten können nicht eindeutig den GN zugeordnet werden.

Aufgrund der geringen Aussagekraft eines Vergleichs der PMAA-Verhältnisse und den freigesetzten OS wurde daher generell auf einen Vergleich der GN-Zusammensetzung verzichtet. Die Verhältnisse der AN-PMAAs können jedoch genutzt werden, um die tendenziellen Aussagen der beiden Methoden zu vergleichen.

4.3.4.1 Unlösliche Ballaststoffe

Die Methode wurde zunächst angewandt, um Informationen über die Zellwandzusammensetzung der verschiedenen pflanzlichen Rohstoffe zu erhalten. Dabei wurde festgestellt, dass bei manchen Rohstoffen wie zum Beispiel ZRS-UBS unerwartet geringe Mengen an AN-OS und keine GN-OS freigesetzt wurden. Jedoch liegen in den ZRS-UBS gemäß der Monosaccharidanalyse und der Methylierungsanalyse (Abschnitt 4.1.2.5) ein sehr hoher AN-Gehalt und signifikante Mengen an GN vor. Die geringe Freisetzung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die komplexe Zellwandarchitektur die enzymatische Zugänglichkeit der PS stark

4.3 Chromatographisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

einschränkt. Um die Zellwandstruktur aufzubrechen, können verschiedene Extraktionen verwendet werden. Die meisten Extraktionsmethoden, wie zum Beispiel eine basische Extraktion, beinhalten jedoch die Verwendung starker Salzlösungen. Diese könnten sich störend auf die HPAEC-PAD-Analyse auswirken oder die Modifikation der neutralen Seitenketten zur Folge haben. Salzbestandteile können zwar durch die Verwendung von Dialyse oder Ionenaustauschern entfernt werden, jedoch würde dies einen deutlich erhöhten Arbeitsaufwand bedeuten. Die von OOSTERVELD ET AL. (1996) beschriebene Autoklavenextraktion von Pektin-PS kann dagegen schnell und einfach in Wasser durchgeführt werden (siehe auch Abschnitt 3.2.3).

Um die Eignung sowie den Einfluss dieser Vorbehandlung auf die Freisetzung und Strukturen der AN und GN zu evaluieren, wurden die UBS aller analysierten Rohstoffe der Autoklavenextraktion unterworfen. Die Verhältnisse der freigesetzten AN- und GN-OS sowie die Verhältnisse der AN-PMAAs sind in Tabelle 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.13: Prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane sowie prozentuale Oligosaccharid (OS)-Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe von Apfel (Ap), Amaranth (AM), Quinoa (Q), Buchweizen (BW), Zuckerrübenschnitzel (ZRS) und Sojaextraktionsschrot (SES) nach *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Verdau ohne bzw. mit Autoklavenextraktion (a). t = terminal, Ara = Arabinose, f = Furanose, nb = nicht bestimmbar, nn = nicht nachweisbar, ✓ = vorhanden. Die Strukturen der OS sind in Abbildung 9.2 auf Seite 182 und Abbildung 9.3 auf Seite 183 gezeigt.

OS	Ap	Ap a	AM	AM a	Q	Q a	BW	BW a	ZRS	ZRS a	SES	SES a
A2a	80,7	82,2	67,2	68,0	76,5	74,6	74,8	67,8	74,3	71,8	87,0	92,0
A2b	nn	nn	8,5	5,9	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
A4a	13,0	12,0	14,3	15,4	13,4	14,9	17,9	21,4	17,0	16,9	5,4	3,0
A4b	1,0	0,8	2,2	2,5	1,3	1,7	nn	nn	nb	1,7	4,9	3,6
A5a	0,6	0,6	1,1	1,1	0,5	0,6	nn	nn	nb	1,0	0,6	0,2
A5b	nn	nn	nn	nn	3,0	2,0	nn	nn	nn	nn	nn	nn
A5c	nn	nn	nn	nn	0,8	0,5	nn	nn	nn	nn	nn	nn
A6a	2,1	2,2	2,5	2,4	1,6	2,1	3,5	5,4	3,0	3,4	nb	nb
A7a	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
A7b	2,7	2,2	4,1	4,7	3,0	3,5	3,8	5,4	5,6	5,1	2,1	1,2
PMAA	Ap	AM	Q	BW	ZRS	SES						
t-Araf	37,0	26,8	20,2	35,6	39,1	38,4						
1,5-Araf	29,9	48,7	58,3	32,5	28,5	37,4						
1,3,5-Araf	22,3	17,9	18,7	32,0	25,3	10,5						
1,2,5-Araf	1,5	4,5	1,4	nn	1,8	5,2						
1,2,3,5-Araf	9,4	2,0	1,5	nn	5,2	8,4						
OS	Ap	Ap a	AM	AM a	Q	Q a	BW	BW a	ZRS	ZRS a	SES	SES a
G2a	93,4	89,8	✓	95,1	nn	✓	nn	✓	nn	96,3	85,6	87,8
G2b	3,8	6,6	nn	4,9	nn	nn	nn	nn	nn	3,7	7,9	6,8
G2c	2,8	3,6	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	nn	6,5	5,3

Die Anwendung der Methode zeigte generell eine gute Präzision und die relative Range/2 war

meist kleiner als 5 %. Generell wurde durch die Verwendung der Autoklavenextraktion eine höhere Menge an OS freigesetzt, ein erhöhtes Vorkommen von Matrixpeaks konnte dagegen nicht beobachtet werden. Dadurch konnten bei manchen schwer spaltbaren Materialien wie zum Beispiel ZRS alle freigesetzten OS bestimmt werden.

Die Verhältnisse der durch *endo*-Arabinanase freigesetzten OS zeigen meist nur kleinere Abweichungen bei Anwendung der Autoklavenextraktion, so zum Beispiel bei Apfel, Amaranth, Quinoa und ZRS. Bei Buchweizen findet sich jedoch nach Autoklavenextraktion eine erhöhte Menge aller verzweigten OS, während bei SES eine größere Menge der Verbindung A2a freigesetzt wird und eine Umkehrung des Verhältnisses der OS A4a und A4b stattfindet. Diese Änderungen der Zusammensetzung könnten darauf zurückgeführt werden, dass durch die Extraktion auch PS für die Enzyme zugänglich und somit enzymatisch gespalten werden, die sonst sehr fest im Zellverband verankert sind. Da je nach Material sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der verzweigten Strukturelemente beobachtet wurde, kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass kein verfahrensbedingter Abbau bestimmter Strukturelemente, insbesondere verzweigter Strukturen, stattfindet. Bei den durch *endo*-Galactanase freigesetzten OS zeigen sich bei Apfel und SES kleinere Unterschiede bei Verwendung der Autoklavenextraktion. So ist der Anteil an Arap-enthaltenden OS bei Apfel nach der Extraktion höher, bei SES jedoch niedriger. Die Verhältnisse zwischen den beiden OS untereinander werden dabei nicht bedeutend beeinflusst. Dies spricht wiederum dafür, dass die vergleichsweise geringfügigen Veränderungen durch zusätzlich freigesetzte OS und nicht auf den Abbau einzelner Strukturelemente während der Autoklavenextraktion zurückzuführen sind. Bei Amaranth und ZRS ermöglichte die Autoklavenextraktion eine Freisetzung und Quantifizierung der vorher nicht nachweisbaren GN-OS G2a und G2b. Diese Daten verdeutlichen den Nutzen und die Eignung der Autoklavenextraktionsmethode auch für analytische Zwecke. Die folgende Interpretation der Daten erfolgte aufgrund der ähnlichen Anteile der freigesetzten OS und zur Vereinfachung der Diskussion nur aus den Experimenten nach Autoklavenextraktion.

Die verschiedenen UBS unterscheiden sich teilweise stark in der freigesetzten Menge an dem aus dem AN-Rückgrat freigesetzten Disaccharid A2a. Jedoch sind Rückschlüsse auf die Anteile an linearen Abschnitten allein mit dieser Methode schwer, da 1,5-substituierte α -Ara-Einheiten auch in nicht detektierten hochmolekularen OS vorkommen könnten. Dies könnte zum Beispiel bei den Quinoa-UBS der Fall sein, da sie den höchsten Anteil an 1,5-substituierter α -Araf, jedoch lediglich den dritthöchsten Anteil an freigesetztem A2a besitzen. Beim Vergleich der Anteile der Verbindung A4a, die eine O3-Substitution des AN-Rückgrats widerspiegelt, und dem mittels Methylierungsanalyse bestimmten Anteil an 1,3,5-substituierter Araf deuten beide Methoden an, dass bei Buchweizen und ZRS die meisten Verzweigungen vorliegen und bei SES die wenigsten. Zudem zeigen die OS A6a bzw. A7b, welche benachbarte Verzweigungen innerhalb des AN-Rückgrats repräsentieren, dass ebenfalls die meisten bzw. wenigsten dieser stärker verzweigten Bereiche bei Buchweizen und ZRS bzw. SES vorliegen. Apfel, Amaranth und Quinoa weisen dagegen sowohl beim Vergleich der Anteile 1,3,5-substituierter Araf und

dem verzweigten OS A4a als auch beim Vergleich der Anteile an den linearen Strukturelementen (1,5-substituierte Araf bzw. A2a) jeweils abweichende Anteile der OS bzw. der PMAAs auf. Dennoch können durch die freigesetzten AN-OS wichtige Rückschlüsse auf die Komplexität der AN der jeweiligen UBS gezogen werden, vor allem auch durch die zusätzliche Analyse der hochmolekularen OS A6a und A7b. Des Weiteren liefern sowohl das Profiling der freigesetzten OS als auch die Methylierungsanalyse ähnliche Aussagen bezüglich der Art der Verzweigung. So liegt bei Apfel, ZRS und Quinoa das höchste Verhältnis zwischen den OS A4a und A4b bzw. den PMAAs der 1,3,5- und 1,2,5-substituierten Araf vor, was auf Position O3 als hauptsächliche Verzweigungsstelle hindeutet. Ebenso zeigen sich bei beiden Methoden etwas kleinere Verhältnisse für Amaranth und die kleinsten Verhältnisse für SES. Bei Buchweizen konnten 1,2,5- und 1,2,3,5-substituierte Araf mittels Methylierungsanalyse nicht nachgewiesen werden und dementsprechend wurden auch die OS A4b und A5a nicht detektiert. Das OS A5a konnte ansonsten in allen Materialien nachgewiesen werden, wobei ein Vergleich mit dem PMAA der 1,2,3,5-substituierten Araf aus der Methylierungsanalyse aufgrund möglicher Untermethylierung (siehe Kapitel 3.3.2) jedoch schwierig ist. Zusätzlich konnten die vorher aus Amaranth und Quinoa isolierten OS A2b bzw. A5b und A5c durch diesen Ansatz schnell nachgewiesen und semiquantitativ bestimmt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass diese Strukturelemente eine quantitativ bedeutende Rolle in den *endo*-Arabinanase-Hydrolysaten spielen.

Die Analyse der GN-OS zeigt, dass terminale Arap ein weiter verbreitetes Strukturelement zu sein scheint. So konnte dieses Strukturelement in Apfel-, Amaranth-, ZRS- und SES-UBS nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass interne, 1,4-substituierte α -Arap-Einheiten einen größeren Anteil an den GN von Apfel-UBS und SES-UBS haben. Zudem sind die GN in Quinoa, Buchweizen und ZRS wahrscheinlich sehr stark in den Zellverband eingebunden, da eine Freisetzung der GN-OS nur nach Autoklavenextraktion stattfand. Die erhaltenen Informationen über die neuartigen Strukturelemente sind durch die Methylierungsanalyse nicht zugänglich, was einen großen Vorteil der entwickelten Methode verdeutlicht. Darüber hinaus können mit einer deutlich vereinfachten Durchführung ähnliche Rückschlüsse auf die AN- bzw. GN-Zusammensetzung der UBS gezogen werden.

4.3.4.2 Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide (vor und nach Lagerung)

Da die Modifizierung von AN und GN großen Einfluss auf die Physiologie der pflanzlichen Zellwand haben kann (siehe Abschnitt 1.5.1), wurde das Potential der chromatographischen Profilingmethode zur Verfolgung der Zellwandveränderungen von Äpfeln während der Lagerung evaluiert. Dazu wurden, auch um die modifizierte Isolierungsmethode auf ihre Eignung zu überprüfen, die NSPS der unterschiedlich lang gelagerten Apfelproben verwendet. Die freigesetzten AN- und GN-OS sowie die Verhältnisse der AN-PMAAs sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

Die Verwendung der NSPS anstatt der UBS führte zu keinen Störungen der Analyse. So zeigten

Tabelle 4.14: Prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane sowie prozentuale Oligosaccharid (OS)-Zusammensetzung der Nicht-Stärke-Polysaccharide von Äpfeln (Ap) vor (Stadium 1) und nach dreiwöchiger Lagerung (Stadium 2) ohne bzw. mit Autoklavenextraktion (a) nach *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Verdau. t = terminal, Ara = Arabinose, f = Furanose, nb = nicht bestimmbar, nn = nicht nachweisbar. Die Strukturen der OS sind in Abbildung 9.2 auf Seite 182 und Abbildung 9.3 auf Seite 183 gezeigt.

OS	Ap Stadium 1	Ap Stadium 1 a	Ap Stadium 2	Ap Stadium 2 a
A2a	84,4	84,9	91,6	90,4
A2b	nn	nn	nn	nn
A4a	10,9	10,1	5,9	6,4
A4b	0,8	0,8	0,8	0,9
A5a	0,1	0,5	nb	0,4
A5b	nn	0,1	nb	0,3
A5c	nn	nn	nn	nn
A6a	1,7	1,7	0,7	0,8
A7a	nn	nn	nn	nn
A7b	2,0	1,8	1,0	1,0

PMAA	Ap Stadium 1	Ap Stadium 2
t-Araf	39,6	36,3
1,5-Araf	31,2	39,1
1,3,5-Araf	18,4	15,4
1,2,5-Araf	2,1	2,1
1,2,3,5-Araf	8,7	7,0

OS	Ap Stadium 1	Ap Stadium 1 a	Ap Stadium 2	Ap Stadium 2 a
G2a	-	89,4	-	86,4
G2b	-	6,4	-	8,6
G2c	-	4,3	-	5,0

die Chromatogramme keinerlei Matrixpeaks oder Retentionszeitverschiebungen für die Analyten. Nach Autoklavenextraktion zeigten sich ebenfalls keine chromatographischen Störungen und es wurde wie schon bei den anderen pflanzlichen Materialien eine ähnliche Zusammensetzung für die analysierten AN- und GN-OS erhalten. Die AN-PMAAs der NSPS zeigen eine Zunahme der linearen, das heißt unverzweigten Abschnitte innerhalb der AN während der Lagerung, zu erkennen an der Abnahme der 1,3,5-substituierten *Araf* und einer Zunahme der 1,5-substituierten *Araf*. Dieselbe Tendenz wird durch die Analyse der enzymatisch freigesetzten AN-OS erhalten. Es ist ebenfalls eine Abnahme der verzweigten OS, insbesondere von A4a, A6a und A7b, und eine Zunahme des Rückgratdisaccharids A2a zu erkennen. Äquivalent zur Methylierungsanalyse, bei der der relative Anteil der 1,2,5-substituierten *Araf* keine Veränderung zeigt, bleibt der Anteil an dem an Position O2 verzweigten OS A4b konstant. Die Anteile der an Position O3 verzweigten AN-OS nehmen dagegen ab, was sowohl bei A4a und A5a, als auch bei den komplexeren OS A6a und A7b zu beobachten ist. Daraus folgt, dass eine Substitution nebeneinander liegender Ara-Einheiten keinen größeren Einfluss auf deren Abbaubarkeit

durch zelleigene Enzyme zu haben scheint. Im Gegensatz dazu konnte insbesondere nach Autoklavenextraktion beobachtet werden, dass der Anteil der Verbindung A5b während der Lagerung zunimmt. Möglicherweise spielen die in diesem OS enthaltenen β -Ara-Einheiten eine entscheidende Rolle bei den Zellwandveränderungen während der Lagerung. Ebenso ist nach der Lagerung ein erhöhter Anteil der Arap-enthaltenden OS vorhanden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass diese Strukturelemente Einfluss auf die Zellwandveränderungen haben könnten. Die festgestellten Veränderungen müssten jedoch in weiteren Studien reproduziert und mit mehreren Proben über längere Zeiträume betrachtet werden. Allerdings zeigt sich, dass sich die entwickelte Methode sehr gut eignet, um nacherntephysiologische Prozesse zu analysieren.

4.3.4.3 Lösliche Polysaccharide

Um die Anwendbarkeit der Methode für lösliche PS zu untersuchen, wurden die löslichen AN- und GN-PS gemäß den erarbeiteten Inkubationsbedingungen umgesetzt. Die aus den löslichen PS freigesetzten AN- und GN-OS sowie die Verhältnisse der AN-PMAAs sind in Tabelle 4.15 dargestellt.

Auch bei Verwendung der löslichen PS konnte keine Veränderung der chromatographischen Trennung der Analyten festgestellt werden. Die aus den AN-PS freigesetzten OS sowie die mittels Methylierungsanalyse bestimmten AN-PMAAs zeigen für die löslichen AN-PS eine dem zur Isolierung verwendeten Material (ZRS) ähnliche Zusammensetzung. So sprechen ein vergleichsweise niedriger Anteil an A2a bzw. 1,5-substituierter Araf sowie ein hoher Anteil an A4a bzw. 1,3,5-substituierter Araf für höher verzweigte, hauptsächlich an Position O3 substituierte AN-PS. Die relativ hohen Anteile der mehrfach verzweigten OS A6a und A7b deuten an, dass Abschnitte, in denen das AN-Rückgrat stark substituiert ist, ebenfalls einen größeren Teil der AN-PS darstellen. Aus den geringen Mengen an 1,2,5- und 1,2,3,5-substituierten Araf bzw. A4b und A5a kann geschlossen werden, dass O2-verzweigte bzw. doppelt substituierte Strukturelemente eine eher untergeordnete Rolle spielen. Die Anteile der Arap-enthaltenden GN-OS konnten durch den verwendeten Ansatz ebenfalls semiquantitativ bestimmt werden. Dabei wird, wie schon bei den anderen untersuchten Materialien, eine höhere Menge an G2b als an G2c freigesetzt.

Tabelle 4.15: Prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane sowie prozentuale Oligosaccharid (OS)-Zusammensetzung der löslichen Arabinan-Polysaccharide (AN-PS, links) bzw. Galactan-Polysaccharide (GN-PS, rechts) nach *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Verdau. t = terminal, Ara = Arabinose, f = Furanose, nb = nicht bestimmbar, nn = nicht nachweisbar. Die Strukturen der OS sind in Abbildung 9.2 auf Seite 182 und Abbildung 9.3 auf Seite 183 gezeigt.

OS	AN-PS	OS	GN-PS
A2a	66,3	G2a	91,9
A2b	nn	G2b	4,7
A4a	19,5	G2c	3,3
A4b	2,2		
A5a	1,5		
A5b	nb		
A5c	nn		
A6a	3,9		
A7a	nn		
A7b	6,6		

PMAA	AN-PS
t-Araf	38,4
1,5-Araf	29,4
1,3,5-Araf	25,6
1,2,5-Araf	1,6
1,2,3,5-Araf	4,9

4.4 NMR-spektroskopisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Strukturelementen

Die chemische Verschiebung der Protonen und Kohlenstoffe einzelner Monosaccharid-Einheiten innerhalb von PS ist meist nur von der Art und Substitution der Monosaccharid-Einheiten abhängig, und im PS weiter entfernte Einheiten haben dabei keinen größeren Einfluss. Wie aus den NMR-Daten der Standardsubstanzen ersichtlich, unterscheiden sich die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der verschiedenen Strukturelemente teilweise deutlich. Durch die Verwendung spezifischer Signale sollte es somit möglich sein, Strukturmerkmale gelöster OS und PS nachzuweisen. Die ^1H -NMR-Spektren der verschiedenen AN- und GN-OS sind häufig zu ähnlich, um nur aufgrund der ^1H -Verschiebung zwischen den verschiedenen Strukturmerkmalen zu diskriminieren. In Kombination mit den häufig charakteristischeren ^{13}C -Verschiebungen ist eine solche Unterscheidung jedoch grundsätzlich möglich. Daher wurde ein HSQC-Experiment für das zu entwickelnde Profiling verwendet. Da nur lösliche Bestandteile mittels hochauflösender Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie detektierbar sind, wurden im Falle der UBS die durch *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase freisetzbaren AN- bzw. GN-OS analysiert. Zudem wurde untersucht, ob auch lösliche PS bzw. LBS auf diese Weise analysiert werden können.

4.4.1 Aufarbeitung der pflanzlichen Materialien

Zur Analyse enzymatischer Hydrolysate mittels 2D-NMR-Spektroskopie muss eine ausreichend hohe Konzentration der OS für die Messung vorliegen. Dies wurde durch die Verwendung einer erhöhten Menge an UBS oder NSPS für die vorausgehende enzymatische Hydrolyse realisiert, wobei teilweise Suspensionen mit einer hohen Viskosität erhalten wurden. Die Einwaage an Rohstoff wurde dabei so gewählt, dass die Suspensionen noch fließfähig waren. Dementsprechend kann die Einwaage bei Bedarf auch reduziert werden. Um eine angemessene Durchmischung zu erreichen, wurden die Suspensionen in 15 mL Zentrifugenröhrchen liegend und um 360° drehend inkubiert. Zur enzymatischen Spaltung der AN und GN wurden die gleichen oder vergleichbare *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Aktivitäten wie beim chromatographischen Profiling verwendet. Da die Strukturelemente durch die NMR-spektroskopische Analyse auch in höheren, löslichen Oligomeren detektiert werden können, ist eine vollständige Spaltung zu den Endprodukten des enzymatischen Abbaus nicht immer zwingend notwendig. Bei einer unzureichenden Freisetzung von OS oder einer erschwerten Zentrifugation kann in den Zentrifugenröhrchen wie beim OS-Profiling mittels HPAEC-PAD eine Extraktion im Autoklaven durchgeführt werden. Da manche Signale der AN bzw. GN teilweise nahe an den Markersignalen der jeweils anderen PS-Gruppe liegen, sollten die Enzymbehandlungen getrennt durchgeführt werden.

Das durch Zentrifugation erhaltene klare Hydrolysat kann nach Zugabe von D₂O und Aceton zur Referenzierung direkt in H₂O vermessen werden. Alternativ könnte durch Gefriertrocknung ein Lösungsmittelwechsel zu D₂O bzw. DMSO-*d*₆ oder eine Aufkonzentrierung vorgenommen werden. Die Auswirkungen der Trocknung und des Aufnehmens in anderen Lösungsmitteln wurde anhand des *endo*-Arabinanase-Hydrolysats der Amaranth-UBS evaluiert. In Abbildung 4.24 ist ein Vergleich des Bereichs der anomeren Protonen in den verschiedenen Lösungsmitteln gezeigt.

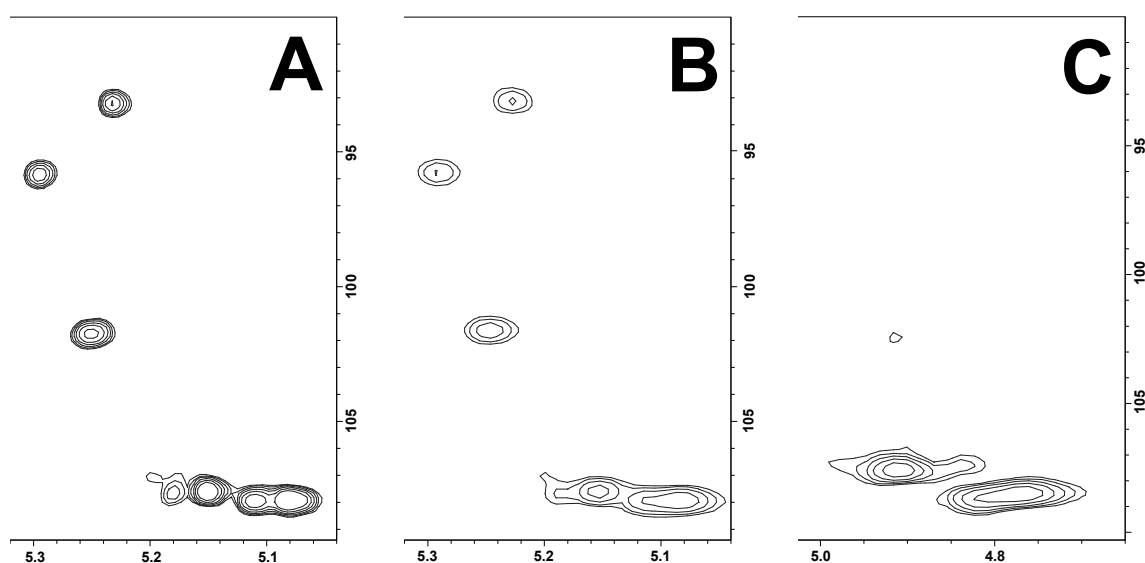


Abbildung 4.24: Anomerer Bereich der HSQC-Spektren des *endo*-Arabinanase-Hydrolysats von unlöslichen Amaranth-Ballaststoffen in H₂O/D₂O (A), D₂O (B) und DMSO-*d*₆ (C).

Dabei ist zu erkennen, dass bei einer direkten Messung nach Zugabe von D₂O eine bessere Auflösung erhalten wird als bei der Messung des gefriergetrockneten Hydrolysats in D₂O. Ein möglicher Grund könnte eine verminderte Löslichkeit der OS nach der Gefriertrocknung sein. Dies war vor allem bei der Verwendung von DMSO optisch zu erkennen, was sich auch in einer verringerten Intensität der Signale in Abbildung 4.24 zeigt. Aufgrund der verbesserten Auflösung, des geringeren Verbrauchs an deuterierten Lösungsmitteln sowie der Zeitersparnis wurden für die NMR-spektroskopische Analyse 450 µL der UBS- bzw. NSPS-Hydrolysate mit 50 µL D₂O und 0,5 µL Aceton versetzt.

Die löslichen AN- und GN-PS sowie die Amaranth-LBS wurden ebenfalls in allen drei Lösungsmitteln gemessen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Auflösung zwischen H₂O/D₂O 90:10 (v/v) und reinem D₂O. Jedoch wurden manche Peaks durch die Verwendung von H₂O/D₂O 90:10 (v/v) mit einer etwas geringeren Empfindlichkeit detektiert, weshalb D₂O für die

Messungen der löslichen PS und der LBS verwendet wurde. Um deuteriertes Lösungsmittel einzusparen, kann $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 90:10 (v/v) jedoch als Alternative verwendet werden. Vor allem die LBS zeigten bei der Verwendung von DMSO eine im Vergleich zu Wasser deutlich verringerte Löslichkeit der PS. Dies hatte wiederum eine deutlich geringere Signalintensität und das Fehlen einiger Peaks zur Folge, weshalb die Verwendung von DMSO nicht weiter in Betracht gezogen wurde. Während die AN- und GN-PS sehr gut in D_2O löslich waren (25 mg / 500 μL bzw. 5 mg / 500 μL), blieb beim Lösen der LBS auch bei der Verwendung von D_2O konzentrationsunabhängig ein unlöslicher Rückstand zurück. Die Entfernung dieses Rückstandes bewirkte jedoch keinerlei Veränderung bezüglich der NMR-spektroskopischen Auflösung, weshalb darauf verzichtet wurde. Viele der LBS lagen nach der Isolierung als große Partikel vor, weshalb sie zur Erhöhung der Homogenität und eventuell der Löslichkeit vor der Einwaage durch Behandlung in einer Kugelmühle zerkleinert wurden (5 x 1 Minute, 5 Minuten Intervallzeit). Bei den verwendeten Bedingungen findet keine mittels Methylierungsanalyse messbare Zerstörung von PS statt (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 NMR-spektroskopische Analyse

Um spezifische Markersignale für die einzelnen Strukturmerkmale zu identifizieren, wurden die HSQC-Spektren der isolierten Standardsubstanzen der AN- und GN-OS verwendet. Durch Übereinanderlegen der Spektren konnte evaluiert werden, ob ein Signal spezifisch für das jeweilige Strukturelement ist.

Die Intensität der HSQC-Volumenintegrale ist abhängig von bestimmten Messparametern sowie der $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplung der ^1H - und ^{13}C -Kerne der verschiedenen Strukturelemente. Daher können die Integrale nicht direkt miteinander ins Verhältnis gesetzt werden, sondern müssen um ihren Response korrigiert werden. Zur Korrektur der HSQC-Signalintensitäten wurden durch die Verwendung der isolierten Standardsubstanzen die RRFs der Markersignale zueinander bestimmt. Dazu wurden lediglich OS ausgewählt deren Markersignale keine Überlappung mit anderen Peaks oder noch vorhandenen Verunreinigungen aufwiesen. Dabei ergaben sich bei verschiedenen, das gleiche Strukturelement repräsentierenden OS sehr ähnliche RRFs für die jeweiligen Markersignale, daher wurden alle für ein Markersignal erhaltenen Werte gemittelt. Liegt in einem zu analysierenden Hydrolysat lediglich ein Teil der zur Bestimmung der RRFs verwendeten OS vor, kann der gemittelte RRF zu Abweichungen führen. Aufgrund der ähnlichen RRFs der Markersignale bei verschiedenen OS sollten diese Abweichungen jedoch vergleichsweise gering sein und eine semiquantitative Bestimmung der Strukturelemente ermöglichen. In Abschnitt 9.7 sind die RRFs der verschiedenen Signale aufgeführt. Zur Errechnung der Anteile der Strukturelemente wurde stets die Signalintensität nach Response-Korrektur verwendet.

4.4.2.1 Markersignale der Arabinan-Oligosaccharide

In Abbildung 4.25 sind die durch die Markersignale beschriebenen AN-Strukturmerkmale und die chemischen Verschiebungen der als Markersignale verwendeten Peaks gezeigt.

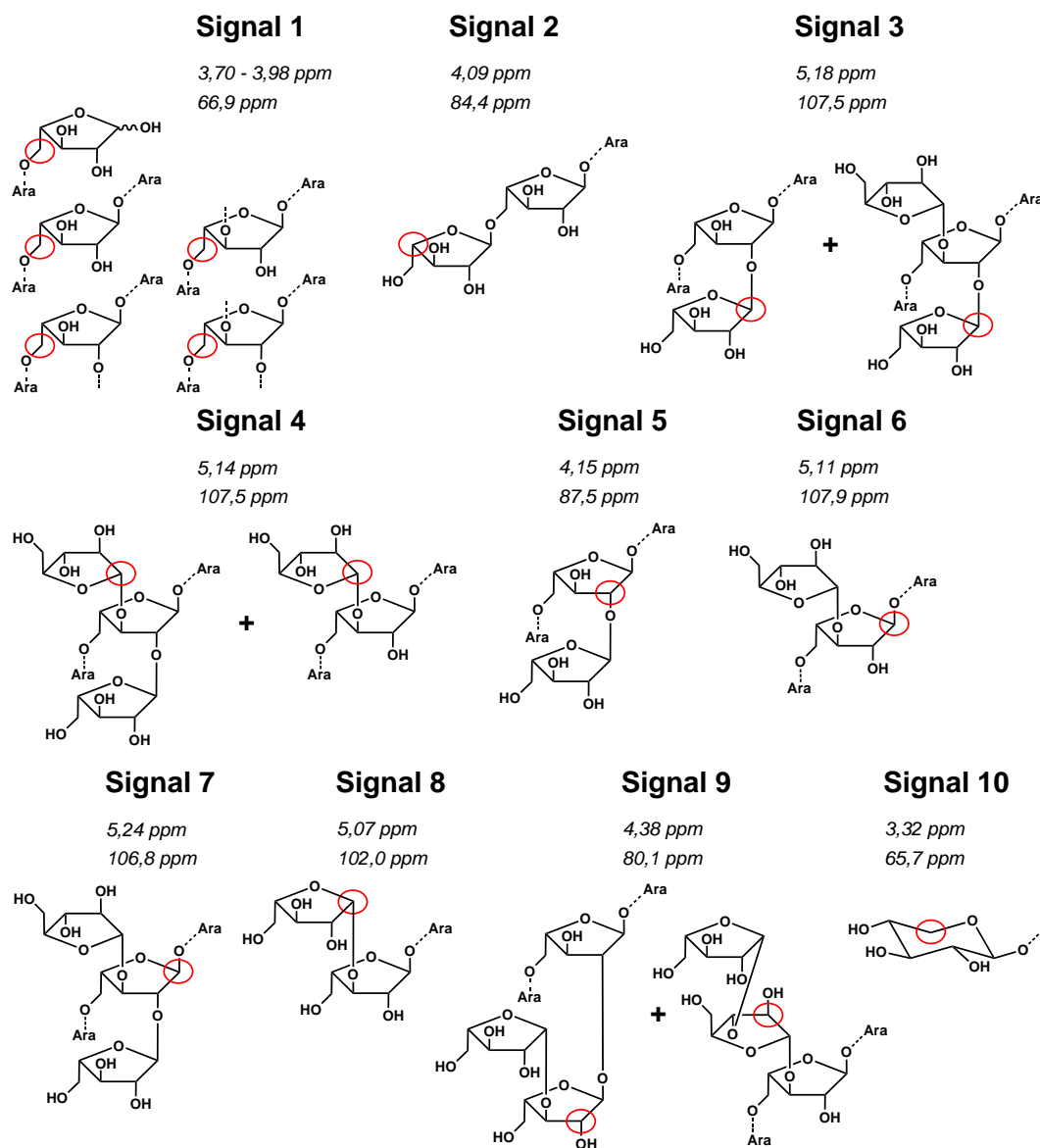


Abbildung 4.25: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) der Markersignale für bestimmte Arabinan-Strukturelemente. Ara = Arabinose.

Als Bezugspunkt für die RRFs der AN-Strukturelemente wurde Signal 1 verwendet, da dieses Signal von allen gemessenen AN-OS erzeugt wird. Signal 1 repräsentiert alle H5-Protonen, die Teil einer O5-, 1,5-, 1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-substituierten AraF-Einheit sind. Somit repräsentiert Signal 1 mehr als ein Strukturmerkmal und kann daher nicht direkt als Markersignal ver-

wendet werden. Nur durch Subtraktion der Intensitäten der Signale 5, 6 und 7 kann somit die Intensität der *O5*- bzw. 1,5-substituierten *Araf*-Einheiten errechnet werden. Signal 1 ist zudem das einzige Signal, das zwei Protonen pro Struktureinheit repräsentiert und dessen Intensität daher zusätzlich halbiert werden muss. Ein Nachteil dieses Signals ist, dass das äquatoriale H5-Proton monomerer α -*Arap* ebenfalls mit erfasst wird. Diese kommt in *endo*-Arabinanase-Hydrolysaten ebenfalls vor, da die bei der enzymatischen Spaltung entstehende monomere Ara hauptsächlich in *p*-Form vorliegt. Durch Integration der Signale der anomeren Protonen im ^1H -Spektrum monomerer Ara konnte ein α/β -Verhältnis von 2:1 bestimmt werden. Es werden also rund 30 % der monomeren *Arap* mit detektiert.

Terminale, *O5*-gebundene α -*Araf*-Einheiten weisen sehr ähnliche chemische Verschiebungen wie *O2*-/*O3*-terminale bzw. 1,5-substituierte α -*Araf*-Einheiten auf. Lediglich das durch Signal 2 repräsentierte H4-Proton unterscheidet sich von allen Signalen genannter Strukturelemente, auch wenn es dicht am Signal der H4-Protonen der *O2*-gebundenen, terminalen α -*Araf*-Einheiten liegt (siehe HSQC-Peaks der OS A4b und A5a in Abbildung 4.26).

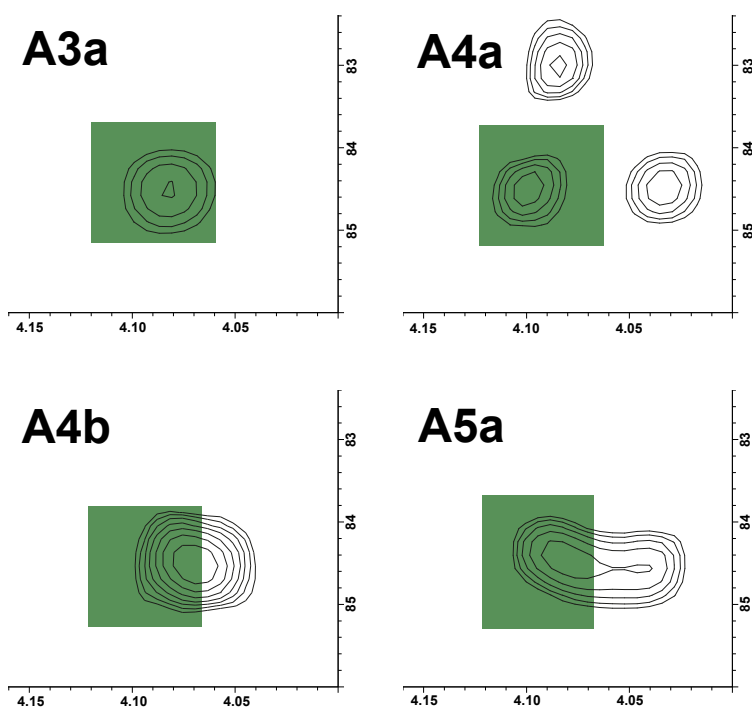


Abbildung 4.26: Integrierter C4/H4-HSQC-Peak der terminalen, *O5*-gebundenen Arabinofuranose des linearen Arabinan-Trimers A3a, der an Position *O3* (A4a) und *O2* (A4b) verzweigten Arabinan-Tetramere und des an den Positionen *O3* und *O2* verzweigten Arabinan-Pentamers A5a. Die Strukturen der OS sind in Abbildung 9.2 auf Seite 182 gezeigt.

Aufgrund der teilweisen Überlappung der Peaks kann es bei der Integration dieser Signale zu Ungenauigkeiten kommen. Für die *O2*- und *O3*-gebundenen, terminalen α -Ara-Einheiten wur-

den aufgrund dieser Signalüberlappung die Signale der anomeren Protonen verwendet. Diese Signale sind gut voneinander bzw. von anderen Signalen aufgelöst und repräsentieren nur die jeweiligen Strukturelemente (siehe Abbildung 4.27). Dabei werden, wie in Abbildung 4.25 gezeigt, jeweils alle terminalen, O2-gebundenen (Signal 3) bzw. O3-gebundenen (Signal 4) α -Araf-Reste erfasst, unabhängig, ob eine einfache oder doppelte Substitution der Rückgrat-Ara vorliegt. Als Markersignale der O3- bzw. doppelt-substituierten Rückgrat-Ara wurden ebenfalls die Korrelationspeaks der anomeren Protonen verwendet (Signal 6 bzw. 7). Signal 6 zeigt geringfügige Überlappung mit dem benachbarten Signal der terminalen, O5-gebundenen bzw. 1,5-substituierten α -Araf-Einheiten (Signal 1 V2), während sich Signal 7 deutlich von allen anderen Signalen abhebt (siehe Abbildung 4.27).

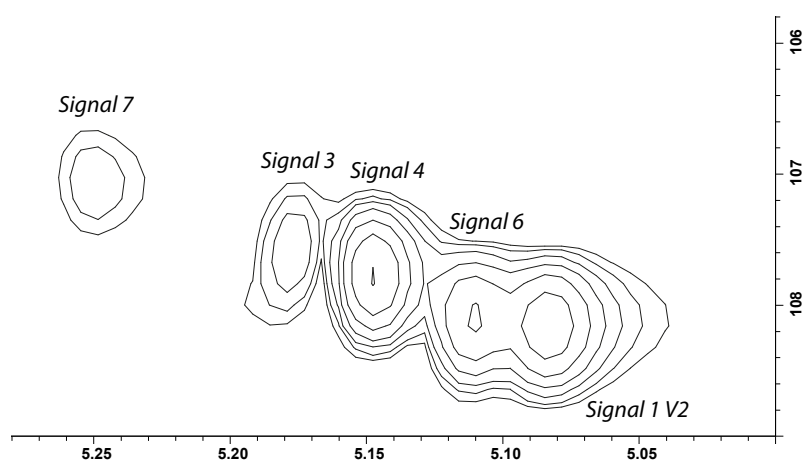


Abbildung 4.27: HSQC-Spektrum der löslichen Arabinan-Polysaccharide. Die HSQC-Markersignale im Bereich der anomeren Arabinofuranose-Protonen sind entsprechend benannt.

Der HSQC-Korrelationspeak des anomeren Protons 1,2,5-substituierter α -Araf-Einheiten ist zwar meist gut aufgelöst, jedoch liegt es sehr nahe an Signal 3. Der C2/H2-Peak dieses Strukturelements besitzt ebenfalls eine sehr charakteristische chemische Verschiebung, welche sich deutlich von der aller anderen Signale in diesem Bereich unterscheidet. Um eventuelle Überschneidungen zu vermeiden, wurde dieser Korrelationspeak als Markersignal verwendet (Signal 5). Terminale β -Araf-Einheiten besitzen ebenfalls sehr charakteristische ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für das anomere Zentrum und dadurch einen gut separierten HSQC-Peak (Signal 8). Eine an das AN-Rückgrat gebundene, an O3 mit β -Araf substituierte α -Araf-Einheit kann anhand eines charakteristischen C2/H2-Signals detektiert werden (Signal 9). Dieses Signal zeigt eine hohe ^1H -Verschiebung und hebt sich dadurch deutlich von den anderen Protonen in diesem Bereich ab. Jedoch kann nicht unterschieden werden, ob dieses Strukturelement an Position O2 oder Position O3 des Rückgrats gebunden ist. Die den anomeren Protonen zugeordneten Korrelationspeaks dieser Strukturelemente wurden nicht verwendet, da sie nahe an anderen re-

lativ intensiven Signalen liegen und dadurch teilweise überdeckt werden bzw. Überschneidungen zeigen. Bei einem an Position O3 mit α -Araf anstelle von β -Araf substituierten OS könnte möglicherweise eine sehr ähnliche chemische Verschiebung vorliegen. Zwar konnten in den verwendeten pflanzlichen Materialien keine Hinweise auf dieses von CARDOSO ET AL. (2007) beschriebene Strukturelement gefunden werden, jedoch besteht die Möglichkeit, dass es bei der Untersuchung anderer Rohstoffe mitbestimmt wird. Daher wird das durch Signal 9 repräsentierte Strukturelement im weiteren als 1,3- α -Araf bezeichnet. Für die Detektion terminaler, Araf-gebundener Xyl-Einheiten wurde der von allen Ara-Peaks gut separierte Korrelationspeak des axialen H5-Protons der Xyl-Einheit verwendet (Signal 10). Dieser ist jedoch nicht spezifisch für eine an Ara gebundene Xyl-Einheit, so dass er bei Vorliegen von löslichen XGA, Xylanen und Xyloglucanen ebenfalls detektiert wird. Eine Zusammenfassung der für die Analyse von *endo*-Arabinanase-Hydrolysaten verwendeten Markersignale ist in Tabelle 4.16 (Seite 99) gezeigt.

4.4.2.2 Markersignale der Galactan-Oligosaccharide

Die anomeren Protonen der GN-OS weisen lediglich geringe Unterschiede in ihren chemischen Verschiebungen bei ähnlichen ^{13}C -Verschiebungen der anomeren Kohlenstoffe von ca. 105 ppm auf. So liegen die chemischen Verschiebungen 1,4-substituierter β -Galp und terminaler, O4-gebundener β -Galp sehr nahe beieinander (4,63 ppm bzw. 4,59 ppm). Erstere Struktureinheit ergibt im HSQC-Spektrum von GN-PS meist ein sehr intensives Signal, während nur ein kleiner Anteil an terminaler β -Galp vorhanden ist. Wie in Abbildung 4.28 zu erkennen, führt dies auch aufgrund der Signalbreite zu einer Überlagerung des Signals der terminalen β -Galp bei 4,59 ppm.

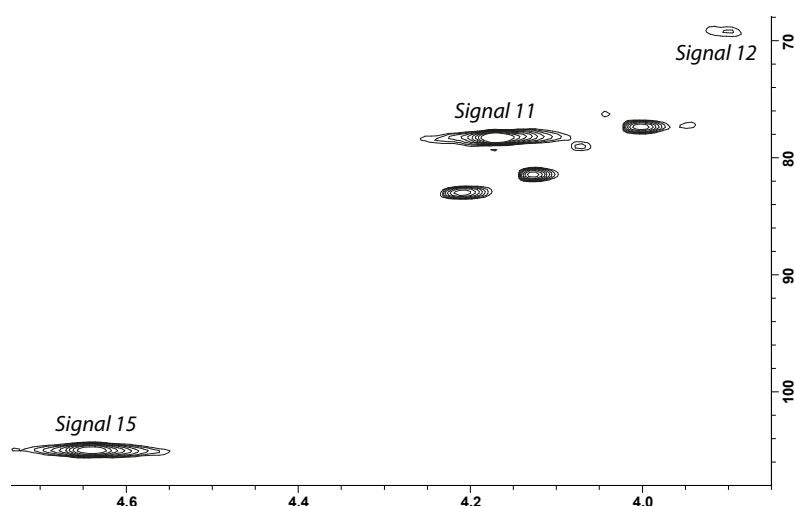


Abbildung 4.28: HSQC-Spektrum der löslichen Galactan-Polysaccharide in D_2O .

4 Ergebnisse und Diskussion

Bei GN-OS aus enzymatischen Hydrolysaten wird dagegen meist ein sehr großes Signal für die terminale O4-gebundene β -Galp bei 4,59 ppm erhalten. Dadurch können die Signale der in vergleichsweise geringeren Mengen vorkommenden terminalen α -Arap bei 4,56 ppm und der 1,4-substituierten α -Arap bei 4,61 ppm überdeckt werden. Bei der Analyse von GN-PS werden diese Signale ebenfalls überlagert (siehe Abbildung 4.28). Daher wurden für alle GN-Strukturelemente andere Markersignale ermittelt, wobei je nach analysierter Probe (*endo*-Galactanase-Hydrolysat oder lösliche PS) teilweise unterschiedliche Signale verwendet werden. In Abbildung 4.29 sind die durch die Markersignale beschriebenen GN-Strukturmerkmale und die chemischen Verschiebungen der als Markersignale verwendeten Peaks gezeigt.

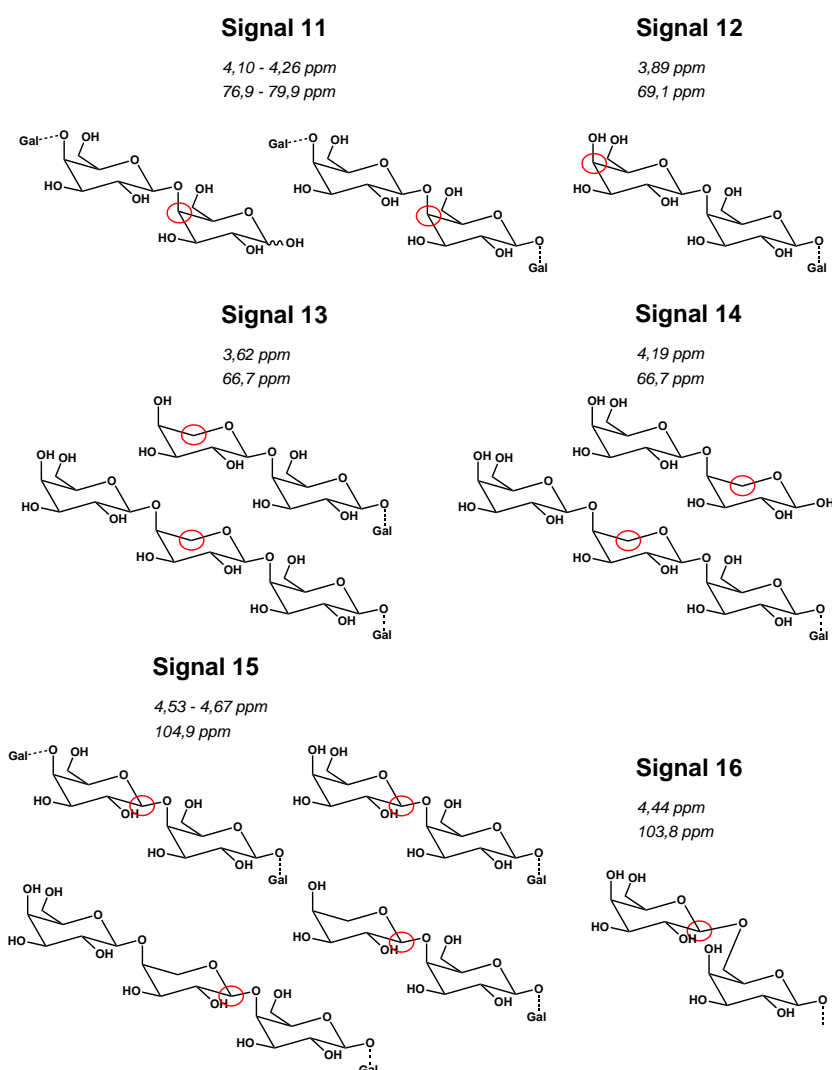


Abbildung 4.29: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) der Markersignale für bestimmte Galactan-Strukturelemente. Gal = Galactose.

Die verschiedenen, α -Arap-enhaltenden GN-OS können durch die charakteristische Verschiebung der α -Arap-H5-Protonen detektiert werden (bei gleicher ^{13}C -Verschiebung). Dabei un-

terscheiden sich terminale und *O*4-/1,4-substituierte α -Ara ρ -Einheiten in der chemischen Verschiebung des äquatorialen Protons, während die axialen Protonen sehr ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen. Durch die Tieffeldverschiebung des Signals des äquatorialen Protons kann dieses direkt als Markersignal für *O*4-/1,4-substituierte α -Ara ρ -Einheiten verwendet werden (Signal 14). Der Korrelationspeak des äquatorialen Protons der terminalen, *O*4-gebundenen α -Ara ρ -Einheiten liegt dagegen im Bereich von Signal 1 (Abbildung 4.25). Daher würde dieses Signal durch AN, die durch die *endo*-Galactanase-Spaltung bzw. Autoklavextraktion mit freigesetzt werden könnten, überdeckt werden. Deshalb wurden die Korrelationspeaks der axialen Protonen der *O*4-/1,4-substituierten und der terminalen, *O*4-gebundenen α -Ara ρ -Einheiten als Signal 13 verwendet. Durch Bestimmung der Signalintensität von Signal 13 und Subtraktion der Signalintensität von Signal 14 kann die der terminalen α -Ara ρ entsprechende Signalintensität erhalten werden. Der Korrelationspeak des anomeren Protons einer terminalen, *O*6-gebundenen β -Gal ρ -Einheit konnte ebenfalls als Markersignal verwendet werden, da er sehr gut von den Korrelationspeaks der restlichen anomeren Protonen abgetrennt ist (Signal 16).

Durch die *endo*-Galactanase-Behandlung sollte größtenteils G2a im Hydrolysat vorliegen, daher müssen hauptsächlich die terminalen, *O*4-gebundenen β -Gal ρ -Einheiten und die reduzierenden, *O*4-substituierten Gal ρ -Einheiten detektiert werden. Die chemischen Verschiebungen der auf den H4-Protonen 1,4-substituierter und *O*4-substituierter Gal ρ -Einheiten beruhenden HSQC-Korrelationspeaks unterscheiden sich durch die Substitution an Position *O*4 deutlich von den C4/H4-Korrelationspeaks terminaler Einheiten. Daher können die C4/H4-Korrelationspeaks der an Position *O*4 substituierten β -Gal ρ -Einheiten direkt als Markersignal verwendet werden (Signal 11, Abbildung 4.28). Der Integrationsbereich wurde dabei so gewählt, dass sowohl die β -Anomere als auch die α -Anomere der *O*4-substituierten, reduzierenden Gal ρ -Einheiten erfasst werden.

Da die OS G2a, G2b und G2c die Hauptprodukte der *endo*-Galactanase-Hydrolyse darstellen, sollte Signal 15 überwiegend die Korrelationspeaks der anomeren Protonen der terminalen, *O*4-gebundenen β -Gal ρ - und α -Ara ρ -Einheiten repräsentieren. Daher kann aus Signal 15 nach Abzug der Signalintensität der α -Ara ρ -enthaltenden Strukturelemente die Intensität der terminalen β -Gal ρ -Einheiten errechnet werden. Beim Vorliegen von OS mit einem höheren Polymerisationsgrad würden durch die Verwendung von Signal 11 und Signal 15 sowohl die C4/H4- als auch die C1/H1-Struktureinheiten der 1,4-substituierten β -Gal ρ -Einheiten erfasst werden. Daher würde es zu einer doppelten Erfassung der 1,4-substituierten β -Gal ρ -Einheiten und somit einer Überbestimmung der β -Gal ρ -Einheiten kommen. Falls eine Aussage über die Verhältnisse der β -Gal ρ -Einheiten und anderer durch *endo*-Galactanase freigesetzter GN-Strukturelemente getroffen werden soll, sollte daher eine möglichst vollständige enzymatische Hydrolyse erfolgen. Signal 12 kann nicht zur Detektion der terminalen, *O*4-gebundenen β -Gal ρ -Einheiten in *endo*-Galactanase-Hydrolysaten verwendet werden, da es sich stark mit

dem C4/H4-Korrelationspeak der ebenfalls vorhandenen monomeren Gal überschneidet. Eine Zusammenfassung der für die Analyse von *endo*-Galactanase-Hydrolysaten verwendeten Markersignale ist in Tabelle 4.16 gezeigt.

4.4.2.3 Markersignale zur Analyse von Polysacchariden

Bei nicht enzymatisch modifizierten, löslichen PS sollten die terminalen β -Gal ρ -Einheiten hauptsächlich von den Kettenenden der GN stammen, und es sollte keine monomere Gal vorliegen. Daher kann die Intensität der terminalen β -Gal ρ -Einheiten aus Signal 12 bestimmt werden. Dabei muss jedoch die Intensität der terminalen α -Ara ρ -Einheiten abgezogen werden, da deren C4/H4-Korrelationspeaks sehr ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen und dadurch mit erfasst werden. Zu berücksichtigen ist auch, dass Signal 12 mit den Peaks anderer PS überlagern kann, da es zum Beispiel dicht am Korrelationspeak der H3-Protonen 1,4-substituierter α -GalA-Einheiten liegt. Für die Analyse der AN-Strukturelemente in PS können die bereits für AN-OS beschriebenen AN-Markersignale verwendet werden.

Bei löslichen PS ist es wahrscheinlich, dass sowohl AN als auch GN vorliegen. Die RRFs der Signale für die AN- und GN-Strukturelemente wurden jedoch lediglich auf ein Signal innerhalb der jeweiligen PS-Gruppe bezogen. Allerdings haben die Signale der beiden PS-Gruppen wahrscheinlich einen voneinander abweichenden Response. Um die Bestimmung der Verhältnisse zwischen den beiden PS-Gruppen zu ermöglichen, wurde der Response zwischen Signal 1 und Signal 15 durch Messung einer äquimolaren Lösung aus den OS A2a und G2a bestimmt. Aus den relativen Intensitäten dieser beiden Markersignale konnte ein Korrekturfaktor (0,908) für die Intensitäten von Signal 15 bestimmt werden. Durch die Multiplikation aller GN-Markersignale mit diesem Faktor können diese näherungsweise mit den AN-Markersignalen ins Verhältnis gesetzt werden, sollen AN-Strukturelemente mit GN-Strukturelementen in den PS verglichen werden. Jedoch ist der genaue Response der einzelnen Markersignale und das AN/GN-Verhältnis von den tatsächlich vorliegenden Verbindungen und deren Polymerisationsgrad abhängig. Daher stellt die Verwendung der mittels OS bestimmten Korrekturfaktoren lediglich eine Näherung für die Analyse von PS dar.

Aufgrund der Signalgröße von Signal 1 könnten für dieses Signal möglicherweise Überlappungen mit den Korrelationspeaks anderer PS vorliegen. Daher wurde für die Analyse der 1,5-substituierten α -Ara f -Einheiten in PS ein alternatives Signal etabliert (Signal 1 V2). Signal 1 V2 detektiert das anomere Proton 1,5-substituierter sowie terminaler, O5-gebundener α -Ara f -Einheiten (neben Signal 6 in Abbildung 4.27, Seite 94). Bei Polymeren sollten die durch Signal 1 V2 nicht detektierten, O5-substituierten Ara f -Einheiten nur eine geringe bzw. keine Rolle spielen, so dass Signal 1 V2 nach Subtraktion von Signal 2 als Alternative für die Analyse von 1,5-substituierten α -Ara f -Einheiten in AN-PS dienen kann. Für die anderen AN-Strukturelemente

können die bereits beschriebenen Markersignale verwendet werden. Die RRFs der AN-Markernsignale zu Signal 1 V2 wurden äquivalent zu den RRFs zu Signal 1 bestimmt und sind in Abschnitt 9.7 aufgeführt. Zur Responsekorrektur der GN-Markernsignale relativ zu Signal 1 V2 muss wiederum ein Korrekturfaktor verwendet werden (0,784). Dieser wurde wie bereits für Signal 1 beschrieben bestimmt.

Signal 1 V2 ist jedoch nicht zur Analyse von AN-OS in *endo*-Arabinanase-Hydrolysaten geeignet, da O5-substituierte Araf-Einheiten, die in allen als Standardsubstanzen verwendeten AN-OS vorhanden sind, durch Signal 1 V2 nicht detektiert werden. Stattdessen werden die terminalen, O5-gebundenen α -Araf-Einheiten durch die gleichzeitige Verwendung von Signal 1 V2 und Signal 2 doppelt detektiert. Für Hydrolysate, die ausschließlich die als Standardsubstanzen isolierten AN-OS enthalten, sollten sich aufgrund der strukturellen Eigenschaften der OS die gleichen Anteile an O5- bzw. 1,5-substituierter Araf durch Signal 1 und Signal 1 V2 ergeben. Der Grund hierfür ist, dass alle isolierten AN-OS jeweils eine terminale, O5-gebundene α -Araf-Einheit und eine O5-substituierte Araf-Einheit enthalten. Jedoch würde die Verwendung von Signal 1 V2 bei komplexeren AN-OS mit mehr als einer terminalen, O5-gebundenen α -Araf-Einheit pro OS zu einer Überbestimmung der 1,5-substituierten Araf-Einheiten führen (beispielhaft gezeigt in Abbildung 9.33 auf Seite 211).

In Tabelle 4.16 sind die beschriebenen repräsentierten Strukturelemente sowie ihre Berechnung aus den Markersignalen in OS und PS zusammengefasst.

Tabelle 4.16: Durch HSQC-Markernsignale beschriebene Strukturelemente sowie deren Berechnung aus den Intensitäten der Markersignale in enzymatischen Hydrolysaten und Polysacchariden (PS). t = terminal, Ara = Arabinose, Gal = Galactose, Xyl = Xylose, f = Furanose, p = Pyranose, S = Signal, Alt = Alternativ.

Strukturelement	Berechnung in Hydrolysaten	Berechnung in PS
5-/1,5-Ara	S1-(S5+S6+S7)	S1-(S5+S6+S7)
1,5-Ara		Alt S1 V2-S2
t-O5-Araf	S2	S2
t-O2-Araf	S3	S3
t-O3-Araf	S4	S4
1,2,5-Araf	S5	S5
1,3,5-Araf	S6	S6
1,2,3,5-Araf	S7	S7
t- β -Araf	S8	S8
1,3-Araf	S9	S9
t-Xylp	S10	S10
4-/1,4-Galp	S11	S11
t-O4-Galp	S15-(S13-S14)	S12-(S13-S14)
t-Arap	S13-S14	S13-S14
1,4-Arap	S14	S14
t-O6-Galp	S16	S16

Durch die verwendeten Signale können die relativen Anteile der meisten wichtigen Strukturelemente der Standardsubstanzen bestimmt werden. Das OS A6a unterscheidet sich von A4a nur durch die Signale des H3-Protons an Einheit A und des H4-Protons an Einheit B. Diese ergeben jedoch keine diskreten Peaks in *endo*-Arabinanase-Hydrolysaten, daher kann über die Substitution benachbarter Rückgrat-Ara keine Aussage getroffen werden. Ebenso zeigt A7b kein charakteristisches HSQC-Signal, weshalb durch die NMR-spektroskopische Analyse keine Aussage über höher verzweigte Bereiche getroffen werden kann.

4.4.3 Anwendung der Methode

Im Gegensatz zum Profiling mittels HPAEC-PAD werden mittels NMR-Spektroskopie auch höhermolekulare OS miterfasst. Zudem werden äquivalent zur Methylierungsanalyse die Verhältnisse einzelner Strukturelemente erhalten. Daher kann hier ein Vergleich mit den Daten der Methylierungsanalyse vorgenommen werden. Jedoch können auch beim NMR-basierten Profiling nur die gelösten, enzymatisch freigesetzten OS detektiert werden.

In *endo*-Arabinanase-Hydrolysaten wird ein Großteil der terminalen, O5-gebundenen Araf-Einheiten wahrscheinlich durch die enzymatische Spaltung gebildet. Daher liefert die entwickelte Methode lediglich den ungefähren Anteil der O5-/1,5-substituierten Araf-Einheiten und keine Aussage über die Kettenlänge. Für einen besseren Vergleich mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse werden für die *endo*-Arabinanase-Hydrolysate die Verhältnisse für die O5-/1,5-substituierte Araf und die terminale, O5-gebundene Araf bzw. die terminalen, O2- und O3-gebundenen Araf sowohl summiert als auch einzeln aufgeführt. Bei den nicht-modifizierten, löslichen PS und LBS wird für einen besseren Vergleich mit der Methylierungsanalyse lediglich die Summe der terminalen Araf-Einheiten aufgeführt.

Für die HSQC-Messungen wurde der Bruker Standardparametersatz für die Pulssequenz "hsqcedetgp" mit 32 Scans benutzt. Dadurch konnte sowohl eine gute Empfindlichkeit als auch eine angemessene Analysenzeit von ca. 220 Minuten erreicht werden.

4.4.3.1 Arabinan-Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe

Die Methode wurde zunächst auf die verschiedenen UBS-Proben angewendet. Dabei wurden die Ausgangsmaterialien sowohl unbehandelt als auch nach Extraktion im Autoklaven untersucht, um den Einfluss dieser Behandlung zu ermitteln. Eine Inkubation der Rohstoffe ohne vorherige Autoklavenextraktion ergab jedoch lediglich für die Pseudocerealien Amaranth, Quinoa und Buchweizen eine für die NMR-spektroskopische Analyse geeignete Konzentration an löslichen OS. Wie in Tabelle 4.17 gezeigt, ergaben sich bei der NMR-spektroskopischen Mes-

sung der Hydrolysate der Pseudocerealien teilweise erhöhte Schwankungen in den analysierten Anteilen der Strukturelemente.

Tabelle 4.17: Relative Range/2 der mittels NMR-Spektroskopie gemessenen Anteile der verschiedenen Strukturelemente von unlöslichen Amaranth- (AM), Quinoa- (Q) und Buchweizen (BW)-Ballaststoffen nach *endo*-Arabinanase-Verdau ohne bzw. mit Autoklavenextraktion (a). t = terminal, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, f = Furanose, p = Pyranose.

Strukturelement	AM	AM a	Q	Q a	BW	BW a
5-/1,5-Araf	19,3	24,7	6,1	3,0	7,6	4,1
t-O5-Araf	3,3	18,7	2,4	1,0	10,5	3,8
t-O2-Araf	10,9	7,3	21,1	21,8	-	-
t-O3-Araf	12,6	21,5	1,9	2,9	8,5	2,2
1,2,5-Araf	19,0	3,0	15,3	23,9	-	-
1,3,5-Araf	14,7	20,2	1,3	4,7	9,6	3,1
1,2,3,5-Araf	24,8	1,9	17,2	13,6	-	-
t-β-Araf	-	-	20,5	12,4	-	-
1,3-Araf	-	-	10,5	4,7	-	-
t-Xylp	45,7	2,8	-	-	-	-

Meist liegt die relative Range/2 zwischen 2 % und 20 %, in einigen Fällen jedoch über 20 %. Dabei ist jedoch zu erkennen, dass die erhöhte Schwankung nicht durch die Autoklavenextraktion verursacht wird, sondern auch teilweise bei Verwendung der nicht extrahierten Rohstoffe auftritt. Generell zeigt sich bei gleichzeitiger Betrachtung der Anteile der Strukturelemente (Tabelle 4.18) ebenfalls, dass die in geringen Mengen vorkommenden Strukturelemente sehr oft mit einer schlechteren Präzision analysiert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Gründe für die vergleichsweise schlechte Reproduzierbarkeit in der Integration kleiner und überlappender Signale liegen, vor allem auch, da sich die enzymatische Spaltung nach vorausgegangener Autoklavenextraktion beim HPAEC-PAD-Profilung als sehr reproduzierbar erwiesen hat. In Tabelle 4.18 sind die Zusammensetzungen der *endo*-Arabinanase-Hydrolysate der verschiedenen UBS sowie zum Vergleich die Verhältnisse der AN-PMAAs aufgeführt.

Wie bereits beim HPAEC-PAD-Profilung festgestellt, hat die Autoklavenextraktion nur einen geringen Einfluss auf die bestimmten Verhältnisse der AN-Strukturelemente. Bei Buchweizen sind, wie ebenfalls beim HPAEC-PAD-Profilung bestimmt, die größten Veränderungen durch die zusätzliche Autoklavenextraktion zu beobachten, da nach Autoklavenextraktion mehr verzweigte Strukturelemente gemessen werden. Die abweichende Zusammensetzung der bestimmten Strukturelemente resultiert wahrscheinlich aus der zusätzlichen Freisetzung von AN mit einem höheren Verzweigungsgrad durch die Autoklavenextraktion. Da durch Anwendung der Autoklavenextraktion für alle Rohstoffe eine ähnliche Zusammensetzung ermittelt werden konnte, werden diese Proben für weitere Vergleiche verwendet.

Auf Basis der isolierten Strukturelemente bzw. Standardsubstanzen müsste jeder Verzweigung des Rückgrats eine terminale, O2- oder O3-gebundene Araf-Einheit zugeordnet werden kön-

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.18: Mittels NMR-Spektroskopie bestimmte, prozentuale Zusammensetzung der *endo*-Arabinanase-Hydrolysate von unlöslichen Apfel- (Ap), Amaranth- (AM), Quinoa- (Q), Buchweizen- (BW), Zuckerrübenschnitzel- (ZRS) und Sojaextraktionsschrot (SES)-Ballaststoffen ohne bzw. mit Autoklavenextraktion (a) sowie prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane. Die Anteile mancher Strukturelemente sind für einen besseren Vergleich mit der Methylierungsanalyse einzeln und zusätzlich summiert aufgeführt. t = terminal, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, f = Furanose, p = Pyranose.

Strukturelement	Ap	Ap a	AM	AM a	Q	Q a	BW	BW a	ZRS	ZRS a	SES	SES a
5-/1,5-Araf	-	19,7	25,8	24,7	33,0	29,7	29,5	26,0	-	17,9	-	19,8
t-O5-Araf	-	15,6	19,2	18,7	24,1	24,2	21,1	14,0	-	12,5	-	23,5
t-O2-Araf	-	12,8	10,8	7,3	4,2	5,7	-	-	-	7,3	-	15,8
t-O3-Araf	-	24,8	15,6	21,5	14,5	15,9	24,5	29,6	-	28,5	-	18,3
Σ 5-/1,5/t-O5-Araf	-	35,3	45,0	43,4	57,2	53,8	50,6	40,0	-	30,4	-	43,3
Σ t-O3/O2-Araf	-	37,6	26,4	28,8	18,8	21,5	24,5	29,6	-	35,8	-	34,1
1,2,5-Araf	-	2,0	3,0	3,0	1,7	1,3	-	-	-	1,0	-	4,7
1,3,5-Araf	-	18,0	20,5	20,2	16,8	16,7	25,0	30,3	-	29,5	-	11,6
1,2,3,5-Araf	-	7,2	1,6	1,9	0,6	0,7	-	-	-	3,2	-	6,2
t- β -Araf	-	-	-	-	2,8	2,8	-	-	-	-	-	-
1,3-Araf	-	-	-	-	2,1	3,1	-	-	-	-	-	-
t-Xylp	-	-	3,6	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-
PMAA	Ap	AM	Q	BW	ZRS	SES						
1,5-Araf	29,9	48,7	58,3	32,5	28,5	37,4						
t-Araf	37,0	26,8	20,2	35,6	39,1	38,4						
1,2,5-Araf	1,5	4,5	1,4	nn	1,8	5,2						
1,3,5-Araf	22,3	17,9	18,7	32,0	25,3	10,5						
1,2,3,5-Araf	9,4	2,0	1,5	nn	5,2	8,4						

nen. Dabei muss der Anteil der 1,2,3,5-substituierten Araf-Einheiten doppelt gezählt werden, da dieses Strukturelement zwei terminale Araf-Einheiten bindet. Beim Vergleich der summierten Anteile aus verzweigten Strukturelementen und an Verzweigungen gebundenen, terminalen Araf-Einheiten ergeben sich für fast alle Materialien vergleichbare Werte. Lediglich bei SES ist eine höhere Menge terminaler Araf-Einheiten vorhanden. Ein Grund hierfür könnten unbekanntere Strukturelemente sein, bei denen terminale O2-/O3-gebundene Araf-Einheiten andersartig gebunden sind, zum Beispiel an 1,2- oder 1,3-substituierte α -Araf-Einheiten.

Beim Vergleich der erhaltenen Daten mit denen aus der Methylierungsanalyse zeigen sich trotz der Vernachlässigung der ursprünglich terminalen, O5-gebundenen Araf-Einheiten vergleichbare Anteile an terminalen Araf- und O5-/1,5-substituierten Araf-Einheiten. Dementsprechend ergibt sich bei einer Betrachtung der O5-/1,5-substituierten Anteile dieselbe Reihenfolge dieser Anteile bei beiden Methoden. Der höchste Anteil an O5-/1,5-substituierten Araf-Einheiten ergibt sich dabei für Quinoa-UBS, der niedrigste Anteil für ZRS-UBS. Auch für doppelt-substituierte Araf-Einheiten (1,2,3,5-Araf) wird dieselbe Tendenz erhalten, wobei die mittels Methylierungs-

analyse bestimmten Anteile etwas höher ausfallen. Dies könnte wiederum auch auf eine teilweise Untermethylierung zurückzuführen sein. Für Quinoa-UBS und SES-UBS ergeben sich nach Bestimmung mittels NMR-Profiling und Methylierungsanalyse vergleichbare Anteile an 1,3,5- und 1,2,5-substituierter Araf. Ebenso wurden bei Buchweizen-UBS mit beiden Methoden keine 1,2,5- bzw. 1,2,3,5-substituierten Araf detektiert. Somit konnten die Besonderheiten der Proben, wie ein höherer Anteil an O₂-Verzweigungen bei SES-UBS und keine O₂-Verzweigungen bei Buchweizen-UBS, bei Anwendung beider Methoden beobachtet werden. Bei der Bestimmung der 1,3,5-Araf/1,2,5-Araf-Verhältnisse der anderen Materialien mit den beiden Methoden zeigen sich etwas größere Abweichungen zwischen den beiden Methoden. Dabei werden mittels NMR-spektroskopischer Analyse höhere 1,3,5-Araf/1,2,5-Araf-Verhältnisse für Amaranth-UBS und ZRS-UBS bzw. ein niedrigeres Verhältnis für Apfel-UBS bestimmt. Jedoch sind die mit den unterschiedlichen Methoden bestimmten Anteile der beiden Strukturelemente in einem vergleichbaren Bereich und zeigen so eine ähnliche Tendenz. Daher sind die Unterschiede wahrscheinlich in der zuvor erwähnten geringen Reproduzierbarkeit der NMR-spektroskopischen Messung für bestimmte Strukturelemente begründet, die sich insbesondere bei Strukturelementen mit niedrigem Anteil wie der 1,2,5-substituierten Araf ergeben. Insgesamt können durch die NMR-spektroskopische Analyse der OS trotz der wahrscheinlich unvollständigen enzymatischen AN-Spaltung und einer deutlich einfacheren und schnelleren Durchführung, ähnliche Aussagen über die in den UBS enthaltenen AN getroffen werden. Mittels NMR-Spektroskopie konnten zudem einige Zusatzinformationen, wie die Bindungsstellen der terminalen Araf-Reste sowie die Anteile der terminalen β -Araf-Einheiten oder der 1,3-substituierten α -Araf-Seitenketten, erhalten werden.

4.4.3.2 Ethanolfällung zur Aufkonzentrierung der Hydrolysate

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde evaluiert, inwiefern ein weiterer Probenaufarbeitungsschritt, eine Fällung mittels 80 % Ethanol im Anschluss an die enzymatische Hydrolyse, zusätzliche Informationen über die freigesetzten AN-Strukturen liefern kann. Unter diesen Bedingungen sollten die meisten PS ausfallen, wodurch überwiegend OS mit niedrigem Polymerisationsgrad im Überstand enthalten sein sollten, welche nach Eindampfen des Überstands getrennt untersucht werden können. Dies hat den weiteren Vorteil, dass eventuell mitfreigesetzte PS oder polymere Verunreinigungen von den OS abgetrennt werden. Zudem kann hierbei leicht eine Aufkonzentrierung der OS durchgeführt werden. Aufgrund der erhöhten Konzentrationen können zusätzlich zeitaufwändige Experimente, zum Beispiel HSQC-TOCSY- oder HMBC-Experimente, zur eindeutigen Identifizierung mancher OS durchgeführt werden. Die Zusammensetzung der vor der enzymatischen Hydrolyse nicht autoklavierten *endo*-Arabinanase-Hydrolysate der Pseudocerealien Amaranth, Quinoa und Buchweizen sind in Tabelle 4.19 gezeigt. Die OS-Gehalte dieser Hydrolysate wurden durch die Ethanolfällung fünffach aufkonzentriert.

triert.

Tabelle 4.19: Mittels NMR-Spektroskopie bestimmte prozentuale Zusammensetzung der *endo*-Arabinanase-Hydrolysate von unlöslichen Amaranth- (AM), Quinoa- (Q) und Buchweizen (BW)-Ballaststoffen ohne bzw. mit anschließender Ethanol (EtOH)-Fällung zur Aufkonzentrierung von Oligosacchariden und zur Präzipitation freigesetzter Polysaccharide. t = terminal, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, f = Furanose, p = Pyranose.

Strukturelement	AM	AM EtOH	Q	Q EtOH	BW	BW EtOH
5-/1,5-Araf	25,8	25,0	33,0	28,7	29,5	30,0
t-O5-Araf	19,2	18,4	24,1	27,6	21,1	19,6
t-O2-Araf	10,8	9,8	4,2	6,4	-	-
t-O3-Araf	15,6	21,7	14,5	12,4	24,5	24,8
1,2,5-Araf	3,0	2,3	1,7	1,6	-	-
1,3,5-Araf	20,5	19,6	16,8	17,7	25,0	25,7
1,2,3,5-Araf	1,6	1,6	0,6	1,3	-	-
t- β -Araf	-	-	2,8	1,9	-	-
1,3-Araf	-	-	2,6	2,2	-	-
t-Xylp	3,6	1,6	-	-	-	-

Aus den gezeigten Daten ist ersichtlich, dass sich durch Verwendung der Ethanolfällung keine großen Veränderungen in der Zusammensetzung der analysierten Strukturelemente ergeben. Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls bei Anwendung der modifizierten Aufarbeitung auf andere Materialien bzw. Autoklavenextrakte. Die bei der Aufarbeitung deutlich sichtbaren, ausgefällten polymeren Verbindungen wurden gelöst und wiederum mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Dabei war an einigen schwachen Signalen ersichtlich, dass ebenfalls AN-Verbindungen vorliegen. Durch die geringe Intensität der Signale war jedoch keine quantitative Auswertung möglich. Aufgrund der vergleichbaren Zusammensetzungen der Ausgangshydrolysate und der Überstände kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die polymeren Verbindungen ebenfalls eine ähnliche Zusammensetzung aufweisen.

Die aufkonzentrierten Überstände wiesen erwartungsgemäß deutlich höhere Signalintensitäten bei gleicher Anzahl an Scans auf. Daher können aufgrund der tatsächlichen Aufkonzentrierung der OS weitere, weniger empfindliche Experimente zur Identifizierung bestimmter Strukturelemente durchgeführt werden. Vor allem eine Identifizierung seltener und spezieller Strukturelemente wie 1,3-substituierter α -Araf- und terminaler β -Araf-Einheiten kann bei vielen Materialien von Bedeutung sein. Daher wurde die Eignung eines HSQC-TOCSY-Experiments am aufkonzentrierten Hydrolysat von Quinoa-UBS getestet, welches die beiden genannten Strukturelemente enthalten sollte (Abbildung 4.30).

Ausgehend von der ^1H -Verschiebung des Markersignals für 1,3-substituierte α -Araf-Einheiten konnten alle dem Spinsystem (d.h. der Monosaccharid-Einheit) zugehörigen ^{13}C -Signale gefunden werden (siehe blaue Korrelationspeaks in Abbildung 4.30). Die anderen Protonen sowie die Kohlenstoffe der 1,3-substituierten α -Araf zeigen sehr ähnliche chemische Verschiebungen

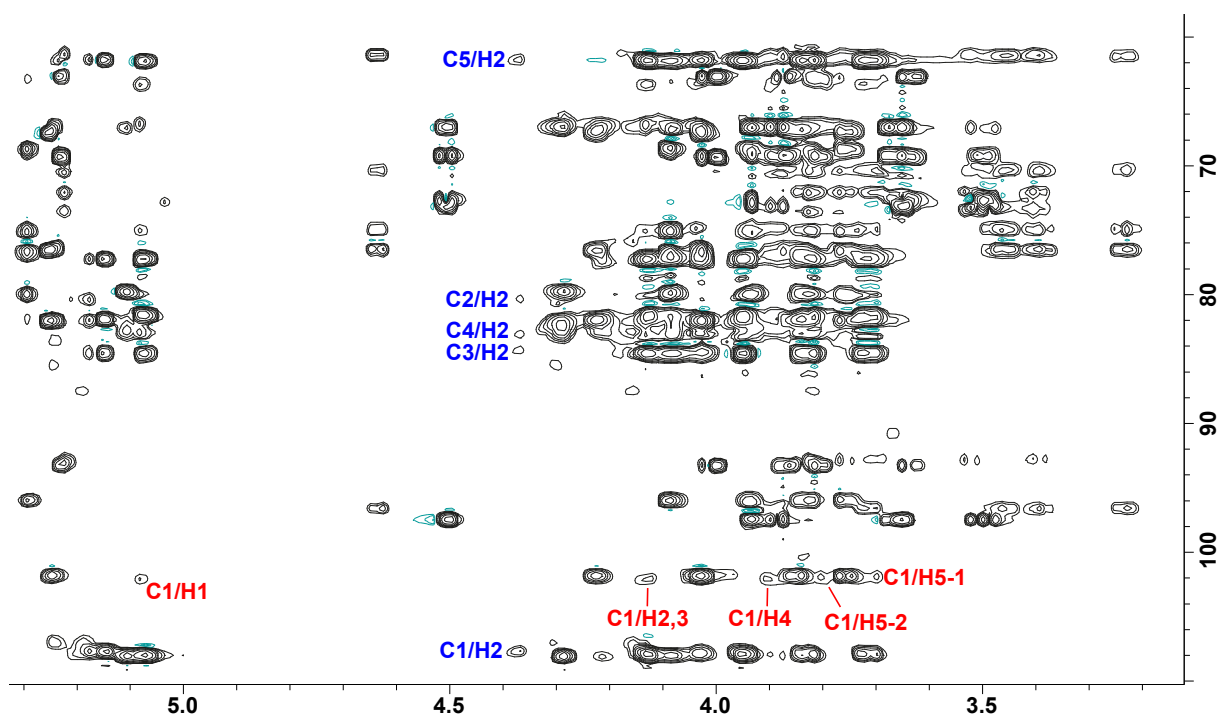


Abbildung 4.30: HSQC-TOCSY-Spektrum eines *endo*-Arabinanase-Hydrolysats von unlöslichen Quinoa-Ballaststoffen. Die Korrelation zum Nachweis 1,3-substituierter α -Arabinofuranose (blau) und terminaler β -Arabinofuranose (rot) sind entsprechend benannt.

wie die anderer α -Araf-Einheiten. Daher können die Signale dieser Protonen bzw. der Kohlenstoffe nicht als Ausgangspunkt zur vollständigen Zuordnung der dem Spinsystem zugehörigen Korrelationspeaks verwendet werden. Ausgehend von den chemischen Verschiebungen der Protonen der β -Araf-Einheiten werden die entsprechenden ^{13}C -Signale des zugehörigen Spinsystems teilweise ebenfalls durch andere Signale überdeckt. Jedoch können ausgehend von der charakteristischen ^{13}C -Verschiebung des Markersignals der terminalen β -Araf alle koppelnden Protonen des dazugehörigen Spinsystems zugeordnet werden (siehe rote Korrelationspeaks in Abbildung 4.30). Die Aufkonzentrierung der Hydrolysate mit anschließender Analyse mittels HSQC-TOCSY-Experiment stellt dementsprechend eine gute Methode zur eindeutigen Identifizierung dieser Strukturelemente dar.

4.4.3.3 Galactan-Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe

Mittels *endo*-Galactanase konnten, übereinstimmend mit den Ergebnissen des HPAEC-PAD-Profilings, lediglich kleine Mengen an GN-OS aus den unbehandelten Materialien freigesetzt werden. Daher wurde für alle Materialien eine Autoklavenextraktion durchgeführt. Die Ergebnis-

se der sich anschließenden NMR-spektroskopischen Analyse der enzymatischen Hydrolysate sind in Tabelle 4.20 gezeigt.

Tabelle 4.20: Nachweis (✓) und prozentuales Vorkommen der mittels NMR-Spektroskopie gemessenen Galactan-Strukturelemente in den nach Autoklavenextraktion (a) erhaltenen *endo*-Galactanase-Hydrolysaten von unlöslichen Apfel- (Ap), Amaranth- (AM), Quinoa- (Q), Buchweizen- (BW), Zuckerrübenschnitzel- (ZRS) und Sojaextraktionsschrot (SES)-Ballaststoffen. t = terminal, Ara = Arabinose, Gal = Galactose, p = Pyranose.

Strukturelement	Ap a	AM a	Q a	BW a	ZRS a	SES a
4-Galp	✓	✓	-	✓	✓	44,7
t-Galp	✓	✓	-	✓	✓	45,6
t-Arap	-	-	-	-	-	5,8
4-Arap	-	-	-	-	-	3,9

Mithilfe der ausgewählten diagnostischen HSQC-Peaks konnten O4-substituierte Galp-Einheiten und terminale, O4-gebundene β -Galp-Einheiten in den *endo*-Galactanase-Hydrolysaten aller Materialien außer Quinoa nachgewiesen werden. Jedoch konnten lediglich bei SES die α -Arap-enhaltenden Strukturelemente nachgewiesen und semiquantitativ bestimmt werden, was wahrscheinlich auf ihren generell geringen Anteil zurückzuführen ist. Da das Verhältnis zwischen O4-substituierter Galp und terminaler, O4-gebundener β -Galp keinerlei Rückschlüsse auf die GN-Struktur zulässt, wurden nur bei den SES-UBS die relativen Anteile der Strukturelemente berechnet. Die sehr ähnlichen Anteile an O4-substituierten Galp- und terminalen, O4-gebundenen β -Galp-Einheiten in den SES-UBS zeigen, dass das Disaccharid G2a als Hauptprodukt vorliegt. Zudem zeigen die mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Anteile der α -Arap-Strukturelemente im *endo*-Galactanase-Hydrolysat der SES-UBS eine ähnliche Tendenz wie die mittels HPAEC-PAD ermittelte OS-Zusammensetzung. So wurde durch Anwendung beider Methoden ein geringfügig höherer Anteil an terminalen α -Arap-Strukturelementen gegenüber O4-substituierten α -Arap-Strukturelementen ermittelt (HPAEC-PAD-Profilung: 6,8 % G2b und 5,3 % G2c).

Zum sicheren Nachweis aller Strukturelemente wurde wiederum ein HSQC-TOCSY-Spektrum der Hydrolysate nach Ethanol-fällung bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung der OS durchgeführt. Durch Analyse der Spinsysteme konnten die O4-substituierten bzw. terminalen Galp-Strukturelemente und die α -Arap-Strukturelemente eindeutig identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den NMR-spektroskopischen Ansatz bei ausreichender enzymatischer Freisetzung sowohl die Anteile mehrerer Strukturelemente bestimmt werden können als auch kleinere Mengen an GN-Strukturelementen nachgewiesen werden können.

4.4.3.4 Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide (vor und nach Lagerung)

Die Eignung der Methode für die Analyse der Apfel-NSPS vor und nach der Lagerung wurde ebenfalls evaluiert. Die Zusammensetzung der *endo*-Arabinanase-Hydrolysate nach vorausgegangener Autoklavenextraktion sowie die AN-PMAA-Verhältnisse sind in Tabelle 4.21 dargestellt.

Tabelle 4.21: Prozentuale Zusammensetzung der mittels NMR-Spektroskopie gemessenen, durch *endo*-Arabinanase nach vorausgegangener Autoklavenextraktion (a) freigesetzten Strukturelemente aus Apfel-Nicht-Stärke-Polysacchariden direkt nach dem Kauf der Äpfel (Stadium 1) und nach dreiwöchiger Lagerung (Stadium 2) sowie prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane. Die Anteile mancher Strukturelemente sind für einen besseren Vergleich mit der Methylierungsanalyse einzeln und zusätzlich summiert aufgeführt. t = terminal, Ara = Arabinose, f = Furanose.

Struktur	Apfel Stadium 1 a	Apfel Stadium 2 a
5-/1,5-Araf	23,3	31,6
t-O5-Araf	13,0	13,6
t-O2-Araf	13,0	10,8
t-O3-Araf	24,8	22,2
Σ 5-/1,5/t-O5-Araf	36,3	45,2
Σ t-O3/O2-Araf	37,8	33,0
1,2,5-Araf	2,3	2,2
1,3,5-Araf	15,6	14,0
1,2,3,5-Araf	8,0	5,7
t- β -Araf	-	-
PMAA	Apfel Stadium 1 a	Apfel Stadium 2 a
1,5-Araf	31,2	39,1
t-Araf	39,6	36,3
1,2,5-Araf	2,1	2,1
1,3,5-Araf	18,4	15,4
1,2,3,5-Araf	8,7	7,0

Die Anteile der O5-/1,5-substituierten Araf- bzw. der O2-/O3-terminalen α -Araf-Einheiten zeigen leichte Unterschiede zur Methylierungsanalyse, jedoch liegen die Anteile der anderen Strukturelemente in einem vergleichbaren Bereich. Zudem können durch die NMR-spektroskopische Analyse der *endo*-Arabinanase-Hydrolysate dieselben Strukturveränderungen während der Lagerung festgestellt werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse und dem HPAEC-PAD-Profilung weist Stadium 2 einen deutlich höheren Anteil an O5-/1,5-substituierter Araf, also an linearen Strukturelementen, auf. Zudem zeigt sich eine leichte Abnahme an 1,3,5-substituierter und 1,2,3,5-substituierter α -Araf, allerdings nicht an 1,2,5-substi-

tuerter α -Araf. Im Gegensatz zum HPAEC-PAD-Profilings konnte, wahrscheinlich aufgrund des sehr geringen Anteils, keine β -Araf nach Lagerung der Äpfel detektiert werden. Jedoch zeigen die präsentierten Ergebnisse, dass die entwickelte Methode ebenfalls sehr gut zur Detektion von Veränderungen in den NSPS während der Lagerung von Früchten geeignet ist. Ebenso bringt die modifizierte Aufarbeitung zur Gewinnung der NSPS im Vergleich zur Gewinnung der UBS keine Nachteile bezüglich der NMR-spektroskopischen Analyse mit sich.

4.4.3.5 Lösliche Polysaccharide und lösliche Ballaststoffe

Um die Anwendbarkeit der Methode für lösliche PS zu untersuchen, wurden die löslichen AN- bzw. GN-PS und die LBS verwendet. Da bei löslichen PS keine enzymatische Modifikation stattfindet, werden nur die nativ vorhandenen terminalen, O5-gebundenen Araf-Einheiten detektiert. Für einen besseren Vergleich mit der Methylierungsanalyse wurden dementsprechend die Signale aller terminalen Einheiten summiert. Zudem sollten in löslichen PS reduzierende, O5-substituierte Araf- bzw. O4-substituierte Galp-Einheiten nur eine geringe bzw. keine Rolle spielen, weshalb im Folgenden lediglich die Bezeichnungen 1,5-Araf bzw. 1,4-Galp verwendet werden. Die Auswertung wurde zusätzlich mit Signal 1 V2 durchgeführt, um die Eignung dieses Signals als Alternative zu Signal 1 zu überprüfen. Die Zusammensetzungen der AN- bzw. GN-PS sowie die PMAA-Verhältnisse sind in Tabelle 4.22 aufgeführt.

Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Verwendung von Signal 1 V2 sehr ähnliche Ergebnisse wie die Auswertung mit Signal 1 liefert und daher sehr gut als Alternative für die Analyse von AN-Strukturelementen geeignet ist. Bei den AN-PS zeigen die Anteile der terminalen bzw. 1,5-substituierten α -Araf-Einheiten wiederum kleine Abweichungen im Vergleich zur Methylierungsanalyse, wobei ein leicht erhöhter Anteil an 1,5-substituierten α -Araf-Einheiten erhalten wird. Jedoch sind die Anteile verzweigter AN-Strukturelemente gut vergleichbar und es wird ein ähnliches Verhältnis von O3- zu O2-verzweigten Rückgrat-Araf erhalten. Durch die spezifische Analyse der terminalen, O5-gebundenen Araf-Einheiten kann durch den NMR-spektroskopischen Ansatz zudem auf eine Kettenlänge von durchschnittlich ca. sechs Ara-Resten geschlossen werden. Mittels NMR-Spektroskopie konnten zusätzlich terminale β -Araf- sowie 1,3-substituierte α -Araf-Einheiten in geringen Anteilen detektiert werden. Bei Anwendung des HPAEC-PAD-Profilings wurde das OS A5b dagegen nur unter seiner Bestimmungsgrenze detektiert. Daher könnten die dimeren, β -Araf-enthaltenden Seitenketten in Abschnitten mit hoher Verzweigung lokalisiert sein. Sowohl mittels Methylierungsanalyse als auch mittels NMR-Spektroskopie wurden zudem vergleichbare Anteile 1,4-substituierter und terminaler β -Galp detektiert. Die NMR-Daten zeigen dabei ein 4:1 Verhältnis zwischen 1,4-substituierter und terminaler Galp und deuten somit auf eine Kettenlänge von durchschnittlich ca. vier Gal-Resten hin. Das Verhältnis der PMAAs zeigt jedoch einen höheren Anteil an terminaler Galp, was wahrscheinlich auf die bereits vermutete Unterbestimmung 1,4-substituierter Galp zurückgeführt werden kann. Diese Unter-

4.4 NMR-spektroskopisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Strukturelementen

Tabelle 4.22: Prozentuale, mittels NMR-Spektroskopie bestimmte Zusammensetzung der löslichen Arabinan-Polysaccharide (AN-PS) und Galactan-Polysaccharide (GN-PS) sowie prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane und Galactane. Die Auswertung wurde sowohl mit Signal 1 als auch mit Signal 1 V2 (V2) durchgeführt. Die Anteile der terminalen Arabinose-Einheiten sind zusätzlich summiert aufgeführt. t = terminal, Ara = Arabinose, Gal = Galactose, f = Furanose, p = Pyranose.

Struktur	AN-PS	AN-PS V2	GN-PS	GN-PS V2
t-O5-Araf	8,9	8,8	1,1	1,1
t-O2-Araf	5,5	5,2	-	-
t-O3-Araf	27,6	27,8	-	-
Σ t-Araf	42,0	41,8	-	-
1,5-Araf	23,2	21,8	15,0	14,2
1,2,5-Araf	1,1	1,2	-	-
1,3,5-Araf	23,8	25,4	-	-
1,2,3,5-Araf	3,8	3,2	-	-
t- β -Araf	0,4	0,4	-	-
1,3-Araf	0,7	0,9	-	-
1,4-Galp	3,9	4,1	79,3	80,2
t-Galp	1,1	1,2	2,0	2,0
t-Arap	-	-	0,6	0,6
1,4-Arap	-	-	2,0	2,0
PMAA	AN		GN	
t-Araf	36,9		4,2	
1,5-Araf	28,2		35,6	
1,2,5-Araf	1,6		-	
1,3,5-Araf	24,6		-	
1,2,3,5-Araf	4,7		-	
t-Arap	-		1,9	
t-Galp	2,5		13,2	
1,4-Galp	1,6		45,1	

bestimmung wird auch bei der Betrachtung der mittels Methylierungsanalyse ermittelten Zusammensetzung der GN-PS ersichtlich, da relativ zum Anteil der 1,4-substituierten Galp ein sehr hoher Gehalt an terminalen Galp detektiert wird. Durch die NMR-spektroskopische Analyse hingegen wird ein Verhältnis von 40:1 zwischen 1,4-substituierter β -Galp und terminaler β -Galp erhalten, was auf eher lange Ketten mit durchschnittlich ca. 40 Gal-Resten hindeutet. Der Anteil der GN-Strukturelemente innerhalb der GN-PS-Präparate liegt ebenfalls höher und kommt damit dem durch die Monosaccharidanalyse bestimmten Gal-Anteil von 72,4 % deutlich näher. Übereinstimmend mit der Methylierungsanalyse werden nur lineare AN-Strukturelemente detektiert. Zusätzlich konnten mittels NMR-Spektroskopie die Anteile terminaler und 1,4-substituierter α -Arap-Strukturelemente bestimmt werden. Der hier entwickelte NMR-Ansatz eignet sich daher potentiell besser zur Analyse der aufgereinigten, löslichen PS als die Methylierungsanalyse.

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Analyse der LBS sind in Tabelle 4.23 gezeigt. Aufgrund schlechter Löslichkeit und einer daraus resultierenden geringen Signalintensität war eine Analyse der Apfel-LBS nicht möglich.

Beim Vergleich der Auswertungsmethoden zeigen sich signifikante Unterschiede in den Anteilen aller Strukturelemente. Jedoch besteht der einzige Unterschied zwischen den beiden Auswertungsmethoden in der Verwendung einer anderen Signalintensität für Signal 1. Dementsprechend liegen die Unterschiede lediglich in den Intensitäten der 1,5-substituierten α -Araf begründet, welche bei Verwendung von Signal 1 V2 einen deutlich geringeren Anteil aufweist. Der Grund hierfür könnte sein, dass möglicherweise andere, nicht AN-gebundene, terminale α -Araf-Einheiten mit dem Signal für terminale, O5-gebundene α -Araf-Einheiten mit erfasst werden. Die Subtraktion dieser von Signal 1 V2 hätte einen verminderten Anteil an 1,5-substituierter α -Araf zur Folge. Für das Vorhandensein anderer terminaler Araf-Einheiten spricht, dass mittels Methylierungsanalyse in allen LBS signifikante Mengen an Typ II GN sowie ein relativ hoher Anteil an terminalen Araf detektiert wurden. Daher ist Signal 1 beim Vorhandensein großer Mengen anderer Araf-enthaltender PS potentiell besser zur Analyse der AN in LBS geeignet als Signal 1 V2. Über die Kettenlänge der AN ist aufgrund der potentiellen Überbestimmung der terminalen, O5-gebundenen Araf-Einheiten jedoch keine Aussage möglich. Durch die unspezifische Bestimmung der terminalen Araf ist dies bei der Methylierungsanalyse ebenfalls nicht möglich.

Die durch die Verwendung von Signal 1 erhaltenen Daten zeigen größtenteils dieselben Tendenzen wie die Verhältnisse der PMAAs. Die Abweichungen in den Anteilen der Strukturelemente können durch das Vorliegen von Typ II GN-Strukturelementen begründet werden. Diese werden mittels Methylierungsanalyse miterfasst, können aufgrund fehlender Markersignale jedoch größtenteils nicht mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden. So wurden lediglich bei Amaranth größere Mengen der terminalen, O6-gebundenen Galp detektiert, welche wahrscheinlich Teil des Typ II GN ist. Bei Amaranth konnte durch Anwendung der NMR-spektroskopischen Methode das Vorkommen hoher Mengen an 1,2,5-substituierter α -Araf bestätigt werden. Zudem deutet das Verhältnis zu den 1,5-substituierten α -Araf-Einheiten auf stärker verzweigte AN-Ketten hin. Bei Quinoa, Buchweizen und ZRS wurden mit beiden Methoden etwas niedrigere Anteile an verzweigten AN-Strukturelementen als in Amaranth detektiert. Die Verzweigungen finden sich dabei hauptsächlich an Position O3. Vor allem in den ZRS-LBS konnten Strukturelemente, welche auch in der Methylierungsanalyse nur kleine Anteile zeigen, nicht mittels NMR-Spektroskopie detektiert werden. In Quinoa-LBS konnten durch Anwendung des NMR-Profilings signifikante Mengen an terminalen β -Araf-Einheiten bestimmt werden. Sowohl die mittels Methylierungsanalyse bestimmten PMAAs als auch die mittels NMR-Profilierung ermittelten Anteile der Strukturelemente weisen auf eine hohe Linearität der AN in den SES-LBS hin. Jedoch konnte die mittels Methylierungsanalyse in kleinen Mengen detektierte 1,2,5-substituierte Araf mittels NMR-Spektroskopie nicht erfasst werden. In den SES-LBS konnte zusätzlich mit beiden Methoden ein signifikanter Anteil an 1,4-substituierter Galp detektiert werden. Der mittels

4.4 NMR-spektroskopisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Strukturelementen

NMR-Spektroskopie ermittelte, vergleichsweise geringe Anteil an terminalen, O4-gebundenen β -Galp-Einheiten deutet dabei auf eine Kettenlänge von durchschnittlich ca. acht Gal-Resten hin.

Trotz der beschriebenen Einschränkungen durch das Vorhandensein anderer PS konnten durch Anwendung der NMR-Spektroskopie auch in den LBS alle wichtigen Strukturmerkmale der enthaltenen AN und GN bestimmt werden. Außerdem konnten wiederum Zusatzinformationen, wie zum Beispiel der Anteil an terminalen β -Araf-Einheiten, erhalten werden. Insgesamt kann die Methode daher auch für die Anwendung auf LBS als gut geeignet bewertet werden.

Tabelle 4.23: Prozentuale, mittels NMR-Spektroskopie bestimmte Zusammensetzung der löslichen Ballaststoffe (LBS) von Amaranth (AM), Quinoa (Q), Buchweizen (BW), Zuckerrübenschnitzel (ZRS) und Sojaextraktionsschrot (SES) sowie prozentuale Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Arabinane und Galactane. Die Auswertung wurde sowohl mit Signal 1 als auch mit Signal 1 V2 (V2) durchgeführt. Die Verhältnisse der terminalen Arabinose-Einheiten sind zusätzlich summiert aufgeführt. t = terminal, Ara = Arabinose, Gal = Galactose, Xyl = Xylose, f = Furanose, p = Pyranose.

Strukturelement	AM	AM V2	Q	Q V2	BW	BW V2	ZRS	ZRS V2	SES	SES V2
t-O5-Araf	7,7	7,5	13,9	17,1	18,0	38,0	18,9	31,8	11,2	23,5
t-O2-Araf	10,3	9,5	5,8	6,8	-	-	-	-	-	-
t-O3-Araf	-	-	4,4	5,4	-	-	10,0	17,1	-	-
Σ t-Araf	18,0	17,0	24,1	29,3	18,0	38,0	28,9	48,9	11,2	23,5
1,5-Ara	26,9	19,0	57,0	39,2	78,0	52,9	60,8	32,7	62,1	18,1
1,2,5-Araf	8,9	9,3	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3,5-Araf	-	-	13,7	23,9	4,0	9,1	10,2	18,4	-	-
1,2,3,5-Araf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t- β -Araf	-	-	5,1	7,6	-	-	-	-	-	-
1,3-Araf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t-Xylp	21,2	25,2	-	-	-	-	-	-	-	-
1,4-Galp	-	-	-	-	-	-	-	-	23,6	52,1
t-O4-Galp	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	6,4
t-O6-Galp	24,9	29,6	-	-	-	-	-	-	-	-
PMAA	AM	Q	BW	ZRS	SES					
t-Araf	13,3	31,0	16,0	37,0	21,3					
1,5-Araf	35,4	37,1	15,8	23,1	18,2					
1,3,5-Araf	1,8	6,1	3,7	9,8	-					
1,2,5-Araf	15,4	2,7	-	1,6	1,0					
1,2,3,5-Araf	-	-	-	5,1	-					
1,2-Araf	-	-	-	1,3	-					
t-Arap	-	-	-	0,9	-					
t-Galp	1,0	4,5	36,7	3,5	28,6					
1,4-Galp	-	-	-	1,3	6,8					
1,6-Galp	-	4,7	-	3,6	9,8					
1,3,6-Galp	7,9	11,3	3,8	10,7	10,7					
1,3-Galp	2,5	2,6	24,1	2,2	3,5					
t-Xylp	22,7	-	-	-	-					

4.5 Chromatographisches Profiling von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden

In Driselase- bzw. Viscozyme L-Hydrolysaten stellen die drei FS-OS FAA, FG und FAAA (Abbildung 9.1, Seite 181) die Hauptprodukte der enzymatischen Spaltung dar und repräsentieren die verschiedenen Möglichkeiten der AN- und GN-Substitution mit FS. Durch Bestimmung dieser OS mittels RP-HPLC mit UV-Detektion können Rückschlüsse auf die Bindung der FS an Pektine gezogen werden. Die weiteren isolierten Standardsubstanzen repräsentieren spezielle Strukturelemente, wie die Substitution benachbarter Ara-Einheiten mit FS, die Substitution mittels *p*-CS und das Vorhandensein von DFS-cross-links. Insbesondere die *p*-CS- und DFS-enthaltenden OS kommen in sehr kleinen Mengen vor und können im UV-Chromatogramm meist nicht integriert werden. Jedoch können bereits kleine Mengen dieser Strukturelemente Einfluss auf die Eigenschaften der UBS haben, weshalb ein Nachweis dieser OS durch die Verwendung der MS²-Detektion in die Methode integriert wurde.

4.5.1 Probenaufarbeitung

Ein chromatographischer Vergleich der Driselase- und Viscozyme L-Hydrolysate der ZRS-UBS zeigte signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung dieser durch die unterschiedlichen Enzympräparate gewonnenen Hydrolysate (Abbildung 4.31).

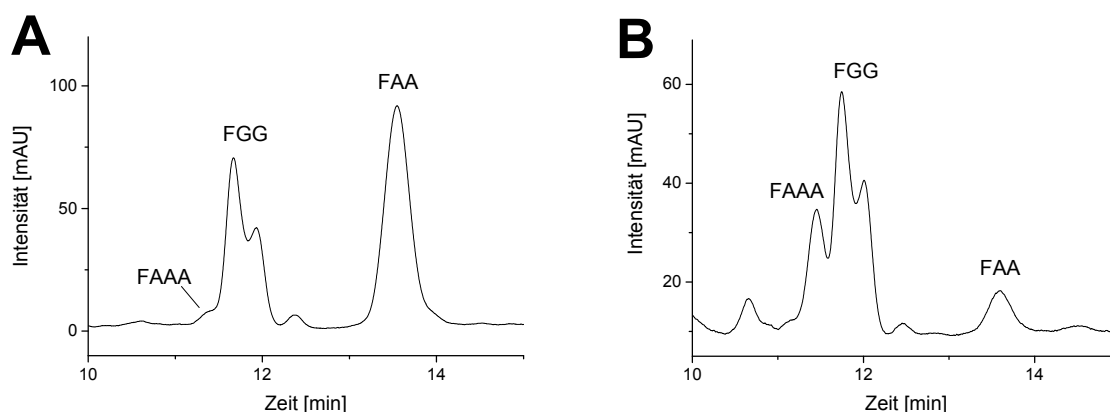


Abbildung 4.31: RP-18 chromatographische Trennung von Viscozyme L- (A) bzw. Driselase-Hydrolysaten (B) von unlöslichen Zuckerrübenschnitzel-Ballaststoffen. Die identifizierten Ferulasäure-Oligosaccharide FAAA, FAA und FG (Abbildung 9.1, Seite 181) sind entsprechend bezeichnet.

So wurden nach Viscozyme L-Hydrolyse nur geringe Mengen an FAAA und hohe Mengen an

FAA detektiert, während durch die Driselase-Hydrolyse ein ausgeglichenes Verhältnis der beiden OS erhalten wurde. Um eventuelle Unterschiede in der Substratspezifität feststellen zu können, wurde eine FAAA-Lösung mit den beiden Enzymen inkubiert. Die Inkubation der FAAA-Lösung mit Viscozyme L resultierte in einer Abnahme an FAAA bei gleichzeitiger Bildung von FAA und somit in einer Abspaltung der O3-gebundenen, terminalen Araf. Bei der Verwendung von Driselase konnte keine Spaltung von FAAA festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass die Unterschiede in der Zusammensetzung nicht durch eine unterschiedliche Freisetzung der OS aus den polymeren Strukturen begründet sind, sondern durch eine Spaltung der verzweigten FS-OS. Da eine Modifikation der Strukturelemente unerwünscht ist, wurde Driselase zur enzymatischen Spaltung verwendet.

Zur Bestimmung einer geeigneten Inkubationszeit wurden ZRS-UBS in einem Substrat-Enzym-Verhältnis von 10:1 für 24 und 48 Stunden inkubiert. Dabei wurden nach 24 Stunden 17,9 % und nach 48 Stunden 20,4 % unverdaulicher Rückstand erhalten. Zudem wurden mit 0,41 mg/g Rückstand nach 24 Stunden und 0,37 mg/g Rückstand nach 48 Stunden sehr ähnliche FS-Gehalte in den Rückständen bestimmt. Daher ist unter den verwendeten Bedingungen eine Inkubationszeit von 24 Stunden ausreichend. Basierend auf einem FS-Gehalt von ca. 6 mg/g unkorrigierter, unverdauter UBS kann aus den FS-Gehalten der Rückstände geschlossen werden, dass ein großer Teil der FS durch die Driselase-Hydrolyse in Lösung gebracht wird. Um Hinweise auf die Zusammensetzung des nicht-spaltbaren Anteils der ZRS-UBS zu bekommen, wurde die Monosaccharidzusammensetzung des Rückstands mittels H₂SO₄-Hydrolyse bestimmt (Tabelle 4.24).

Tabelle 4.24: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung der unlöslichen Zuckerrübenschnitzel-Ballaststoffe (ZRS-UBS) und des Rückstands der ZRS-UBS nach Driselase-Hydrolyse. Sp = Spuren.

Monosaccharid	ZRS-UBS	Rückstand
Fucose	Sp	Sp
Rhamnose	2,2	Sp
Arabinose	37,2	3,6
Galactose	9,3	1,7
Glucose	34,7	81,1
Xylose	3,6	9,4
Mannose	2,6	4,3
Galacturonsäure	10,4	Sp
Glucuronsäure	Sp	Sp

Im Vergleich zur Zusammensetzung der UBS konnten im Hydrolyserückstand nur noch geringe Anteile an Ara und Gal und nur Spuren an GalA und Rha detektiert werden. Dies spricht dafür, dass die Pektine durch die Driselase-Hydrolyse in ausreichendem Ausmaß gespalten wurden. Der hohe Anteil von Glc im Rückstand resultiert wahrscheinlich aus enzymatisch nicht spaltbarer Cellulose, während die Monosaccharide Xyl und Man wahrscheinlich von den mit Cellu-

lose assoziierten Hemicellulosen stammen. Die Spaltung der restlichen Pektine und somit die Freisetzung der im Rückstand verbleibenden FS könnte durch dieses PS-Netzwerk verhindert werden. Alternativ könnte die FS jedoch auch an andere Bestandteile des Hydrolyserückstands gebunden sein.

Da Driselase ein Multienzympräparat ist, besteht die Möglichkeit, dass auch andere OS freigesetzt werden, die mit der FS-OS-Detektion interferieren. Die Verwendung der AN- und GN-spezifischen Enzyme *endo*-Arabinanase und *endo*-Galactanase in Kombination mit α -Arabinofuranosidase und β -Galactosidase wäre eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen. Bei Verwendung dieser Enzyme zeigten jedoch große Mengen an nicht hydrolysiertem Material (ca. 80 % unlöslicher Rückstand) und FS-Gehalte von ca. 4,5 mg/g unlöslicher Rückstand, dass diese Enzyme die ZRS-UBS bzw. die AN- und GN-PS nur in einem geringen Ausmaß hydrolysieren. Zudem wurden im Hydrolysat zwar die OS FAA und FAAA detektiert, jedoch konnte kein FGG nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Galactane zu stark in die Zellwandmatrix integriert sind. Dies konnte bereits beim HPAEC-PAD- und NMR-Profilung beobachtet werden, da hier keine Freisetzung von GN-OS durch *endo*-Galactanase stattfand. Bei Verwendung von Driselase wird der Zellverband und die Zellwandmatrix durch die Einwirkung der Cellulasen und Hemicellulasen gespalten bzw. aufgelockert, weshalb die GN ohne weitere Behandlung für die GN-spaltenden Enzyme des Enzympräparats zugänglich sind. Damit stellt die Driselase-Hydrolyse eine effektive und gleichzeitig schonende Hydrolysemethode dar, die für die Methodenentwicklung verwendet wurde.

Im präparativen Maßstab wird zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung von FS-OS des enzymatischen Hydrolysats oft eine Amberlite XAD-2-Säulenchromatographie durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.4). Dabei wird das wässrige Hydrolysat zunächst auf die Säule gegeben, wobei Hydroxymethylsulfon-OS adsorbiert werden. Nach Waschen mit Wasser zur Elution reiner Kohlenhydrate werden die FS-OS mit Wasser/Methanol 50:50 (v/v) und/oder Methanol von der Säule eluiert. Durch diese Aufreinigung werden sowohl Monosaccharide und nicht mit phenolischen Substanzen substituierte OS, aber auch PS, die nur geringe Mengen an phenolischen Substanzen enthalten, entfernt. Da mittels Solid-Phase Extraction (SPE) an Umkehrphasen aufgrund des geringeren Säulen- und Bettvolumens eine effektivere Aufkonzentrierung erreicht werden kann, sollte die Verwendung von SPE-Säulen für den analytischen Maßstab von Vorteil sein. Um die Eignung von Amberlite XAD-2 mit einem kleineren Säulenvolumen bzw. einer C18-SPE zu überprüfen, wurde die Wiederfindung von FAA nach simulierter Probenvorbereitung an beiden Phasen bestimmt.

Dabei wurden bei der Verwendung von Amberlite XAD-2 nur insgesamt 85 % des FAA in den mittels Methanol/Wasser 50:50 (v/v) und Methanol eluierten Fraktionen wiedergefunden, während 11 % in der Wasserfraktion vorlagen. Da bei Anwendung der C18-SPE eine Wiederfindung von 101 % erzielt werden konnte, wurde diese Phase für die Methode verwendet. Dies hat den

weiteren Vorteil, dass das aufgereinigte Hydrolysat in einem kleinen Volumen von ca. 3 mL vorliegt und das Lösungsmittel zur Einstellung eines definierten Volumens schnell entfernt werden kann. Als Lösungsmittel für das getrocknete Hydrolysat wurde eine 50:50 (v/v) Wasser/Methanol Mischung verwendet, da in diesem Gemisch alle Standardsubstanzen gelöst werden konnten.

4.5.2 Chromatographische Analyse

Bei den zunächst verwendeten chromatographischen Bedingungen konnte keine vollständige Trennung von FAA, FGG und FAAA erreicht werden (siehe auch Abbildung 4.31 auf Seite 112). Der Hauptgrund hierfür sind die relativ breiten Peaks der drei OS, welche überwiegend auf die Mutarotation der reduzierenden Einheiten der OS zurückzuführen sind. Eine Reduktion der reduzierenden Einheiten mit NaBH_4 in einem aprotischen Lösungsmittel (DMSO) führte zu unreproduzierbaren Mengen an unreduziertem FGG und erwies sich somit als nicht geeignet. Ebenso wurden bei der Detektion mittels MS^2 bereits ohne Matrixzugabe sehr große Schwankungen im Response beobachtet. Daher mussten Bedingungen gefunden werden, die eine möglichst vollständige chromatographische Trennung und damit eine UV-spektroskopische Quantifizierung ermöglichen. Dazu wurden diverse stationäre Phasen und Eluentensysteme getestet. Eine nahezu vollständige Trennung konnte durch Verwendung einer Kinetex Phenyl-Hexyl Phase und eines ternären Gradienten aus Wasser, Acetonitril und einer 65:35 Mischung (v/v) aus Methanol und Acetonitril erreicht werden. Ein Chromatogramm der Trennung von FAA, FAAA und FGG ist in Abbildung 4.32 gezeigt.

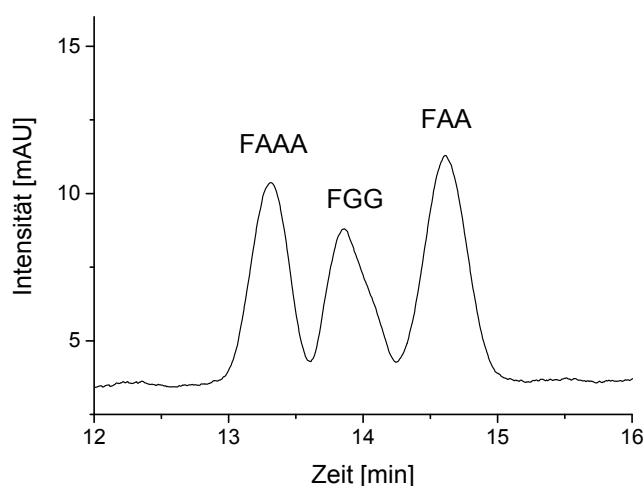


Abbildung 4.32: Trennung der Ferulasäure-Oligosaccharide FAAA, FAA und FGG (Abbildung 9.1, Seite 181) auf einer Kinetex Phenyl-Hexyl-Säule.

Die anderen Standardsubstanzen (CAA , FAAAA , 8-O-4-DFS(AA)_2 und 5-5-DFS(AA)_2) konnten

ebenfalls durch den verwendeten Gradienten getrennt und daher anhand ihrer Retentionszeiten (siehe Abschnitt 9.9) in Kombination mit der charakteristischen MS²-Fragmentierung (siehe Abschnitt 9.4) identifiziert werden.

Die OS FAA, FAAA und FGG wurden in ausreichender Reinheit und in Mengen über 10 mg isoliert, so dass Stammlösungen durch Einwiegen der Substanzen erstellt werden konnten. Bei der Aufarbeitung mittels SPE treten nachweislich keine Verluste an FS-OS auf, zudem ist eine Detektion über die UV-Flächen bei einer chromatographischen Basislinientrennung sehr reproduzierbar. Da ebenfalls ausreichende Mengen an Standardsubstanzen vorlagen, wurde zur Quantifizierung der FS-OS eine externe Kalibrierung angewendet (mindestens sechs Kalibrierpunkte, Dreifachbestimmung). Die für die Kalibrierungen verwendeten Konzentrationsbereiche, die Gleichungen der Kalibriergeraden und deren Korrelationskoeffizienten sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für FAA, FAAA und FGG sind in Tabelle 4.25 gezeigt.

Tabelle 4.25: Verfahrensmerkmale für die chromatographische Bestimmung von Ferulasäure-Oligosacchariden (FS-OS) mit UV-Detektion. Die Strukturen der FS-OS FAAA, FAA und FGG sind in Abbildung 9.1 auf Seite 181 gezeigt. R² = Korrelationskoeffizienten der Kalibrierungen, LOQ = Bestimmungsgrenze, LOD = Nachweisgrenze.

FS-OS	Konzentrationsbereich [μM]	Geradengleichung	R ²	LOQ [μM]	LOD [μM]
FAAA	1 - 50	$y = 62850x + 5157$	0,9994	0,80	0,25
FAA	1 - 50	$y = 80129x + 2129$	0,9999	0,73	0,26
FGG	5 - 50	$y = 52330x + 18862$	0,9997	1,07	0,34

Die dargestellten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zeigen, dass trotz der Mutarotation der FS-OS während der Chromatographie, welche mit vergleichsweise breiten Peaks verbunden ist, die FS-OS in sehr niedrigen Konzentrationen quantifiziert werden können. Die Streuung der Residuen ist bei relativen Standardabweichungen von 0,5 - 5 % akzeptabel, so dass die Präzision der Kalibrierung als zufriedenstellend beurteilt werden kann. Zudem wurde für die oberen und untersten Punkte jeweils Varianzenhomogenität festgestellt (Signifikanzniveau 0,001 %). Um eventuelle Matrixeinflüsse festzustellen, wurde ein Driselase-Hydrolysat von Buchweizen-UBS als Matrix verwendet. In diesem konnten im Vorfeld zwar zusätzliche UV-aktive Substanzen unbekannter Identität detektiert werden, jedoch keines der zu analysierenden FS-OS und auch keine Peaks im Retentionszeitbereich der FS-OS. Daher wurden zwei Konzentrationen der Kalibrierungen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durch Verdünnung mit dem Buchweizen-Hydrolysat hergestellt und im Vergleich zu Stammlösungen in Wasser/Methanol (50:50, v/v) viermal gemessen. Dabei wurde kein Einfluss auf die Richtigkeit der Methode und auch keine Verschlechterung der Messpräzision beobachtet. Zudem wurde wiederum Varianzenhomogenität (Signifikanzniveau 0,001 %) für die mit Matrix verdünnten Stammlösungen festgestellt.

4.5.3 Anwendung der Methode

Da in Buchweizen keine FS-OS detektiert wurden, wurde die Methode nur auf Amaranth, Quinoa und ZRS angewendet (Tabelle 4.26). Dabei wurde zusätzlich zu den Gehalten der drei Haupt-FS-OS die Menge der durch diese Strukturelemente repräsentierten FS berechnet. In allen Ma-

Tabelle 4.26: Gehalte (mg/g unlösliche Ballaststoffe (UBS)) der durch Driselase freigesetzten Oligosaccharide FAAA, FAA und FG (Abbildung 9.1, Seite 181) sowie prozentuale Anteile der durch diese Oligosaccharide repräsentierten Ferulasäure (FS) in Amaranth- (AM), Quinoa- (Q) und Zuckerrübenschnitzel (ZRS)-UBS.

Oligosaccharid	AM	Q	ZRS
FAA	0,52	0,54	1,48
FAAA	0,57	0,89	2,82
FGG	0,22	0,11	5,14
Σ gefundene FS [%]	48,1	59,8	49,3

terialien konnten die drei Haupt-FS-OS nachgewiesen und mit einer zufriedenstellenden Präzision quantifiziert werden (relative Range/2: 0,5 - 5 %). Zudem konnten die beiden DFS-OS in allen drei Proben anhand ihrer Retentionszeiten und MS²-Fragmentierungen nachgewiesen werden. Ebenso wurde FFAAA, welches höher FS-substituierte Bereiche der AN repräsentiert, in allen Rohstoffen nachgewiesen. Jedoch konnte der Nachweis dieses OS bei Amaranth und Quinoa aufgrund des niedrigen Gehalts und der schwachen MS²-Fragmentierung nur durch das Vorkommen des Moleküllions zur entsprechenden Retentionszeit erfolgen. Das *p*-CS-enthaltende OS CAA konnte in den ZRS-UBS nachgewiesen werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das Vorkommen estergebundener *p*-CS nicht auf Quinoa beschränkt ist.

Zwischen ca. 50 und 60 % der zellwandgebundenen, mittels alkalischer Hydrolyse freisetzbaren FS konnte in den enzymatischen Hydrolysaten in Form der FS-OS FAAA, FAA und FGG wiedergefunden werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass höhermolekulare FS-OS nicht mitbestimmt werden und dass die analysierten Gehalte nur Aussagen über die unter den verwendeten Bedingungen enzymatisch freisetzbaren Strukturelemente liefern. Aus der Bestimmung der FS-OS wird deutlich, dass die Bindung der FS je nach pflanzlichem Material bevorzugt an AN oder GN stattfindet. In den ZRS-UBS liegt die Mehrheit der durch Driselase freigesetzten FS an GN gebunden vor. Amaranth zeigt einen etwas höheren Anteil an FG (5,14 %) als Quinoa, jedoch überwiegt bei beiden die Bindung an AN-Strukturelemente. Außerdem liegt bei den aus ZRS- und Quinoa-UBS freigesetzten AN-FS-OS ein deutlich höherer Anteil an FAAA vor, was darauf hindeutet, dass in diesen Materialien verstärkt verzweigte Strukturelemente mit FS substituiert sind. Insgesamt kann festgestellt werden, dass mit dieser Methode ca. die Hälfte der zellwandassoziierten FS schnell und einfach analysiert werden kann und so wichtige Rückschlüsse auf die Strukturen der mit FS veresterten AN und GN gezogen werden können.

4.6 Zusammenfassende Diskussion

Wie durch Anwendung der konventionellen Methoden zur PS-Analyse gezeigt, bestehen zwischen den verwendeten Rohstoffen vor allem Unterschiede in der Struktur der AN. Mittels Methylierungsanalyse konnten dabei zum einen verschiedene Anteile an verzweigten AN-Strukturelementen beobachtet werden, zum anderen zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede in den Verhältnissen zwischen O3-/O2-Substitution des Rückgrats. Über die Strukturen der GN werden mittels Methylierungsanalyse, auch aufgrund einer möglichen Unterbestimmung, nur sehr begrenzte Informationen erhalten. So konnte zwar das Vorhandensein von (1→4)-verknüpften GN für die meisten unlöslichen PS-Präparate gezeigt werden, jedoch ist keine Aussage über mögliche Substituenten wie beispielsweise Arap möglich. Auch im Fall der AN kann keine Aussage über strukturelle Aspekte der vorhandenen Seitenketten getroffen werden.

Durch die Isolierung und Strukturcharakterisierung der AN-Standardsubstanzen konnten die vielfältigen Substitutionsmöglichkeiten des α -(1→5)-verknüpften Rückgrats demonstriert werden. Strukturelemente wie die hochverzweigten OS A6a, A7a und A7b sind durch die beschriebenen konventionellen Methoden nicht nachweisbar. Selbiges gilt für die β -Araf-enthaltenden AN-OS A5b und A5c, welche als neue Strukturelemente dieser PS etabliert werden konnten. Mit G3b konnte erstmals ein terminale α -Arap-Einheiten-enthaltendes GN-OS isoliert und eindeutig charakterisiert werden. Da dieses OS durch *endo*-Galactanase freigesetzt werden konnte, stammt es wahrscheinlich, wie bereits von HUISMAN ET AL. (2001a) vermutet, von den Kettenenden der GN. Das Vorkommen von 1,4-substituierten α -Arap-Einheiten innerhalb der Ketten wurde dagegen bisher nicht in der Literatur beschrieben, was vermutlich in der komplexen Analyse dieses Strukturelements begründet ist. Da 1,4-substituierte Arap und 1,5-substituierte Araf das gleiche PMAA ergeben, können diese mittels Methylierungsanalyse nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund der Reduktion zu Zuckeralkoholen gehen zudem Informationen über die anomere Konfiguration verloren, weswegen Strukturelemente wie terminale β -Araf ebenfalls nicht nachgewiesen werden können. Die isolierten OS verdeutlichen daher die Notwendigkeit neuer methodischer Ansätze zur Analyse solcher Strukturelemente.

Sowohl mittels HPAEC-PAD als auch mittels HPLC-PGC-MS konnte ein Großteil der isolierten AN- und GN-OS vollständig getrennt werden. Insbesondere wenn nur sehr geringe Mengen an OS vorliegen, kann somit auch unter Miteinbeziehung der MS²-Fragmentierung ein sicherer Nachweis erfolgen. Durch die Verwendung der RRFs zu Raffinose für die semiquantitative Bestimmung der OS mittels HPAEC-PAD konnten die mittels enzymatischer Hydrolyse freigesetzten OS robust und mit geringem Aufwand analysiert werden. Eine große Zeitersparnis stellt insbesondere die Tatsache dar, dass die Kalibrierung nicht mit jeder Messserie erfolgen muss. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass lediglich die niedermolekularen Produkte der enzymatischen Spaltung nachgewiesen werden können, weshalb die Struktur der PS durch Analyse

dieser niedermolekularen OS nicht in jedem Fall exakt widergespiegelt wird.

Durch die Analyse mittels NMR-Spektroskopie werden dagegen Strukturelemente aller gelösten OS und PS detektiert. Für die meisten Strukturelemente konnten hierfür spezifische Markersignale im HSQC-Spektrum identifiziert werden, auch wenn eine partielle Überlappung mit benachbarten Peaks teilweise zu Ungenauigkeiten in der semiquantitativen Bestimmung führt. Durch die Verwendung von HSQC-TOCSY-Experimenten erfolgte zusätzlich ein eindeutiger Nachweis von selteneren Strukturmerkmalen. Jedoch konnten mit dieser Methode aufgrund der geringeren Empfindlichkeit manche in kleinen Mengen vorkommenden Strukturelemente, die mittels HPAEC-PAD nachgewiesen wurden, nicht immer detektiert werden. Da für benachbarte, substituierte Ara-Einheiten des AN-Rückgrats kein spezifisches Markersignal gefunden werden konnte, ist keine Aussage über dieses Strukturmerkmal möglich. Jedoch können durch Kombination der beiden neuen methodischen Ansätze Informationen über alle gezeigten Strukturelemente erhalten werden. Falls jeweils sehr unterschiedliche Anteile an bestimmten Strukturelementen detektiert werden, können zudem erweiterte Rückschlüsse auf die Strukturen der AN-PS gezogen werden. So können die Strukturmerkmale, die mittels HPAEC-PAD in einem höheren Ausmaß detektiert werden, den linearen, enzymatisch gut spaltbaren Bereichen der AN zugeordnet werden. Wird ein erhöhter Anteil bestimmter Strukturmerkmale mittels NMR-Spektroskopie detektiert, entstammt dieser wahrscheinlich den stärker verzweigten und damit enzymatisch weniger zugänglichen Bereichen der AN.

Beim Vergleich des HPAEC-PAD- und NMR-Profilings mit der Methylierungsanalyse müssen jedoch auch die Nachteile der entwickelten Ansätze berücksichtigt werden. Wie beschrieben, können aufgrund der angewendeten enzymatischen Spaltung lediglich solche Strukturelemente der AN und GN analysiert werden, die durch *endo*-Arabinanase und *endo*-Galactanase zu ausreichend niedermolekularen OS gespalten bzw. in eine lösliche Form überführt werden. Sehr fest im Zellverband verankerte und damit enzymatisch unzugängliche PS werden somit nicht bestimmt. Durch die bei der Methylierungsanalyse angewendete chemische Behandlung werden potentiell alle PS erfasst und analysiert. Außerdem können durch diese Methode auch Aussagen über die Strukturen der sonstigen PS, wie beispielsweise Hemicellulosen, erhalten werden. Jedoch besitzt die Methylierungsanalyse gegenüber den entwickelten Methoden die bereits beschriebenen Einschränkungen im Bezug auf bestimmte Strukturmerkmale.

Die HPAEC-PAD-Analyse der verschiedenen UBS nach enzymatischem Verdau mittels *endo*-Arabinanase ermöglichte zumeist mit der Methylierungsanalyse vergleichbare Rückschlüsse hinsichtlich der PS-Strukturen. So konnten beispielsweise Materialien mit einem unterschiedlichen Verzweigungsgrad des AN-Rückgrats voneinander unterschieden werden. Dabei konnten mit beiden Methoden ähnliche Anteile an O3- bzw. O2-Verzweigungen für die pflanzlichen Materialien bestimmt werden. Zusätzlich zu den Informationen über die Grundstrukturen und die speziellen Strukturelemente konnten durch das chromatographische Profiling Hinwei-

se auf die Anteile an hochverzweigten Bereichen und damit auf die Komplexität der AN erhalten werden. Wie beschrieben, sind die prozentualen Anteile der OS und der damit verbundenen Strukturelemente aufgrund der Nichterfassung der hochmolekularen Bestandteile des enzymatischen Hydrolysats nicht direkt mit der Methylierungsanalyse vergleichbar. Die mittels NMR-Spektroskopie ermittelten Anteile können jedoch unter der Annahme, dass die meisten terminalen, O5-gebundenen *Araf*-Einheiten durch die enzymatische Hydrolyse gebildet werden, mit der Methylierungsanalyse verglichen werden. Dabei wurden für alle pflanzlichen Materialien sehr ähnliche Zusammensetzungen bestimmt. Zudem konnten auch die neu etablierten Strukturelemente semiquantitativ bestimmt werden. Die durch die Methylierungsanalyse bzw. das NMR-Profilng erhaltenen ähnlichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch *endo*-Arabinanase hydrolysierten bzw. freisetzbaren AN-Strukturen repräsentativ für die in der ganzen Zellwand enthaltenen AN-Strukturen sind.

Für *endo*-Galactanase-Hydrolysate haben die Einschränkungen der Methylierungsanalyse zur Folge, dass ein Vergleich zwischen den Methoden nicht sinnvoll ist. So werden die GN hierbei einerseits unterbestimmt und andererseits sind keine Informationen über die neuartigen Strukturelemente abzuleiten. Durch Anwendung der HPAEC-PAD- bzw. NMR-Profilngmethoden wurden dagegen Detailinformationen über die vorhandenen GN-Strukturen erhalten. So konnten mittels HPAEC-PAD die Anteile von internen, 1,4-substituierten- sowie terminalen α -*Arap*-enthaltenden OS in Apfel- und SES-UBS bestimmt werden. Zusätzlich war es möglich, die Anteile terminaler, α -*Arap*-enthaltender OS in Amaranth- und ZRS-UBS zu erfassen, während eine semiquantitative Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie aufgrund der niedrigen Anteile dieser Strukturmerkmale lediglich in den SES-UBS möglich war.

Bei der Analyse der löslichen GN-PS konnten die Anteile der α -*Arap*-Strukturelemente ebenfalls mit beiden entwickelten Methoden bestimmt werden. Mittels NMR-Spektroskopie wird das PS in seiner nativen Form analysiert, daher konnten hierbei zusätzlich Rückschlüsse auf die Kettenlänge gezogen werden. Dieser Ansatz weist somit deutliche Vorteile gegenüber der Methylierungsanalyse auf, mit welcher keine Aussage über die Länge der GN-Ketten möglich war. Durch HPAEC-PAD-Analyse der durch *endo*-Arabinanase freigesetzten OS und durch die Methylierungsanalyse konnten ähnliche Rückschlüsse auf die Struktur der löslichen AN-PS gezogen werden. Wie auch für die UBS der untersuchten pflanzlichen Materialien wurden durch die Anwendung der NMR-Profilngmethode auf die löslichen AN-PS bzw. die verschiedenen LBS mit der Methylierungsanalyse vergleichbare Ergebnisse erhalten. Die teilweise auftretenden Abweichungen der jeweils bestimmten Anteile an den verschiedenen Strukturelementen könnten neben Ungenauigkeiten der NMR-spektroskopischen Messung auch auf die harschen Bedingungen während der Methylierungsanalyse zurückzuführen sein. Da bei Verwendung des NMR-Ansatzes die nativen Strukturen der PS analysiert werden, bestehen lediglich die beschriebenen methodischen Limitierungen, eine Veränderung der nativen Strukturen ist hingegen nicht zu erwarten. Während bei den meisten LBS eher einfach aufgebaute AN-Strukturen vorlagen,

wurden in Quinoa-LBS und den löslichen AN-PS terminale β -Araf-Einheiten mithilfe der NMR-spektroskopischen Profilingmethode bestimmt.

Durch die Analyse der Apfel-NSPS vor und nach drei-wöchiger Lagerung der als Ausgangsmaterial dienenden Äpfel konnte gezeigt werden, dass die entwickelten Profilingmethoden ebenfalls sehr gut zur Untersuchung nacherntephysiologischer Prozesse geeignet sind. So konnten sowohl mit den Profilingmethoden als auch mit der Methylierungsanalyse die bereits von PENA & CARPITA (2004) beschriebenen strukturellen Veränderungen der AN und GN festgestellt werden. Die dominante Veränderung ist der Abbau von Verzweigungen des AN-Rückgrats, während die GN in eher geringerem Ausmaß modifiziert werden. Jedoch konnten durch Anwendung der Profilingmethoden Änderungen in den Verhältnissen der durch *endo*-Galactanase hydrolysierten GN-OS detektiert werden, was auf einen möglichen Einfluss der α -Arap-Strukturelemente auf die Modifikation der Zellwand-PS hindeutet. Ebenso wurden nach der Lagerung kleinere Mengen an β -Araf-enthaltenden AN-OS bestimmt, was einen weiteren Informationsgewinn darstellt, der durch das chromatographische Profiling erzielt werden konnte.

Diese erste Anwendung der Profilingmethoden auf pflanzliche Rohstoffe in verschiedenen Nacherntestadien deutet auf eine eventuelle pflanzenphysiologische Rolle dieser neu beschriebenen AN-Strukturelemente hin. So ist der Abbau der pflanzlichen Zellwand-PS, welcher durch eine damit einhergehende Veränderung der Textur die Lebensmittelqualität beeinflussen kann, wahrscheinlich durch Enzyme wie α -Arabinofuranosidase und β -Galactosidase vermittelt (BONGHI ET AL., 1996; GOULAO ET AL., 2007; WEI ET AL., 2010). Strukturelemente wie β -Araf oder α -Arap könnten durch eine Verringerung des PS-Abbaus Einfluss auf diesen Prozess nehmen. Ein Einfluss dieser Strukturelemente auf die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der AN und GN als Ballaststoffkomponenten erscheint ebenfalls möglich. So könnte in Abhängigkeit von der Enzymausstattung der menschlichen Mikrobiota ein reduzierter bzw. selektiver Abbau dieser Strukturelemente erfolgen. Zusammengefasst lieferten die hier entwickelten Methoden zur Analyse der AN und GN einen erhöhten Informationsgehalt und weisen einen im Vergleich mit der Methylierungsanalyse deutlich reduzierten Arbeits- und Zeitaufwand und eine gute Anwendbarkeit auf verschiedene Materialien auf. Des Weiteren wird, anders als bei der Methylierungsanalyse, auf den Einsatz toxikologisch bedenklicher Chemikalien weitgehend verzichtet.

Als Standardsubstanzen für die Untersuchung der Substitution von PS mit FS wurden bereits in der Literatur beschriebene FS-OS isoliert, welche die gängigsten Substitutionstypen der AN und GN repräsentieren. Zudem wurden erstmalig zwei AN-DFS-OS isoliert und eindeutig charakterisiert. Ebenso wurde die Substitution zweier benachbarter Araf-Reste und die Veresterung von AN mit *p*-CS demonstriert. Die bekannten und neu beschriebenen Hydroxyzimtsäure- bzw. DFS-OS wurden durch das entwickelte chromatographische Profiling in verschiedenen pflanzlichen Materialien quantifiziert bzw. nachgewiesen. Durch die Quantifizierung der Hauptprodukte konnten einerseits Informationen über die an lineare AN, verzweigte AN oder GN gebundene

FS-Menge erhalten werden. Andererseits zeigte sich, dass die Substitution benachbarter Araf-Einheiten bzw. die DFS-/p-CS-Substitution nicht nur auf bestimmte Pflanzen begrenzt ist. Hier nachgewiesene DFS-cross-links zwischen verschiedenen AN-Ketten als auch die Substitution unterschiedlich komplexer Strukturelemente mit FS, kann potentiell die enzymatische Fermentation der AN und GN beeinflussen. Dies kann sowohl für pflanzenphysiologische Prozesse als auch für die Fermentation dieser PS im menschlichen Dickdarm von Bedeutung sein. Abschließend sei erwähnt, dass die hier entwickelte Methode zum schnellen Nachweis der Hydroxyzimtsäure-OS in verschiedenen Pflanzenmaterialien verwendet werden kann. Dieser Nachweis wurde bislang, wenn überhaupt, nur durch zeitintensive präparative Isolierung und Strukturcharakterisierung entsprechender FS-OS geführt.

5 Zusammenfassung

Die pflanzliche Zellwand und deren Struktur ist von großer Bedeutung für die Pflanzenphysiologie und für die Qualität, insbesondere die Textur, pflanzlicher Lebensmittel. Des Weiteren ist die Struktur der pflanzlichen Zellwand bedeutend für die Zusammensetzung und die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der aus ihr erhaltenen Ballaststoffe. Der Pektinkomplex stellt einen wichtigen Teil der pflanzlichen Zellwand dar, der in vielfältiger Weise Einfluss auf deren Eigenschaften nehmen kann. Eine entscheidende Rolle für die pflanzenphysiologischen, ernährungsphysiologischen und lebensmitteltechnologischen Eigenschaften wird den neutralen Seitenketten des Pektins, den Arabinanen (AN) und Galactanen (GN), zugesprochen. Diese besitzen eine sehr heterogene Struktur, wobei viele strukturelle Details noch nicht aufgeklärt wurden. Aufgrund den beschränkten Möglichkeiten zur Analyse dieser Polysaccharide (PS) ist ebenfalls wenig über den Einfluss bestimmter Strukturelemente dieser Polymere auf die Funktionalität der PS in isolierter Form oder als Bestandteil der Zellwände bekannt.

Daher wurden in dieser Arbeit neue Profilingmethoden zur schnellen und detaillierten Analyse neutraler Pektinseitenketten entwickelt. Die Verwendung spezifischer Enzyme sollte dabei den Erhalt möglichst vieler Strukturelemente während der Hydrolyse gewährleisten. Durch die Isolierung und detaillierte Charakterisierung der für die Methodenentwicklung benötigten Standardsubstanzen sowie durch deren späteren Nachweis mit den entwickelten Profilingmethoden in verschiedenen pflanzlichen Materialien sollte das Wissen über die Strukturen der Pektinseitenketten erweitert werden.

Die zur Isolierung von Standardsubstanzen und zur Anwendung der entwickelten Methoden verwendeten pflanzlichen Rohstoffe bzw. deren Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSPS) wurden zunächst durch klassische Methoden der PS-Analyse charakterisiert. So wurden die Monosaccharidzusammensetzung mittels Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD), die Verhältnisse der partiell methylierten Alditolacetate mittels Methylierungsanalyse und die durch Verseifung freigesetzten Hydroxymethylsäuren mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die AN und GN einen quantitativ bedeutenden Teil der unlöslichen Ballaststoffe (UBS) bzw. der NSPS von Apfel, Amaranth, Quinoa, Buchweizen, Zuckerrübenschnitzeln (ZRS) und Sojaextraktionsschrot (SES) darstellen (beispielsweise ca. 25 - 45 % der UBS). Bereits durch die Anwendung dieser Methoden konnten Unterschiede in den PS-Strukturen verschiedener pflanzlicher Rohstoffe, besonders in der AN-Struktur, gezeigt werden. Außerdem konnten größere Mengen zellwandassoziiertes Ferulasäure (FS) in Amaranth, Quinoa und ZRS (zum Beispiel 7 mg FS / g ZRS-UBS), jedoch nicht in Buchweizen detektiert werden.

Aus den verschiedenen pflanzlichen Materialien wurde eine Vielzahl an Standardsubstanzen gewonnen, die durch die Anwendung zweidimensionaler Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS) detailliert charakterisiert wurden. Neben Oligosacchariden (OS) die bereits bekannte Strukturelemente repräsentierten, konnte eine Reihe an bisher nicht bekannten Strukturelementen beschrieben werden. So wurde gezeigt, dass das AN-Rückgrat mit dimeren, β -(1 \rightarrow 3)-verknüpften Arabinose-Seitenketten verzweigt sein kann. Durch die Isolierung und Charakterisierung entsprechender GN-OS wurde zudem demonstriert, dass α -Arabinopyranose sowohl terminal an GN-Ketten vorliegt als auch 1,4-substituiert innerhalb der Ketten. Neben den bereits bekannten Pektin-FS-OS konnten erstmals zwei Dehydrodiferulasäure (DFS)-AN-OS isoliert und vollständig charakterisiert werden. Die Isolierung dieser Verbindungen weist darauf hin, dass AN-Ketten durch DFS verknüpft werden können. Zudem konnte erstmalig die Bindung von *para*-Cumarsäure (*p*-CS) an AN nachgewiesen werden.

Die auf Grundlage der isolierten OS entwickelte HPAEC-PAD-Methode liefert eine gute Trennung der durch *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase aus den UBS bzw. NSPS freigesetzten AN- und GN-OS. Die OS können sehr empfindlich detektiert und unter Verwendung von relativen Responsefaktoren über einen weiten Konzentrationsbereich semiquantitativ bestimmt werden. Eine in Zweifelsfällen eindeutige Identifizierung ist mit HPLC-MS² unter Verwendung einer Porous Graphitized Carbon-Phase möglich. Durch die Anwendung der entwickelten Methode auf verschiedene pflanzliche Materialien konnten die neubeschriebenen Strukturelemente in mehreren Pflanzen nachgewiesen werden und die durch die bestimmten OS repräsentierten Strukturelemente in den verschiedenen Materialien ins Verhältnis zueinander gesetzt werden. Diese Verhältnisse ließen ähnliche Rückschlüsse auf die PS-Struktur zu wie die Ergebnisse der konventionell verwendeten Analysemethoden.

Als weiterer Ansatz zur Analyse der verschiedenen AN- und GN-Strukturelemente wurde die zweidimensionale NMR-Spektroskopie, insbesondere das Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)-Experiment, verwendet. Für einen Großteil der durch die isolierten OS repräsentierten Strukturelemente konnten spezifische HSQC-Korrelationspeaks identifiziert werden. Wo dies nicht möglich war, konnte ihr Anteil aus verschiedenen Signalen errechnet werden. Somit konnten durch Volumenintegration der entsprechenden HSQC-Signale die Anteile der AN- bzw. GN-Strukturelemente sowohl in den *endo*-Arabinanase- bzw. *endo*-Galactanase-Hydrolysaten der UBS als auch in den löslichen PS bzw. löslichen Ballaststoffen (LBS) bestimmt werden. Die Untersuchung der verschiedenen enzymatischen Hydrolysate der UBS und der NSPS sowie die Untersuchung der löslichen Polysaccharide durch das entwickelte NMR-Profilung ergab Strukturvorschläge für die AN und GN, die in ähnlicher Form auch aus der Methylierungsanalyse erhalten wurden. Darüber hinaus lieferte die entwickelte Methode weitere Informationen über spezielle, mit der Methylierungsanalyse nicht erfassbare Strukturelemente.

Zudem weist der entwickelte NMR-Ansatz weitere Vorteile auf, wie eine deutlich einfachere und schnellere Durchführung der Analytik.

Für die Analyse der mit Hydroxyzimtsäuren und DFS veresterten AN- bzw. GN-OS wurde eine HPLC-MS-Methodik entwickelt. Durch die zur Hydrolyse verwendete Driselase-Spaltung konnte ein Großteil der veresterten PS ohne Modifikation der Hydroxyzimtsäure-tragenden Einheit hydrolysiert werden. Die Quantifizierung der Hauptprodukte lieferte Rückschlüsse auf die Struktur der veresterten PS, während die hier neu beschriebenen neuartigen Strukturelemente mittels MS² empfindlich nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend zeichnen sich die entwickelten Profilingmethoden im Vergleich zu klassischen Methoden der PS- bzw. Zellwandanalyse sowohl durch eine deutlich einfachere Durchführung als auch durch einen erhöhten Informationsgehalt über die PS-Strukturen aus. Durch ihre Anwendung können somit umfangreiche Informationen über die AN und GN der pflanzlichen Zellwand erhalten werden, eine Grundlage für Studien bezüglich des Einflusses bestimmter Strukturen auf die Qualität sowie die ernährungsphysiologischen und technologischen Eigenschaften pflanzlicher Lebensmittel.

6 Literaturverzeichnis

- AACC, **2001**, The definition of dietary fiber, *Cereal Foods World*, 46, 112–126.
- ABDEL-MASSIH, R. M., BAYDOUN, E. A. H., WALDRON, K. W., BRETT, C. T., **2007**, Effects of partial enzymic degradation of sugar beet pectin on oxidative coupling of pectin-linked ferulates *in vitro*, *Phytochemistry*, 68, 1785–1790.
- AL-TAMIMI, M. A. H. M., PALFRAMAN, R. J., COOPER, J. M., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., **2006**, *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora, *J. Appl. Microbiol.*, 100, 407–414.
- ALBERSHEIM, P., NEUKOM, H., DEUEL, H., **1960**, Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions, *Arch. Biochem. Biophys.*, 90, 46–51.
- ALBERSHEIM, P., NEVINS, D. J., ENGLISH, P. D., KARR, A., **1967**, A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography, *Carbohydr. Res.*, 5, 340–345.
- ALLERDINGS, E., RALPH, J., SCHATZ, P. F., GNIECHWITZ, D., STEINHART, H., BUNZEL, M., **2005**, Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre, *Phytochemistry*, 66, 113–124.
- ALLERDINGS, E., RALPH, J., STEINHART, H., BUNZEL, M., **2006**, Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran, *Phytochemistry*, 67, 1276–1286.
- ALVAREZ-JUBETE, L., ARENDT, E. K., GALLAGHER, E., **2010**, Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients, *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 106–113.
- AN, J. H., O'NEILL, M. A., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. G., **1994a**, Isolation and structural characterization of β -D-glucosyluronic acid and 4-O-methyl β -D-glucosyluronic acid-containing oligosaccharides from the cell-wall pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan I, *Carbohydr. Res.*, 252, 235–243.
- AN, J. H., ZHANG, L., O'NEILL, M. A., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. G., **1994b**, Isolation and structural characterization of *endo*-rhamnogalacturonase-generated fragments of the backbone of rhamnogalacturonan I, *Carbohydr. Res.*, 264, 83–96.
- BELDMAN, G., SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F., DE RUITER, G. A., SILIHA, H. A., VORAGEN, A. G. J., **1993**, Degradation of arabinans by arabinanases from *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*, *Carbohydr. Polym.*, 20, 159–168.
- BHARTI, S. K., ROY, R., **2012**, Quantitative ^1H NMR spectroscopy, *TrAC- Trends Anal. Chem.*, 35, 5–26.
- BJÖRNDAL, H., LINDBERG, B., SVENSSON, S., **1967**, Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates, *Carbohydr. Res.*, 5, 433–440.
- BLAKENEY, A. B., HARRIS, P. J., HENRY, R. J., STONE, B. A., **1983**, A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydr. Res.*, 113, 291–299.

- BLUMENKRANTZ, N., ASBOE-HANSEN, G., **1973**, New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, 54, 484–489.
- BONGHI, C., PAGNI, S., VIDRIH, R., RAMINA, A., TONUTTI, P., **1996**, Cell wall hydrolases and amylase in kiwifruit softening, *Postharvest Biol. Technol.*, 9, 19–29.
- BRAUNE, A., BUNZEL, M., YONEKURA, R., BLAUT, M., **2009**, Conversion of dehydrodiferulic acids by human intestinal microbiota, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 3356–3362.
- BRUMMELL, D. A., **2006**, Cell wall disassembly in ripening fruit, *Funct. Plant Biol.*, 33, 103–119.
- BRUMMELL, D. A., DAL CIN, V., CRISOSTO, C. H., LABAVITCH, J. M., **2004**, Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit, *J. Exp. Bot.*, 55, 2029–2039.
- BUNZEL, M., **2010**, Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers, *Phytochem. Rev.*, 9, 47–64.
- BUNZEL, M., ALLERDINGS, E., RALPH, J., STEINHART, H., **2008**, Cross-linking of arabinoxylans via 8-8-coupled diferulates as demonstrated by isolation and identification of diarabinosyl 8-8 (cyclic)-dehydrodiferulate from maize bran, *J. Cereal Sci.*, 47, 29–40.
- BUNZEL, M., ALLERDINGS, E., SINWELL, V., RALPH, J., STEINHART, H., **2002**, Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre, *Eur. Food Res. Technol.*, 214, 482–488.
- BUNZEL, M., RALPH, J., **2006**, NMR characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8352–8361.
- BUNZEL, M., RALPH, J., MARITA, J., STEINHART, H., **2000**, Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3166–3169.
- BUNZEL, M., RALPH, J., MARITA, J. M., HATFIELD, R. D., STEINHART, H., **2001**, Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre, *J. Sci. Food Agric.*, 81, 653–660.
- BUNZEL, M., RALPH, J., STEINHART, H., **2005**, Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 551–559.
- CAFFALL, K. H., MOHNEN, D., **2009**, The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, 344, 1879–1900.
- CANCILLA, M. T., PENN, S. G., CARROLL, J. A., LEBRILLA, C. B., **1996**, Coordination of alkali metals to oligosaccharides dictates fragmentation behavior in matrix assisted laser desorption ionization Fourier transform mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6736–6745.
- CAPEK, P., TOMAN, R., KARDOSOVA, A., ROSIK, J., **1983**, Polysaccharides from the roots of the marsh mallow (*Althaea officinalis* L., var. Rhobusta): Structure of an arabinan, *Carbohydr. Res.*, 117, 133–140.
- CARDOSO, S. M., FERREIRA, J. A., MAFRA, I., SILVA, A. M. S., COIMBRA, M. A., **2007**, Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7124–7130.

- CARDOSO, S. M., SILVA, A. M. S., COIMBRA, M. A., **2002**, Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains, *Carbohydr. Res.*, 337, 917–924.
- CARPITA, N. C., GIBEAUT, D. M., **1993**, Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant J.*, 3, 1–30.
- CCRC, COMPLEX CARBOHYDRATE RESEARCH CENTER, **2016**, Spectral Database for PMAA's, <http://www.ccrcc.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html> zuletzt aufgerufen am 05.01.2016.
- CHAMP, M., LANGKILDE, A. M., BROUNS, F., KETTLITZ, B., COLLET, Y. L., **2003a**, Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects, *Nutr. Res. Rev.*, 16, 71–82.
- CHAMP, M., LANGKILDE, A. M., BROUNS, F., KETTLITZ, B., LE BAIL-COLLET, Y., **2003b**, Advances in dietary fibre characterisation. 2. Consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labelling, *Nutr. Res. Rev.*, 16, 143–161.
- CHURMS, S. C., MERRIFIELD, E. H., STEPHEN, A. M., WALWYN, D. R., POLSON, A., VANDERMERWE, K. J., SPIES, H. S. C., COSTA, N., **1983**, An L-arabinan from apple-juice concentrates, *Carbohydr. Res.*, 113, 339–344.
- CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G., BERTOLINI, M. L. C., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MARQUES, M. C. A., GORIN, P. A. J., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., **2009**, Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal, *Food Chem.*, 115, 687–690.
- CIUCANU, I., KEREK, F., **1984**, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydr. Res.*, 131, 209–217.
- COENEN, G. J., BAKX, E. J., VERHOEF, R. P., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **2007**, Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I, *Carbohydr. Polym.*, 70, 224–235.
- COLQUHOUN, I. J., DE RUITER, G. A., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **1990**, Hairy (ramified) regions of pectins. 3. Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase, *Carbohydr. Res.*, 206, 131–144.
- COLQUHOUN, I. J., RALET, M. C., THIBAUT, J. F., FAULDS, C. B., WILLIAMSON, G., **1994**, Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 263, 243–256.
- CORDEIRO, L. M. C., REINHARDT, V. D., BAGGIO, C. H., WERNER, M. F. D., BURCI, L. M., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., **2012**, Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity, *Food Chem.*, 130, 937–944.
- CUMMINGS, J. H., MACFARLANE, G. T., **2002**, Gastrointestinal effects of prebiotics, *Br. J. Nutr.*, 87, S145–S151.
- DAAS, P. J. H., ARISZ, P. W., SCHOLS, H. A., DE RUITER, G. A., VORAGEN, A. G. J., **1998**, Analysis of partially methyl-esterified galacturonic acid oligomers by high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 257, 195–202.

- DAHER, F. B., BRAYBROOK, S. A., **2015**, How to let go: Pectin and plant cell adhesion, *Front. Plant Sci.*, **6**, 523.
- DE RUITER, G. A., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., ROMBOUTS, F. M., **1992**, Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods, *Anal. Biochem.*, **207**, 176–185.
- DE VRIES, J. A., ROMBOUTS, F. M., VORAGEN, A. G. J., PILNIK, W., **1982**, Enzymic degradation of apple pectins, *Carbohydr. Polym.*, **2**, 25–33.
- DGE, DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, **2016**, Vollwertige Ernährung, <https://www.dge.de/ernaehrungspraxis/vollwertige-ernaehrung/> zuletzt aufgerufen am 05.01.2016.
- DOBBERSTEIN, D., BUNZEL, M., **2010**, Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 8927–8935.
- DOMON, B., COSTELLO, C. E., **1988**, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconj. J.*, **5**, 397–409.
- DOURADO, F., CARDOSO, S. M., SILVA, A. M. S., GAMA, F. M., COIMBRA, M. A., **2006**, NMR structural elucidation of the arabinan from *Prunus dulcis* immunobiological active pectic polysaccharides, *Carbohydr. Polym.*, **66**, 27–33.
- DUNKEL, M. P. H., AMADO, R., **1994**, Purification and physicochemical properties of an *endo*-1,5- α -L-arabinanase (EC 3.2.1.99) isolated from an *Aspergillus niger* pectinase preparation, *Carbohydr. Polym.*, **24**, 247–263.
- DUNKEL, M. P. H., AMADO, R., **1995**, Analysis of *endo*-(1 \rightarrow 5)- α -L-arabinanase degradation patterns of linear (1 \rightarrow 5)- α -L-arabino-oligosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Carbohydr. Res.*, **268**, 151–158.
- ERIKSSON, I., ANDERSSON, R., WESTERLUND, E., ANDERSSON, R., AMAN, P., **1996**, Structural features of an arabinan fragment isolated from the water-soluble fraction of dehulled rapeseed, *Carbohydr. Res.*, **281**, 161–172.
- FRANSEN, C. T. M., VAN LAERE, K. M. J., VAN WIJK, A. A. C., BRULL, L. P., DIGNUM, M., THOMAS-OATES, J. E., HAVERKAMP, J., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., KAMERLING, J. P., VLIEGENTHART, J. F. G., **1998**, α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 1)- β -D-Galp-containing oligosaccharides, novel products from lactose by the action of β -galactosidase, *Carbohydr. Res.*, **314**, 101–114.
- FUNAMI, T., NAKAUMA, M., ISHIHARA, S., TANAKA, R., INOUE, T., PHILLIPS, G. O., **2011**, Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality, *Food Hydrocolloids*, **25**, 221–229.
- FUNK, C., BRAUNE, A., GRABBER, J. H., STEINHART, H., BUNZEL, M., **2007**, Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2418–2423.
- GALLARDO, C., JIMENEZ, L., GARCIA-CONESA, M. T., **2006**, Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fractions, *Food Chem.*, **99**, 455–463.

- GASPAR, Y., JOHNSON, K. L., MCKENNA, J. A., BACIC, A., SCHULTZ, C. J., **2001**, The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function, *Plant Mol. Biol.*, 47, 161–176.
- GOMEZ, B., GULLON, B., REMOROZA, C., SCHOLS, H. A., PARAJÓ, J. C., ALONSO, J. L., **2014**, Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 9769–9782.
- GOTTLIEB, H. E., KOTLYAR, V., NUDELMAN, A., **1997**, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities, *J. Org. Chem.*, 62, 7512–7515.
- GOULAO, L. F., SANTOS, J., DE SOUSA, I., OLIVEIRA, C. A., **2007**, Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples, *Postharvest Biol. Technol.*, 43, 307–318.
- GRABBER, J. H., HATFIELD, R. D., RALPH, J., **1998**, Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls, *J. Sci. Food Agric.*, 77, 193–200.
- GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A., SMITH, P. J. C., THOM, D., **1973**, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *FEBS Lett.*, 32, 195–198.
- GULLON, F., THIBAUT, J. F., **1989**, Structural investigation of the neutral sugar side-chains of sugar-beet pectins 1. Methylation analysis and mild acid-hydrolysis of the hairy fragments of sugar-beet pectins, *Carbohydr. Res.*, 190, 85–96.
- GULLON, F., THIBAUT, J. F., **1990**, Oxidative cross-linking of chemically and enzymatically modified sugar-beet pectin, *Carbohydr. Polym.*, 12, 353–374.
- GULFI, M., ARRIGONI, E., AMADO, R., **2007**, *In vitro* fermentability of a pectin fraction rich in hairy regions, *Carbohydr. Polym.*, 67, 410–416.
- GUO, W. W., BETA, T., **2013**, Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals, *Food Res. Int.*, 51, 518–525.
- HABIBI, Y., MAHROUZ, M., MARAIS, M. F., VIGNON, M. R., **2004**, An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits, *Carbohydr. Res.*, 339, 1201–1205.
- HAKOMORI, S. I., **1964**, A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide, *J. Appl. Biochem.*, 55, 205–208.
- HARRIS, P. J., SMITH, B. G., **2006**, Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: Structures, properties and uses in food products, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41, 129–143.
- HARRIS, P. J., TRETHERWEY, J. A. K., **2010**, The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms, *Phytochem. Rev.*, 9, 19–33.
- HARTLEY, R. D., HARRIS, P. J., **1981**, Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons, *Biochem. Syst. Ecol.*, 9, 189–203.
- HICKS, K. B., SONDEY, S. M., **1987**, Preparative high-performance liquid chromatography of malto-oligosaccharides, *J. Chromatogr.*, 389, 183–194.

- HINZ, S. W. A., VERHOEF, R., SCHOLS, H. A., VINCKEN, J. P., VORAGEN, A. G. J., **2005**, Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp structural elements, *Carbohydr. Res.*, 340, 2135–2143.
- HOFMEISTER, G. E., ZHOU, Z., LEARY, J. A., **1991**, Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: Tandem mass spectrometry and semiempirical calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 5964–5970.
- HOLCK, J., HJERNO, K., LORENTZEN, A., VIGSNAES, L. K., HEMMINGSEN, L., LICHT, T. R., MIKKELSEN, J. D., MEYER, A. S., **2011a**, Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation, *Process Biochem.*, 46, 1039–1049.
- HOLCK, J., LORENTZEN, A., VIGSNAES, L. K., LICHT, T. R., MIKKELSEN, J. D., MEYER, A. S., **2011b**, Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal *in vitro* fermentations, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 6511–6519.
- HUISMAN, M. M. H., BRULL, L. P., THOMAS-OATES, J. E., HAVERKAMP, J., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **2001a**, The occurrence of internal (1 \rightarrow 5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances, *Carbohydr. Res.*, 330, 103–114.
- HUISMAN, M. M. H., FRANSEN, C. T. M., KAMERLING, J. P., VLIEGENTHART, J. F. G., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **2001b**, The CDTA-soluble pectic substances from soybean meal are composed of rhamnogalacturonan and xylogalacturonan but not homogalacturonan, *Biopolymers*, 58, 279–294.
- HUISMAN, M. M. H., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **1998**, Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation, *Carbohydr. Polym.*, 37, 87–95.
- HUISMAN, M. M. H., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **1999**, Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal, *Carbohydr. Polym.*, 38, 299–307.
- HUNG, P.V., MORITA, N., **2008**, Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities, *Food Chem.*, 109, 325–331.
- IMMERZEEL, P., EPPINK, M. M., DE VRIES, S. C., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **2006**, Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins, *Physiol. Plant.*, 128, 18–28.
- ISHII, T., **1991**, Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls, *Carbohydr. Res.*, 219, 15–22.
- ISHII, T., **1994**, Feruloyl oligosaccharides from cell-walls of suspension-cultured spinach cells and sugar-beet pulp, *Plant Cell Physiol.*, 35, 701–704.
- ISHII, T., **1997**, O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls, *Plant Physiol.*, 113, 1265–1272.
- ISHII, T., HIROI, T., **1990**, Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot, *Carbohydr. Res.*, 206, 297–310.

- ISHII, T., KONISHI, T., ITO, Y., ONO, H., OHNISHI-KAMEYAMA, M., MAEDA, I., **2005a**, A β -(1 \rightarrow 3)-arabinopyranosyltransferase that transfers a single arabinopyranose onto arabino-oligosaccharides in mung bean (*Vigna radiate*) hypocotyls, *Phytochemistry*, 66, 2418–2425.
- ISHII, T., MATSUNAGA, T., **2001**, Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan, *Phytochemistry*, 57, 969–974.
- ISHII, T., ONO, H., OHNISHI-KAMEYAMA, M., MAEDA, I., **2005b**, Enzymic transfer of α -L-arabinopyranosyl residues to exogenous 1,4-linked β -D-galacto-oligosaccharides using solubilized mung bean (*Vigna radiata*) hypocotyl microsomes and UDP- β -L-arabinopyranose, *Planta*, 221, 953–963.
- ISHII, T., TOBITA, T., **1993**, Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls, *Carbohydr. Res.*, 248, 179–190.
- JARAMILLO, S., RODRIGUEZ, R., JIMENEZ, A., GUILLEN, R., FERNANDEZ-BOLANOS, J., HEREDIA, A., **2007**, Effects of storage conditions on the accumulation of ferulic acid derivatives in white asparagus cell walls, *J. Sci. Food Agric.*, 87, 286–296.
- JILEK, M. L., BUNZEL, M., **2013**, Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal flours, *Cereal Chem.*, 90, 507–514.
- JOSELEAU, J. P., CHAMBAT, G., VIGNON, M., BARNOUD, F., **1977**, Chemical and ^{13}C NMR studies on two arabinans from inner bark of young stems of *Rosa glauca*, *Carbohydr. Res.*, 58, 165–175.
- KARPLUS, M., **1963**, Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2870–2871.
- KENDALL, C. W. C., ESFAHANI, A., JENKINS, D. J. A., **2010**, The link between dietary fibre and human health, *Food Hydrocolloids*, 24, 42–48.
- KÜHNEL, S., HINZ, S. W. A., POUVREAU, L., WERY, J., SCHOLS, H. A., GRUPPEN, H., **2010**, *Chrysosporium lucknowense* arabinohydrolases effectively degrade sugar beet arabinan, *Bioresour. Technol.*, 101, 8300–8307.
- KIM, J. B., CARPITA, N. C., **1992**, Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles, *Plant Physiol.*, 98, 646–653.
- KOMALAVILAS, P., MORT, A. J., **1989**, The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins, *Carbohydr. Res.*, 189, 261–272.
- KOSEKI, T., FUSHINOBU, S., ARDIANSYAH, SHIRAKAWA, H., KOMAI, M., **2009**, Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 803–810.
- KRAVTCHEKNO, T. P., ARNOULD, I., VORAGEN, A. G. J., PILNIK, W., **1992**, Improvement of the selective depolymerisation of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution, *Carbohydr. Polym.*, 19, 237–242.
- KROON, P. A., FAULDS, C. B., RYDEN, P., ROBERTSON, J. A., WILLIAMSON, G., **1997**, Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 661–667.

- LAMOTHE, L. M., SRICHUWONG, S., REUHS, B. L., HAMAKER, B. R., **2015**, Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans, *Food Chem.*, 167, 490–496.
- LARM, O., THEANDER, O., AMAN, P., **1975**, Structural studies on a water-soluble arabinan isolated from rapeseed (*Brassica napus*), *Acta Chem. Scand., Ser. B*, 29, 1011–1014.
- LAU, J. M., MCNEIL, M., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P., **1985**, Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants, *Carbohydr. Res.*, 137, 111–125.
- LAU, J. M., MCNEIL, M., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P., **1987**, Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine, *Carbohydr. Res.*, 168, 245–274.
- LE GOFF, A., RENARD, C. M. G. C., BONNIN, E., THIBAUT, J. F., **2001**, Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls, *Carbohydr. Polym.*, 45, 325–334.
- LEIJDEKKERS, A. G. M., AGUIRRE, M., VENEMA, K., BOSCH, G., GRUPPEN, H., SCHOLS, H. A., **2014**, *In vitro* fermentability of sugar beet pulp derived oligosaccharides using human and pig fecal inocula, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 1079–1087.
- LEIJDEKKERS, A. G. M., SANDERS, M. G., SCHOLS, H. A., GRUPPEN, H., **2011**, Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A*, 1218, 9227–9235.
- LEONTEIN, K., LINDBERG, B., LONNGREN, J., **1978**, Assignment of absolute configuration of sugars by GLC of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols, *Carbohydr. Res.*, 62, 359–362.
- LEROUGE, P., O'NEILL, M. A., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P., **1993**, Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan-I, *Carbohydr. Res.*, 243, 359–371.
- LEROUX, J., LANGENDORFF, V., SCHICK, G., VAISHNAV, V., MAZOYER, J., **2003**, Emulsion stabilizing properties of pectin, *Food Hydrocolloids*, 17, 455–462.
- LEVIGNE, S., RALET, M. C., QUEMENER, B., POLLET, B. N. L., LAPIERRE, C., THIBAUT, J. F., **2004a**, Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers, *Plant Physiol.*, 134, 1173–1180.
- LEVIGNE, S., RALET, M. C., QUEMENER, B., THIBAUT, J. F., **2004b**, Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls, *Carbohydr. Res.*, 339, 2315–2319.
- LICHTENTHALER, F. W., OBERTHUR, M., PETERS, S., **2001**, Directed and efficient syntheses of $\beta(1\rightarrow4)$ -linked galacto-oligosaccharides, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, 3849–3869.
- LOZOVAYA, V. V., GORSHKOVA, T. A., RUMYANTSEVA, N. I., ULANOV, A. V., VALIEVA, A. I., YABLOKOVA, E. V., MEI, C. S., WIDHOLM, J. M., **2000**, Cell wall-bound phenolics in cells of maize (*Zea mays*, Gramineae) and buckwheat (*Fagopyrum tataricum*, Polygonaceae) with different plant regeneration abilities, *Plant Sci.*, 152, 79–85.
- LUONTERI, E., KROON, P. A., TENKANEN, M., TELEMANN, A., WILLIAMSON, G., **1999**, Activity of an *Aspergillus terreus* α -arabinofuranosidase on phenolic-substituted oligosaccharides, *J. Biotechnol.*, 67, 41–48.

- LUONTERI, E., LAINE, C., UUSITALO, S., TELEMAN, A., SIIKA-AHO, M., TENKANEN, M., **2003**, Purification and characterization of *Aspergillus* β -D-galactanases acting on β -1,4- and β -1,3/6-linked arabinogalactans, *Carbohydr. Polym.*, 53, 155–168.
- MANSFIELD, S. D., KIM, H., LU, F. C., RALPH, J., **2012**, Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR, *Nat. Protoc.*, 7, 1579–1589.
- MCCLEARY, B. V., COOPER, J. M. F. V., WILLIAMS, E. L. S. W., **1991**, Debranched araban and its use as a fat substitute, *European Patent 0446291*.
- MCCLEARY, B. V., DEVRIES, J. W., RADER, J. I., COHEN, G., PROSKY, L., MUGFORD, D. C., CHAMP, M., OKUMA, K., **2010**, Determination of total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study, *J. AOAC Int.*, 93, 221–233.
- MCCLEARY, B. V., SLOANE, N., DRAGA, A., **2015**, Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates *in vivo* digestion, *Starch/Stärke*, 67, 860–883.
- MCDougALL, G. J., MORRISON, I. M., STEWART, D., HILLMAN, J. R., **1996**, Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function, *J. Sci. Food Agric.*, 70, 133–150.
- MICARD, V., GRABBER, J. H., RALPH, J., RENARD, C. M. G. C., THIBAUT, J. F., **1997**, Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp, *Phytochemistry*, 44, 1365–1368.
- MICARD, V., RENARD, C. M. G. C., THIBAUT, J. F., **1996**, Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp, *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 162–170.
- MICARD, V., THIBAUT, J. F., **1999**, Oxidative gelation of sugar-beet pectins: Use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins, *Carbohydr. Polym.*, 39, 265–273.
- MOREIRA, L. R. S., FILHO, E. X. F., **2008**, An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79, 165–178.
- MUELLER-HARVEY, I., HARTLEY, R. D., HARRIS, P. J., CURZON, E. H., **1986**, Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw, *Carbohydr. Res.*, 148, 71–85.
- NAKAMURA, A., FURUTA, H., MAEDA, H., TAKAO, T., NAGAMATSU, Y., **2002a**, Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1155–1158.
- NAKAMURA, A., FURUTA, H., MAEDA, H., TAKAO, T., NAGAMATSU, Y., **2002b**, Structural studies by step-wise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1301–1313.
- NARAN, R., CHEN, G. B., CARPITA, N. C., **2008**, Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage, *Plant Physiol.*, 148, 132–141.
- NAVARRO, D. A., CEREZO, A. S., STORTZ, C. A., **2002**, NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*, *Carbohydr. Res.*, 337, 255–263.

- NUNES, F. M., REIS, A., SILVA, A. M. S., DOMINGUES, M. R. M., COIMBRA, M. A., **2008**, Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans, *Phytochemistry*, 69, 1573–1585.
- OLANO-MARTIN, E., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A., **2002**, Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides, *J. Appl. Microbiol.*, 93, 505–511.
- O'NEILL, M. A., ISHII, T., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. G., **2004**, Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 109–139.
- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., SCHOLS, H. A., **1996**, Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp, *Carbohydr. Res.*, 288, 143–153.
- OOSTERVELD, A., BELDMAN, G., VORAGEN, A. G. J., **2000**, Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp, *Carbohydr. Res.*, 328, 199–207.
- OOSTERVELD, A., POL, I. E., BELDMAN, G., VORAGEN, A. G. J., **2001**, Isolation of feruloylated arabinans and rhamnogalacturonans from sugar beet pulp and their gel forming ability by oxidative cross-linking, *Carbohydr. Polym.*, 44, 9–17.
- OOSTERVELD, A., VORAGEN, A. G. J., SCHOLS, H. A., **2002**, Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein, *Carbohydr. Polym.*, 49, 407–413.
- O'SULLIVAN, A. C., **1997**, Cellulose: The structure slowly unravels, *Cellulose*, 4, 173–207.
- OU, S. Y., KWOK, K. C., **2004**, Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1261–1269.
- PACKERT, M., STEINHART, H., **1995**, Separation and identification of some monomeric and dimeric phenolic acids by a simple gas chromatographic method using a capillary column and FID-MSD, *J. Chromatogr. Sci.*, 33, 631–639.
- PARKER, C. C., PARKER, M. L., SMITH, A. C., WALDRON, K. W., **2003**, Thermal stability of texture in chinese water chestnut may be dependent on 8,8'-diferulic acid (aryltetralyn form), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2034–2039.
- PARKER, M. L., NG, A., WALDRON, K. W., **2005**, The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains, *J. Sci. Food Agric.*, 85, 2539–2547.
- PARKER, M. L., WALDRON, K. W., **1995**, Texture of chinese water chestnut: Involvement of cell wall phenolics, *J. Sci. Food Agric.*, 68, 337–346.
- PELLERIN, P., VIDAL, S., WILLIAMS, P., BRILLOUET, J. M., **1995**, Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content, *Carbohydr. Res.*, 277, 135–143.
- PENA, M. J., CARPITA, N. C., **2004**, Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple, *Plant Physiol.*, 135, 1305–1313.

- PETTOLINO, F. A., WALSH, C., FINCHER, G. B., BACIC, A., **2012**, Determining the polysaccharide composition of plant cell walls, *Nat. Protoc.*, 7, 1590–1607.
- PITSON, S. M., VORAGEN, A. G. J., VINCKEN, J. P., BELDMAN, G., **1997**, Action patterns and mapping of the substrate-binding regions of *endo*-(1→5)- α -L-arabinanases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*, *Carbohydr. Res.*, 303, 207–218.
- PROSKY, L., ASP, N. G., SCHWEIZER, T. F., DEVRIES, J. W., FURDA, I., **1988**, Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study, *J. AOAC Int.*, 71, 1017–1023.
- PUSTJENS, A. M., SCHOLS, H. A., KABEL, M. A., GRUPPEN, H., **2013**, Characterisation of cell wall polysaccharides from rapeseed (*Brassica napus*) meal, *Carbohydr. Polym.*, 98, 1650–1656.
- QUEMENER, B., RALET, M. C., **2004**, Evidence for linkage position determination in known feruloylated mono- and disaccharides using electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 39, 1153–1160.
- RADHA, A., CHANDRASEKARAN, R., **1997**, X-ray and conformational analysis of arabinan, *Carbohydr. Res.*, 298, 105–115.
- RALET, M. C., ANDRE-LEROUX, G., QUEMENER, B., THIBAUT, J. F., **2005**, Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall, *Phytochemistry*, 66, 2800–2814.
- RALET, M. C., FAULDS, C. B., WILLIAMSON, G., THIBAUT, J. F., **1994a**, Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*, *Carbohydr. Res.*, 263, 257–269.
- RALET, M. C., THIBAUT, J. F., FAULDS, C. B., WILLIAMSON, G., **1994b**, Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell-walls of sugar-beet pulp, *Carbohydr. Res.*, 263, 227–241.
- REDGWELL, R. J., CURTI, D., FISCHER, M., NICOLAS, P., FAY, L. B., **2002**, Coffee bean arabinogalactans: Acidic polymers covalently linked to protein, *Carbohydr. Res.*, 337, 239–253.
- REDGWELL, R. J., FISCHER, M., KENDAL, E., MACRAE, E. A., **1997**, Galactose loss and fruit ripening: High-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls, *Planta*, 203, 174–181.
- REDGWELL, R. J., MELTON, L. D., BRASCH, D. J., **1990**, Cell-wall changes in kiwifruit following post harvest ethylene treatment, *Phytochemistry*, 29, 399–407.
- REDGWELL, R. J., SELVENDRAN, R. R., **1986**, Structural features of cell-wall polysaccharides of onion *Allium cepa*, *Carbohydr. Res.*, 157, 183–199.
- REES, D. A., RICHARDSON, N. G., **1966**, Polysaccharides in germination. Occurrence, fine structure and possible biological role of pectic araban in white mustard cotyledons, *Biochemistry*, 5, 3099–3107.
- REMOROZA, C., CORD-LANDWEHR, S., LEIJDEKKERS, A. G. M., MOERSCHBACHER, B. M., SCHOLS, H. A., GRUPPEN, H., **2012**, Combined HILIC-ELSD/ESI-MSⁿ enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers, *Carbohydr. Polym.*, 90, 41–48.

- RENARD, C. M. G. C., **2005**, Variability in cell wall preparations: Quantification and comparison of common methods, *Carbohydr. Polym.*, 60, 515–522.
- RENARD, C. M. G. C., CREPEAU, M. J., THIBAUT, J. F., **1995**, Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus, *Carbohydr. Res.*, 275, 155–165.
- RENARD, C. M. G. C., CREPEAU, M. J., THIBAUT, J. F., **1999a**, Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins, *Eur. J. Biochem.*, 266, 566–574.
- RENARD, C. M. G. C., THIBAUT, J. F., **1993**, Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents, *Carbohydr. Res.*, 244, 99–114.
- RENARD, C. M. G. C., WENDE, G., BOOTH, E. J., **1999b**, Cell wall phenolics and polysaccharides in different tissues of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), *J. Sci. Food Agric.*, 79, 2029–2034.
- RENGER, A., STEINHART, H., **2000**, Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre, *Eur. Food Res. Technol.*, 211, 422–428.
- RIHOUEY, C., MORVAN, C., BORISSOVA, I., JAUNEAU, A., DEMARTY, M., JARVIS, M., **1995**, Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls, *Carbohydr. Polym.*, 28, 159–166.
- ROBERFROID, M. B., DELZENNE, N. M., **1998**, Dietary fructans, *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 117–143.
- RODRIGUEZ-ARCOS, R. C., SMITH, A. C., WALDRON, K. W., **2004**, Ferulic acid crosslinks in asparagus cell walls in relation to texture, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4740–4750.
- ROMBOUTS, F. M., THIBAUT, J. F., **1986**, Enzymatic and chemical degradation and the fine-structure of pectins from sugar-beet pulp, *Carbohydr. Res.*, 154, 189–203.
- ROMBOUTS, F. M., VORAGEN, A. G. J., SEARLE-VAN LEEUWEN, M. F., GERAEDS, C. C. J. M., SCHOLS, H. A., PILNIK, W., **1988**, The arabinanases of *Aspergillus niger* - Purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidases and an *endo*-1,5- α -L-arabinanase, *Carbohydr. Polym.*, 9, 25–47.
- RUNDLÖF, T., McEWEN, I., JOHANSSON, M., ARVIDSSON, T., **2014**, Use and qualification of primary and secondary standards employed in quantitative ^1H NMR spectroscopy of pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 93, 111–117.
- SAEMAN, J. F., BUBL, J. L., HARRIS, E. E., **1945**, Quantitative saccharification of wood and cellulose, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 17, 35–37.
- SAULNIER, L., CREPEAU, M. J., LAHAYE, M., THIBAUT, J. F., GARCIA-CONESA, M. T., KROON, P. A., WILLIAMSON, G., **1999**, Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates, *Carbohydr. Res.*, 320, 82–92.
- SAULNIER, L., VIGOUROUX, J., THIBAUT, J. F., **1995**, Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran, *Carbohydr. Res.*, 272, 241–253.
- SCHELLER, H. V., ULVSKOV, P., **2010**, Hemicelluloses, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61, 263–289.

- SCHENDEL, R. R., BECKER, A., TYL, C. E., BUNZEL, M., **2015a**, Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from the perennial cereal grain intermediate wheat grass (*Thinopyrum intermedium*), *Carbohydr. Res.*, 407, 16–25.
- SCHENDEL, R. R., KARRER, C., BUNZEL, D., HUCH, M., HILDEBRAND, A. A., KULLING, S. E., BUNZEL, M., **2015b**, Structural transformation of 8-5-coupled dehydrodiferulates by human intestinal microbiota, *J. Agric. Food Chem.*, 63, 7975–7985.
- SCHOLS, H. A., BAKX, E. J., SCHIPPER, D., VORAGEN, A. G. J., **1995a**, Hairy (ramified) regions of pectins. 7. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin, *Carbohydr. Res.*, 279, 265–279.
- SCHOLS, H. A., POSTHUMUS, M. A., VORAGEN, A. G. J., **1990**, Hairy (ramified) regions of pectins. 1. Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process, *Carbohydr. Res.*, 206, 117–129.
- SCHOLS, H. A., VIERHUIS, E., BAKX, E. J., VORAGEN, A. G. J., **1995b**, Hairy (ramified) regions of pectins. 6. Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell-walls, *Carbohydr. Res.*, 275, 343–360.
- SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **1994**, Hairy (ramified) regions of pectins. 4. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase, *Carbohydr. Res.*, 256, 83–95.
- SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., COLQUHOUN, I. J., **1994**, Hairy (ramified) regions of pectins. 5. Isolation and characterization of rhamnogalacturonan oligomers, liberated during degradation of pectic hairy regions by rhamnogalacturonase, *Carbohydr. Res.*, 256, 97–111.
- SENGKHAMPARN, N., BAKX, E. J., VERHOEF, R., SCHOLS, H. A., SAJJAANANTAKUL, T., VORAGEN, A. G. J., **2009**, Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and α -linked galactosyl groups, *Carbohydr. Res.*, 344, 1842–1851.
- SIDDIQUI, I. R., WOOD, P. J., **1974**, Structural investigation of oxalate soluble rapeseed (*Brassica campestris*) polysaccharides. 3. An arabinan, *Carbohydr. Res.*, 36, 35–44.
- SUN, Y. L., CUI, S. W., TANG, J., GU, X. H., **2010**, Structural features of pectic polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) diels, *Carbohydr. Polym.*, 80, 544–550.
- SWAMY, N. R., SALIMATH, P. V., **1991**, Arabinans from *Cajanus cajan* cotyledon, *Phytochemistry*, 30, 263–265.
- SWEET, D. P., SHAPIRO, R. H., ALBERSHEIM, P., **1975**, Quantitative-analysis by various GLC response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates, *Carbohydr. Res.*, 40, 217–225.
- THAKUR, B. R., SINGH, R. K., HANDA, A. K., **1997**, Chemistry and uses of pectin - A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37, 47–73.
- THIBAUT, J. F., **1983**, Enzymatic degradation and β -elimination of the pectic substances in cherry fruits, *Phytochemistry*, 22, 1567–1571.

- THOMASSEN, L. V., VIGSNAES, L. K., LICHT, T. R., MIKKELSEN, J. D., MEYER, A. S., **2011**, Maximal release of highly bifidogenic soluble dietary fibers from industrial potato pulp by minimal enzymatic treatment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 873–884.
- TROWELL, H., SOUTHGATE, D. A. T., WOLEVER, T. M. S., LEEDS, A. R., GASSULL, M. A., JENKINS, D. J. A., **1976**, Dietary fiber redefined, *Lancet*, 1, 967.
- VAN DE VIS, J. W., SEARLE-VAN LEEUWEN, M. J. F., SILIHA, H. A., KORMELINK, F. J. M., VORAGEN, A. G. J., **1991**, Purification and characterization of *endo*-1,4- β -D-galactanases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*: Use in combination with arabinanases from *Aspergillus niger* in enzymatic conversion of potato arabinogalactan, *Carbohydr. Polym.*, 16, 167–187.
- VAN LAERE, K. M. J., HARTEMINK, R., BOSVELD, M., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **2000**, Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1644–1652.
- VIGSNAES, L. K., HOLCK, J., MEYER, A. S., LICHT, T. R., **2011**, *In vitro* fermentation of sugar beet arabino-oligosaccharides by fecal microbiota obtained from patients with ulcerative colitis to selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 8336–8344.
- VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A., OOMEN, R. J. F. J., McCANN, M. C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G. J., VISSER, R. G. F., **2003**, If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant Physiol.*, 132, 1781–1789.
- VORAGEN, A. G. J., COENEN, G. J., VERHOEF, R. P., SCHOLS, H. A., **2009**, Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls, *Struct. Chem.*, 20, 263–275.
- VORAGEN, A. G. J., SCHOLS, H. A., PILNIK, W., **1986**, Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c, *Food Hydrocolloids*, 1, 65–70.
- WEI, J. M., MA, F. W., SHI, S. G., QI, X. D., ZHU, X. Q., YUAN, J. W., **2010**, Changes and postharvest regulation of activity and gene expression of enzymes related to cell wall degradation in ripening apple fruit, *Postharvest Biol. Technol.*, 56, 147–154.
- WESTPHAL, Y., KÜHNEL, S., DE WAARD, P., HINZ, S. W. A., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., GRUPPEN, H., **2010a**, Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan, *Carbohydr. Res.*, 345, 1180–1189.
- WESTPHAL, Y., KÜHNEL, S., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., GRUPPEN, H., **2010b**, LC/CE-MS tools for the analysis of complex arabino-oligosaccharides, *Carbohydr. Res.*, 345, 2239–2251.
- WESTPHAL, Y., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., GRUPPEN, H., **2010c**, Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis, *J. Chromatogr. A*, 1217, 689–695.
- WILLFÖR, S., PRANOVICH, A., TAMMINEN, T., PULS, J., LAINE, C., SUURNAKKI, A., SAAKE, B., UOTILA, K., SIMOLIN, H., HEMMING, J., HOLMBOM, B., **2009**, Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides - A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques, *Ind. Crop. Prod.*, 29, 571–580.
- WOOD, P. J., SIDDIQUI, I. R., **1972**, Isolation and structural studies of a water-soluble galactan from potato (*Solanum tuberosum*) tubers, *Carbohydr. Res.*, 22, 212–220.

- YAMAGUCHI, F., INOUE, S., HATANAKA, C., **1995**, Purification and properties of *endo*- β -1,4-galactanase from *Aspergillus niger*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1742–1744.
- YAPO, B. M., **2011**, Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model, *Carbohydr. Polym.*, 86, 373–385.
- ZAIDEL, D. N. A., ARNOUS, A., HOLCK, J., MEYER, A. S., **2011**, Kinetics of enzyme-catalyzed cross-linking of feruloylated arabinan from sugar beet, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 11598–11607.
- ZAIDEL, D. N. A., CHRONAKIS, I. S., MEYER, A. S., **2013**, Stabilization of oil-in-water emulsions by enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin, *Food Hydrocolloids*, 30, 19–25.
- ZANDLEVEN, J., BELDMAN, G., BOSVELD, M., SCHOLS, H. A., VORAGEN, A. G. J., **2006**, Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase, *Carbohydr. Polym.*, 65, 495–503.
- ZHAO, Z. H., MOGHADASIAN, M. H., **2010**, Bioavailability of hydroxycinnamates: A brief review of *in vivo* and *in vitro* studies, *Phytochem. Rev.*, 9, 133–145.

7 Chemikalien und Instrumente

7.1 Chemikalien

Für alle in Kapitel 8 beschriebenen Experimente wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Als HPLC- bzw. HPLC-MS-Fließmittel wurden organische Lösungsmittel mit entsprechender Reinheit ("HPLC Grade" bzw. "LC-MS Grade") verwendet. Soweit nicht anders angegeben waren alle hier aufgeführten Chemikalien von höchstmöglicher Reinheit bzw. mindestens zur Analyse.

Chemikalie	Hersteller	GHS-Symbol(e)	H-Sätze	P-Sätze
(<i>R</i>)-2-Octanol	Alfa Aesar	GHS07	319	261, 305+351+338
1-Methylimidazol (> 99 %, zur Synthese)	Carl Roth	GHS05, GHS06	302, 311, 314	280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Acetanilid	Sigma Aldrich	GHS07	302	301+312+330
Aceton	VWR	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233+403, 305+351+338
Aceton- <i>d</i> 6 (99,9 Atom% D)	Sigma Aldrich	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233+403, 305+351+338
Acetonitril	VWR	GHS02, GHS07	225, 302+312+332, 319	280, 305+351+338, 310
Ameisensäure	Carl Roth	GHS02, GHS05, GHS06	226, 290, 302, 314, 331	260, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Ammoniak-Lösung (25 %)	Merck	GHS05, GHS07, GHS09	290, 314, 335, 400	273, 280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 310
Ammoniumchlorid	Carl Roth	GHS07	302, 319	305+351+338
L-Arabinose	Sigma Aldrich	-	-	-
<i>N,O</i> -Bis-trimethylsilyl- trifluoracetamid	Sigma Aldrich	GHS02, GHS05	225, 314	210, 280, 305+351+338, 310
Calciumhydroxid (95 %, Ph. Eur.)	Carl Roth	GHS05, GHS07	315, 318, 335	260, 280, 302+352, 305+351+338, 310

7 Chemikalien und Instrumente

Chemikalie	Hersteller	GHS-Symbol(e)	H-Sätze	P-Sätze
<i>trans-ortho</i> -Cumarsäure	Sigma Aldrich	GHS06	301, 315, 319, 335	261, 301+310, 305+351+338
<i>trans-para</i> -Cumarsäure	Sigma Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Deuteriumoxid (99,9 Atom% D)	Sigma Aldrich	-	-	-
Dichlormethan	VWR	GHS08	351	201, 281, 308+313
Diethylether	VWR	GHS02, GHS07	224, 302, 336	210, 243, 280, 304+340+, 310
Dimethylsulfoxid	Carl Roth	-	-	-
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> 6 (99,9 Atom% D)	Sigma Aldrich	-	-	-
Eisessig	Carl Roth	GHS02, GHS05	226, 290, 314	210, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid (> 99 %, zur Synthese)	Carl Roth	GHS02, GHS05, GHS07	226, 302+332, 314	210, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
Ethanol (99 %)	VWR	GHS02	225	210, 243, 280
<i>trans</i> -Ferulasäure	Sigma Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
L-Fucose	Alfa Aesar	-	-	-
D-Galactose	Sigma Aldrich	-	-	-
D-Galacturonsäure- Monohydrat	Sigma Aldrich	-	-	-
D-Glucose	Sigma Aldrich	-	-	-
D-Glucuronsäure	Sigma Aldrich	-	-	-
<i>trans</i> -Kaffeesäure	Sigma Aldrich	GHS07, GHS08	315, 319, 335, 351, 361	261, 281, 305+351+338
Lithiumchlorid	Riedel-de Haen	GHS07	302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
Malto-Oligosaccharide (Polymerisationsgrad 3-7)	Sigma Aldrich	-	-	-
D-Mannit	Sigma Aldrich	-	-	-
D-Mannose	Sigma Aldrich	-	-	-
Methanol	VWR	GHS02, GHS06, GHS08	225, 301+311+331, 370	210, 243, 280, 302+352, 304+340, 310
Methanolische HCl (1,25 M)	Sigma Aldrich	GHS02, GHS05, GHS06, GHS08	225, 301+311+331, 314, 370	210, 260, 280, 301+310+330, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 308+311, 403+233
Methyliodid	VWR	GHS06, GHS08	351, 301+331, 312, 335, 315	201, 281, 302+352, 304+340, 310

Chemikalie	Hersteller	GHS-Symbol(e)	H-Sätze	P-Sätze
Natriumhydroxid-Lösung (50 %)	Sigma Aldrich	GHS05	290, 314	280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Natriumhydroxid-Plätzchen	Carl Roth	GHS05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Natriumacetat	Sigma Aldrich	-	-	-
Natriumbordeuterid (98 Atom% D)	Sigma Aldrich	GHS02, GHS05, GHS06	260, 301, 311, 314	223, 231+232, 280, 301+310, 370+378, 422
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth	-	-	-
Natriumhypochlorit-Lösung (12 % Cl)	Carl Roth	GHS05, GHS09	290, 314, 400	280, 303+361+353, 305+351+338, 301+330+331
Natriumnitroprussid-Dihydrat	Carl Roth	GHS06	301	260, 301+310, 405
Natriumsalicylat	Sigma Aldrich	GHS07	302, 319	305+351+338
Natriumthiosulfat	Carl Roth	-	-	-
Pyridin	VWR	GHS02, GHS07	225, 302+312, 332	210, 243, 280, 302+352, 304+340, 310
Raffinose	Sigma Aldrich	-	-	-
L-Rhamnose-Monohydrat	Sigma Aldrich	-	-	-
Schwefelsäure (96 %)	Carl Roth	GHS05	290, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
Salzsäure (37 %)	VWR	GHS05, GHS07	314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Selenreaktionsgemisch (Kjeldahl Katalysator)	Sigma Aldrich	GHS07, GHS09	302, 410	273, 501
<i>trans</i> -Sinapinsäure	Sigma Aldrich	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich	GHS05, GHS07	314, 332, 412	273, 280, 305+351+338, 310
Trinatriumphosphat	Riedel-de Haen	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+388
D-Xylose	Sigma Aldrich	-	-	-

Enzyme

Enzym	Herkunftsorganismus	EC-Nr.	Aktivität	Firma
Alcalase 1.5 MG	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.4.21.62	1,5 AU/g	Novozymes
Alcalase 2.4 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.4.21.62	2,4 AU/g	Novozymes
AMG 300 L	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	300 AGU/g	Novozymes
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.3	200 U/mL	Megazyme
Driselase	<i>Basidomycetes</i> sp.	-	-	Sigma Aldrich
endo-Arabinanase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.99	9 U/mg	Megazyme
endo-Galactanase	<i>Aspergillus niger</i>	3.2.1.89	408 U/mg	Megazyme
MATS L Classic	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	8150 TAU/g	DSM
Maxazyme NNP DS	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3.4.24.28	184000 PCU/g	DSM
Termamyl 120 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	120 KNU/g	Novozymes
Thermostabile α -Amylase	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.2.1.1	20 - 60 kU/mL	Sigma Aldrich
Viscozyme L	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	Novozymes

7.2 Instrumente

GC-MS-System

(Methylierungsanalyse)

Gaschromatograph	Shimadzu GC-2010 Plus
Autosampler	Shimadzu AOC-20i
Massenspektrometer	Shimadzu GCMS-QP2010 SE

GC-MS-System

(Monosaccharidkonfiguration)

Gaschromatograph	Shimadzu GC-2010 Plus
Autosampler	Shimadzu AOC-20i
Massenspektrometer	Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

GC-FID-System

Gaschromatograph	Shimadzu GC-2010 Plus
Autosampler	Shimadzu AOC-20i
Detektor	Shimadzu FID-2010 Plus

GPC-RI-System

Pumpe	Knauer HPLC Pump K-500
Detektor	Knauer Smartline RI Detektor 2300
Fraktionssammler	Advantec SF2120

GPC-UV-System

Pumpe	Jasco 880-PU
Detektor	Biotronik BT8200
Fraktionssammler	Gilson FC204

HPAEC-PAD-System

Pumpe	Thermo Scientific Dionex ICS-5000 DP
Autosampler	Thermo Scientific Dionex ICS-5000 AS-AP
Detektor	Thermo Scientific Dionex ICS-5000 DC mit Thermo Scientific Dionex ICS-5000 ED

HPLC-DAD-System

Pumpen (3x)	Shimadzu Prominence LC-20AT
Autosampler	Shimadzu Prominence SIL-20AC
Detektor	Shimadzu Prominence SPD-M20A

HPLC-DAD-System

(Fraktionierung)

Pumpe HP 1100 Series G1312A Binary Pump
Detektor HP 1100 Series G1315A DAD

HPLC-ELSD-System

Pumpen (2x) Knauer AZURA P2.1L
Autosampler Knauer Optimas
Flussteiler Analytical Scientific Instruments 600-PO20-CS
Detektor ELSD Sedex 85
Fraktionierventil Knauer AZURA V2.1S

HPLC-MS-System

Pumpe Thermo Scientific Finnigan Surveyor MS Pump Plus
Autosampler Thermo Scientific Finnigan Surveyor Autosampler Plus
Detektor Thermo Scientific Finnigan Surveyor PDA Plus Detector
Massenspektrometer LXQ Linear Ion Trap MS mit ESI-Ionenquelle

HPLC-RI-System

Pumpe Merck/Hitachi L-7100
Detektor Merck/Hitachi L-7490 RI Detector

HPLC-UV-System

(semipräparativ)

Pumpen (2x) Knauer AZURA P2.1L
Detektor Knauer AZURA UVD2.1L

HPLC-UV-System (präparativ)

Pumpen (2x) Shimadzu LC-8A
Detektor Shimadzu SPD-20A

Kugelmühle

Retsch PM 100 mit 50 mL ZrO₂-Mahlbecher und zehn ZrO₂-Kugeln

NMR-Spektrometer	Bruker Ascend 500 (Prodigy Kryoprobenkopf)
NMR-Spektrometer (FFAAA, DFS-OS)	Bruker Ultrashield 700 (TXI Kryoprobenkopf)
NMR-Spektrometer (CAA)	Bruker Ascend 850 (TXI Kryoprobenkopf)
Photometer	Jasco V-550 UV/Vis Spectrophotometer
Schneidmühle	IKA MF10 mit MF10.1 Schneidmahlkopf und 0,5 mm Sieb

8 Arbeitsvorschriften

8.1 Ausgangsmaterialien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Proben von lokalen Händlern bezogen und entweder sofort wie unten beschrieben verarbeitet oder im Gefrierschrank gelagert. Alle Proben wurden mit einer Schneidmühle auf eine Größe < 0,5 mm vermahlen. Die PS-Präparate (AN-PS: "Arabinan from sugar beet"; GN-PS: "Pectic galactan from potato"; Polygalacturonsäure: "Polygalacturonic Acid") wurden von der Firma Megazyme bezogen.

Apfel <i>Aufarbeitung</i> <i>Lagerung (2015)</i>	<i>Malus domestica</i> cv. Braeburn, 2013, Deutschland Schälen, schneiden, gefriertrocknen, mahlen Drei Wochen bei 25°C unter Lichtausschluss
Amaranth <i>Aufarbeitung</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> , 2012, Deutschland Mahlen, entfetten mit Aceton
Quinoa <i>Aufarbeitung</i>	<i>Chenopodium quinoa</i> , 2012, Bolivien Mahlen, entfetten mit Aceton
Buchweizen <i>Aufarbeitung</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i> , 2012, China Mahlen, entfetten mit Aceton
Zuckerrübenschnitzel <i>Aufarbeitung</i>	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i> , 2013, Deutschland Zur Verfügung gestellt von Südzucker Mahlen
Sojaextraktionsschrot <i>Aufarbeitung</i>	<i>Glycine max</i> , 2013 Zur Verfügung gestellt von ADM Rothensee Mahlen
Rotkleesprossen <i>Aufarbeitung</i>	<i>Trifolium pratense</i> cv. Rozeta, 2013, Polen Selbstanbau Mahlen

8.1.1 Ballaststoffisolierung

Unlösliche Ballaststoffe

- 20 g gemahlene Probe in 200 mL 0,08 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,2) suspendieren
- 1,5 mL Termamyl 120 L zugeben
- 20 min bei 92°C inkubieren, Kolben alle 5 min schwenken
- Im Eisbad abkühlen, mit 0,275 M Natriumhydroxid-Lösung pH 7,5 einstellen
- 1,12 g Alcalase 1.5 MG oder 700 µL Alcalase 2.4L zugeben
- 30 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubieren
- Im Eisbad abkühlen, mit 0,325 M Salzsäure pH 4,5 einstellen
- 700 µL AMG 300 L zugeben
- 30 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubieren
- Rückstand durch Absaugen oder Zentrifugation abtrennen, Überstand zur Gewinnung der LBS aufbewahren
- Rückstand zweimal mit 100 mL und einmal mit 50 mL 60°C warmem Wasser waschen, Waschlösung mit wässrigem Überstand vereinigen
- Rückstand je einmal mit 100 mL und 50 mL Ethanol waschen, Waschlösungen verwerfen
- Rückstand je einmal mit 100 mL und 50 mL Aceton waschen, Waschlösungen verwerfen
- Rückstand bei 60°C im Trockenschrank oder 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen

Lösliche Ballaststoffe

- Vereinigte Überstände mit der vierfachen Menge an Ethanol versetzen und LBS über Nacht ausfallen lassen
- Präzipitat durch Absaugen oder Zentrifugation abtrennen, Überstand verwerfen
- Präzipitat je einmal mit 100 mL und 50 mL Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) waschen, Waschlösungen verwerfen
- Präzipitat je einmal mit 100 mL und 50 mL Ethanol waschen, Waschlösungen verwerfen
- Präzipitat je einmal mit 100 mL und 50 mL Aceton waschen, Waschlösungen verwerfen
- Präzipitat bei 60°C im Trockenschrank oder 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen

Proteinkorrektur

- 50 - 100 mg UBS/LBS in Kjeldahl-Kolben einwiegen, Glasperlen hinzufügen
- 500 mg Selenreaktionsgemisch und 5 mL konzentrierte Schwefelsäure zugeben
- 1 - 2 h bis zum Auflösen des Probenrückstands im Heizblock erhitzen
- Nach Abkühlen 10 mL Wasser zugeben
- In 50 mL Messkolben überführen, mit Wasser zur Marke auffüllen
- 0,1 mL Probe bzw. Ammoniumchlorid-Kalibrierlösung (6, 10, 14, 18 und 22 mg N / L) in

ein Schliffreagenzglas geben

- 4 mL Farbreagenz (bestehend aus 3,2 g Natriumsalicylat, 8 g Trinatriumphosphat, 0,05 g Natriumprussiat in 100 mL Wasser) zugeben und schütteln
- 1 mL Natriumhypochlorit-Lösung zugeben und schütteln
- Nach 10 min Extinktion bei 685 nm messen
- Extinktion eines Blindwerts (Durchführung mit 0,1 mL Wasser) von allen Werten abziehen
- Stickstoffgehalt durch Kalibrierung bestimmen, Proteingehalt durch Multiplikation mit 6,25 errechnen

Aschekorrektur

- Porzellantiegel bei 525°C ausglühen und wiegen
- 50 - 100 mg UBS/LBS in Porzellantiegel einwiegen
- Mindestens 5 h bei 525°C im Muffelofen veraschen
- Bei schlechter Veraschung Wasser zugeben und erneut veraschen
- Tiegel nach Abkühlen wiegen und Aschegehalt errechnen

8.1.2 Isolierung der Nicht-Stärke-Polysaccharide

- 2,5 g Apfelmehl dreimal mit 40 mL Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) waschen, gefriertrocknen
- Gefriertrocknetes Pulver in 10 mL Wasser suspendieren
- 100 µL thermostabile α -Amylase zugeben
- 5 min bei 95°C inkubieren
- Abkühlen und 200 µL Amyloglucosidase zugeben
- 10 min bei 60°C inkubieren
- 5 min bei 100°C inkubieren
- 40 mL Ethanol zugeben, mischen, kurz warten, zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Rückstand mit 40 mL Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) waschen
- *Zweimal:*
 - Rückstand in 5 mL 60°C warmem Wasser suspendieren
 - 20 mL Ethanol zugeben, mischen, kurz warten, zentrifugieren
 - Überstand verwerfen, Rückstand mit 40 mL Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) waschen
- Gefriertrocknen

8.2 Charakterisierung der pflanzlichen Rohstoffe

8.2.1 Monosaccharidanalyse

HPAEC-PAD-Bedingungen

<i>Injektionsvolumen</i>	25 µL
<i>Detektionsmodus</i>	IntAmp
<i>Data Collection Rate</i>	2 Hz
<i>Waveform Name</i>	Carbohydrates (Standard Quad)
<i>Electrode</i>	AgCl
<i>InjectMode</i>	PushSeqFull
<i>LoopOverfill</i>	2.0
<i>Säule</i>	CarboPac PA20
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	0,1 M Natriumhydroxid-Lösung
<i>Eluent C</i>	0,1 M Natriumhydroxid- + 0,2 M Natriumacetat-Lösung
<i>Fluss</i>	0,4 mL/min
<i>Temperatur</i>	25°C

Gradientprogramme

Im für die Quantifizierung aller Monosaccharide üblicherweise verwendeten Gradientenprogramm sind Xyl und Man nicht vollständig getrennt. Bei größeren Mengen und einer nicht ausreichenden Trennung dieser beiden Monosaccharide muss eine erneute Messung mit einem alternativen Gradientenprogramm erfolgen. Die verwendeten Gradientenprogramme sind in Tabelle 8.1 aufgeführt.

Kalibrierung

Es wurden zwei 5-Punkt Kalibrierungen (25, 50, 75, 100, 125 µM und 1, 6, 12, 18, 25 µM) für alle Monosaccharide durchgeführt, wobei Man aufgrund der schlechten Trennung von Xyl separat kalibriert wurde. Für alle Kalibrierungen wurde eine quadratische Anpassung durchgeführt.

Tabelle 8.1: Zur Trennung der Monosaccharide verwendete HPAEC-PAD-Gradientenprogramme.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-20,0	0,0	100,0	0,0
-10,0	0,0	100,0	0,0
-9,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
1,5	96,0	4,0	0,0
22,0	96,0	4,0	0,0
32,0	0,0	100,0	0,0
32,1	0,0	0,0	100,0
42,0	0,0	0,0	100,0

<i>Gradient zur Trennung von Xylose und Mannose</i>			
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-20,0	0,0	100,0	0,0
-10,0	0,0	100,0	0,0
-9,9	96,0	4,0	0,0
25,0	96,0	4,0	0,0
25,1	0,0	0,0	100,0
40,0	0,0	0,0	100,0

8.2.1.1 Schwefelsäurehydrolyse

Teilweise wurde die Hydrolyse mit einer reduzierten Substanzmenge und dementsprechend mit reduzierten Volumina durchgeführt. Die dabei verwendeten Mengen sind jeweils in Klammern aufgeführt.

- 100 mg (10 mg) Probenmaterial in ein Pyrexglas (GC-Vial) einwiegen, mit Glasperlen versetzen
- 1,5 mL (150 µL) 12 M H₂SO₄ zugeben, vortexen
- 30 min im Eisbad stehen lassen, alle 10 min vortexen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen, alle 30 min vortexen
- 9,75 mL (975 µL) Wasser zugeben
- 3 h bei 100°C im Trockenschrank hydrolysieren
- Nach Abkühlen 1 mL durch Polytetrafluorethylen-Spritzenfilter (0,45 µm, Chromafil Xtra, Macherey-Nagel) filtrieren
- 100 µL Filtrat mit 75 µL 4 M NaOH und 825 µL Wasser verdünnen
- 20 µL verdünntes Filtrat mit 20 µL 1 mM D-Mannit-Lösung und 160 µL Wasser versetzen, mittels HPAEC-PAD analysieren

8.2.1.2 Methanolyse

- 10 - 25 mg Probe in ein GC-Vial einwiegen
- 2 mL 1,25 M methanolische HCl zugeben
- 16 h bei 80°C im Trockenschrank behandeln
- Abkühlen, 40 µL in neues Gefäß überführen
- Zur Trockne eindampfen
- 500 µL 2 M TFA zugeben
- 1 h bei 121°C im Trockenschrank hydrolysieren
- Zur Trockne eindampfen
- Zweimal je 200 µL Ethanol zugeben und zur Trockne eindampfen
- In 180 µL Wasser aufnehmen, 20 µL 1 mM D-Mannit-Lösung zugeben und mittels HPAEC-PAD analysieren

8.2.2 Methylierungsanalyse

- Ca. 5 mg Probe in ein Pyrexglas einwiegen
- 2 mL DMSO zugeben
- 15 min im Ultraschallbad behandeln
- Über Nacht bei Raumtemperatur quellen lassen
- 15 min im Ultraschallbad behandeln
- Unter Stickstoffstrom ca. 100 mg frisch gemörserte NaOH zugeben
- 90 Minuten im Ultraschallbad behandeln
- 90 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- 1 mL Methyliodid zugeben
- 30 Minuten im Ultraschallbad behandeln
- 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- 3 mL Dichlormethan zugeben
- 5 mL 0,1 M Natriumthiosulfat-Lösung zugeben und gut mischen
- Wässrige Phase abnehmen und organische Phase zweimal mit Wasser waschen
- Lösungsmittel abrotieren, Rest unter Stickstoff abblasen und über Nacht bei 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen
- 2 mL 2 M TFA zugeben und 90 min bei 121°C im Trockenschrank hydrolysieren
- Lösungsmittel abrotieren bzw. unter Stickstoff abblasen
- 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 mL 2 M Ammoniak zugeben
- 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zum Abbruch der Reaktion 100 µL Eisessig zugeben

- Unter Eiskühlung 450 μL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Unter Eiskühlung 3 mL Wasser zugeben
- Mit 5 mL Dichlormethan extrahieren
- Organische Phase dreimal mit Wasser waschen
- Restwasser über Nacht bei -18°C ausfrieren
- Organische Phase mittels GC analysieren

GC-Bedingungen

	GC-MS	GC-FID
Säule	DB-225MS	DB-225
Säulendimensionen	30 m x 0,25 mm, 0,25 μm Filmdicke	
Injektionstemperatur		220 $^\circ\text{C}$
Injektionsart		Split
Injektionsvolumen		1 - 3 μL
Splitrate	30:1	10:1
Trägergas		Helium
Trägergasgeschwindigkeit		40 cm/s
Transfer-Line-Temperatur	220 $^\circ\text{C}$	-
FID-Temperatur	-	240 $^\circ\text{C}$

GC-Temperaturprogramm

Tabelle 8.2: Zur Analyse der partiell methylierten Alditolacetate verwendetes GC-Temperaturprogramm.

	Aufheizrate [$^\circ\text{C}/\text{min}$]	Endtemperatur [$^\circ\text{C}$]	Haltezeit [min]
Anfangstemperatur		140	1
Level 1	20	220	25

8.2.3 Phenolische Säuren/Dehydrodiferulasäuren

Die Hydroxyzimtsäure- und DFS-Gehalte wurden üblicherweise mit der von DOBBERSTEIN & BUNZEL (2010) beschriebenen Methode mit den internen Standardsubstanzen Kaffeesäure und monomethylierter 5-5-DFS bestimmt. Da bei den Pseudocerealien Amaranth, Quinoa und Buchweizen kleinere Mengen an zellwandassoziierten Kaffeesäuren vorlagen, wurde für diese Materialien *ortho*-Cumarsäure als interne Standardsubstanz verwendet.

- 75 - 300 mg UBS in ein Pyrexglas einwiegen
- 5 mL 2 M NaOH zugeben
- 18 h ohne Sauerstoff-/Lichteinwirkung unter Rühren bei Raumtemperatur verseifen
- 25 µL einer 5 mM *ortho*-Cumarsäure-Lösung bzw. 50 µg Kaffeesäure und 5 - 10 µg monomethylierte 5-5-DFS zugeben, vortexen
- 0,95 mL 37 %ige HCl zugeben, vortexen
- Dreimal mit 4 mL Diethylether extrahieren
- Extrakt im Stickstoffstrom trocknen
- In 500 mL Methanol/Wasser (50:50, v/v) lösen

HPLC-Bedingungen

<i>Injektionsvolumen</i>	10 - 30 µL
<i>Detektion</i>	DAD
<i>Säule</i>	Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	1 mM TFA
<i>Eluent B</i>	Methanol / 1 mM TFA (90:10, v/v)
<i>Eluent C</i>	Acetonitril / 1 mM TFA (90:10, v/v)
<i>Fluss</i>	1 mL/min
<i>Temperatur</i>	45°C

Gradientenprogramme

Um eine optimale Trennung der Hydroxyzimtsäuren und DFS zu erreichen, wurde je nach verwendeter interner Standardsubstanz ein separates Gradientenprogramm verwendet (Tabelle 8.3 und Tabelle 8.4).

Kalibrierung/Auswertung

Bei Verwendung von Kaffeesäure bzw. monomethylierter 5-5-DFS wurden die Hydroxyzimtsäure- bzw. DFS-Gehalte mit den von DOBBERSTEIN & BUNZEL (2010) beschriebenen RRFs bestimmt. Bei der Verwendung von *ortho*-Cumarsäure wurde eine Kalibrierung mit *ortho*-Cumarsäure und den zu bestimmenden Hydroxyzimtsäuren erstellt (Konzentrationsbereich 5 - 500 µM). Für die Bestimmung der *cis*-Isomere wurde eine *p*-CS- bzw. FS-Lösung 20 h bei 366 nm isomerisiert. Die Gehalte der *cis*-Isomere wurden über die Abnahme der *trans*-Isomere bestimmt. Mit den erhaltenen Lösungen wurde wiederum eine Kalibrierung mit *ortho*-Cumarsäure hergestellt (Konzentrationsbereich 5 - 200 µM).

Tabelle 8.3: HPLC-DAD-Gradientenprogramme zur Trennung der Hydroxyzimtsäuren mit *ortho*-Cumarsäure bzw. Kaffeesäure als interner Standardsubstanz.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
<i>ortho</i> -Cumarsäure			
0,0	87,0	0,0	13,0
11,0	87,0	0,0	13,0
23,0	85,0	0,0	15,0
28,0	84,0	0,0	16,0
32,0	25,0	25,0	50,0
33,0	87,0	0,0	13,0
42,0	87,0	0,0	13,0
<i>Kaffeesäure</i>			
0,0	87,0	0,0	13,0
10,0	87,0	0,0	13,0
20,0	77,0	3,0	20,0
25,0	70,0	5,0	25,0
30,0	25,0	25,0	50,0
35,0	0,0	50,0	50,0
40,0	87,0	0,0	13,0
45,0	87,0	0,0	13,0

Tabelle 8.4: HPLC-DAD-Gradientenprogramm zur Trennung der Dehydrodiferulasäuren mit monomethylierter 5-5-Dehydrodiferulasäure als interner Standardsubstanz.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0,0	85,0	0,0	15,0
15,0	82,0	0,0	18,0
20,0	80,0	0,0	20,0
25,0	72,0	3,0	25,0
30,0	70,0	5,0	25,0
40,0	65,0	5,0	30,0
45,0	65,0	5,0	30,0
55,0	55,0	5,0	40,0
60,0	55,0	5,0	40,0
63,0	85,0	0,0	15,0
70,0	85,0	0,0	15,0

8.3 Isolierung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

8.3.1 Enzymatische Freisetzung

endo-Arabinanase-Inkubation von Arabinan-Polysacchariden

Zur Isolierung ausreichender Mengen an Standardsubstanzen wurde die *endo*-Arabinanase-Inkubation der löslichen AN-PS zweimal mit leicht abweichenden Parametern durchgeführt.

- Erster Inkubationsansatz
 - 1 g lösliche AN-PS in 100 mL Wasser lösen
 - 4 U *endo*-Arabinanase zugeben
 - 24 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - Gefriertrocknen
- Zweiter Inkubationsansatz
 - 1 g lösliche AN-PS in 100 mL Wasser lösen
 - 8 U *endo*-Arabinanase zugeben
 - 24 h bei 40°C inkubieren
 - 4 U *endo*-Arabinanase zugeben
 - 24 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - Gefriertrocknen

endo-Arabinanase-Inkubation von unlöslichen Rotkleesprossen-Ballaststoffen

- 15 g Rotkleesprossen-UBS in 150 mL Wasser suspendieren
- 0,6 g Ca(OH)₂ zugeben
- 30 min bei 95°C erhitzen
- Abkühlen, Überstand durch Zentrifugation abtrennen
- Rückstand zweimal mit Wasser waschen, Waschlösungen mit Überstand vereinen
- Vereinigte Überstände mit 0,325 M HCl auf ca. pH 6 neutralisieren und gefriertrocknen
- Gefriergetrockneten Extrakt in Wasser lösen und 24 h gegen Wasser dialysieren (Zellu-Trans-Dialysiermembran, Molecular Weight Cut Off: 3500, Roth)
- Mit Wasser auf 150 mL auffüllen
- 20 U *endo*-Arabinanase zugeben
- 48 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Gefriertrocknen

endo-Arabinanase-Inkubation von unlöslichen Quinoa-Ballaststoffen

Zur Isolierung ausreichender Mengen an Standardsubstanzen wurde die *endo*-Arabinanase-Inkubation der Quinoa-UBS zweimal mit leicht abweichenden Parametern durchgeführt.

- Erster Inkubationsansatz
 - 5 g Quinoa-UBS in 500 mL Wasser suspendieren, 20 min bei 95°C im Wasserbad quellen lassen
 - 50 U *endo*-Arabinanase zugeben
 - 24 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - Überstand abtrennen und gefriertrocknen
- Zweiter Inkubationsansatz
 - 8 g Quinoa-UBS 1 min bei 600 rpm in Kugelmühle mahlen
 - UBS in 800 mL Wasser suspendieren und 10 min bei 95°C im Wasserbad quellen lassen
 - 80 U *endo*-Arabinanase zugeben
 - 48 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - Überstand abtrennen und gefriertrocknen

endo-Arabinanase-Inkubation von unlöslichen Amaranth-Ballaststoffen

- 10 g Amaranth-UBS in 1 L Wasser suspendieren
- 100 U *endo*-Arabinanase zugeben
- 48 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Überstand abtrennen und gefriertrocknen

Driselase-Inkubation von Arabinan-Polysacchariden

- 1 g lösliche AN-PS in 100 mL Wasser lösen
- 100 mg Driselase zugeben
- 24 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Gefriertrocknen

Driselase-Inkubation von Galactan-Polysacchariden

Zur Isolierung ausreichender Mengen an Standardsubstanzen wurde die *endo*-Galactanase-Inkubation der löslichen GN-PS mehrfach mit leicht abweichenden Parametern bzw. Ausgangsmaterialien durchgeführt.

- Erster Inkubationsansatz
 - 200 mg lösliche GN-PS in 20 mL Wasser lösen
 - 25 mg Driselase zugeben
 - 24 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - 80 mL Ethanol zugeben, Rückstand durch Zentrifugation abtrennen und verwerfen
 - Überstand am Rotationsverdampfer einengen und gefriertrocknen
 - LC-SAX-SPE-Säule (3 mL / 500 mg, Supelco) mit 3 mL Methanol und 3 mL Wasser konditionieren
 - Gefriergetrockneten Überstand in Wasser aufnehmen und auf Säule geben
 - Mit 3 mL Wasser waschen und Eluat gefriertrocknen
- Zweiter Inkubationsansatz
 - 1 g lösliche GN-PS in 100 mL Wasser lösen
 - 125 mg Driselase zugeben
 - 24 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - Gefriertrocknen
- Dritter Inkubationsansatz
 - 600 mg Polygalacturonsäure in 60 mL Wasser lösen
 - 5 mg Driselase zugeben
 - 15 h bei 40°C inkubieren
 - Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
 - Gefriertrocknen

endo-Galactanase-Inkubation von unlöslichen Sojaextraktionsschrot-Ballaststoffen

- 8 g SES-UBS in 160 mL Wasser suspendieren
- 40 min bei 121°C autoklavieren
- Mit Wasser auf ca. 400 mL auffüllen
- 180 U *endo*-Galactanase zugeben
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Überstand abtrennen und gefriertrocknen

8.3.2 Gelpermeationschromatographie

<i>Injektionsvolumen</i>	10 - 20 mL
<i>Detektion</i>	RI
<i>Säule</i>	Bio-Gel P-2 (85 cm x 2,6 cm, Bio-Rad)
<i>Eluent</i>	Wasser
<i>Fluss</i>	1 mL/min
<i>Temperatur</i>	45°C
<i>Fraktionierung</i>	Fraktionensammler, Fraktionsgröße 2,5 min

Die erhaltenen Fraktionen wurden dem Chromatogramm entsprechend vereint und anschließend gefriergetrocknet.

8.3.3 Chromatographische Aufreinigung

Aufreinigung mittels semipräparativer C18-HPLC

<i>Injektionsvolumen</i>	500 µL - 1 mL
<i>Detektion</i>	RI
<i>Säule</i>	Knauer Eurosphere 100 (250 mm x 8 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent</i>	Wasser
<i>Fluss</i>	1 - 1,5 mL/min
<i>Temperatur</i>	5 - 40°C
<i>Fraktionierung</i>	Manuell

Aufreinigung mittels analytischer C18-HPLC

<i>Injektionsvolumen</i>	500 µL
<i>Detektion</i>	RI
<i>Säule</i>	Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent</i>	Wasser
<i>Fluss</i>	0,5 mL/min
<i>Temperatur</i>	5°C
<i>Fraktionierung</i>	Manuell

Aufreinigung mittels PGC-HPLC

<i>Injektionsvolumen</i>	50 µL
<i>Detektion</i>	ELSD
<i>Säule</i>	Thermo Hypercarb (100 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	Acetonitril
<i>Fluss</i>	3 mL/min
<i>Temperatur</i>	70°C
<i>Fraktionierung</i>	Fraktionierventil, programmiert nach Chromatogramm

Vor dem ELSD-Detektor wurde der Fluss ca. 1:20 gesplittet. Zur Trennung der OS wurde das in Tabelle 8.5 gezeigte Gradientenprogramm verwendet. Bei ausreichend früher Elution der OS wurde das Gradientenprogramm entsprechend verkürzt (früherer Start des 20:80 Wasser/Acetonitril Spülschritts).

Tabelle 8.5: Zur Fraktionierung der Oligosaccharide auf einer Porous Graphitized Carbon-Säule verwendetes Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100,0	0,0
1,0	100,0	0,0
20,0	80,0	20,0
24,0	20,0	80,0
28,0	80,0	20,0

Die durch die verschiedenen HPLC-Fraktionierungen erhaltenen Fraktionen wurden jeweils gefriergetrocknet.

8.4 Isolierung von Hydroxyzimtsäure-Oligosacchariden

8.4.1 Enzymatische Freisetzung und Vorreinigung

Viscozyme L-Hydrolyse von Quinoa-Nicht-Stärke-Polysacchariden

- 800 g Quinoamehl in 8 L 0,08 M Natriumphosphatpuffer suspendieren
- 20 mL MATS L Classic zugeben
- 20 min bei 92°C inkubieren
- Mit 1 M HCl auf pH 5,2 einstellen
- 4 mL Maxazyme NNP DS zugeben
- 30 min bei 60°C inkubieren
- Rückstand durch Zentrifugation abtrennen, Überstand verwerfen
- Rückstand mit Wasser waschen und in 600 mL Wasser suspendieren
- 4 mL Viscozyme L zugeben
- 45 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 90°C erhitzen
- Rückstand durch Zentrifugation abtrennen und verwerfen
- Amberlite XAD-2 (Supelco)-Säule (45 cm x 5 cm) mit 1 L Wasser konditionieren
- Hydrolysat auf Säule geben
- Mit 1 L Wasser waschen
- Mit 1 L Methanol eluieren
- Methanol-Eluat am Rotationsverdampfer auf 10 mL einengen

Viscozyme L-Hydrolyse von Zuckerrübenschnitzeln

- 80 g ZRS in 5 L Wasser suspendieren
- 20 min bei 90°C im Wasserbad inkubieren
- Abkühlen, 718 µL Viscozyme L zugeben
- 45 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 90°C erhitzen
- Rückstand durch Zentrifugation abtrennen und verwerfen
- Amberlite XAD-2 (Supelco)-Säule (45 cm x 5 cm) mit 750 mL Wasser konditionieren
- Hydrolysat auf Säule geben
- Mit 750 mL Wasser waschen
- Mit 750 mL Methanol eluieren
- Methanol-Eluat am Rotationsverdampfer auf 10 mL einengen

Driselase-Hydrolyse von unlöslichen Zuckerrübenschitzel-Ballaststoffen

- 20 g ZRS-UBS 1 min bei 600 rpm in Kugelmühle mahlen
- UBS in 1800 mL Wasser suspendieren und 10 min bei 95°C im Wasserbad quellen lassen
- 2 g Driselase zugeben
- 48 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Überstand abtrennen und gefriertrocknen
- Rückstand durch Zentrifugation abtrennen und verwerfen
- Chromabond C18f (Macherey-Nagel)-Säule (12 cm x 2,5 cm) mit 500 mL Methanol und 500 mL Wasser konditionieren
- Hydrolysat auf Säule geben
- Mit 150 mL Wasser waschen
- Mit 150 mL Methanol eluieren
- Methanol-Eluat am Rotationsverdampfer auf 10 mL einengen

8.4.2 Gelpermeationschromatographie

<i>Injektionsvolumen</i>	10 mL
<i>Detektion</i>	UV, 280 nm
<i>Säule</i>	Sephadex LH-20 (85 cm x 2,6 cm, GE Healthcare)
<i>Eluent 1</i>	Wasser
<i>Eluent 2</i>	Wasser/Methanol (75:25, v/v)
<i>Eluent 3</i>	Wasser/Methanol (25:75, v/v)
<i>Fluss</i>	0,5 mL/min (Eluent 1) bzw. 1 mL/min (Eluent 2 + 3)
<i>Temperatur</i>	Raumtemperatur
<i>Fraktionierung</i>	Fraktionensammler, Fraktionsgröße 6 min

Zur Elution der verschiedenen polaren Hydroxycitronensäure- und DFS-OS wurde eine schrittweise Elution mit den aufgeführten Lösungsmitteln (gemischt) durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden dem Chromatogramm entsprechend vereint und anschließend gefriergetrocknet bzw. am Rotationsverdampfer eingengt und gefriergetrocknet.

8.4.3 Chromatographische Aufreinigung

Fraktionierung mittels präparativer HPLC

Zur präparativen HPLC-Fraktionierung der Hydroxyzimtsäure- bzw. DFS-OS wurden die aufgeführten Bedingungen und die in Tabelle 8.6 und Tabelle 8.7 aufgeführten Gradientenprogramme verwendet.

<i>Injektionsvolumen</i>	2 mL
<i>Detektion</i>	UV, 325 nm
<i>Säule</i>	Phenomenex Luna C18 (250 mm x 10 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	Acetonitril (Hydroxyzimtsäure-OS) / Methanol (DFS-OS)
<i>Fluss</i>	4 mL/min
<i>Temperatur</i>	Raumtemperatur
<i>Fraktionierung</i>	Manuell

Tabelle 8.6: Zur präparativen HPLC-Fraktionierung der Hydroxyzimtsäure-Oligosaccharide verwendetes Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	85,0	15,0
25,0	85,0	15,0
26,0	0,0	100,0
30,0	0,0	100,0
31,0	85,0	15,0
35,0	85,0	15,0

Tabelle 8.7: Zur präparativen HPLC-Fraktionierung der Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide verwendetes Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	80,0	20,0
2,5	80,0	20,0
30,0	0,0	100,0
45,0	0,0	100,0
46,0	80,0	20,0
50,0	80,0	20,0

Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC

Zur semipräparativen HPLC-Fraktionierung des OS FFAAA wurden die aufgeführten Bedingungen und das in Tabelle 8.7 aufgeführte Gradientenprogramm verwendet.

<i>Injektionsvolumen</i>	500 µL
<i>Detektion</i>	UV, 325 nm
<i>Säule</i>	Phenomenex Luna C18 (250 mm x 10 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	Methanol
<i>Fluss</i>	2 mL/min
<i>Temperatur</i>	Raumtemperatur
<i>Fraktionierung</i>	Manuell

Fraktionierung mittels analytischer HPLC

Zur analytischen HPLC-Fraktionierung des OS CAA wurden die aufgeführten Bedingungen und das in Tabelle 8.6 aufgeführte Gradientenprogramm verwendet.

<i>Injektionsvolumen</i>	100 µL
<i>Detektion</i>	UV, 325 nm
<i>Säule</i>	Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	Acetonitril
<i>Fluss</i>	0,5 mL/min
<i>Temperatur</i>	Raumtemperatur
<i>Fraktionierung</i>	Manuell

8.5 Charakterisierung der Standardsubstanzen

8.5.1 Monosaccharidanalyse

8.5.1.1 Monosaccharidzusammensetzung mittels HPAEC-PAD

- Aliquot einer Lösung des OS in kleines GC-Vial geben (ca. 1 µg)
- Zur Trockne eindampfen
- 500 µL 2 M TFA zugeben
- 30 min bei 121°C im Trockenschrank hydrolysieren
- Zur Trockne eindampfen
- Zweimal je 200 µL Ethanol zugeben und zur Trockne eindampfen
- In 180 µL Wasser aufnehmen, 20 µL 1 mM D-Mannit-Lösung zugeben und mittels HPAEC-PAD analysieren

Die zur Analyse der Monosaccharidzusammensetzung verwendeten HPAEC-PAD-Bedingungen sind in Abschnitt 8.2.1 beschrieben.

8.5.1.2 Bestimmung der Konfiguration der Monosaccharide mittels GC-MS

- Aliquot einer Lösung des OS in kleines GC-Vial geben (ca. 1 µg)
- Zur Trockne eindampfen
- 500 µL 2 M TFA zugeben
- 30 min bei 121°C im Trockenschrank hydrolysieren
- Zur Trockne eindampfen
- 150 µL (*R*)-2-Octanol und 5 µL TFA zugeben
- Über Nacht bei 130°C im Trockenschrank behandeln
- Lösungsmittel bei 60°C im Stickstoffstrom entfernen
- Zweimal je 200 µL Ethanol zugeben und im Stickstoffstrom entfernen
- 80 µL *N,O*-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid und 20 µL Pyridin zugeben
- 30 min bei 60°C im Trockenschrank behandeln, abkühlen und mittels GC-MS analysieren

GC-MS Bedingungen

<i>Säule</i>	Rxi-5Sil MS
<i>Säulendimensionen</i>	30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke
<i>Injektionstemperatur</i>	275°C
<i>Injektionsart</i>	Split
<i>Injektionsvolumen</i>	1 - 3 µL
<i>Splitrate</i>	10:1
<i>Trägergas</i>	Helium
<i>Trägergasgeschwindigkeit</i>	40 cm/s
<i>Transfer-Line-Temperatur</i>	275°C

GC-MS Temperaturprogramm

Tabelle 8.8: Zur Bestimmung der Konfiguration der Monosaccharide verwendetes GC-Temperaturprogramm.

	Aufheizrate [°C/min]	Endtemperatur [°C]	Haltezeit [min]
Anfangstemperatur	-	150	0
Level 1	1	200	0
Level 2	15	300	0

8.5.2 HPLC-MS Analyse

HPLC-MS-Analyse von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

<i>Injektionsvolumen</i>	20 µL
<i>Detektion</i>	MS (ESI, Positiv-Modus)
<i>Säule</i>	Thermo Hypercarb (100 mm x 2,1 mm, 3 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	25 µM LiCl
<i>Eluent B</i>	Acetonitril
<i>Fluss</i>	0,2 mL/min
<i>Temperatur</i>	70°C

Tabelle 8.9: Zur Porous Graphitized Carbon-HPLC-MS-Analyse der Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide verwendetes Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100,0	0,0
1,0	100,0	0,0
20,0	85,0	15,0
28,0	30,0	70,0
31,0	20,0	80,0
35,0	20,0	80,0
36,0	100,0	0,0
41,0	100,0	0,0

HPLC-MS-Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Dehydrodiferulasäure-Oligosacchariden

<i>Injektionsvolumen</i>	20 µL
<i>Detektion</i>	UV (325 nm), MS (ESI, Negativ-Modus)
<i>Säule</i>	Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	Acetonitril
<i>Fluss</i>	0,5 mL/min
<i>Temperatur</i>	40°C

Tabelle 8.10: Zur C18-HPLC-MS-Analyse der Hydroxyzimtsäure und Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide verwendetes Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	85,0	15,0
20,0	75,0	25,0
21,0	0,0	100,0
26,0	0,0	100,0
27,0	85,0	15,0
32,0	85,0	15,0

Die OS FFAAA und 8-O-4-DFS(AA)₂ zeigten eine sehr schlechte Fragmentierung und wurden zur Messung der MS²-Spektren mit einer Spritzenpumpe direkt in die ESI-Quelle injiziert (20 µL /min).

8.5.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung

Lösungsmittel und Referenzierung

Vor Messung der NMR-Spektren der OS wurde jeweils ein Protonenaustausch in den aufgeführten Lösungsmitteln durchgeführt.

Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide

<i>Lösungsmittel</i>	D ₂ O
<i>Referenzierung</i>	Aceton (2,22 ppm / 30,89 ppm) Acetanilid (2,17 ppm / 23,36 ppm)

Hydroxyzimtsäure-Oligosaccharide

<i>Lösungsmittel</i>	D ₂ O
<i>Referenzierung</i>	Aceton (2,22 ppm / 30,89 ppm)

Zweifach Ferulasäure-substituiertes-Oligosaccharid FFAAA

<i>Lösungsmittel</i>	Aceton-d ₆ / D ₂ O (3:1, v/v)
<i>Referenzierung</i>	Aceton (2,04 ppm / 29,80 ppm)

Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide

<i>Lösungsmittel</i>	Aceton-d ₆ / D ₂ O (4:1, v/v)
<i>Referenzierung</i>	Aceton (2,04 ppm / 29,80 ppm)

Pulssequenzen

Alle aufgeführten NMR-Experimente wurden jeweils mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt.

¹ H	zg30
H,H-COSY	cosygpqf, cosygpmfphpp
HSQC	hsqcedetgp
HMQC	hmqcgpqf
HMBC	hmbcgplpndqf
TOCSY	mlevphpp
HSQC-TOCSY	hsqcdietgpsisp.2

8.6 Chromatographisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden

HPAEC-PAD-Bedingungen

<i>Injektionsvolumen</i>	25 µL
<i>Detektionsmodus</i>	IntAmp
<i>Data Collection Rate</i>	2 Hz
<i>Waveform Name</i>	Carbohydrates (Standard Quad)
<i>Electrode</i>	AgCl
<i>InjectMode</i>	PushSeqFull
<i>LoopOverfill</i>	2.0
<i>Säule</i>	CarboPac PA200
<i>Eluent A</i>	Wasser
<i>Eluent B</i>	0,1 M Natriumhydroxid-Lösung
<i>Eluent C</i>	0,1 M Natriumhydroxid- + 0,5 M Natriumacetat-Lösung
<i>Fluss</i>	0,45 mL/min (AN-OS) 0,40 mL/min (GN-OS)
<i>Temperatur</i>	25°C

HPAEC-PAD-Gradientenprogramme

Tabelle 8.11: Zur Trennung der Arabinan-Oligosaccharide verwendetes HPAEC-PAD-Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	50,0	50,0	0,0
60,0	50,0	30,0	20,0
75,0	0,0	40,0	60,0
75,1	0,0	0,0	100,0
90,0	0,0	0,0	100,0

Tabelle 8.12: Zur Trennung der Galactan-Oligosaccharide verwendetes HPAEC-PAD-Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	90,0	10,0	0,0
60,0	50,0	50,0	0,0
75,0	50,0	40,0	10,0
75,1	0,0	0,0	100,0
90,0	0,0	0,0	100,0

Die zum HPLC-MS-Nachweis der AN- und GN-OS verwendeten chromatographischen Bedingungen sind in Abschnitt 8.5.2 aufgeführt.

Durchführung ohne Autoklavenextraktion

- 5 mg UBS/NSPS einwiegen
- 500 µL Wasser zugeben, gut mischen
- 5 µL einer 20 U/mL *endo*-Arabinanase-Lösung bzw. 5 µL einer 100 U/mL *endo*-Galactanase-Lösung zugeben
- 24 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Rückstand durch Zentrifugation abtrennen
- Klaren Überstand mit Raffinose versetzen (Endkonzentration 10 µM)

Durchführung mit Autoklavenextraktion

- 5 mg UBS/NSPS einwiegen
- 500 µL Wasser zugeben, gut mischen
- 40 min bei 121°C im Trockenschrank behandeln
- 5 µL einer 20 U/mL *endo*-Arabinanase-Lösung bzw. 5 µL einer 100 U/mL *endo*-Galactanase-Lösung zugeben
- 24 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Rückstand durch Zentrifugation abtrennen
- Klaren Überstand mit Raffinose versetzen (Endkonzentration 10 µM)

Durchführung für lösliche Polysaccharide

- Lösung des PS herstellen (1 mg/mL)
- 200 μ L mit 2 μ L einer 20 U/mL *endo*-Arabinanase-Lösung bzw. 2 μ L einer 200 U/mL *endo*-Galactanase-Lösung versetzen
- 24 h bei 40°C inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Klare Lösung mit Raffinose versetzen (Endkonzentration 10 μ M)

8.7 NMR-spektroskopisches Profiling von Arabinan- und Galactan-Strukturelementen

Für die HSQC-Messungen wurde stets die Pulssequenz "hsqcedetgp" mit dem Bruker Standardparametersatz und 32 Scans benutzt. Alle anderen Experimente wurden wie in Abschnitt 8.5.3 beschrieben durchgeführt.

Durchführung für Arabinan- bzw. Galactan-Oligosaccharide

- 250 - 500 mg UBS bzw. NSPS in einem Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 10 mL Wasser zugeben
- *Optional*: Autoklavenextraktion
 - Deckel leicht aufschrauben und 40 min bei 121°C im Autoklaven behandeln
 - Auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 2 U *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase / 100 mg UBS bzw. NSPS zugeben
- 24 h bei 40°C liegend und um 360° drehend inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Zentrifugieren und Rückstand verwerfen
- Zur NMR-Analyse 450 μ L des klaren Überstands mit 50 μ L D₂O und 0,5 μ L Aceton versetzen

Aufkonzentrierung der Hydrolysate

- 2,5 mL Hydrolysat mit 10 mL Ethanol versetzen
- Gut mischen und Präzipitat ausbilden lassen (mindestens 3 h im Kühlschrank)
- Zentrifugieren und Rückstand verwerfen
- Überstand im Evaporator eindampfen und gefriertrocknen

Durchführung für lösliche Polysaccharide

- *Optional:*
 - 5 x 1 Minute bei 600 rpm mit je 5 Minuten Intervallzeit in Kugelmühle homogenisieren
- 5 - 25 mg lösliche PS bzw. 25 mg LBS in NMR-Röhrchen einwiegen
- 500 µL D₂O und 0,5 µL Aceton zugeben, gut mischen
- Zum Lösen ggf. im Ultraschallbad behandeln

8.8 Chromatographisches Profiling von Hydroxycimtsäure-Oligosacchariden

Evaluierung der Inkubationsbedingungen

- 100 mg ZRS-UBS in einem Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 10 mL Wasser zugeben, gut mischen
- 10 mg Driselase zugeben
- 24 h bzw. 48 h bei 40°C liegend und um 360° drehend inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Zentrifugieren, Überstand verwerfen und Rückstand mit Wasser waschen
- Rückstand gefriertrocknen
- Rückstand auswiegen und anschließend für die Bestimmung des FS-Gehalts (*ortho*-Cumarsäure als Standard) bzw. für die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung verwenden

Durchführung

- 100 mg ZRS-UBS in einem Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 10 mL Wasser zugeben, gut mischen
- 10 mg Driselase zugeben
- 24 h bei 40°C liegend und um 360° drehend inkubieren
- Zur Enzyminaktivierung 5 min auf 100°C erhitzen
- Zentrifugieren, Überstand abnehmen und aufbewahren
- Rückstand zweimal mit Wasser waschen und Waschlösungen jeweils mit Überstand vereinen
- Chromabond C18-SPE-Säule (3 mL / 500 mg, Macherey-Nagel) mit 3 mL Methanol und 3 mL Wasser konditionieren
- Vereinte Überstände auf Säule aufgeben
- Mit 3 mL Wasser waschen

- Mit 3 mL Methanol eluieren
- Eluat eindampfen und in 500 µL Wasser/Methanol (50:50, v/v) aufnehmen

HPLC-MS-Bedingungen

Zur Kalibrierung wurde eine Mischung der drei FS-OS in den Konzentrationen 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL verwendet.

<i>Injektionsvolumen</i>	20 µL
<i>Detektion</i>	UV (325 nm), MS (ESI, Negativ-Modus)
<i>Säule</i>	Phenomenex Kinetex Phenyl-Hexyl (150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm Partikelgröße)
<i>Eluent A</i>	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure
<i>Eluent B</i>	Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
<i>Eluent C</i>	Methanol/Acetonitril 65:35 (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure
<i>Fluss</i>	0,5 mL/min
<i>Temperatur</i>	40°C

HPLC-MS-Gradientenprogramm

Tabelle 8.13: Zur Trennung der Hydroxyzimtsäure- und Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide verwendetes HPLC-MS-Gradientenprogramm.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0,0	90,0	5,0	5,0
18,0	85,0	10,0	5,0
36,0	0,0	95,0	5,0
40,0	0,0	95,0	5,0
41,0	90,0	5,0	5,0
47,0	90,0	5,0	5,0

9 Anhang

9.1 Methylierungsanalyse der löslichen Ballaststoffe

Tabelle 9.1: Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA, bestimmt mittels Methylierungsanalyse) der löslichen Ballaststoffe (LBS) von Apfel (Ap), Amaranth (AM), Quinoa (Q), Buchweizen (BW), Zuckerrübenschnitzel (ZRS) und Sojaextraktionschrot (SES). *p* = Pyranose, *f* = Furanose, *t* = terminal, Ara = Arabinose, Gal = Galactose, Rha = Rhamnose, Xyl = Xylose, Glc = Glucose, Man = Mannose.

PMAA	Ap LBS	AM LBS	Q LBS	BW LBS	ZRS LBS	SES LBS
t-Araf	30,1	11,5	17,3	7,0	29,8	8,2
1,5-Araf	15,0	30,5	20,7	6,9	18,6	7,0
1,3,5-Araf	5,4	1,6	3,4	1,6	7,9	-
1,2,5-Araf	-	13,3	1,5	-	1,3	0,4
1,2,3,5-Araf	-	-	-	-	4,1	-
1,2-Araf	-	-	-	-	1,1	-
t-Arap	2,6	-	-	-	0,7	-
t-Galp	2,4	0,9	2,5	16,0	2,8	11,1
1,3-Galp	2,7	2,1	1,5	10,5	1,8	1,3
1,3,6-Galp	16,4	6,8	6,3	1,7	8,7	4,1
1,6-Galp	-	-	2,6	-	2,9	3,8
1,4-Galp	-	-	-	-	1,1	2,6
1,2-Rhap	1,4	1,0	1,7	4,0	0,6	0,6
1,2,4-Rhap	-	-	-	-	0,6	-
t-Xylp	3,6	19,5	4,4	25,5	0,9	2,8
1,4-Xylp	-	0,3	0,9	0,4	-	0,5
1,2-Xylp	-	0,3	0,6	0,6	-	1,7
t-Glcp	3,3	2,9	7,5	4,9	1,8	3,1
1,4-Glcp	5,5	2,1	6,0	4,1	8,1	-
t-Manp	11,5	7,2	22,4	16,9	5,6	15,9
1,4-Manp	-	-	0,7	-	1,8	22,1
1,4,6-Manp	-	-	-	-	-	8,1
1,2-Manp	-	-	-	-	-	6,5

9.2 Methanolyse der Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide vor und nach der Lagerung

Tabelle 9.2: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (bestimmt mittels HPAEC-PAD nach Methanolyse) der Apfel-Nicht-Stärke-Polysaccharide vor (Stadium 1) und nach dreiwöchiger Lagerung (Stadium 2).

Monosaccharid	Stadium 1	Stadium 2
Fucose	2,6	3,2
Rhamnose	4,4	5,6
Arabinose	26,5	19,8
Galactose	18,8	17,1
Glucose	3,6	4,3
Xylose	16,7	19,9
Mannose	5,1	5,1
Galacturonsäure	21,6	24,6
Glucuronsäure	0,5	0,5

9.3 NMR-Daten der Standardsubstanzen

In den Abbildungen 9.1, 9.2 und 9.3 sind die Strukturen aller isolierten AN-, GN-, Hydroxyzimtsäure- und DFS-OS erneut dargestellt. Dabei sind alle Struktureinheiten mit Deskriptoren gekennzeichnet, die für die Angabe der chemischen Verschiebungen genutzt werden.

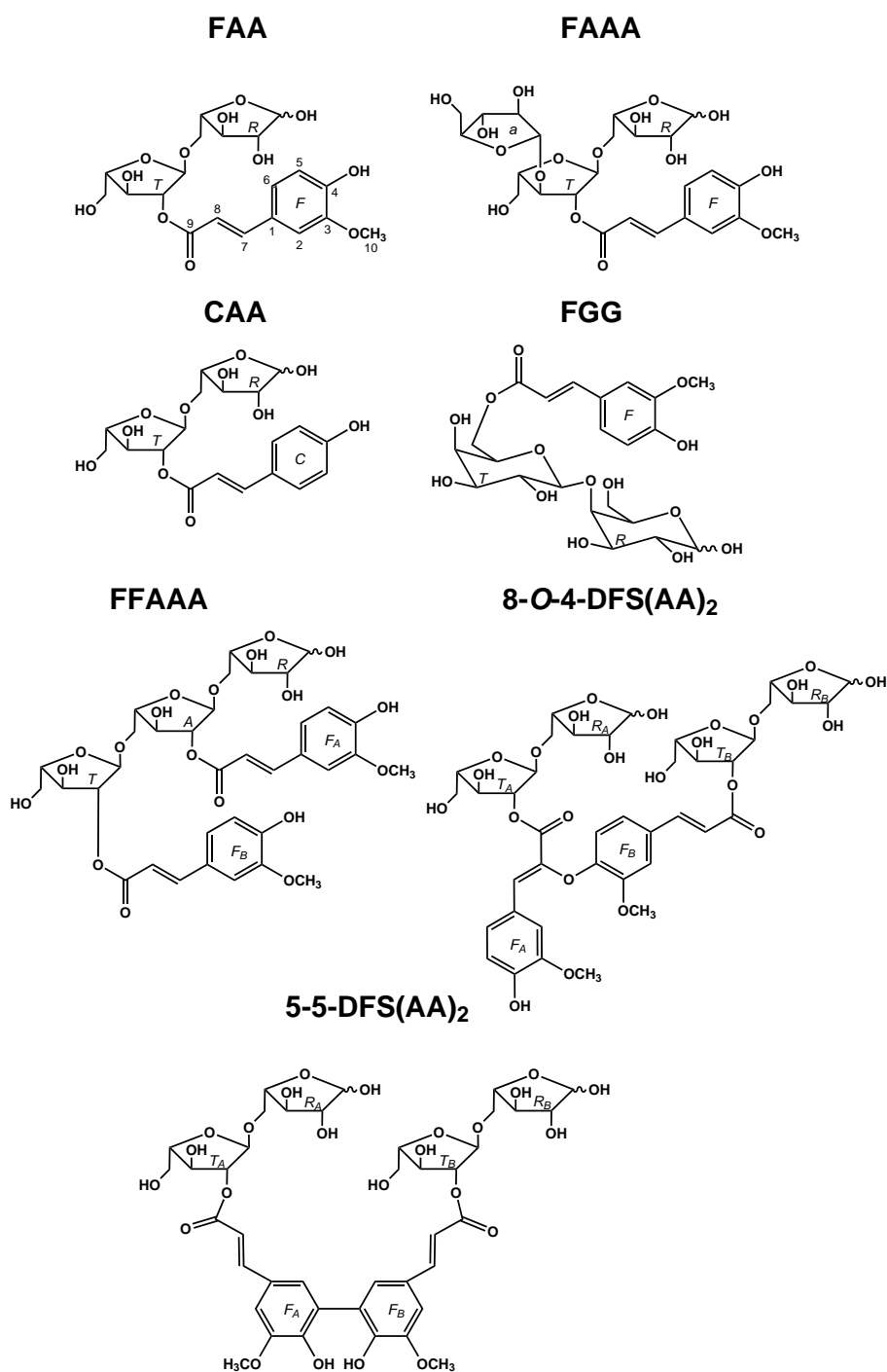


Abbildung 9.1: Strukturen der isolierten Hydroxyzimtsäure- und Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide. Die Buchstaben dienen zur Kennzeichnung der Einheiten für die Angabe der chemischen Verschiebungen.

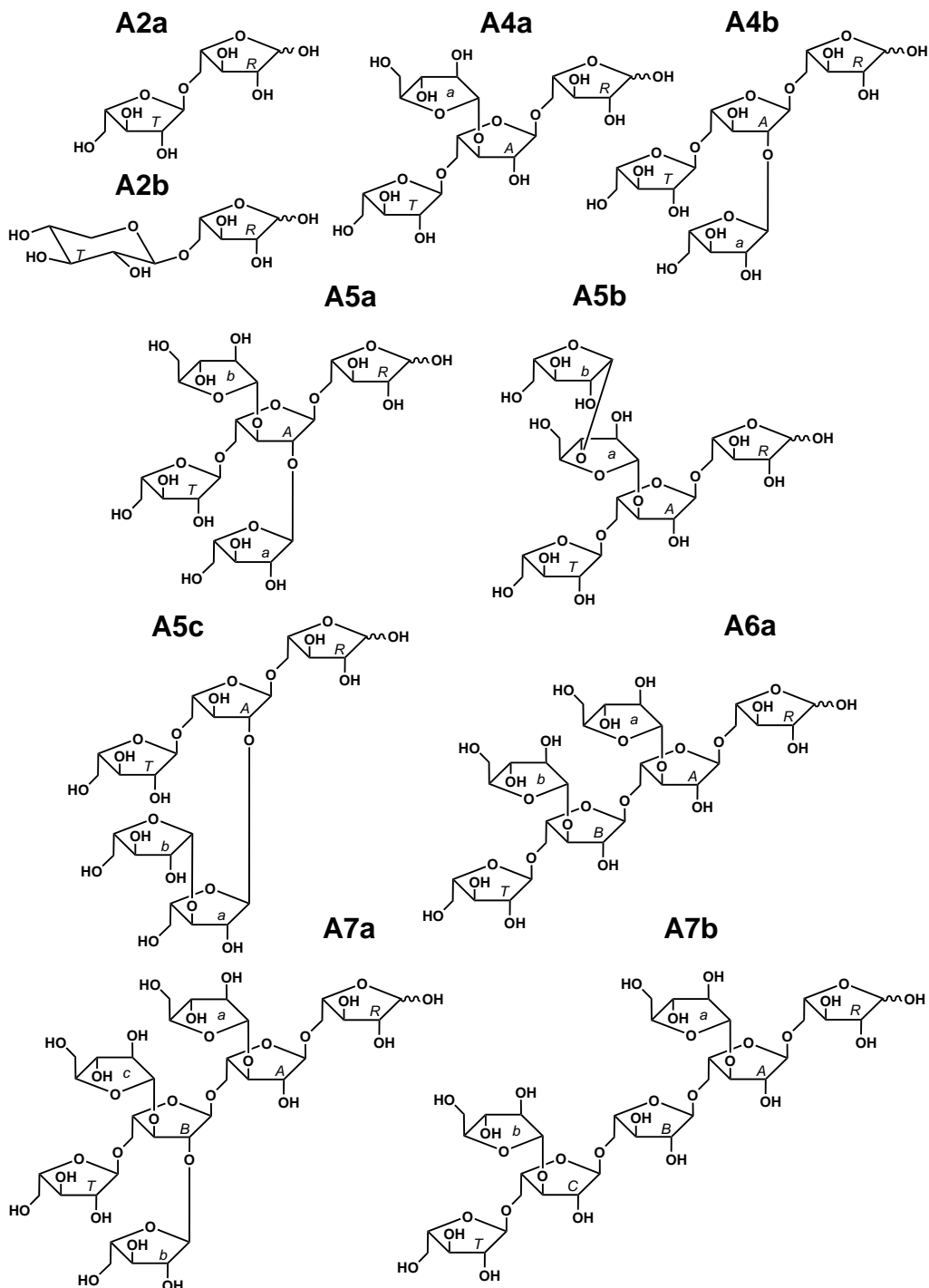


Abbildung 9.2: Strukturen der als Hauptprodukte der *endo*-Arabinanase-Spaltung eingeordneten Arabinan-Oligosaccharide. Die Buchstaben dienen zur Kennzeichnung der Einheiten für die Angabe der chemischen Verschiebungen.

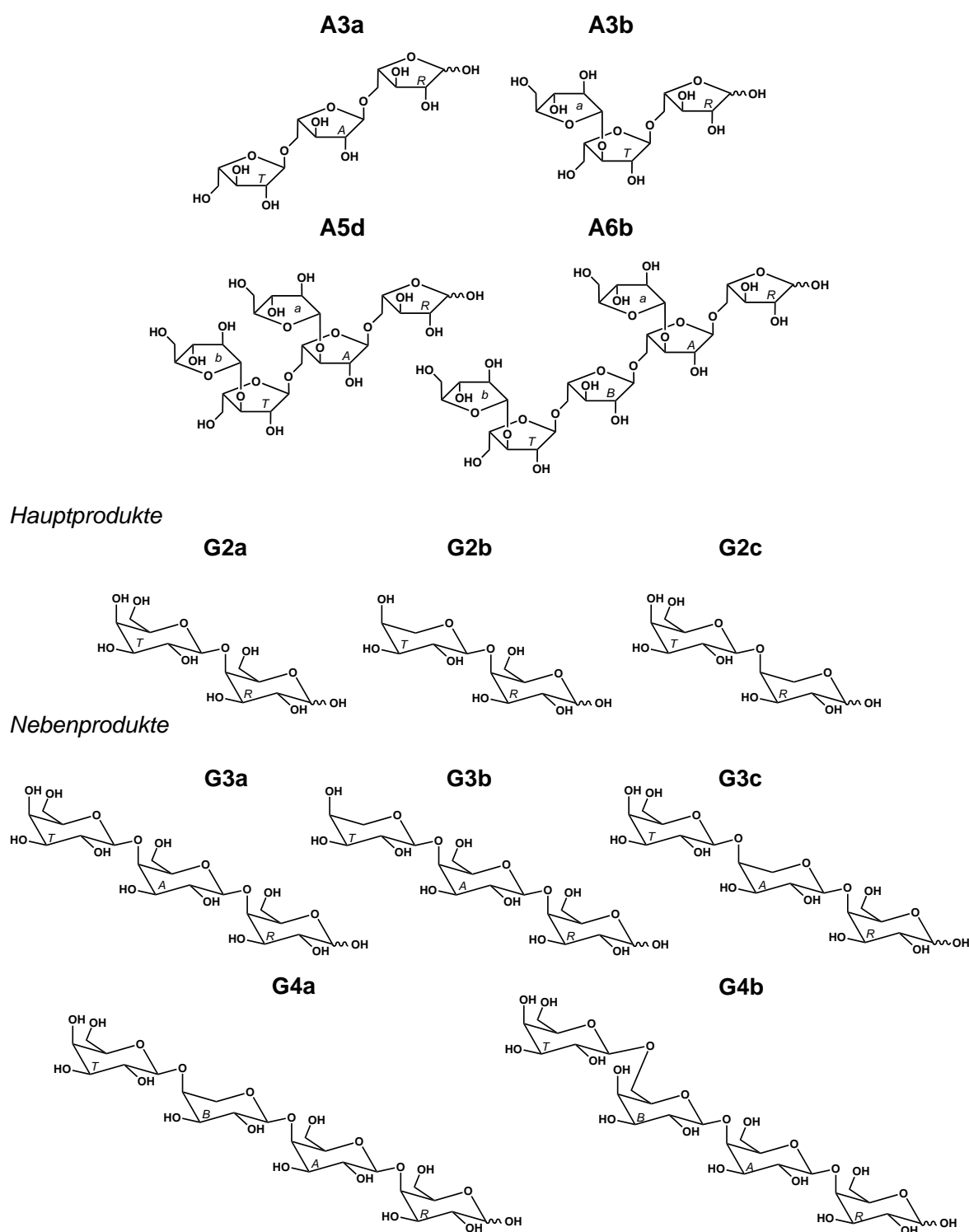


Abbildung 9.3: Strukturen der als Nebenprodukte der *endo*-Arabinanase-Spaltung eingeordneten Arabinan-Oligosaccharide und Strukturen der Galactan-Oligosaccharide sowie deren Einordnung als Haupt- oder Nebenprodukte der *endo*-Galactanase-Spaltung. Die Buchstaben dienen zur Kennzeichnung der Einheiten für die Angabe der chemischen Verschiebungen.

Tabelle 9.3: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A2a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,25 101,72	4,03 81,89	4,03 76,46	4,23 81,99	3,76/3,85 67,43
R- β	5,29 95,82	4,09 76,59	4,09 74,94	3,94 79,98	3,76/3,83 68,76
T	5,07/5,08 108,01	4,12 81,48	3,94 77,13	4,08 84,57	3,82/3,71 61,78

Tabelle 9.4: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A2b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,26 101,72	4,03 81,96	4,03 76,43	4,22 82,22	3,88/3,97 69,72
R- β	5,29 95,85	4,09 76,52	4,09 74,87	3,94 80,02	3,85/3,96 71,13
T	4,44/4,45 103,87	3,29 73,59	3,44 76,19	3,62 69,84	3,97/3,32 65,82

Tabelle 9.5: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A4a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,24 101,62	4,02 81,97	4,04 76,33	4,22 81,80	3,76/3,83 67,09
R- β	5,29 95,88	4,09 76,53	4,09 74,96	3,94 79,97	3,76/3,82 68,35
A	5,10/5,11 108,05	4,28 79,68	4,09 82,97	4,31 82,26	3,85/3,93 67,03
T	5,09 107,94	4,13 81,70	3,94 77,15	4,10 84,51	3,71/3,83 61,74
a	5,15 107,68	4,14 81,78	3,94 77,15	4,03 84,51	3,71/3,83 61,74

Tabelle 9.6: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A4b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,26 101,74	4,03 81,97	4,02 76,53	4,24 82,02	3,76/3,83 67,76
R- β	5,29 95,85	4,09 76,54	4,09 75,12	3,95 79,97	3,76/3,83 69,15
A	5,20/5,21 107,01	4,16 87,59	4,16 75,82	4,20 82,19	3,81/3,89 67,02
T	5,08 108,07	4,12 81,88	3,95 77,15	4,08 84,53	3,71/3,83 61,75
a	5,18 107,80	4,12 81,88	3,95 77,15	4,07 84,60	3,71/3,83 61,75

Tabelle 9.7: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A5a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,25 101,74	4,02 81,93	4,04 76,37	4,23 81,85	3,77/3,83 67,05
R- β	5,29 95,89	4,09 76,53	4,09 75,09	3,95 79,95	3,77/3,83 68,69
A	5,24/5,25 106,97	4,30 85,56	4,25 80,87	4,31 81,72	3,85/3,95 66,72
T	5,08 107,95	4,13 81,76	3,95 77,16	4,09 84,52	3,71/3,83 61,72
a	5,18 107,53	4,13 81,76	3,95 77,16	4,07 84,63	3,71/3,83 61,72
b	5,15 107,57	4,13 81,76	3,95 77,16	4,04 84,62	3,71/3,83 61,72

Tabelle 9.8: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A5b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,25 101,87	4,03 82,01	4,03 76,46	4,23 82,09	3,77/3,83 67,20
R- β	5,30 96,00	4,09 76,60	4,09 75,17	3,94 80,04	3,77/3,83 68,78
A	5,10/5,11 108,30	4,29 79,90	4,11 82,74	4,29 82,05	3,84/3,94 67,10
T	5,08 108,06	4,13 81,68	3,95 77,27	4,10 84,65	3,72/3,83 61,81
a	5,19 107,81	4,38 80,36	3,95 84,41	4,15 83,36	3,72/3,83 61,79
b	5,08 102,21	4,13 76,98	4,04 74,92	3,90 82,72	3,72/3,80 63,62

Tabelle 9.9: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A5c. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,26	4,03	4,02	4,23	3,77/3,85
	101,74	81,96	76,38	82,13	67,80
R- β	5,29	4,09	4,09	3,95	3,77/3,82
	95,80	76,60	75,01	79,85	69,05
A	5,19/5,20	4,17	4,15	4,20	3,82/3,87
	106,92	87,38	75,77	82,19	67,17
T	5,08	4,13	3,95	4,08	3,72/3,83
	107,97	81,70	77,12	84,55	61,75
a	5,21	4,39	3,95	4,19	3,72/3,83
	107,88	80,18	84,76	83,55	61,75
b	5,09	4,13	4,03	3,90	3,71/3,80
	102,24	76,97	74,84	82,66	63,60

Tabelle 9.10: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A6a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,24	4,03	4,04	4,22	3,76/3,83
	101,68	81,95	76,31	81,84	66,92
R- β	5,29	4,09	4,09	3,93	3,76/3,83
	95,82	76,52	75,00	79,87	68,35
A	5,09/5,10	4,28	4,11	4,30	3,83/3,94
	108,01	79,81	82,99	82,11	66,62
B	5,12	4,29	4,09	4,33	3,85/3,96
	107,98	79,63	83,00	82,38	66,84
T	5,08	4,13	3,94	4,10	3,71/3,83
	108,01	81,72	77,16	84,45	61,72
a	5,15	4,13	3,94	4,03	3,71/3,83
	107,76	81,72	77,16	84,50	61,72
b	5,15	4,13	3,94	4,03	3,71/3,83
	107,76	81,72	77,16	84,50	61,72

Tabelle 9.11: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A7a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,24 101,56	4,02 81,94	4,05 76,29	4,22 81,90	3,77/3,83 66,80
R- β	5,29 95,91	4,09 76,51	4,09 75,02	3,94 79,99	3,76/3,83 68,35
A	5,10/5,11 108,03	4,28 79,83	4,11 82,95	4,31 82,19	3,85/3,94 66,67
B	5,26 106,84	4,32 85,34	4,25 80,84	4,33 82,09	3,85/3,94 66,67
T	5,08 108,02	4,13 81,87	3,95 77,21	4,09 84,49	3,72/3,82 61,70
a	5,15 107,67	4,13 81,87	3,95 77,21	4,06 84,68	3,72/3,82 61,70
b	5,18 107,45	4,12 81,87	3,95 77,21	4,03 84,50	3,72/3,82 61,70
c	5,15 107,67	4,13 81,87	3,95 77,21	4,06 84,68	3,72/3,82 61,70

Tabelle 9.12: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A7b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,24 101,66	4,02 81,95	4,04 76,30	4,22 81,94	3,76/3,82 66,93
R- β	5,29 95,82	4,09 76,52	4,09 74,97	3,94 79,92	3,76/3,82 68,35
A	5,10/5,11 108,00	4,29 79,64	4,09 82,93	4,30 82,21	3,84/3,94 66,99
B	5,09 107,96	4,13 81,61	4,03 77,15	4,22 82,84	3,78/3,88 66,87
C	5,11 108,00	4,29 79,64	4,09 82,93	4,30 82,21	3,84/3,94 66,99
T	5,09 107,96	4,13 81,61	3,95 77,11	4,10 84,49	3,71/3,83 61,69
a	5,15 107,68	4,13 81,61	3,95 77,11	4,03 84,48	3,71/3,83 61,69
b	5,15 107,68	4,13 81,61	3,95 77,11	4,03 84,48	3,71/3,83 61,69

Tabelle 9.13: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A3a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
R- α	5,25	4,02	4,02	4,23	3,75/3,85
	101,79	81,96	76,50	81,98	67,49
R- β	5,29	4,09	4,08	3,94	3,75/3,83
	95,91	76,63	74,98	80,02	68,87
A	5,08/5,09	4,12	4,00	4,21	3,79/3,88
	108,14	81,51	77,36	83,00	67,40
T	5,08	4,12	3,94	4,08	3,71/3,83
	108,14	81,51	77,15	84,60	61,80

Tabelle 9.14: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A3b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
R- α	5,24	4,03	4,05	4,22	3,77/3,85
	101,67	82,11	76,27	81,89	66,97
R- β	5,29	4,09	4,09	3,94	3,78/3,82
	95,86	76,62	75,13	79,92	68,45
T	5,10/5,11	4,28	4,03	4,18	3,76/3,85
	108,02	79,77	82,74	83,73	61,65
a	5,16	4,13	3,94	4,03	3,72/3,82
	107,63	81,74	77,16	84,39	61,68

Tabelle 9.15: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A5d. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,24	4,02	4,04	4,22	3,76/3,83
	101,66	82,14	76,32	81,86	66,73
R- β	5,29	4,09	4,09	3,94	3,76/3,83
	95,87	76,48	75,03	79,91	68,44
A	5,10/5,11	4,28	4,11	4,30	3,84/3,95
	108,00	79,77	82,93	82,15	66,71
T	5,11	4,28	4,03	4,21	3,75/3,84
	108,00	79,77	82,78	83,86	61,62
a	5,15	4,13	3,94	4,03	3,72/3,82
	107,74	81,81	77,18	84,45	61,72
b	5,15	4,13	3,94	4,03	3,72/3,82
	107,74	81,81	77,18	84,45	61,72

Tabelle 9.16: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS A6b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
R- α	5,24	4,02	4,05	4,22	3,77/3,81
	101,73	82,16	76,26	81,87	67,00
R- β	5,29	4,09	4,09	3,94	3,77/3,82
	95,79	76,56	75,02	79,88	68,43
A	5,11/5,12	4,29	4,09	4,31	3,85/3,93
	108,04	79,76	82,96	82,27	67,04
B	5,09	4,13	4,04	4,23	3,79/3,88
	108,06	81,69	77,18	82,90	66,73
T	5,11	4,29	4,04	4,18	3,75/3,84
	108,04	79,76	82,65	83,80	61,63
a	5,15	4,13	3,94	4,03	3,72/3,82
	107,71	81,69	77,20	84,48	61,74
b	5,15	4,13	3,94	4,03	3,72/3,82
	107,71	81,69	77,20	84,48	61,74

Tabelle 9.17: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G2a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,26	3,87	3,94	4,23	4,12	3,70/3,82
	92,95	69,37	70,28	78,99	70,37	61,33
R- β	4,60	3,57	3,73	4,17	3,73	3,69/3,82
	97,05	72,77	73,85	77,88	74,92	61,33
T	4,58	3,58	3,65	3,90	3,68	3,76
	104,94	72,04	73,38	69,27	75,77	61,55

Tabelle 9.18: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G2b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,27	3,88	3,93	4,19	4,12	3,74/3,77
	92,91	69,42	70,38	79,12	70,53	61,60
R- β	4,60	3,56	3,73	4,13	3,72	3,74/3,77
	97,02	72,84	73,99	78,03	75,05	61,60
T	4,55	3,60	3,67	3,92	3,63/3,91	-
	105,22	72,12	73,10	69,01	67,14	-

Tabelle 9.19: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G2c. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	4,52	3,56	3,70	4,07	3,64/4,18	-
	97,36	72,68	73,07	79,15	66,30	-
R- β	5,25	3,88	3,94	4,12	3,94/4,01	-
	93,08	69,34	69,24	79,50	62,35	-
T	4,54/4,55	3,61	3,66	3,91	3,68	3,74/3,77
	105,17	71,71	73,19	69,20	75,76	61,57

Tabelle 9.20: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G3a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,27	3,89	3,93	4,22	4,12	3,74/3,79
	92,95	69,31	70,32	79,46	70,42	61,45
R- β	4,60	3,56	3,73	4,16	3,72	3,74/3,79
	97,05	72,85	73,98	78,47	75,07	61,45
A	4,63	3,66	3,78	4,17	3,72	3,79/3,83
	105,08	72,40	73,91	77,76	75,07	61,30
T	4,59	3,59	3,65	3,90	3,67	3,76
	104,94	72,02	73,36	69,27	75,81	61,50

Tabelle 9.21: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G3b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,27	3,87	3,94	4,23	4,12	3,74/3,79
	92,93	69,43	70,35	79,37	70,45	61,39
R- β	4,60	3,56	3,74	4,17	3,72	3,74/3,79
	97,02	72,83	73,96	78,40	75,08	61,39
A	4,63	3,65	3,76	4,13	3,72	3,79/3,82
	105,02	72,74	73,99	77,83	75,08	61,36
T	4,56	3,61	3,68	3,92	3,63/3,91	-
	105,17	72,06	72,99	68,99	67,12	-

Tabelle 9.22: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G3c. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,27	3,87	3,93	4,19	4,12	3,73/3,77
	92,92	69,41	70,42	79,36	70,58	61,57
R- β	4,60	3,56	3,73	4,13	3,72	3,73/3,77
	97,01	72,84	74,12	78,31	75,12	61,57
A	4,59/4,60	3,66	3,74	4,07	3,63/4,20	-
	105,21	72,55	73,14	78,87	66,75	-
T	4,57	3,62	3,65	3,91	3,68	3,77
	105,32	71,82	73,09	69,18	75,74	61,53

Tabelle 9.23: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G4a. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,27 92,96	3,87 69,41	3,94 70,31	4,23 79,40	4,12 70,44	3,74/3,79 61,51
R- β	4,60 97,04	3,56 72,83	3,76 74,01	4,17 78,39	3,72 75,14	3,74/3,79 61,51
A	4,64 105,01	3,67 72,82	3,78 74,06	4,13 78,03	3,72 75,14	3,79/3,83 61,43
B	4,61 105,08	3,67 72,39	3,74 73,03	4,07 78,86	3,63/4,20 66,72	- -
T	4,57 105,32	3,62 71,79	3,65 73,03	3,91 69,16	3,68 75,75	3,79 61,51

Tabelle 9.24: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS G4b. Die Struktur und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
R- α	5,27 93,14	3,87 69,83	3,96 70,48	4,22 79,59	4,12 70,62	3,74/3,79 61,53
R- β	4,60 97,13	3,56 72,86	3,73 74,20	4,16 78,63	3,73 75,11	3,74/3,79 61,53
A	4,64 105,20	3,68 73,14	3,77 73,98	4,19 77,95	3,73 75,11	3,79/3,85 61,42
B	4,61 105,08	3,60 72,01	3,66 73,32	3,94 69,35	3,88 74,55	3,92/4,03 70,11
T	4,44 104,24	3,51 71,45	3,64 73,35	3,92 69,34	3,69 75,88	3,77 61,66

Tabelle 9.25: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS FAA. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9	H10 C10
R- α	5,28 101,88	4,05 81,97	4,06 76,50	4,26 82,02	3,75/3,89 67,34	- -	- -	- -	- -	- -
R- β	5,31 95,94	4,11 75,08	4,11 76,66	3,98 80,02	3,75/3,86 68,68	- -	- -	- -	- -	- -
T	5,24 106,20	5,05 84,17	4,18 75,83	4,18 85,11	3,75/3,88 61,62	- -	- -	- -	- -	- -
F	- 127,14	7,08 111,93	- 148,22	- 148,73	6,85 116,16	7,04 124,21	7,52 147,60	6,24 114,06	- 168,74	3,82 56,34

Tabelle 9.26: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS FAAA. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt. nb = nicht bestimmt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9	H10 C10
R- α	5,26 101,65	4,03 82,01	4,08 76,41	4,24 81,91	3,81/3,88 66,76	- -	- -	- -	- -	- -
R- β	5,30 95,89	4,12 74,92	4,11 76,69	3,96 80,07	3,81/3,86 68,30	- -	- -	- -	- -	- -
T	5,34 106,11	5,20 82,03	4,26 80,70	4,27 84,43	3,80/3,90 61,24	- -	- -	- -	- -	- -
a	5,26 107,58	4,17 81,82	3,94 77,33	4,03 84,54	3,70/3,83 61,69	- -	- -	- -	- -	- -
F	- nb	7,28 111,96	- nb	- nb	6,88 116,85	7,18 124,73	7,71 148,02	6,40 113,68	- 169,21	3,88 56,52

Tabelle 9.27: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS FG. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9	H10 C10
R- α	5,26 92,94	3,87 69,45	3,90 70,31	4,13 79,74	4,07 70,46	3,73 61,68	- -	- -	- -	- -
R- β	4,57 97,05	3,55 72,92	3,71 73,85	4,07 78,65	3,66 75,01	3,73 61,68	- -	- -	- -	- -
T	4,55 105,18	3,60 71,94	3,66 73,35	3,96 69,23	3,88 73,38	4,30/4,42 64,28	- -	- -	- -	- -
F	- 126,97	7,21 111,78	- 148,76	- 149,90	6,88 116,52	7,13 124,45	7,62 147,44	6,34 114,18	- 169,84	3,87 56,41

Tabelle 9.28: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS CAA. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt. nb = nicht bestimmt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9
R- α	5,26 101,82	4,03 82,02	4,06 76,44	4,25 82,04	3,79/3,89 67,25	- -	- -	- -	- -
R- β	5,30 95,99	4,11 75,09	4,10 76,66	3,96 80,03	3,79/3,89 67,25	- -	- -	- -	- -
T	5,28/5,29 106,26	5,09 84,13	4,20 75,74	4,19 85,17	3,75/3,88 61,58	- -	- -	- -	- -
C	- nb	7,56 131,48	6,87 117,50	- nb	6,87 117,50	7,56 131,48	7,74 nb	6,39 nb	- 169,39

Tabelle 9.29: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS FFAAA. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt. nb = nicht bestimmt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9	H10 C10
R- α	5,13 102,38	3,93 82,64	3,91 77,31	4,13 82,01	3,62/3,80 67,95	- -	- -	- -	- -	- -
R- β	5,17 96,69	3,93 75,86	3,91 77,31	3,82 80,58	3,62/3,80 67,95	- -	- -	- -	- -	- -
A	5,05/5,06 106,37	5,02 84,31	4,20 76,14	4,21 83,64	3,73/3,87 66,53	- -	- -	- -	- -	- -
T	5,11 106,45	5,07 84,57	4,06 76,17	4,08 84,84	3,63/3,75 61,72	- -	- -	- -	- -	- -
F _A	- nb	7,20 111,56	- 149,02	nb nb	6,77 116,29	7,07 124,26	7,59 147,30	6,33 113,49	- nb	3,80 55,97
F _B	- nb	7,12 111,40	- 149,00	nb nb	6,77 116,32	6,99 124,13	7,54 147,32	6,27 113,42	- nb	3,78 55,97

Tabelle 9.30: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS 8-O-4-DFS(AA)₂. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt. nb = nicht bestimmt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9	H10 C10
R _A - α	5,10 102,38	3,92 82,61	3,86 77,51	4,09 81,88	3,55/3,74 67,47	-	-	-	-	-
R _A - β	5,15 96,29	3,90 76,14	4,05 77,52	3,79 80,57	3,55/3,74 67,47	-	-	-	-	-
T _A	4,95/4,96 105,72	5,01 84,98	3,94 76,09	4,04 85,18	3,50/3,59 61,84	-	-	-	-	-
F _A	- nb	7,40 113,53	- 148,42	- 149,66	6,77 115,65	7,17 125,84	7,43 129,31	- 137,09	- 163,42	3,65 55,41
F _B	- 129,85	7,42 112,06	- 149,97	- 148,57	6,80 114,10	7,12 122,93	7,64 148,34	6,46 116,03	- 167,28	3,94 56,14
T _B	5,05/5,06 105,96	5,02 84,55	4,06 76,05	4,07 84,81	3,62/3,75 61,80	-	-	-	-	-
R _B - α	5,13 102,42	3,92 82,61	3,91 77,41	4,12 81,90	3,64/3,80 67,41	-	-	-	-	-
R _B - β	5,16 96,32	3,90 76,14	4,07 77,09	3,83 80,59	3,64/3,80 67,41	-	-	-	-	-

Tabelle 9.31: Chemische Verschiebungen (oben ^1H , unten ^{13}C) des OS 5-5-DFS(AA)₂. Die Struktur und die Zuordnungen der Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.1 (Seite 181) gezeigt. nb = nicht bestimmt.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	H9 C9	H10 C10
R _A - α	5,14 102,37	3,94 82,67	3,92 77,39	4,14 81,95	3,62/3,80 68,75	-	-	-	-	-
R _A - β	5,17 96,30	3,93 76,22	4,04 77,12	3,84 80,67	3,62/3,80 68,75	-	-	-	-	-
T _A	5,05/5,06 106,18	5,01 84,33	4,05 76,28	4,09 84,88	3,63/3,75 61,94	-	-	-	-	-
F _A	- 122,81	7,10 108,45	- 151,85	- 149,91	- nb	7,27 126,66	7,67 148,66	6,28 111,14	- 168,17	3,80 55,80
F _B	- 122,81	7,10 108,45	- 151,85	- 149,91	- nb	7,27 126,66	7,67 148,66	6,28 111,14	- 168,17	3,80 55,80
T _B	5,05/5,06 106,18	5,01 84,33	4,05 76,28	4,09 84,88	3,63/3,75 61,94	-	-	-	-	-
R _B - α	5,14 102,37	3,94 82,67	3,92 77,39	4,14 81,95	3,62/3,80 68,75	-	-	-	-	-
R _B - β	5,17 96,30	3,93 76,22	4,04 77,12	3,84 80,67	3,62/3,80 68,75	-	-	-	-	-

9.4 MS²-Spektren der Standardsubstanzen

In den gezeigten MS²-Spektren sind lediglich Fragmente mit einer relativen Intensität über 5 % gezeigt.

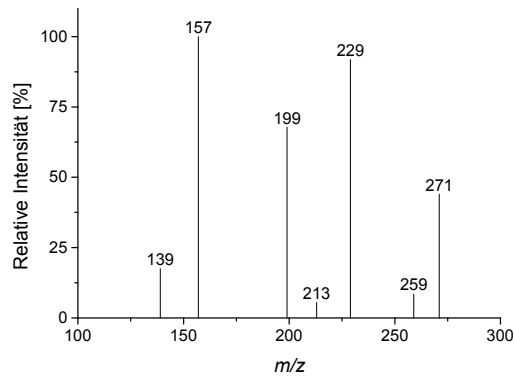


Abbildung 9.4: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 289) des Oligosaccharids A2a (Abbildung 9.2, Seite 182).

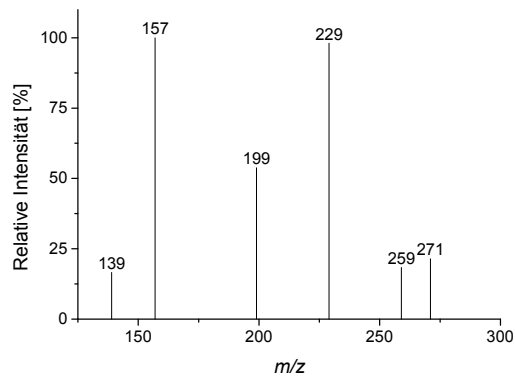


Abbildung 9.5: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 289) des Oligosaccharids A2b (Abbildung 9.2, Seite 182).

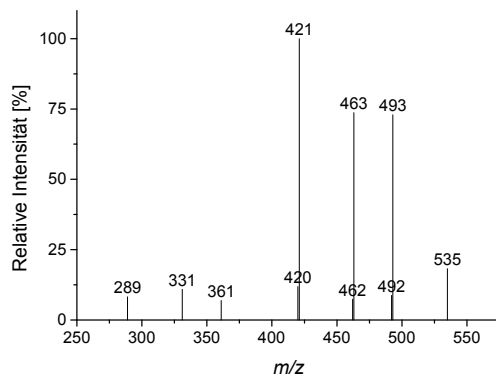


Abbildung 9.6: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 553) des Oligosaccharids A4a (Abbildung 9.2, Seite 182).

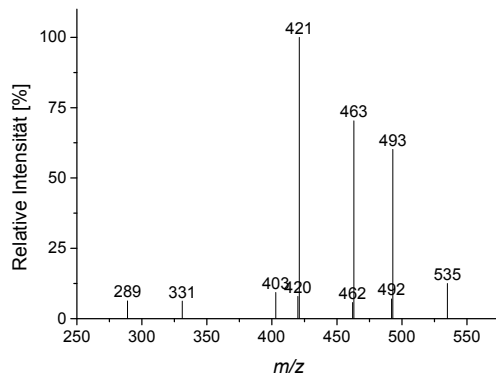


Abbildung 9.7: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 553) des Oligosaccharids A4b (Abbildung 9.2, Seite 182).

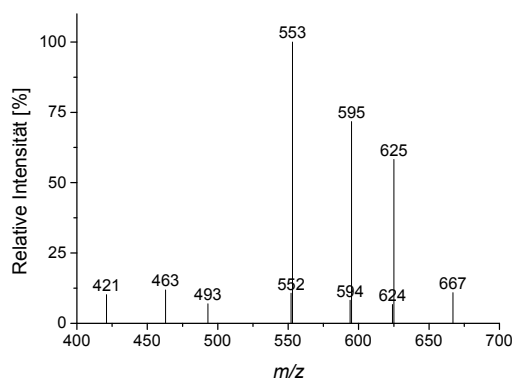


Abbildung 9.8: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 685) des Oligosaccharids A5a (Abbildung 9.2, Seite 182).

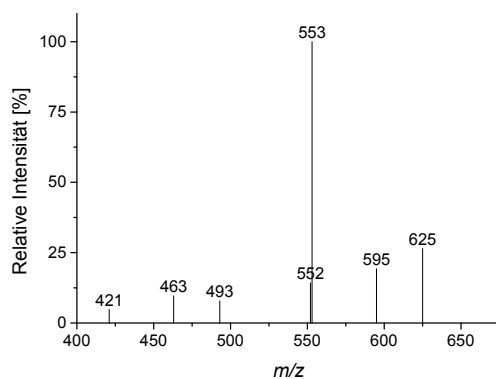


Abbildung 9.9: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 685) des Oligosaccharids A5b (Abbildung 9.2, Seite 182).

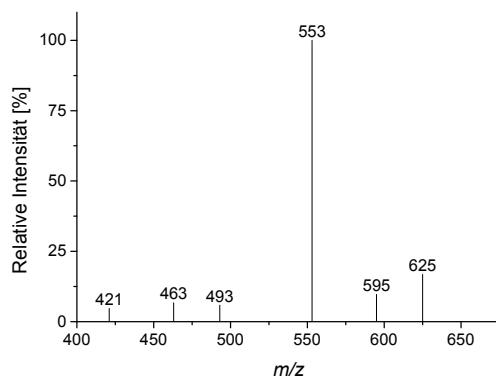


Abbildung 9.10: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 685) des Oligosaccharids A5c (Abbildung 9.2, Seite 182).

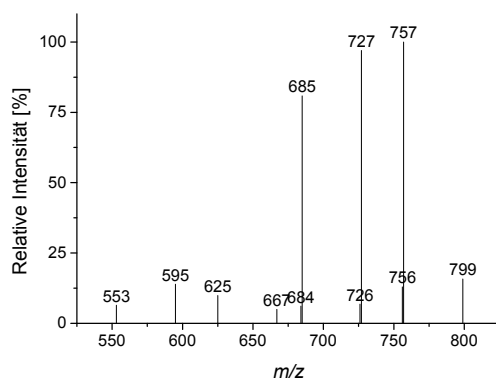


Abbildung 9.11: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 817) des Oligosaccharids A6a (Abbildung 9.2, Seite 182).

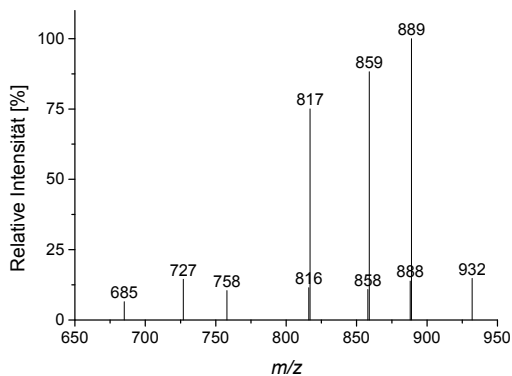


Abbildung 9.12: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 949) des Oligosaccharids A7a (Abbildung 9.2, Seite 182).

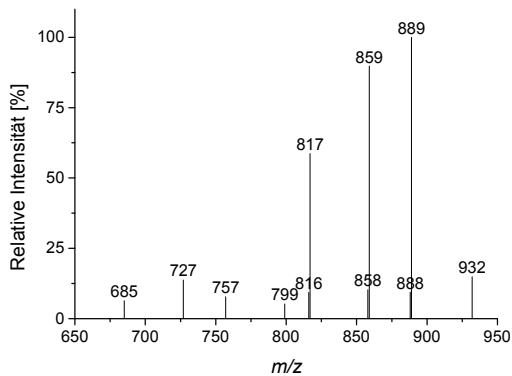


Abbildung 9.13: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 949) des Oligosaccharids A7b (Abbildung 9.2, Seite 182).

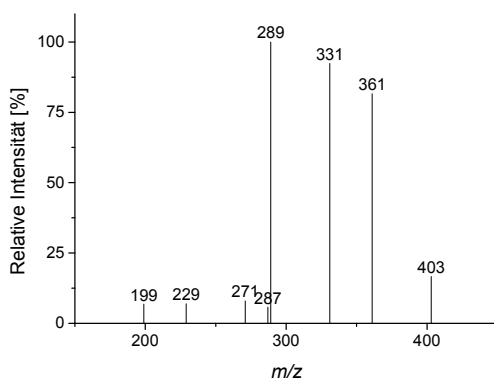


Abbildung 9.14: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 421) des Oligosaccharids A3a (Abbildung 9.3, Seite 183).

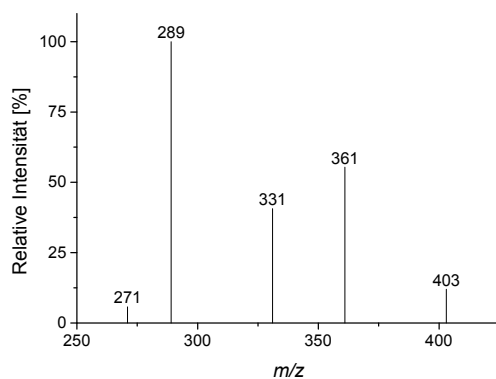


Abbildung 9.15: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 421) des Oligosaccharids A3b (Abbildung 9.3, Seite 183).

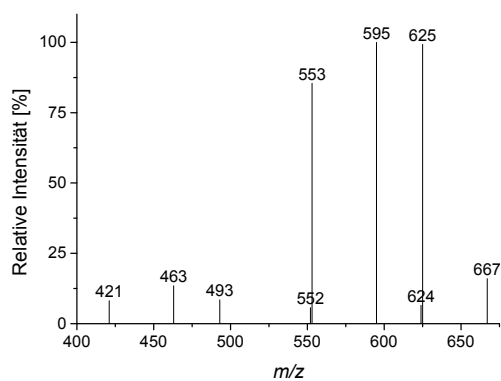


Abbildung 9.16: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 685) des Oligosaccharids A5d (Abbildung 9.3, Seite 183).

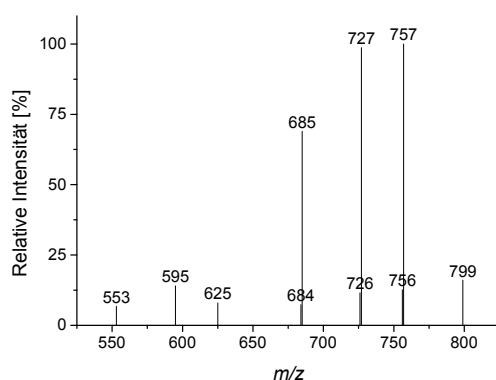


Abbildung 9.17: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 817) des Oligosaccharids A6b (Abbildung 9.3, Seite 183).

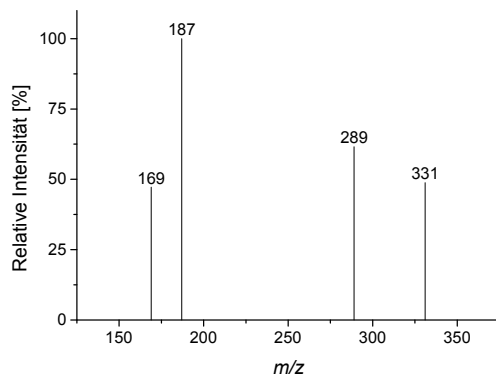


Abbildung 9.18: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 349) des Oligosaccharids G2a (Abbildung 9.3, Seite 183).

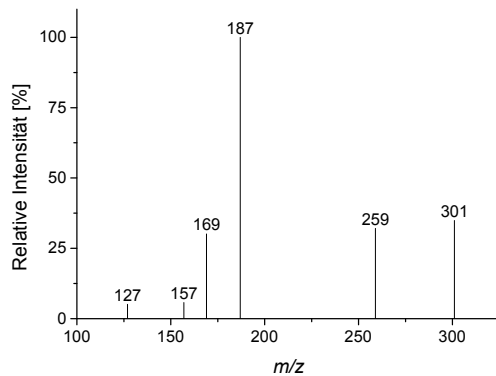


Abbildung 9.19: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 319) des Oligosaccharids G2b (Abbildung 9.3, Seite 183).

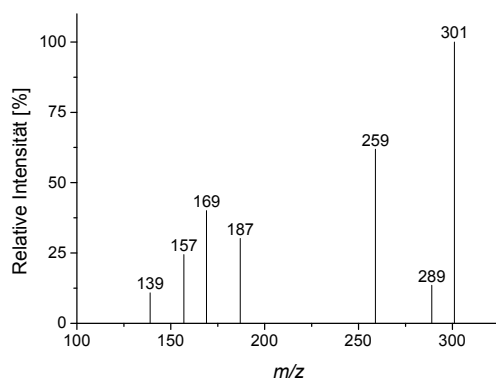


Abbildung 9.20: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 319) des Oligosaccharids G2c (Abbildung 9.3, Seite 183).

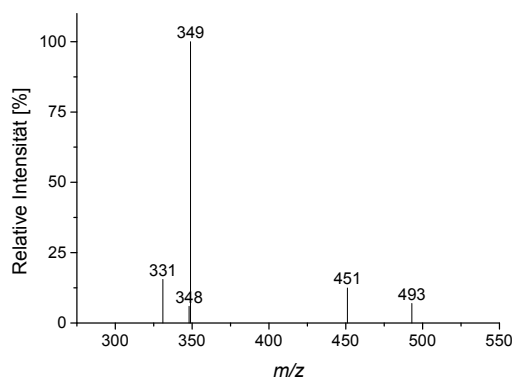


Abbildung 9.21: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 511) des Oligosaccharids G3a (Abbildung 9.3, Seite 183).

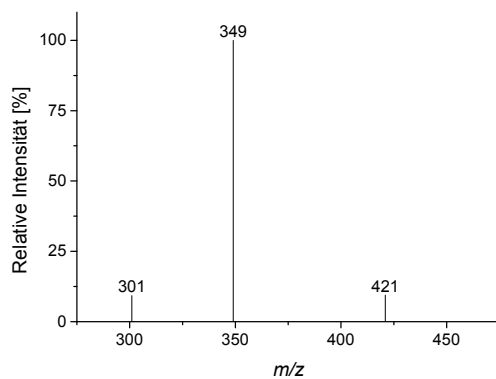


Abbildung 9.22: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 481) des Oligosaccharids G3b (Abbildung 9.3, Seite 183).

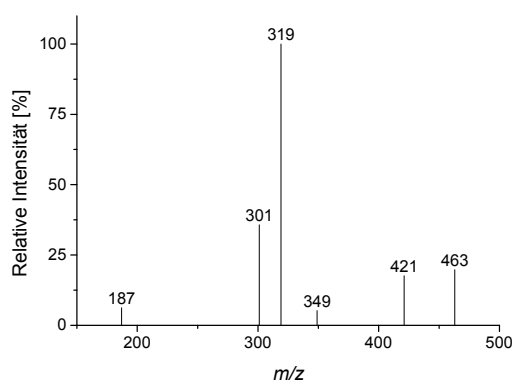


Abbildung 9.23: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 481) des Oligosaccharids G3c (Abbildung 9.3, Seite 183).

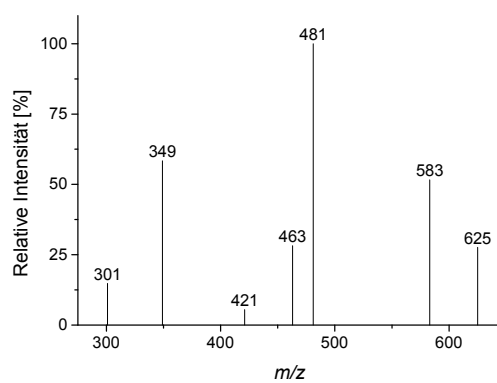


Abbildung 9.24: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 643) des Oligosaccharids G4a (Abbildung 9.3, Seite 183).

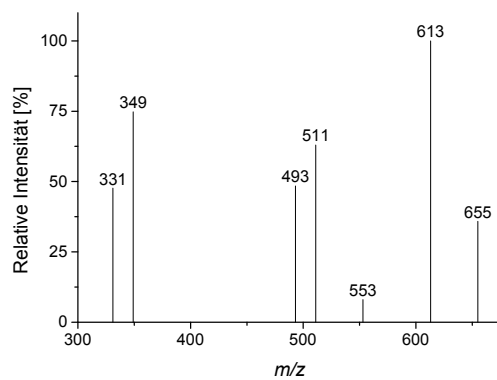


Abbildung 9.25: MS²-Spektrum des Lithiumaddukts (m/z 673) des Oligosaccharids G4b (Abbildung 9.3, Seite 183).

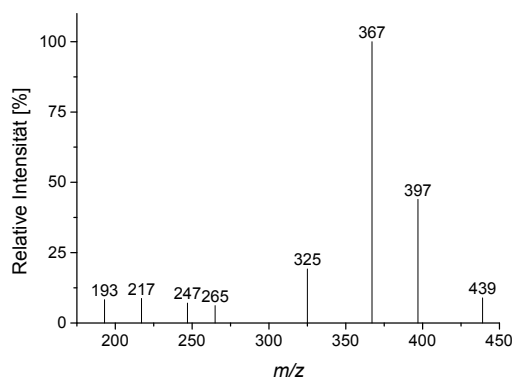


Abbildung 9.26: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküliions (m/z 457) des Ferulasäure-Oligosaccharids FAA (Abbildung 9.1, Seite 181).

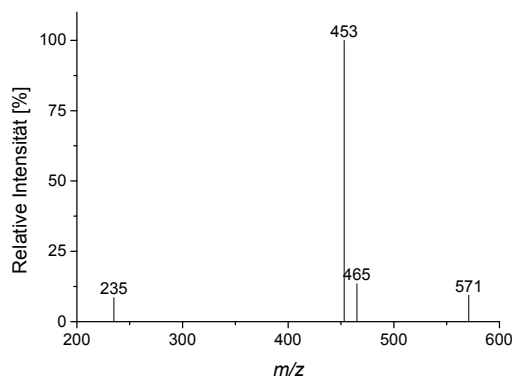


Abbildung 9.27: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküliions (m/z 589) des Ferulasäure-Oligosaccharids FAAA (Abbildung 9.1, Seite 181).

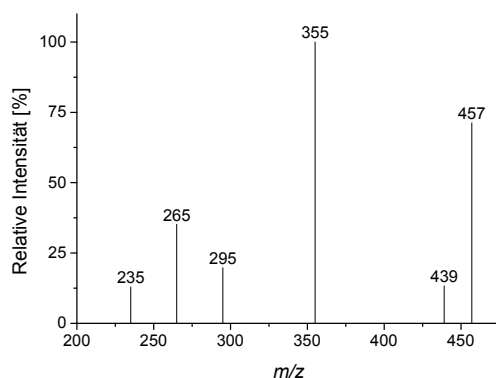


Abbildung 9.28: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküliions (m/z 517) des Ferulasäure-Oligosaccharids FG (Abbildung 9.1, Seite 181).

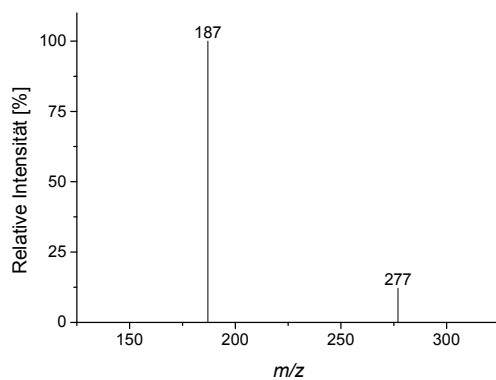
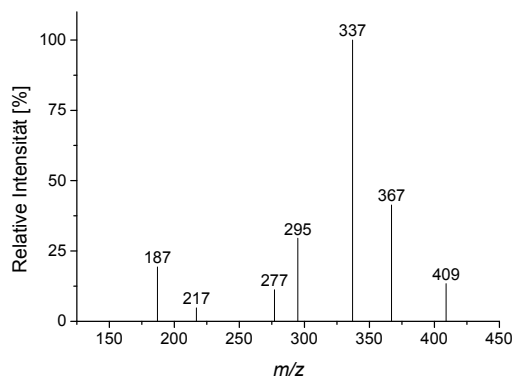


Abbildung 9.29: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküls (m/z 427) des *para*-Cumarsäure-Oligosaccharids CAA (Abbildung 9.1, Seite 181, oben) und MS³-Spektrum des Fragmentations m/z 295 (unten).

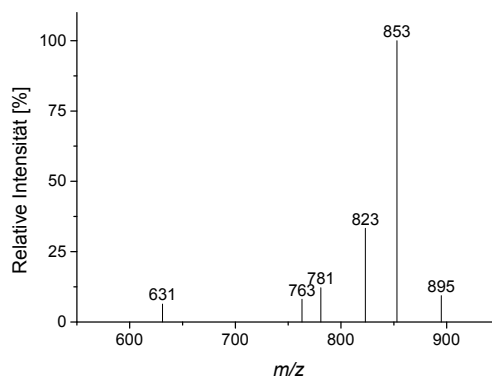


Abbildung 9.30: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküls (m/z 913) des Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharids 8-O-4-DFS(AA)₂ (Abbildung 9.1, Seite 181).

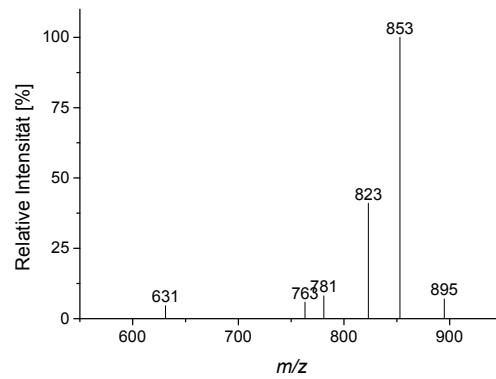


Abbildung 9.31: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküliions (m/z 913) des Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharids 5-5-DFS(AA)₂ (Abbildung 9.1, Seite 181).

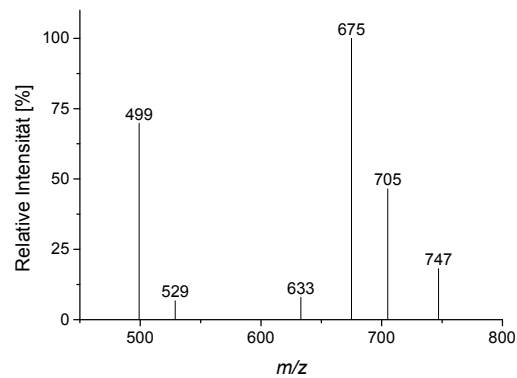


Abbildung 9.32: MS²-Spektrum des deprotonierten Quasimoleküliions (m/z 765) des Ferulasäure-Oligosaccharids FFAAA (Abbildung 9.1, Seite 181).

9.5 Zur Konzentrationsbestimmung verwendete NMR-Signale

Tabelle 9.32: Zur Konzentrationsbestimmung der Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide verwendete Signale im ^1H -NMR-Spektrum. Die Strukturen der Oligosaccharide und die Zuordnungen der Monosaccharid-Einheiten zu den Deskriptoren sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) und Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Oligosaccharid	Verwendetes Signal
A2a	TH1
A2b	TH1
A4a	aH1
A4b	AH1 + aH1
A5a	TH1
A5b	aH1
A5c	aH2
A6a	aH1 + bH1
A7a	RH1 α + RH1 β + BH1
A7b	aH1 + bH1
A3a	AH1 + TH1
A3b	aH1
A5d	aH1 + bH1
A6b	aH1 + bH1
G2a	RH1 α + RH1 β + TH1
G2b	TH1
G2c	RH1 α + RH1 β + TH1
G3a	RH1 α + RH1 β + AH1 + TH1
G3b	AH1
G3c	RH1 α + RH1 β + AH1 + TH1
G4a	RH1 α + RH1 β + AH1 + BH1 + TH1
G4b	TH1

9.6 HPLC-MS Retentionszeiten der Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide

Tabelle 9.33: Porous Graphitized Carbon-HPLC Retentionszeiten und m/z -Werte der Quasimolekülen der Arabinan- und Galactan-Oligosaccharide. Die Strukturen der Oligosaccharide sind in Abbildung 9.2 (Seite 182) und Abbildung 9.3 (Seite 183) gezeigt.

Oligosaccharid	Retentionszeit	m/z [M+Li] ⁺
Raffinose	14,05	511
A2a	4,60	289
A2b	5,90	289
A4a	15,45	553
A4b	15,80	553
A5a	17,98	685
A5b	19,45	685
A5c	18,55	685
A6a	22,70	817
A7a	23,70	949
A7b	24,20	949
A3a	10,80	421
A3b	9,85	421
A5d	19,00	685
A6b	22,70	817
G2a	5,19	349
G2b	5,05	319
G2c	3,95	319
G3a	9,69	511
G3b	9,41	481
G3c	9,26	481
G4a	12,50	643
G4b	13,02	673

9.7 Relative Responsefaktoren der NMR-Markersignale

Tabelle 9.34: Relative Responsefaktoren (RRF) der Arabinan- und Galactan-HSQC-Markersignale.

Signal-Nr.	RRF	RRF zu Signal 1 V2
1	1,000	1,000
2	1,052	0,861
3	1,338	1,038
4	1,209	1,005
5	1,056	0,928
6	1,456	1,277
7	1,494	1,030
8	1,145	1,113
9	0,868	0,845
10	0,854	0,648
11	0,749	-
12	0,682	-
13	0,935	-
14	0,971	-
15	1,000	-
16	1,150	-

9.8 Unterschiede zwischen Signal 1 und Signal 1 V2

Wie in Abbildung 9.33 am Beispiel zweier AN-OS gezeigt, werden O5-/1,5-substituierte Araf-Einheiten in komplexen AN-OS durch die Verwendung des HSQC-Markersignals Signal 1 V2 überbestimmt. Die in Oligosaccharid B enthaltene Seitenkette wurde bereits von ERIKSSON ET AL. (1996) beschrieben.

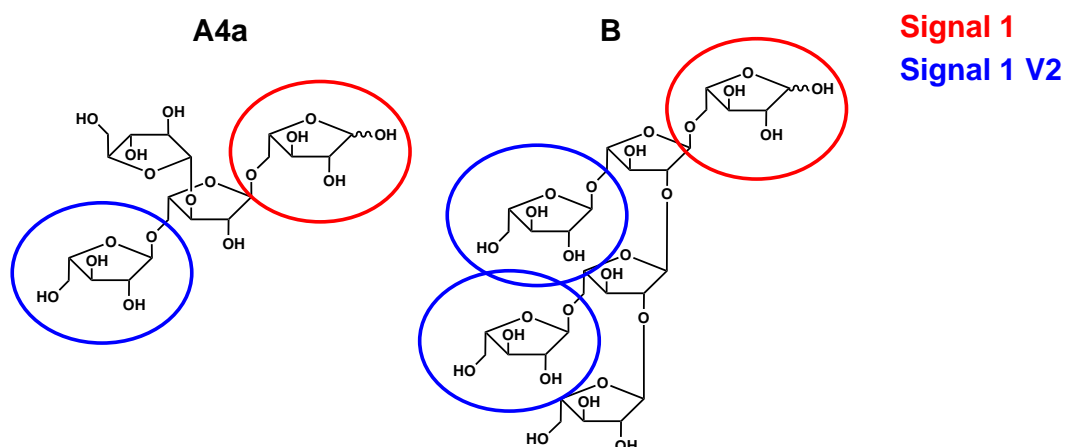


Abbildung 9.33: Durch die Verwendung der HSQC-Markersignale Signal 1 (rot) und Signal 1 V2 als O5-/1,5-substituierte Araf-Einheiten detektierte Araf-Einheiten.

9.9 Retentionszeiten der Hydroxyzimtsäure- und Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide

Tabelle 9.35: HPLC-MS-Retentionszeiten und m/z -Werte der Hydroxyzimtsäure- und Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide. Die Strukturen der Oligosaccharide sind in Abbildung 9.1 auf Seite 181 gezeigt.

Oligosaccharid	Retentionszeit	m/z [M-H] ⁻
FAA	14,6	457
FAAA	13,3	589
FGG	13,8	517
CAA	11,9	427
8-O-4-DFS(AA) ₂	24,2	913
5-5-DFS(AA) ₂	23,5	913
FFAAA	25,8	765

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Daniel Wefers
Geburtsdatum	07.12.1986
Geburtsort	Tettnang
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

09/1993 - 07/1997	Grundschule Weststadt, Ravensburg
09/1997 - 06/2006	Albert-Einstein-Gymnasium, Ravensburg
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

09/2006 - 05/2007	Seniorenzentrum Weststadt, Ravensburg
-------------------	---------------------------------------

Hochschulbildung

10/2007 - 12/2011	Studium der Lebensmittelchemie (Karlsruher Institut für Technologie)
01/2012 - 07/2012	Diplomarbeit am Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie (Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler) Thema: Substrat- und Speziesunterschiede der Catechol-O-Methyltransferase
Abschluss	Diplom-Lebensmittelchemiker

Promotion

08/2012 - 02/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Phytochemie (Arbeitskreis Prof. Dr. Mirko Bunzel)

Mitgliedschaft in Verbänden

Seit 07/2012 Gesellschaft Deutscher Chemiker (Fachgruppe Lebensmittelchemische Gesellschaft)

Seit 04/2014 American Association of Cereal Chemists International

Stipendien

10/2014 Kongressreisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

10/2014 Reisestipendium des Institut Danone Ernährung für Gesundheit

09/2015 Raymond J. Tarleton Graduate Student Fellowship (AACC International)

10/2015 Kongressreisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

04/2016 Zuschuss für Auslandsaufenthalt (Karlsruhe House of Young Scientists)

11 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Pfeiffer, E., Wefers, D., Hildebrand, A. A., Fleck, S. C., Metzler, M., 2013. Catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone are poor substrates but potent inhibitors of catechol-O-methyltransferase. *Mycotoxin Res.*, 29, 177-183.

Wefers, D., Tyl, C. E., Bunzel, M., 2014. Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Front. Chem.*, 2, 100.

Hildebrand, A., Kohn, B., Pfeiffer, E., Wefers, D., Metzler, M., Bunzel, M., 2015. Conjugation of the mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in tobacco suspension cells. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 4728-4736.

Wefers, D., Gmeiner, B. M., Tyl, C. E., Bunzel, M., 2015. Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.). *Phytochemistry*, 116, 320-328.

Wefers, D., Tyl, C. E., Bunzel, M., 2015. Neutral pectin side chains of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) contain long, partially branched arabinans and short galactans, both with terminal arabinopyranoses. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 707-715.

Wefers, D., Tyl, C. E., Bunzel, M., 2015. Pectic arabinans in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* WILLD.) are acylated with *p*-coumaric acid. *Cereal Chem.*, 92, 401-404.

Wefers, D., Bunzel, M., 2015. Characterization of dietary fiber polysaccharides from dehulled, common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Cereal Chem.*, 92, 598-603.

Vorträge auf Fachtagungen

Wefers, D., Schmitt, D., Nguyen, L., Bunzel, M. Charakterisierung der neutralen Pektinseitenketten aus Amaranth. LChG Regionalverbandstagung Südwest, 10. - 11.03.2014, Neustadt an der Weinstraße.

Wefers, D., Gmeiner, B., Schmitt, D., Nguyen, L., Tyl, C., Bunzel, M. Structural characterization of feruloylated and non-feruloylated dietary fiber polysaccharides from amaranth and quinoa. AACC International Annual Meeting, 05. - 08.10.2014, Providence, RI, USA.

Wefers, D., Bunzel, M. Neue Ansätze zur Analyse von Nicht-Stärke-Polysacchariden aus dikotylen Pflanzen. 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. - 16.09.2015, Karlsruhe.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Wefers, D., Pfeiffer, E., Metzler, M. Substrat- und Speziesunterschiede der Catechol-O-Methyltransferase. LChG Regionalverbandstagung Südwest, 19. - 20.03.2013, Karlsruhe.

Pfeiffer, E., Wefers, D., Hildebrand, A. A., Fleck, S. C., Metzler, M. Inhibition of catechol-O-methyltransferase by genotoxic catechol metabolites of zearalenone. 35th Mycotoxin Workshop, 22. - 24.05.2013, Ghent, Belgien.

Wefers, D., Gmeiner, B., Schmitt, D., Nguyen, L., Bunzel, M. Vergleich der Ballaststoffzusammensetzung der Pseudocerealien Amaranth, Quinoa und Buchweizen. 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 22. - 24.09.2014, Gießen.

Wefers, D., Schendel, R. R., Schäfer, J., Bunzel, M. Comparative analysis of the composition of amaranth, quinoa, and buckwheat dietary fiber. 6th Dietary Fibre Conference, 01. - 03.06.2015, Paris, Frankreich.

Wefers, D., Schneider, D., Bunzel, M. Charakterisierung von Pektin-Polysacchariden aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie. 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14. - 16.09.2015, Karlsruhe.

Wefers, D., Bunzel, M. Novel chromatographic and spectroscopic profiling approaches to characterize pseudocereal non-starch polysaccharides. AACC International Annual Meeting 18. - 21.10.2015, Minneapolis, MN, USA.

12 Danksagung

Ein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Mirko Bunzel für die Überlassung des interessanten Themas und die großartige Betreuung dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm für die kompetente und vielseitige Unterstützung bedanken, die mich sowohl wissenschaftlich als auch menschlich geprägt hat.

Prof. Dr. Burkhard Luy danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Catrin Tyl möchte ich dafür danken, dass sie durch Aufnahme der NMR-Spektren in der Anfangszeit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei meinen Diplomand_Innen Lillie Nguyen, David Schmitt, Bianca Gmeiner, Carolin Schlag, Anke Krause, Dominic Schneider und Ramona Flörchinger möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die vielseitigen Erfahrungen, die wir zusammen gemacht haben, bedanken.

Erika Pfeiffer und Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler danke ich dafür, dass sie während meiner Diplomarbeit den Grundstein für meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten gelegt haben.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des AK Bunzel möchte ich mich für jegliche aktive und passive Hilfe und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Dabei danke ich besonders Judith Schäfer, Dr. Andreas Hildebrand und Rachel Schendel, die mich von Anfang an begleitet und durch gute Gespräche, tolle Erlebnisse, nützliche Ratschläge und stete Hilfsbereitschaft unterstützt haben. Auch unserem zeitweisen Adoptivmitglied Dr. Ann Liza Piberger danke ich für das viele geteilte Leid und für die vielen nützlichen Ratschläge.

Den "neuen" Doktoranden Martin Waterstraat, Felix Urvat, Beate Kohn, Andreas Becker und Svenja Ackermann, meinen Mit-Ravensburgern Bettina Fischer und PD Dr. Beate Köberle sowie allen anderen Mitgliedern des AK Hartwig danke ich für die Abwechslung und den vielen Spaß während und außerhalb der Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch den vielen anderen tollen Menschen, die mir in Karlsruhe und andernorts so viele schöne Momente beschert haben.

Meinen Eltern sowie meiner gesamten Familie danke ich für die Ermöglichung dieses Lebenswegs sowie für die vielseitige Unterstützung in jeder Lebenslage.

Besonders Hannah danke ich für ihr stetes Verständnis sowie ihre große Geduld und Unterstützung.