

# **Entwicklung und Anwendung analytischer Verfahren zur Strukturcharakterisierung von Ballaststoffpolymeren aus Beerenobst**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

**Jan Lukas Steck**

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2020



„Ein **Hoch** auf die Kissenschlacht!“

- Pete, eine Figur von Ralph Ruthe





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
a. Beerenobst: Einordnung der ausgewählten Früchte.....	2
I. Die Apfelfrucht der <i>Aronia melanocarpa</i> - Aroniabeere.....	3
II. Die Beerenfrucht der <i>Vaccinium macrocarpon</i> - Cranberry.....	3
III. Die Sammelsteinfrucht der <i>Rubus idaeus</i> - Himbeere.....	4
IV. Die Beerenfrucht der <i>Ribes rubrum</i> - Rote Johannisbeere.....	4
b. Die pflanzliche Zellwand.....	5
I. Die Architektur und Funktion der Zellwand.....	5
II. Zellwandtypen.....	5
III. Grundbausteine.....	6
IV. Das Cellulose-Xyloglucan-Netzwerk.....	7
c. Der Aufbau von Xyloglucanen.....	9
I. Die Beschaffenheit und Phylogenie der Xyloglucanseitenketten.....	9
II. Funktionelle Aspekte der Xyloglucansubstituenten.....	11
III. Xyloglucanseitenketten lebensmittelrelevanter Pflanzen.....	12
IV. Die Biosynthese von Xyloglucanen.....	13
V. Aufklärung von Xyloglucanstrukturen mittels enzymatischer Hydrolyse.....	14
d. Weitere Zellwandkomponenten und assoziierte Verbindungen.....	15
I. Pektine.....	15
II. Lignin.....	16
III. Proanthocyanidine.....	18
e. Zellwandkomponenten und assoziierte Verbindungen in der Ernährung.....	20
I. Als Ballaststoffe.....	20
II. Als Antioxidantien.....	21
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
a. Beschreibung und Aufarbeitung des Probenmaterials.....	26
I. Aufarbeitung der Früchte und Fraktionierung der Gewebe.....	26
II. Isolierung und Quantifizierung von Ballaststofffraktionen.....	28
b. Charakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide.....	29
I. Freisetzung von Monosacchariden durch Säurehydrolysen.....	29
II. Verfahren zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	30
III. Bestimmung der Monosaccharidbindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse.....	31
c. Entwicklung einer Profilingmethode für Xyloglucane.....	34
I. Auswahl und Aufarbeitung xyloglucanreicher Ausgangsmaterialien.....	35
II. Gewinnung von Xyloglucanoligosacchariden als Standardsubstanzen.....	37
III. Strukturauflklärung der isolierten Standardsubstanzen.....	38
IV. Quantifizierung und Bestimmung der relativen Responsefaktoren.....	43
V. Anwendung der Profilingmethode und Implementierung der HPAEC-PAD/MS.....	44
d. Ligninanalytik.....	46
I. Bestimmung der Ligningehalte.....	46
II. Charakterisierung der Ligninstrukturen.....	47
e. Analyse von Proanthocyanidinen.....	49
I. Gehaltsbestimmung der Proanthocyanidine.....	49
II. Charakterisierung der Proanthocyanidinstrukturen.....	50

<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>53</b>
a. Aufarbeitung und Fraktionierung der Früchte .....	53
I. Kennzahlen der Früchte und Samen.....	53
II. Fraktionierung der Früchte .....	55
b. Bestimmung der Ballaststoffgehalte.....	56
I. Die Ballaststoffgehalte der Beerenobstsorten .....	56
II. Die Ballaststoffgehalte der Fruchtwewebe und Samen.....	58
c. Charakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide in Beerenobstsorten .....	60
I. Die Polysaccharidstrukturen der Aroniabeere.....	63
II. Die Polysaccharidstrukturen der Cranberry .....	68
III. Die Polysaccharidstrukturen der Himbeere.....	72
IV. Die Polysaccharidstrukturen der Roten Johannisbeere .....	76
d. Entwicklung und Anwendung einer Profilingmethode für Xyloglucane aus pflanzlichen Lebensmitteln .....	79
I. Isolierung der Xyloglucanoligosaccharid-Standardsubstanzen.....	80
II. Strukturaufklärung der Xyloglucanoligosaccharidstandardsubstanzen - Monosaccharidzusammensetzung .....	84
III. Strukturaufklärung der Xyloglucanoligosaccharidstandardsubstanzen - Massenspektrometrie.....	84
IV. Strukturaufklärung der Xyloglucanoligosaccharidstandardsubstanzen - NMR-Spektroskopie.....	85
V. Bestimmung der relativen Responsefaktoren in der HPAEC-PAD .....	93
VI. Optimierung und Evaluation der XG-Profilingmethode.....	96
VII. Die Xyloglucanstrukturen der ausgewählten Beerenobstsorten .....	99
e. Charakterisierung assoziierter phenolischer Polymere in den Samen der Beerenobstsorten .....	108
I. Bestimmung des Ligningehalts .....	108
II. Analyse der Ligninstrukturen .....	109
III. Bestimmung des Gehalts an Proanthocyanidinen.....	113
IV. Analyse der Proanthocyanidinstrukturen.....	115
f. Zusammenfassende Diskussion.....	122
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>7. Chemikalien und Instrumente .....</b>	<b>146</b>
<b>8. Arbeitsvorschriften.....</b>	<b>154</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>170</b>
<b>10. Publikationsliste .....</b>	<b>218</b>



# Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b> Afzelechin	<b>HG</b> Homogalacturonan
<b>AACC</b> <i>American Association of Cereal Chemists</i>	<b>HILIC</b> Hydrophile Interaktionschromatographie
<b>ABSL</b> Acetylbromidlösliche Lignin	<b>HMBC</b> <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>AG</b> Arabinogalactan	<b>HPAEC-PAD</b> <i>High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
<b>AGP</b> Arabinogalactan-Proteinen	<b>HPLC</b> Hochleistungs-Flüssigchromatographie
<b>AOAC</b> <i>Association of Official Analytical Chemists</i>	<b>HSQC</b> <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>Api</b> Apiose	<b>IC</b> Ionenchromatographie
<b>Ara</b> Arabinose	<b>LBS</b> Lösliche Ballaststoffe
<b>AUR</b> Alkoholunlöslicher Rückstand	<b>LOD</b> <i>Limit of Detection</i>
<b>BuOH</b> Butanol	<b>LOQ</b> <i>Limit of Quantification</i>
<b>C</b> Catechin	$m/z$ Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<b>CAZy</b> <i>Carbohydrate Active enZymes</i>	<b>MALDI</b> <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
<b>CD</b> <i>Conductivity Detector</i>	<b>Man</b> Mannose
<b>CG</b> Catechingallat	<b>MS</b> Massenspektrometrie
<b>CSLC</b> <i>Cellulose Synthase-like C</i>	<b>NEPA</b> Nicht-Extrahierbare Proanthocyanidine
<b>D1</b> Relaxationsdelay	<b>NLBS</b> Niedermolekulare Lösliche Ballaststoffe
<b>DAD</b> <i>Dioden-Array-Detection</i>	<b>NMR</b> <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>DMSO</b> Dimethylsulfoxid	<b>OPC</b> Oligomere Procyanidine
<b>DP</b> <i>Degree of Polymerization</i>	<b>p</b> Pyranose
<b>DS</b> <i>Degree of Substitution</i>	<b>PA</b> Proanthocyanidine
<b>DW</b> Trockengewicht	<b>PGC</b> <i>Porous Graphitic Carbon</i>
<b>EA</b> Epiafzelechin	<b>PMAA</b> Partiiell methylierte Alditolacetate
<b>EC</b> Epicatechin	<b>RG</b> Rhamnogalacturonan
<b>ECG</b> Epicatechingallat	<b>Rha</b> Rhamnose

<b>EGC</b> Epigallocatechin	<b>RI</b> <i>Refractive Index</i>
<b>EI</b> Elektronenstoßionisation	<b>RP</b> <i>Reversed Phase</i>
<b>ELSP</b> <i>Evaporative Light Scattering Detection</i>	<b>RRF</b> Relativen Responsefaktoren
<b>EPA</b> Extrahierbare Proanthocyanidine	<b>RRT</b> Relativen Retentionszeiten
<b>ESI</b> Elektronen-Spray-Ionisation	<b>S</b> Syringyl
<b>EtOH</b> Ethanol	<b>SIM</b> <i>Selected Ion Monitoring</i>
<b>EtSH</b> Ethanthiol	<b>SIXST</b> Xyloglucanarabinofuranosyltransferase
<b>f</b> Furanose	<b>T<sub>1</sub></b> Longitudinale Relaxationszeit
<b>FID</b> Flammenionisations-Detektion	<b>TFA</b> Trifluoressigsäure
<b>Fuc</b> Fucose	<b>THL</b> Finnische Institut für Gesundheit und Wohlstand
<b>FUT1</b> Xyloglucanfucosyltransferase	<b>TIC</b> <i>Total Ion Chromatogram</i>
<b>FW</b> Frischgewicht	<b>TMS</b> Trimethylsilyl
<b>G</b> Guaiacyl	<b>TOCSY</b> <i>Total Correlated Spectroscopy</i>
<b>Gal</b> Galactose	<b>TOF-MS</b> <i>Time of Flight Mass Spectrometry</i>
<b>GalA</b> Galacturonsäure	<b>UBS</b> Unlösliche Ballaststoffe
<b>GallC</b> Gallocatechin	<b>UDP</b> Uridindiphosphat
<b>GC</b> Gaschromatographie	<b>UHPLC</b> Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie
<b>GDP</b> Guanosindiphosphat	<b>USDA</b> US-amerikanisches Landwirtschaftsministerium
<b>GH</b> Glycosylhydrolasen	<b>UV/VIS</b> Ultraviolettes und sichtbares Licht
<b>Glc</b> Glucose	<b>XEG</b> Xyloglucanspezifische <i>endo</i> -β-(1→4)-Glucanase
<b>GlcA</b> Glucuronsäure	<b>XGO</b> Xyloglucanoligosaccharide
<b>GPC</b> Gelpermeations-chromatographie	<b>XLT2</b> <i>Xyloglucan L-Sidechain-Galactosyltransferase Position 2</i>
<b>GSE</b> Weinbeersamen-Äquivalente	<b>XXT</b> Xyloglucanxylosyltransferase
<b>H</b> Hydroxyphenyl	<b>XyG</b> Xyloglucane
<b>H2BC</b> <i>Heteronuclear 2-Bond Correlation</i>	<b>Xyl</b> Xylose



# 1. Einleitung

Beerenfrüchte sind beliebte pflanzliche Lebensmittel. Wegen ihrer Süße, der ansprechenden kräftigen Färbung und der - allgemein positiv bewerteten - bioaktiven Inhaltsstoffe, werden sie in großen Mengen konsumiert: frisch (direkt vom Erzeuger, vom Markt oder aus dem Einzelhandel), prozessiert (getrocknete, gefrorene, pürierte oder versaftete Früchte) sowie in Produkten verarbeitet (Eiscremes, Konfitüren, Backwaren, Zerealien oder alkoholische Getränke). Beerenobst wird eine Reihe gesundheitlich positiver Eigenschaften zugesprochen: Förderung der kardiovaskulären Gesundheit, Reduktion von oxidativem Stress, antiinflammatorische Effekte, Schutz vor Infektionen und Krebsentstehung (Basu *et al.*, 2010). Begründet werden diese Effekte mit dem hohen Gehalt an bioaktiven Pflanzenstoffen wie organischen Säuren, Vitaminen, Mikronährstoffen und Polyphenolen (Szajdek & Borowska, 2008; Nile & Park, 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Augenmerk auf eine weniger geläufige, dennoch nicht weniger gesundheitsrelevante Fraktion der pflanzlichen Lebensmittelinhaltsstoffe gelegt werden – die Ballaststoffe. Vier ausgewählte Beerenobstsorten, die sowohl roh als auch verarbeitet verzehrt werden, sollen bezüglich ihrer Ballaststoffkomponenten untersucht werden: die Aroniabeere (*Aronia melanocarpa*), die Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), die Himbeere (*Rubus idaeus*) und die Rote Johannisbeere (*Ribes rubrum*).

Bezogen auf die Trockenmasse liegt der Anteil der Ballaststoffe der hier ausgewählten Früchte bei über 30 % (siehe Tab. 1). Selbst die industriellen Nebenerzeugnisse der Beerenobstverarbeitung stellen ernährungsphysiologisch wertvolle Naturstoffe dar. Bei der Herstellung von Fruchtsaft fallen beispielsweise die übrigen Stiele, die Fruchtschalen, die Kerne und weitere grobe Gewebeanteile als Pressrückstand an. Besonders diese Beerenobsttrester bestehen häufig zu großen Anteilen aus Ballaststoffkomponenten und können weitere vielversprechende bioaktive Verbindungen enthalten (Struck *et al.*, 2016). So weist beispielsweise der Trester der Aroniabeere, aufgrund des geringeren Wassergehalts und des hohen Gehalts an unlöslichen Polyphenolen, einen höheren Gesamtpolyphenolgehalt auf als die Aroniabeere im Ganzen (Mayer-Miebach *et al.*, 2012). Mikulic-Petkovsek und Mitarbeiter ermittelten unter anderem den Gesamtphenolgehalt von Aroniabeeren, Cranberries, Himbeeren und Roten Johannisbeeren. Demzufolge führt die Aroniabeere die Liste mit 10132 mg/kg FW an, danach folgen Cranberry, Himbeere und zuletzt die Rote Johannisbeere (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012). Diese und weitere Nährwert- bzw. Inhaltsstoffangaben sowie der globale Ernteertrag der Früchte (nach Zhao *et al.*, 2007) sind in Tab. 1 aufgelistet.

In der wissenschaftlichen Literatur sind bereits umfassende Erkenntnisse zur Zusammensetzung der ausgewählten Beerenobstsorten festgehalten. Die Strukturen und Veränderungen verschiedener bioaktiver Nebenkomponenten der Früchte, insbesondere die der Antioxidantien, sind ebenfalls weitreichend untersucht. Jedoch mangelt es an wissenschaftlichen Erkenntnissen zu den vorhandenen Strukturelementen der Ballaststoffkomponenten der vier unterschiedlichen Früchte.

## 1. Einleitung

**Tabelle 1** Nährwert- und Inhaltsangaben der untersuchten Beerenobstsorten. FW, Frischgewicht

Gehalte pro 100 g FW	Aroniabeere /100 g FW	Cranberry /100 g FW	Himbeere /100 g FW	Rote Johannisbeere /100 g FW
Quelle	Kulling & Rawel, 2008	USDA, 2016a <sup>a</sup>	USDA, 2016b <sup>b</sup>	THL, 2016 <sup>c</sup>
Wasser [g]	84,4	87,32	85,75	83,95 <sup>d</sup>
Brennwert [kcal / kJ]	-	46 / 191	52 / 218	57 / 237
Protein [g]	0,7	0,46	1,2	1,4
Fett [g]	0,14	0,13	0,65	0,4
Asche [g]	0,44	0,12	0,25 <sup>e</sup>	-
Zucker (ges.) [g]	6,6 - 10	4,37	4,42	7,5
Gesamtballaststoffe [g]	5,6	3,6	6,5	5,0
Gesamtphenolgehalt <sup>f</sup> [mg]	10132	4522	1076	547
Globale Produktion <sup>g</sup> [t]	-	417.534	503.393	939.918 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> nach United States Department of Agriculture (USDA) - Food Composition Databases - Cranberries, raw

<sup>b</sup> nach United States Department of Agriculture (USDA) - Food Composition Databases - Raspberries, raw

<sup>c</sup> nach National Institute for Health and Welfare (THL) - Fineli resultset - Redcurrant

<sup>d</sup> nach United States Department of Agriculture (USDA) - Food Composition Databases - Currants, red and white, raw

<sup>e</sup> nach de Souza *et al.*, 2014

<sup>f</sup> als Gallensäure-Äquivalente in mg/kg Frischgewicht nach Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012

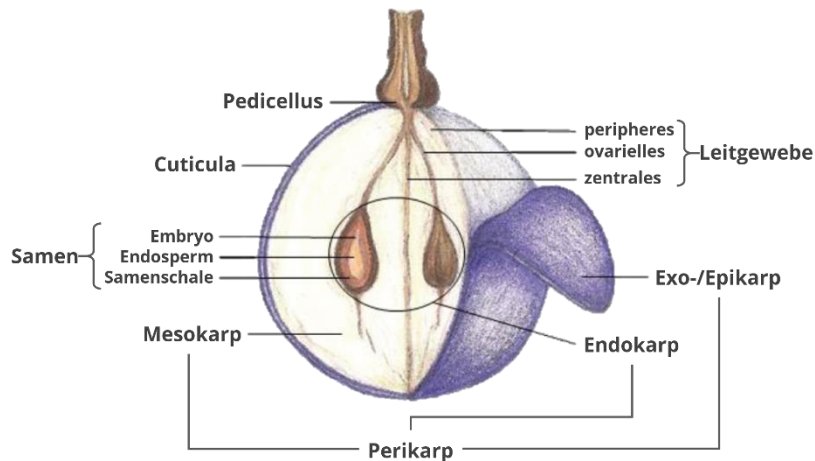
<sup>g</sup> nach Zhao *et al.*, 2007

<sup>h</sup> Summe aus schwarzer und roter Johannisbeere

### a. Beerenobst: Einordnung der ausgewählten Früchte

Der botanische Ausdruck „Beere“ bezeichnet eine Frucht, welche sich aus einem einzelnen Fruchtknoten (Ovar) als umschließende Frucht mit einer saftig fleischigen Fruchtwand entwickelt. Sie gehört damit zu den Schließfrüchten und dient als Ausbreitungsmedium für den Samen. In Abb. 1 ist die Anatomie der Weinbeere (*Vitis vinifera* LINNÉ), stellvertretend als charakteristische Beerenfrucht, dargestellt. Die Gewebe höherer Pflanzen können grob in drei Arten eingeteilt werden: dermales, vaskuläres und Grundgewebe. Abgesehen von den eingelagerten Leitbündeln (vaskuläres Gewebe), besteht die fleischige Fruchtwand (Perikarp) der Beere vorwiegend aus dünnwandigen Zellen, dem sogenannten Speicherparenchym (Grundgewebe). Das Perikarp unterteilt sich in das äußere (Exo-/Epikarp) und innere (Endokarp) Abschlussgewebe und das dazwischenliegende Mesokarp. Der Samen stellt das Ausbreitungsorgan der Samenpflanzen (Spermatophyta) dar und ist aufgeteilt in Samenschale, Endosperm und Embryo. Samen besitzen neben dünnwandigen Speicherzellen, angereichert mit Lipiden, Proteinen und/oder Speicherpolysacchariden, unterschiedlich verhärtete Zellschichten zur Ausbildung der Samenschale. Zur Versorgung der einzelnen Fruchttorgane sind entsprechende Netzwerke an Leitbündeln angelegt (peripheres, ovariell und zentrales vaskuläres Gewebe). Die Schale bildet das abschließende dermale Gewebe, die Cuticula, welche häufig mit Cutin und/oder Wachsen beschichtet ist. Zwei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Früchte sind botanisch gesehen keine Beerenfrüchte, aus diesem Grund werden die Proben im Folgenden als Beerenobst bezeichnet. Dementsprechend sind etwaig auftretende botanisch inkorrekte Bezeichnungen dem Sprachfluss geschuldet.





**Abbildung 1** Aufbau einer Beerenfrucht von *Vitis vinifera*. Die Früchte der Roten Johannisbeere und der Cranberry sind im botanischen Sinne ebenfalls Beerenfrüchte.

### I. Die Apfelfrucht der *Aronia melanocarpa* - Aroniabeere

Die Aroniabeere, im Deutschen auch häufig als Schwarze Apfelbeere bezeichnet, wird vorwiegend im osteuropäischen Raum und im östlichen Teil der Bundesrepublik angebaut (Kulling & Rawel, 2008). Die kultivierte *Aronia melanocarpa* (ELLIOT) entstammt der Familie der Rosaceae (Rosengewächse) und dementsprechend der Ordnung Rosales. Der Strauch ist als Kernobstgewächs (Pyrinae) phylogenetisch sehr nah verwandt mit den Äpfeln und Birnen sowie ferner verwandt mit vielen weiteren Obstpflanzen: Himbeeren, Erdbeeren, Kirschen und weiteren Steinobstbäumen. Ihre fleischige Scheinfrucht, eine sogenannte Apfelfrucht, entwickelt sich aus den Fruchtblättern und der Blütenachse (später als verzehrbarer Hypanthium). Das später darin befindliche Kernhaus (hier Perikarp) besteht aus fünf freien Fruchtblättern, welche jeweils die länglichen Samen umschließen und einen Balg bilden - die Sammelbalgfrucht. Aufgrund ihrer geringen Süße, des bitter-sauren Geschmacks und des adstringierenden Mundgefühls werden Aroniabeeren selten roh verzehrt. Sie eignen sich jedoch als natürlicher Farbgeber und werden in dieser Funktion häufig eingesetzt (Kulling & Rawel, 2008). Die tief schwarzrote Färbung der gesamten Frucht lässt sich auf den sehr hohen Gehalt an Anthocyanen und weiteren Polyphenolen zurückführen. So konnte ein Polyphenolgehalt von bis zu 7849 mg/100 g Trockengewicht, summiert aus Einzelkomponenten, chromatographisch bestimmt werden (Oszmiański & Wojdylo, 2005). Ungefähr zwei Drittel davon lassen sich auf Procyanidine (siehe 1dIII), ein Viertel auf Anthocyane (insbesondere Cyanidin-3-Glycoside) und der Rest auf phenolische Säuren sowie Flavonole zurückführen. Eine weitere Besonderheit der Aroniabeere ist der verhältnismäßig hohe Gehalt des natürlich auftretender Zuckeralkohols Sorbitol (4,62 g/100g FW, Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2012).

### II. Die Beerenfrucht der *Vaccinium macrocarpon* - Cranberry

*Vaccinium macrocarpon* (AITON), die großfruchtige Moosbeere, ist mittlerweile auch im deutschsprachigen Raum als Cranberry geläufig. Die Gattung entspringt der Familie der Ericaceae (Heidekrautgewächse) und der Ordnung Ericales. Nahverwandte Obstsorten sind die Preiselbeere, die Blaubeere und die Heidelbeeren. Die Cranberry, ein immergrüner

## 1. Einleitung

Zwergstrauch, wird insbesondere in Nordamerika angebaut und verarbeitet (74 % des globalen Ertrags), ist allerdings mittlerweile auch in Europa bzw. der Bundesrepublik gefragt und frisch erhältlich (Zhao *et al.*, 2007). Die Früchte sind botanisch betrachtet echte Beeren und werden aufgrund des bitteren Geschmacks ebenfalls eher prozessiert als roh verzehrt. Die dunkelrot gefleckte Beerenschale umschließt ein weißes Fruchtfleisch worin, eingeschlossen in vier großen Hohlräumen, viele kleine kugelige Samen eingebettet sind. Die wachsbeschichtete Schale schützt die Beere noch lange nach der Ernte vor dem Austrocknen (Zhao *et al.*, 2007).

### III. Die Sammelsteinfrucht der *Rubus idaeus* - Himbeere

Die Himbeere (*Rubus idaeus* LINNÉ) entstammt ebenfalls der Familie der Rosaceae bzw. der Ordnung der Rosales (Rosenartige). Somit ist sie, wie die Aroniabeere, verwandt mit Äpfeln, Birnen und verschiedenen Steinobstsorten. Nahe Verwandte sind die Brombeere und die Erdbeere. Sie gehört zu den weltweit meistangebauten und meistverarbeiteten Beerenobstsorten (Zhao *et al.*, 2007). Großflächig kultiviert wird sie in Osteuropa und Asien, wobei zwei Reifetypen ausgenutzt werden (Sommer- und Herbstbeeren). Der stachelige Strauch bildet ein sehr ausgedehntes Wurzelwerk aus. Auf der kegelförmigen Blütenachse bilden sich aus einzelnen Fruchtblättern kleine Steinfrüchte, die sich durch viele feine Härchen zu einer Sammelsteinfrucht (Scheinfrucht) zusammenfügen. Dementsprechend ist die Frucht der Himbeere keine botanische Beere. Die Frucht löst sich nach der Reife im Ganzen von der Blütenachse ab, wobei ein Hohlraum verbleibt. Steinfrüchte sind ebenfalls Schließfrüchte, besitzen jedoch im Gegensatz zu Beeren ein verhärtetes Endokarp um die Samenanlage. Die Steinkerne der Himbeere sind 2 - 3 mm groß, nierenförmig bis länglich und besitzen ein markantes grubiges Endokarp, bestehend aus sich überkreuzenden Faserzellen.

### IV. Die Beerenfrucht der *Ribes rubrum* - Rote Johannisbeere

Innerhalb der Familie der Stachelbeergewächse (Grossulariaceae) existiert nur eine Pflanzengattung - die Johannisbeeren (*Ribes*). Neben der Stachelbeere und der Jostabeere sind hauptsächlich die Schwarze (*Ribes nigrum* LINNÉ) und die Rote Johannisbeere (*Ribes rubrum* LINNÉ) als Obststrauch relevant. Die Weiße Johannisbeere ist lediglich eine Farbvariante der *Ribes rubrum*. Die Gattung der Johannisbeeren gehört zur Ordnung Saxifragales (Steinbrechartige). Nach der Erdbeere sind die Schwarze und Rote Johannisbeere (in Summe) dem Ertrag nach die weltweit meistangebauten Beeren (Zhao *et al.*, 2007). Während die Schwarze Johannisbeere weit verbreitet über Asien und Europa angebaut wird, produzieren vorwiegend Polen und die Bundesrepublik Deutschland die rote Schwesterart. Sie wachsen an einem traubenförmigen Blütenstand und werden häufig in dieser Form vermarktet. Bei der leicht durchscheinenden echten Beerenfrucht können teilweise die Leitbündel und die rundlich kantigen Samen sichtbar sein (ca. 4 mm groß).

## b. Die pflanzliche Zellwand

Die Ausbildung einer Zellwand um die Membran des Protoplasten ist essentiell für die Anatomie von Pflanzen. Primär sichert die Zellwand die Unversehrtheit der Zelle vor abiotischen und biotischen äußeren Einflüssen. Zudem sorgt dieser Schutzwall für Stabilität, schützt die Zelle vor dem Austrocknen, unterstützt die interzelluläre Kommunikation, ermöglicht den gezielten Stoffaustausch, reguliert das Zellwachstum und ermöglicht die Differenzierung von unterschiedlichen Pflanzengeweben. In reproduktiven Pflanzengeweben, beispielweise für keimende Samen, kann die Zellwand obendrein als Kohlenhydratspeicher dienen. Demnach unterliegt sie während der Entwicklung der Pflanze einem ständigen Auf-, Um- und Abbauprozess (Carpita & Gibeaut, 1993).

### I. Die Architektur und Funktion der Zellwand

Die unterschiedlichen Funktionen und Formen der pflanzlichen Zellwand werden durch eine sowohl variable als auch hochkomplexe Zusammensetzung von Polysacchariden, Strukturproteinen und phenolischen Verbindungen gewährleistet. Die Zusammensetzung dieser Komponenten und deren Interaktionen variieren je nach Art, Zelltyp, Gewebe, Reifegrad und Wachstumsbedingungen der Pflanze. Die Pflanzenzellwand besteht im Allgemeinen aus mehreren Schichten (von außen nach innen): der Mittellamelle, der Primärwand und der Sekundärwand (McDougall *et al.*, 1996). Die Mittellamelle ist überwiegend aus Pektinen aufgebaut, füllt den interzellulären Raum und sorgt für die Adhäsion zwischen den Zellen. Cellulose und Hemicellulosen bilden das vernetzte Grundgerüst der Primärzellwand (siehe 1bIV), in welches weitere Pektine eingebettet sind (siehe 1dI). Mit Beendigung des Wachstums lagert die Zelle eine Sekundärwand aus weiteren Schichten von Cellulose und Xylanen auf. Gleichwohl beginnt die Zelle, je nach Art des Gewebes, Lignin in die Wand zu integrieren. Lignin stellt ein komplexes hydrophobes Makromolekül dar und führt zur Verholzung der Zellwand (siehe 1dII). Es verleiht ihr zusätzliche Druckstabilität und steuert die Wasserdurchlässigkeit von Pflanzengeweben (insbesondere im Xylem). Tannine, pflanzliche Gerbstoffe, werden von manchen Pflanzen als zusätzlicher Schutzfaktor gegen Pathogene, Fraßfeinde und Strahlung gebildet. Diese Verbindungen sind nicht am Aufbau der Zellwand beteiligt, interagieren mit dieser gleichwohl beim Aufbruch der Zelle. Die Verbindungen der Untergruppe der kondensierten Tannine, oder auch Proanthocyanidine (PA), gelten neben Lignin als assoziierte Verbindungen pflanzlicher Zellwandkomponenten im Ballaststoffkomplex (siehe 1dIII). Unter diese Definition fallen ebenso weitere phenolische Verbindungen, die mit der Epidermis und Cuticula assoziiert sind: Cutin, Suberin und pflanzliche Wachse. Deren jeweilige chemische Zusammensetzung und pflanzenphysiologische Bedeutung sind nicht weniger komplex als im Fall von Lignin oder PA, dennoch werden diese Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender betrachtet.

### II. Zellwandtypen

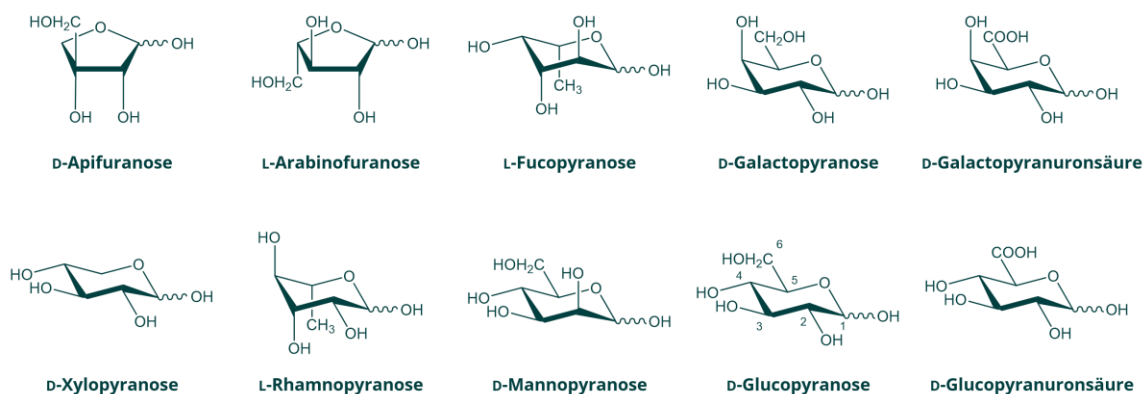
Die Primärzellwände von Landpflanzen teilen sich in zwei Typen auf. Typ I Zellwände treten bei dikotylen Pflanzen, nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen und Gymnospermen

## 1. Einleitung

(Nacktsamer) auf und zeichnen sich durch einen höheren Anteil von Pektinen (20 - 35 % der Trockenmasse) und Strukturproteinen (10 %) aus. Bei diesem Zellwandtyp sorgen Xyloglucane (XyG, 20 - 25 % Anteil) für die Verknüpfung der Cellulosefibrillen (15 - 30 %), während Heteromannane und -xylane (5 - 10 %) eine untergeordnete Rolle spielen (Carpita & Gibeaut, 1993; Vogel, 2008). Im Gegensatz dazu zeichnet sich der Zellwandtyp II der commeliniden Monokotyledonen, zu denen unter anderen Süßgräser (Poaceae) gehören, dadurch aus, dass die Cellulose mit Glucuronoarabinoxylanen (20 - 40 %) vernetzt vorliegt. XyG sind nur in Spuren vorhanden. Zudem treten hier verstärkt Hydroxyzimtsäuren als Bindeglied auf, während der Gehalt an Pektinen und Strukturproteinen (insg. 6 % der Trockenmasse) geringer ausfallen (Vogel, 2008). Die im Rahmen dieser Dissertation behandelten Früchte entstammen allesamt dikotylen Pflanzen. Aus diesem Grund wird lediglich die Zellwandarchitektur des Typs I näher betrachtet.

### III. Grundbausteine

Die wichtigste Fraktion der Zellwandpolymere ist die der Ballaststoffpolysaccharide. Trotz der enormen Vielfalt in Form und Funktion bestehen diese Polysaccharide im Wesentlichen lediglich aus zehn Monosacchariden (siehe Abb. 2): Apiose (Api), Arabinose (Ara), Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Galacturonsäure (GalA), Glucose (Glc), Glucuronsäure (GlcA), Mannose (Man), Rhamnose (Rha) und Xylose (Xyl). Die Variabilität dieser Grundbausteine begründet sich darauf, dass sie in unterschiedlicher Ringform (Pyranose (*p*) oder Furanose (*f*)), in unterschiedlichen Enantiomeren (D oder L), mit unterschiedlicher Konfiguration ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) und verknüpft über zahlreiche glykosidische Bindungen (an den vier bis fünf Hydroxylgruppen) vorliegen können (McDougall *et al.*, 1996). Dennoch liegen die Zellwandmonosaccharide üblicherweise in einer oder wenigen charakteristischen Formen vor (siehe Abb. 2). Darüber hinaus liefern der Ladungszustand ggf. vorhandener Uronsäuren, nichtglykosidische Substituenten sowie der Acetyl- bzw. Methylierungsgrad der Polymere weitere variable Merkmale für die Differenzierung und Funktionalisierung von Polysacchariden.



**Abbildung 2** Strukturen der hauptsächlich in der pflanzlichen Zellwand vorhandenen Monosaccharide in ihrer am häufigsten vorkommenden Form

#### IV. Das Cellulose-Xyloglucan-Netzwerk

Das mengenmäßig wichtigste Polymer in der Natur und der pflanzlichen Zellwand ist die Cellulose. Cellulose besteht aus linearen Ketten  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpfter D-Glcp, die sich über Wasserstoffbrücken dutzendfach zu kristallinen und wasserunlöslichen Mikrofibrillen zusammenlagern. Diese makroskopischen Bündel von Fibrillen bestehen im Durchmesser aus 30 - 100 einzelnen Glucoseketten (McDougall *et al.*, 1996). Ihre Kettenlänge bzw. der Polymerisationsgrad („*Degree of Polymerization*“, DP) beträgt ungefähr 250 - 4000 bei Primärzellwänden und 10000 - 15000 bei Sekundärzellwänden. Aufgrund der glykosidischen  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Bindung sind die Glc-Einheiten im Celluloserückgrat alternierend um 180° gedreht. Somit besteht das Homopolymer im Wesentlichen aus wiederholenden Cellobioseeinheiten (McDougall *et al.*, 1996). Auf dieser simplen Struktur beruht die Grundstabilität der pflanzlichen Zellwand.

Die Sekundärzellwand besteht verstärkt aus kristalliner Cellulose, während die Primärzellwand einen größeren Anteil an amorpher Cellulose aufweist. Dies gewährleistet, dass die Wand für die Zellexpansion enzymatisch zugänglich bleibt und mit der Zelle wachsen kann (Carpita & Gibeaut, 1993). Die Mikrofibrillen sind hierbei zu einem überkreuzenden Netzwerk angeordnet, dennoch bedarf es einer weiteren funktionellen Komponente, damit die Stabilität der Cellulose in einer metabolisch veränderlichen Primärzellwand zum Tragen kommen kann. In Zellwänden des Typs I übernehmen XyG diese Aufgabe. Sie sind dort die vorherrschenden Hemicellulosen und können 20 - 30% der Trockenmasse ausmachen (Fry, 1989). Glucuronoxylane, Glucuronoarabinoxylane, Glucomannane, Galactoglucomannane und die sogenannten „*mixed-linked  $\beta$ -Glucans*“ (MLG) gehören ebenfalls zu den Hemicellulosen. Alle besitzen ein zu Cellulose homologes Rückgrat, welches aus  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften und somit äquatorial konfigurierten D-Pyranosen aufgebaut ist (Scheller & Ulvskov, 2010). Glucuronoxylane basieren auf einem Rückgrat aus Xyl mit unregelmäßigen  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-verknüpften GlcA-Seitenketten und spielen vorwiegend in den sekundären Zellwänden des Typs I eine Rolle. Das Rückgrat von Glucomannanen ist linear verknüpft und kann vollständig aus Man-Einheiten oder aus unregelmäßig alternierenden Man- und Glc-Einheiten aufgebaut sein (Ebringerova *et al.*, 2005). Je nach Spezies oder Entwicklungsstand besitzen Glucomannane an Position 2, 3 oder 6 zusätzlich Gal-Seitenketten tragen (Galactoglucomannane). Dahingegen besitzen Galactomannane ein Rückgrat aus Man-Einheiten sowie unregelmäßige über  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfte Gal-Seitenketten (Gidley & Reid, 2006). Unverzweigte Mannane tendieren, ähnlich wie Cellulose, zur Ausbildung einer kristallinen Struktur. Abgesehen von ihrer Funktion als Zellwandkomponente (eher Gluco- und Galactoglucomannane) und Speicherpolysaccharid (insbesondere Galactomannane) ist über Mannane wenig bekannt. Sie spielen im Zellwandtyp I von Samenpflanzen eine untergeordnete Rolle. Höhere Anteile, sowohl an Heteromananen als auch an MLG, sind selten (Scheller & Ulvskov, 2010).

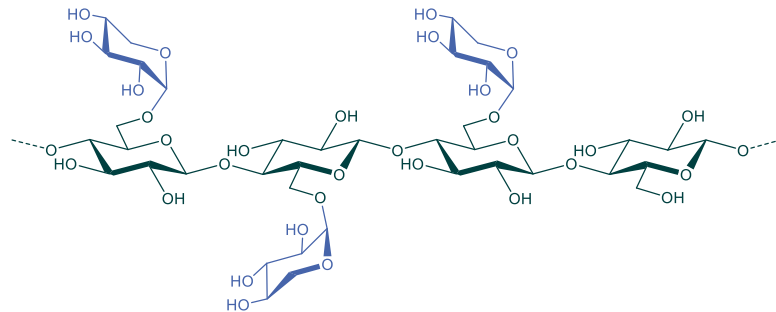
XyG werden gleichwohl als essentielle und multifunktionelle Komponente für den Aufbau des Hemicellulose-Cellulose-Netzwerkes gehandelt. Ausschlaggebend dabei ist ihre Eigenschaft, ebenfalls über Wasserstoffbrücken, starke nicht-kovalente Bindungen mit

## 1. Einleitung

Cellulose auszubilden (Hayashi *et al.*, 1987). Um die Bindung zwischen Cellulose und XyG aus nativen Zellwänden zu lösen, bedarf es konzentrierter alkalischer Lösungsmittel (beispielsweise 24 %iger KOH). Früh wurde davon ausgegangen, dass XyG auf diese Art die Cellulose-Mikrofibrillen quervernetzen und somit deren Aggregation verhindern. Dahingegen konnten sie nicht nur auf deren Oberfläche, sondern auch innerhalb den Mikrofibrillen lokalisiert werden (Hayashi & Maclachlan, 1984). Daraus wurde abgeleitet, dass XyG in drei unterschiedlichen Domänen organisiert sind: XyG, die zwischen Mikrofibrillen vernetzten, XyG, welche die Oberfläche der Mikrofibrillen belegen, und XyG, die innerhalb von amorphen Cellulose-Mikrofibrillen eingeschlossen sind (Pauly *et al.*, 1999a). Es wird auch für möglich gehalten, dass es XyG-Stränge gibt, die sowohl im Inneren als auch auf der Oberfläche der Mikrobrillen liegen. Dieses Modell begründet sich unter anderem auf der variablen Zugänglichkeit von XyG-Fractionen im Cellulose-XyG-Netzwerk. Die erste Fraktion ist durch Enzyme hydrolysierbar und bildet vermutlich Crosslinks, Schleifen oder lose Enden aus. Diese enzymatisch zugängliche und zum Teil wasserlösliche Domäne spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Zellelongation und der Fruchtreifung. Die wasserunlösliche XyG-Fraktion auf der Oberfläche der Mikrofibrillen wird erst durch den Einsatz von alkalischen Lösungsmitteln zugänglich. Übrig bleibt die dritte Fraktion welche erst greifbar wird, nachdem die amorphen Regionen der Cellulose mittels Cellulasen aufgelöst werden (Pauly *et al.*, 1999a). Aus diesem Model wird ersichtlich, dass über XyG sowohl die Stabilität als auch die Flexibilität der Primärzellwand gesteuert werden kann.

## c. Der Aufbau von Xyloglucanen

Die Grundstruktur von XyG entspricht der von Cellulose. Das Rückgrat ist aus  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpfter D-Glcp aufgebaut, gleichwohl sind (bei dikotylen Pflanzen) 50-75 % dieser Glucosereste regelmäßig über Position O-6 mit  $\alpha$ -D-Xylp substituiert. Bei Poaceen liegt der Substitutionsgrad („Degree of Substitution“, DS) bei ungefähr 30-40 % (Fry, 1989). Aus den Beobachtungen enzymatisch freigesetzter Xyloglucanligosaccharide (XGO) der letzten Jahrzehnte hat sich herausgestellt, dass in der Natur hauptsächlich zwei Substitutionsmuster vorkommen: Fucogalactoxyloglucane mit hohem DS (XXXG-Typ) und unfucosylierte XyG mit geringerem DS (XXGG-Typ) (Vincken *et al.*, 1997). In Abb. 3 ist ein XyG-Abschnitt nach dem Substitutionsmuster XXXG abgebildet. Das XXGG-Muster ist ein charakteristisches Merkmal für XyG aus Solanaceen, Poaceae oder Jatobasamen (*Hymenaea courbaril* LINNÉ) zeigen weniger typische Substitutionsmuster nach dem Schema XXGGG bzw. XXXXG (Tuomivaara *et al.*, 2015).



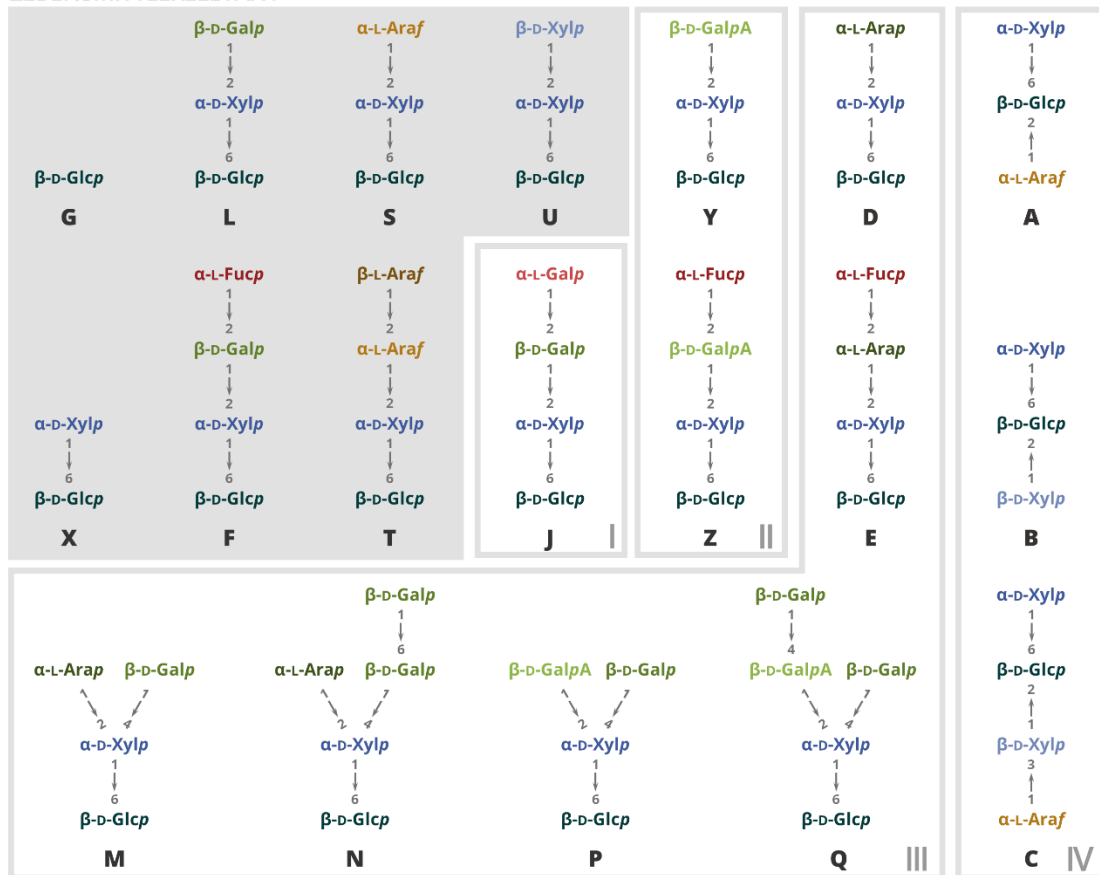
**Abbildung 3** Ausschnitt einer Xyloglucankette nach dem Substitutionsmuster XXXG. Glucosebausteine (dunkelgrün) bilden das Rückgrat und sind meist bis zu 75 % mit Xyloseresten (blau) substituiert.

### I. Die Beschaffenheit und Phylogenie der Xyloglucanseitenketten

Die Seitenketten von XyG können um bis zu drei weitere Monosaccharideinheiten verlängert sein. Am häufigsten ist die Xyloseeinheit über Position O-2 zusätzlich mit  $\beta$ -D-Galp glykosidisch verknüpft. Ein weiteres sehr häufiges Motiv ist die zusätzliche Substitution der Gal-Einheit über die Position O-2 mit  $\alpha$ -L-Fucp (Pauly & Keegstra, 2016). Wobei die Fucosylierung der Gal-Reste bei Poaceen oder Vertretern des XXGG-Substitutionstyps nicht zu beobachten ist. Aktuell sind im Pflanzenreich insgesamt 19 Substitutionsmuster von XyG-Seitenketten bekannt (siehe Abb. 4). Zur Vereinfachung wurde von Fry *et al.* (1993) eine Nomenklatur zur Codierung von XGO eingeführt. Dabei werden die Kettenglieder entsprechend ihrer Substitution mit einzelnen Buchstaben abgekürzt. Eine unsubstituierte Glc-Einheit im Rückgrat von XyG wird beispielweise durch ein G codiert. Das xylosubstituierte Grundelement  $\alpha$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp wird durch X und die beschriebenen Elemente  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp und  $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp werden durch L bzw. F abgekürzt (Fry *et al.*, 1993; Tuomivaara *et al.*, 2015). Diese vier Bausteine treten in der Natur häufig auf und sind auch in essbaren Früchten sowie weiteren pflanzlichen Lebensmitteln vorhanden. Darüber hinaus sind nur wenige weitere Seitenkettenmotive für die humane Ernährung relevant (siehe 1cIII).

## 1. Einleitung

### LEBENSMITTELRELEVANT



**Abbildung 4** Schematischer Aufbau bisher bekannter Motive von Xyloglucanseitenketten. Die Kürzel entsprechen der üblichen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). Grau hinterlegt sind die Motive mit höherer Relevanz für pflanzliche Lebensmittel. Gruppe I und II sind stereochemisch analoge Motive zu F und L und konnten in defizienten Pflanzen oder speziellen –geweben nachgewiesen werden. Die Motive in Gruppe III entstammen Moosen, Farnen und Bärlapppflanzen. Gruppe IV konnte lediglich in Zellkulturen von *Acer pseudoplatanus* nachgewiesen werden. Ara, Arabinose; f, -furanose; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; p, -pyranose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

Die Diversität der Xyloglucanmotive lässt sich entlang der Evolution der Landpflanzen (Embryophyten) über die verschiedenen Moose, Gefäßpflanzen (Tracheophyten), Bärlapppflanzen (Lycophyten) und bis zu den Farnen (Monilophyten) und den unterschiedlichen Samenpflanzen (Spermatophyten) beobachten. Im Allgemeinen ist die XyG-Architektur innerhalb einer phylogenetischen Gruppe homogen (Schultink *et al.*, 2014). Während L-Motive im gesamten Pflanzenreich auftreten, ist das Vorhandensein der übrigen Motive teilweise auf einzelne phylogenetische Gruppen beschränkt (siehe Abb. 4). So kommen in den frühen Gruppen der Leber- und Laubmoose (Marchantiophyten & Bryophyten) verzweigte Seitenkettenmotive M, N, P und Q vor, während bei den Hornmoosen (Anthocerotophyten) das F-Motiv erstmalig auftaucht (Schultink *et al.*, 2014). Die späteren Gruppen der samenlosen Tracheophyta (Lycophyten und Monilophyten) bilden, neben F und M, die  $\alpha$ -L-Arap enthaltende XyG-Motive D und E aus (Peña *et al.*, 2008; Hsieh & Harris, 2012). Innerhalb der Spermatophyten sind die Motive D, E, M, N, P und Q bisher nicht nachgewiesen. Das S-Motiv enthält eine  $\alpha$ -L-Araf-Gruppe und wurde bereits vereinzelt in Vertretern der Monilophyten nachgewiesen (Hsieh & Harris, 2012). Dieses tritt indes in viel späteren



Untergruppen der Eudikotyledonen markant auf: den Enzianartigen (Gentianales), Lippenblütlerartigen (Lamiales), Nachtschattenartigen (Solanales) und den Heidekrautartigen (Ericales) (York *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 2005). Aufgrund der phylogenetischen Distanz dieser Gruppen zu den Monilophyten wird davon ausgegangen, dass die Entwicklung des S-Motivs unabhängig voneinander stattgefunden hat. York *et al.* (1996) konnten aus Tomatenzellkultur (*Solanum lycopersicum* LINNÉ) das T-Motiv identifizieren, welches eine Seitenkette mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -L-Araf besitzt. Jedoch konnte dieses Motiv seither weder in anderen Solanales noch in sonstigen phylogenetischen Gruppen wiedergefunden werden. Das Motiv U trägt eine zusätzliche  $\beta$ -D-Xylp-Einheit am Xyloserest und wurde in Blättern und Früchten des Arganbaumes (*Argania spinosa* LINNÉ) (Ray *et al.*, 2004; Aboughe-Angone *et al.*, 2008) sowie in Blaubeeren (*Vaccinium myrtillus* LINNÉ) (Hilz *et al.*, 2007) beschrieben. Die Seitenkettenmotive A, B und C wurden bisher lediglich in Zellsuspensionskultur des Berg-Ahorns (*Acer pseudoplatanus* LINNÉ) nachgewiesen (Kiefer *et al.*, 1990; Hisamatsu *et al.*, 1992; Vierhuis *et al.*, 2001). Sie besitzen einen zusätzlichen Substituenten (Ara, Xyl oder beide) an Position O-2 des Glc-Rückgrats. Weitere seltene Motive konnten speziellen Pflanzengeweben entnommen werden. Hantus *et al.* (1997) konnten in den Samen von Jojoba (*Simmondsia chinensis* C.K. SCHNEID) das Motiv J identifizieren, welches stereochemisch identisch zum F-Motiv ist, da eine  $\alpha$ -L-Galp anstatt der  $\alpha$ -L-Fucp angehängt wird (Fuc entspricht einer 6-deoxy-Gal). Dieses Motiv konnte zudem in einer *Arabidopsis thaliana* (LINNÉ) Mutante nachgewiesen werden, die einen Defekt in der GDP-L-Fuc Biosynthese aufweist (Hantus *et al.*, 1997; Pauly *et al.*, 2001). Das Fehlen der GDP-D-Man-4,6-dehydrogenase verhindert die Konversion von GDP-Man zu GDP-Fuc. Solche stereochemischen Analogien existieren ebenso zwischen den Motiven D und L bzw. E und F, denn die  $\alpha$ -L-Arap entspricht der Konfiguration einer  $\beta$ -D-Galp. Ein weiteres Analogon zur  $\beta$ -D-Galp stellt  $\beta$ -D-GalpA dar, welches in den Wurzelhaaren von *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden konnte (Motive Y & Z; Peña *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnten die Autoren anhand einer entsprechenden defizienten Mutante zeigen, dass diese sauren XyG-Motive relevant für das normale Wachstum der Wurzelspitzen sind.

## II. Funktionelle Aspekte der Xyloglucansubstituenten

Bereits früh wurde postuliert, dass die Differenzierung von unterschiedlichen Substitutionsmustern zwischen Pflanzen oder gar Pflanzengeweben einen funktionellen Aspekt darstellt. Anhand von *in vitro* und *in silico* Modellen konnte gezeigt werden, dass die Konformation eines freien XyG-Polymers abhängig ist von der Art und dem Grad der Substitution und dass sich verdrehte XyG-Abschnitte („*Twisted Conformation*“) bei der Anlagerung an Cellulose möglicherweise oberflächenwirksam entwirren („*Flat-Ribbon Conformation*“) (Levy *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1997; Park & Cosgrove, 2015). So wird davon ausgegangen, dass die Seitenketten für die XyG-Cellulose-Interaktionen essentiell sind und dass die Fuc-, Gal- oder Ara-Substitution zur Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität der Primärzellwand und der Pflanzenmorphologie beiträgt (Levy *et al.*, 1991; Peña *et al.*, 2004; Schultink *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Die Fähigkeit zur Substitution der XyG ist im Pflanzenreich genetisch konserviert und von funktioneller Bedeutung. Allgemein führt eine gestörte Synthese der Seitenketten zu größeren negativen Effekten für die Pflanze als das

## 1. Einleitung

vollständige Ausschalten der XyG-Synthese (Pauly & Keegstra, 2016). Für XGO mit fucosylierten Seitenketten konnte darüber hinaus eine wachstumsregulierende Wirkung als Auxinantagonist nachgewiesen werden (Fry, 1989; McDougall & Fry, 1991). Die regulatorischen Funktionen von XGO sollen im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht tiefer betrachtet werden. XyG können O-acetyliert vorliegen. Dieser strukturelle Aspekt wurde lange übersehen, da für die Gewinnung von XyG häufig stark alkalische Lösungsmittel zum Einsatz kommen, wobei alle Acetylgruppen verloren gehen. So wurde festgestellt, dass XyG mit dem Substitutionsmuster XXXG vorwiegend an den Gal-Resten der L/F-Seitenketten ein- oder zweifach acetyliert vorliegen (Kiefer *et al.*, 1989). Bei dem XXGG-Typ hingegen erfolgt die O-Acetylierung an der Ara der S-Motive und verstärkt an der unsubstituierten Glc im XyG-Rückgrat (Sims *et al.*, 1996; York *et al.*, 1996; Vierhuis *et al.*, 2001). Dennoch sind weder Rolle noch Struktur-Wirkungs-Beziehungen von XyG bezüglich ihrer Seitenketten und Acetylierungsmuster in Primärzellwänden vollständig aufgeklärt (Pauly & Keegstra, 2016).

### III. Xyloglucanseitenketten lebensmittelrelevanter Pflanzen

Viele der beschriebenen Seitenketten sind in kultivierten Lebensmittelpflanzen nicht vorhanden oder von geringer Relevanz (Abb. 4). So scheiden beispielsweise die archaischen Gruppen D, E, P, Q, M und N aus, da der Großteil der pflanzlichen Lebensmittel von Spermatophyten geliefert wird. Zudem sind in den XyG der geläufigen Obst- und Gemüsesorten hauptsächlich die Substitutionsmuster XXXG und XXGG zu erwarten. Eine Auswahl untersuchter Proben von Nahrungspflanzen und ihre Substitutionsmuster bzw. -motive sind in Tab. 2 aufgelistet (Schultink *et al.*, 2014). Daraus geht hervor, dass, mit Bezug zur menschlichen Ernährung mit Obst und Gemüse, die Bausteine G, X, L, F und S die hauptsächlich vorkommenden XyG-Motive darstellen. Die sehr individuell ausgeprägten Motive T (ausschließlich in Tomaten identifiziert) und U (bisher nur in Ericaceen) sollen vorerst außen vor bleiben. Aus der Tabelle kann zudem abgeleitet werden, dass viele (lebensmittelrelevante) Pflanzen hinsichtlich ihrer XyG-Struktur noch nicht aufgeklärt und eingeordnet sind. Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Früchte entstammen den Pflanzenordnungen Rosales (Aronia, Himbeere), Saxifragales (Rote Johannisbeere) und Ericales (Cranberry). Aus der Ordnung Rosales wurden bisher die XG der Früchte des Kulturapfels (*Malus domestica*) und des Pfirsichs (*Prunus persica*) beschrieben (Watt *et al.*, 1999; Schultink *et al.*, 2014). Als erste Spezies der Ordnung Saxifragales wurde die Schwarze Johannisbeere auf ihre XyG-Strukturen untersucht (Hilz *et al.*, 2006). Den bisherigen Erkenntnissen nach sollten die XyG der Aronia, Himbeere und Roten Johannisbeere, entsprechend ihrer phylogenetischen Einordnung, die Seitenkettenmotive X, L und F aufweisen. Die genauen Strukturen der XyG dieser Spezies sind bisher dennoch unbekannt. In den XyG der Cranberry hingegen wurde bereits das Motiv S nachgewiesen (Hotchkiss *et al.*, 2015; Auken *et al.*, 2019; Coleman *et al.*, 2019). Jedoch basieren diese Erkenntnisse lediglich auf freien Oligosacchariden.

**Tabelle 2** Bisher beschriebene Xyloglucanstrukturen lebensmittelrelevanter Pflanzen (Hilz et al., 2005; Schultink et al., 2014). Die Codierung der Seitenketten entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).

	<b>Familie</b>	<b>Gattung</b>	<b>Art</b>	<b>Gewebe/ Organ</b>	<b>Substitutions- muster</b>	<b>Seiten- ketten</b>
<b>Zwiebel</b>	Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	<i>Cepa</i>	Knolle	XXXG	X, L, F
<b>Knoblauch</b>	Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	<i>sativum</i>	Knolle	XXXG	X, L, F
<b>Ananas</b>	Bromeliaceae	<i>Ananas</i>	<i>comosus</i>	Fruchtfleisch	XXGG <sub>2,4</sub> , XXXG	X, L, F
<b>Saat-Hafer</b>	Poaceae	<i>Avena</i>	<i>sativa</i>	Koleoptile	XXGG <sub>2,4</sub> , XXXG	X, L
<b>Saat-Weizen</b>	Poaceae	<i>Triticum</i>	<i>aestivum</i>	Koleoptile	XXGG <sub>2,4</sub>	X
<b>Mais</b>	Poaceae	<i>Zea</i>	<i>mays</i>	Koleoptile	XXGG <sub>2,4</sub>	X, L
<b>Gerste</b>	Poaceae	<i>Hordeum</i>	<i>vulgare</i>	Koleoptile	XXGG <sub>2,4</sub> , XXXGG	X
<b>Reis</b>	Poaceae	<i>Oryza</i>	<i>sativa</i>	Sämling	XXGGG, XGGG	X
<b>Ingwer</b>	Zingiberaceae	<i>Zingiber</i>	<i>officinale</i>	Rhizom	XXGG <sub>2,4</sub> , XXXG	X, L, F
<b>Kulturapfel</b>	Rosaceae	<i>Malus</i>	<i>domestiva</i>	Frucht	XXXG	X, L, F
<b>Pfirsich</b>	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>persica</i>	Frucht	XXXG	X, L, F
<b>Sojabohne</b>	Fabaceae	<i>Glycine</i>	<i>max</i>	Frucht	XXXG	X, L, F
<b>Tamarinde</b>	Fabaceae	<i>Tamarindus</i>	<i>indica</i>	Samen	XXXG	X, L
<b>Mungobohne</b>	Fabaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>aureus</i>	Hypokotyl	XXXG	X, L, F
<b>Grüne Bohne</b>	Fabaceae	<i>Phaseolus</i>	<i>vulgaris</i>	Zellkultur	XXGG	X, L, F
<b>Gartenerbse</b>	Fabaceae	<i>Pisum</i>	<i>sativum</i>	Stängel	XXXG	X, L, F
<b>Gartensalat</b>	Asteraceae	<i>Lactuca</i>	<i>sativa</i>	Blätter	XXXG	X, L, F
<b>Karotte</b>	Apiaceae	<i>Daucus</i>	<i>carota</i>	Blätter	XXXG	X, L, F
<b>Blaubeere</b>	Ericaceae	<i>Vaccinium</i>	<i>myrtillus</i>	Frucht	XXXG	X, L, F, U
<b>Schwarze Johannisbeere</b>	Saxifragaceae	<i>Ribes</i>	<i>nigrum</i>	Frucht	XXXG	X, L, F
<b>Basilikum</b>	Lamiaceae	<i>Ocimum</i>	<i>basilicum</i>	Blätter	XXGGG	X, L
<b>Olivenbaum</b>	Oleaceae	<i>Olea</i>	<i>europaea</i>	Frucht	XXXG	X, L, S
<b>Paprika</b>	Solanaceae	<i>Capsicum</i>	<i>annuum</i>	Blätter	XXGG	X, S
<b>Tomate</b>	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>lycopersicum</i>	Zellkultur	XXGG	X, L, S, T

#### IV. Die Biosynthese von Xyloglucanen

Pauly und Keegstra befassen sich in einem Übersichtartikel ausführlich mit der Biosynthese von XG (Pauly & Keegstra, 2016). Die Pflanze synthetisiert XyG, wie die meisten komplexen Kohlenhydrate, im Golgi-Apparat. Die Polysaccharidkette wird nach und nach durch Glycansynthasen und Glycosyltransferasen aus Nucleotid-aktivierten Monosacchariden aufgebaut, verlängert und umgebaut. Dabei kommen hauptsächlich die Nucleotide Uridindiphosphat (UDP) und Guanosindiphosphat (GDP) zum Einsatz. Eine in der Membran des Golgi-Apparates lokalisierte Glucansynthase aus der „Cellulose Synthase-like C“ (CSLC)-Familie baut aus UDP-Glc (aus dem Cytosol) die  $\beta$ -(1→4)-Glucankette in den luminalen Raum auf. Die Substitution der Glucankette mit weiteren Monosacchariden oder Acetylgruppen erfolgt innerhalb des Golgi Lumens. Im Cytosol werden aus UDP-Glc zum einen UDP-Gal und zum anderen UDP-GlcA gebildet, welches im Anschluss zu UDP-Xyl umgebaut wird. GDP-Fuc wird ebenfalls im Cytosol aus GDP-Man gebildet. Für diese drei Bausteine existieren

## 1. Einleitung

Membranproteine für den Transport in den Golgi-Apparat (Pauly & Keegstra, 2016). Die UDP-Ara wird durch eine weitere Umbau- und Transportkette aus UDP-Xyl gebildet. Die Substitution des nackten Glc-Stranges mit der UDP-Xyl übernehmen nun Enzyme mit Xyloglucanxylosyltransferase (XXT) Aktivität. Es gibt Hinweise darauf, dass die CSLC und die XXT für die XyG-Synthese in direkter räumlicher Interaktion arbeiten. Es wird zudem angenommen, dass die Xylosylierung auch mit der O-Acetylierung von XyG in Wechselwirkung steht. Die Verlängerung der Seitenkette zum L-Motiv geschieht durch MUR3 und die „Xyloglucan L-Sidechain-Galactosyltransferase Position 2“ (XLT2), welche jeweils zuständig sind für die Galactosylierung entweder an dritter bzw. zweiter Stelle in der XXXG-Sequenz. Für den alternativen Einbau der S-Seitenkette in Solanaceen konnten von Schultink *et al.* (2013) zwei Xyloglucanarabinofuranosyltransferasen (SIXST1 & 2) identifiziert werden (Schultink *et al.*, 2013). Die Xyloglucanfucosyltransferase (FUT1), welche für die F-Seitenkette verantwortlich ist, konnte dahingegen bereits sehr früh identifiziert werden (Perrin *et al.*, 1999). Aufgrund der fehlenden Relevanz in gängigen Lebensmittelpflanzen, werden die Synthesewege der übrigen Seitenkettenmotive im Rahmen dieser Arbeit nicht tiefer erläutert. Nach Abschluss der Synthese werden die XyG-Stränge in exozytotischen Vesikeln verpackt und an der Plasmamembran in die extrazelluläre Matrix entlassen (Pauly & Keegstra, 2016). Die genauen Vorgänge für den anschließenden Einbau in die Zellwand sind noch unbekannt.

### V. Aufklärung von Xyloglucanstrukturen mittels enzymatischer Hydrolyse

Die Aufklärung einer natürlichen primären Polysaccharidstruktur (Monosaccharidzusammensetzung, absolute/anomere Konfiguration, Ringform, Bindungspositionen, Substituenten) aus der Matrix der Zellwand ist ein schwieriges Vorhaben. Im Fall von XyG, die in unterschiedlichen Domänen organisiert sind (siehe 1bIV), ist die Abbildung der vorliegenden Strukturen zusätzlich erschwert. Darum basieren viele Erkenntnisse auf den XyG-Domänen die (mit oder ohne Extraktion) mittels enzymatischer Hydrolyse zugänglich sind. Während frühe Studien auf unspezifische Glucanasen angewiesen waren, sind mittlerweile rekombinante Präparate bekannt und erhältlich, die spezifisch XyG-Ketten zu Oligosacchariden abbauen. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte xyloglucanspezifische *endo*- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glucanase (XEG) aus *Paenibacillus* sp. ist unter der „Enzyme Commission“-Nummer 3.2.1.151 geführt und gehört, laut der sequenzbasierten Klassifizierung „Carbohydrate Active enZymes“ (CAZy), zur Familie der Glycosylhydrolasen 5 (GH5) (Yaoi *et al.*, 2005; Gloster *et al.*, 2007). XEGs katalysieren die Spaltung des Xyloglucanrückgrats an unsubstituierten Glucoseresten unter Beibehaltung der anomeren Konfiguration. Dementsprechend liefert die Inkubation von XyG aus Tamarindensamen mit XEG charakteristische XGO mit einem Glc<sub>4</sub> Grundgerüst: XXXG, XLXG, XXLXG und XLLXG (Yaoi *et al.*, 2005). Die Aktivität gegenüber XyG mit anderen Substitutionsmustern (XXGG, F- bzw. S-Seitengruppen) wurde bereits nachgewiesen (Nguema-Ona *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2018). Die freigelegten XGO sind analytisch deutlich leichter zu erfassen und ermöglichen es, einen repräsentativen Anteil des nativen XyG abzubilden. Die XEG stellt somit ein wertvolles analytisches Werkzeug dar, um XyG-Strukturen und deren Veränderungen in Folge von Wachstum, Reifung, Modifikation und Verarbeitung von pflanzlichem Material zu beschreiben.

## d. Weitere Zellwandkomponenten und assoziierte Verbindungen

### I. Pektine

Unter dem Begriff Pektin wird eine Reihe multifunktionaler und vorwiegend wasserlöslicher Polysaccharide aus der pflanzlichen Zellwand zusammengefasst. Sie sind unter anderem verantwortlich für die Dynamik und Porosität der Zellwand und stellen wichtige Verknüpfungspunkte zwischen Polysacchariden und Strukturproteinen dar (Voragen *et al.*, 2009). Die Funktionalität der Pektine beruht auf ihrer enormen Komplexität. Sie sind in allen Phasen der Entwicklung und auch in allen Schichten der Zellwand (Mittellamelle, Primär- und Sekundärzellwand) involviert, wobei Pflanzen des Zellwandtyps I deutlich höhere Pektingehalte aufweisen als Vertreter des Zellwandtyps II (Carpita & Gibeaut, 1993; McDougall *et al.*, 1996). Per Definition sind Pektine überwiegend aus GalA aufgebaut, tragen zahlreiche neutrale Monosaccharide als Seitenketten und zeichnen sich durch teilweise methylveresterte Säuregruppen aus. Weitere häufige Monosaccharide in Pektinen sind D-Gal, L-Rha und L-Ara. Dabei konnten mehrere strukturelle Gruppen klassifiziert werden (Voragen *et al.*, 2009; Caffall & Mohnen, 2009).

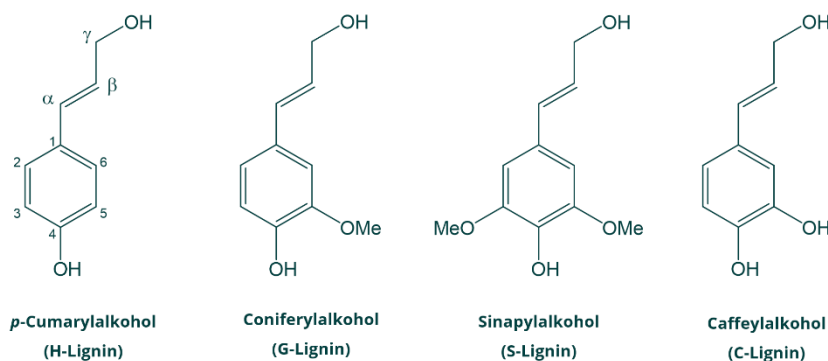
Homogalacturonan (HG) ist ein Polymer aus  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften D-GalpA-Einheiten, die je nach Ursprung unterschiedlich stark an O-6 methylverestert vorliegen. Der Veresterungsgrad wirkt sich stark auf die funktionellen Eigenschaften von HG aus. So führen längere esterfreie Abschnitte dazu, dass HG über  $\text{Ca}^{2+}$  Crosslinks ausbildet („Egg-Box Model“), und ein stabiles Gel entsteht. O-Acetylgruppen an Position 2 und/oder 3 kommen ebenso vor. HG stellt mit ca. 60 % den Hauptanteil der Pektinfraktion dar, wobei die Verhältnisse der Pektinpolymere stark variieren können (Voragen *et al.*, 2009). Eine Sonderform des HG ist das Xylogalacturonan, bei dem  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-verknüpfte Mono- oder Dimere aus D-Xylp als Seitenketten angehängt werden (Schols *et al.*, 1995; Caffall & Mohnen, 2009). Das Rhamnogalacturonan Typ I (RGI) besitzt ein alternierendes Rückgrat aus  $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow)]$  Einheiten, woran über Position O-4 der Rha neutrale Seitenketten geknüpft sind (Voragen *et al.*, 2009). Diese Seitenketten können aus einzelnen Gal-Resten oder auch aus Polymerketten bestehen, wie den Arabinanen, den Galactanen oder dem Arabinogalactan Typ I (AGI). Arabinane sind komplexe, homopolymere Verbindungen mit einem Grundgerüst bestehend aus linearen,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-verknüpften L-Araf-Einheiten mit vielfältigen Verzweigungen über die Positionen O-2 und/oder O-3 (Wefers & Bunzel, 2016). Galactane sind  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpfte D-Galp-Ketten, die vereinzelt intern oder auch terminal mit (1 $\rightarrow$ 4)-L-Arap ergänzt werden. Arabinane und Galactane können zusätzlich (über die O-2- bzw. O-6-Positionen) mit Ferulasäure verestert vorliegen und Diferulasäure-Crosslinks mit anderen Zellwandkomponenten ausbilden (Wefers *et al.*, 2015; Bunzel *et al.*, 2005a). Tragen die Galactane zusätzliche Seitenketten aus  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-L-Araf werden diese häufig als AGI bezeichnet. Rhamnogalacturonan Typ II (RGII) bildet kurze Abschnitte im HG, die sehr speziellen Seitenketten tragen (Caffall & Mohnen, 2009). Insgesamt sind an den hochkonservierten und hochkomplexen Strukturen 12 verschiedene Monosaccharide beteiligt, die seltene und für RGII charakteristische Zuckerbausteine einschließen. So deutet D-Apif zumeist auf das Vorhandensein von RGII hin. Arabinogalactan Typ II (AGII) wird häufig im Zusammenhang mit Pektinen genannt. Diese Polysaccharidfraktion

## 1. Einleitung

ist jedoch stark mit hydroxyprolinreichen Proteinen, den sogenannten Arabinogalactan-Proteinen (AGP), assoziiert. AGII weist ein Grundgerüst aus  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-verknüpfte D-Galp auf. Zudem treten Seitenketten aus einer oder mehreren weiteren  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfte D-Galp-Einheiten auf. Diese Seitenketten können zusätzlich terminale, über  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Bindungen verknüpfte L-Araf-Einheiten tragen (Carpita & Gibeaut, 1993). Die vorgestellten Pektine und pektinverwandten Polysaccharide sind nicht zwingend im gesamten Pflanzenreich gleichmäßig verteilt oder vorhanden. Ebenso ist die übergeordnete Organisation und Funktion dieses makromolekularen Polysaccharidkomplexes noch nicht abschließend aufgeklärt.

## II. Lignin

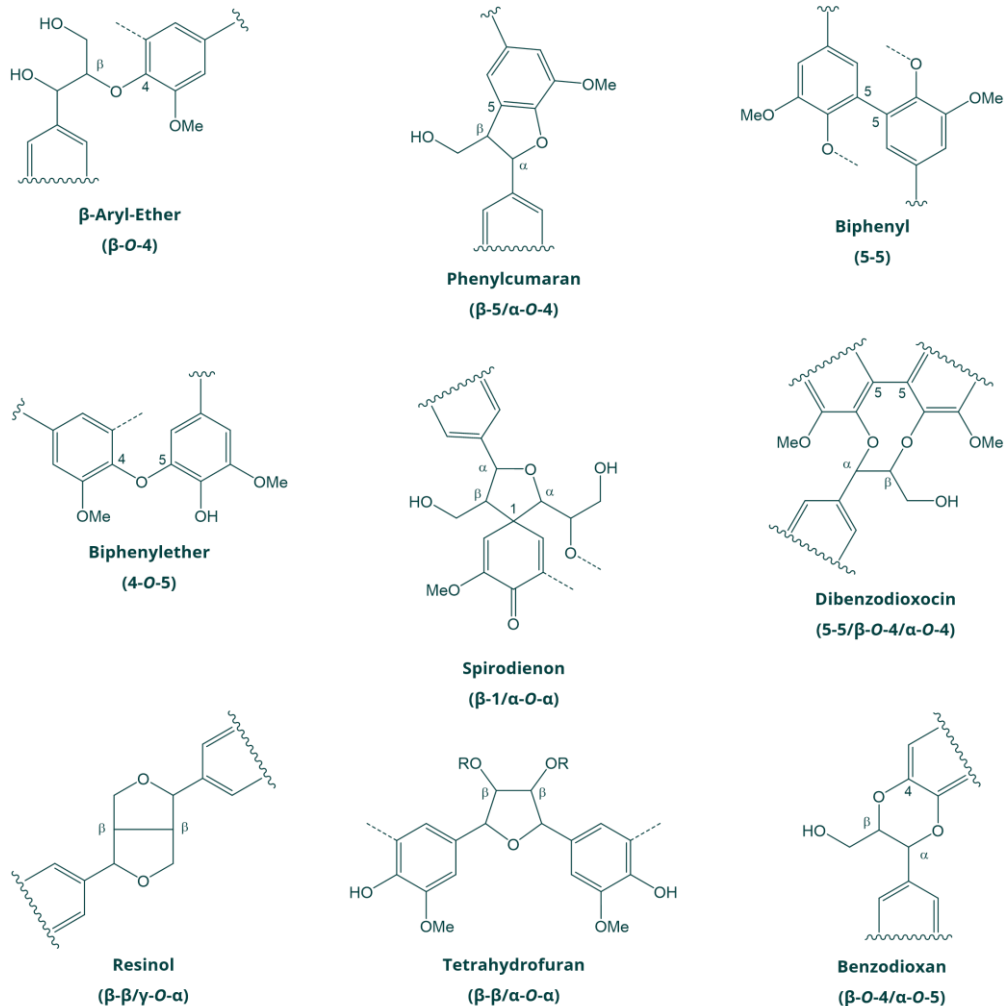
Die Pflanze bildet Lignin, um in bestimmten Pflanzengewebe am Ende der Wachstumsphase die Zellwand zu härten und wasserundurchlässig zu machen. Die Fähigkeit zur Ligninsynthese war ein evolutionär ausschlaggebender Schritt zur Entwicklung von Landpflanzen, denn sie ermöglicht den Aufbau stabiler Stämme und eines vaskulären Versorgungssystems (Xylem) (Boerjan *et al.*, 2003). Lignine können chemisch nicht eindeutig beschrieben werden, sondern lassen sich eher anhand von gemeinsamen strukturellen Attributen eingrenzen (Ralph *et al.*, 2004). Es sind hydrophobe Makromoleküle, bestehend aus 4-Hydroxyphenylpropanoiden, die durch radikalische Kopplungsreaktionen eine Vielzahl ungerichteter Bindungsmuster eingehen. Daraus entsteht ein komplexes, kovalent gebundenes und hydrophobes Heteropolymer. Zwar Beginnt die Lignifizierung der Zellwand in der Mittellamelle, später jedoch sind Lignin überwiegend in der Sekundärzellwand wiederzufinden. Der Grad der Lignifizierung und die Ligninzusammensetzung sind dabei je nach Taxon, Gewebe und Zelltyp unterschiedlich sowie von dem Entwicklungsstand und den Umwelteinflüssen der Pflanze abhängig (Boerjan *et al.*, 2003).



**Abbildung 5** Strukturen relevanter Monolignole. C, Catechyl; G, Guaiacyl; H, p-Hydroxyphenyl; S, Syringyl

Die mengenmäßig und im Rahmen dieser Arbeit relevanten Grundbausteine, die sogenannten Monolignole, sind in Abb. 5 dargestellt: p-Cumaryl-, Coniferyl-, Sinapyl- und Caffeylalcohol. Je nach Anteil der beteiligten Monolignole können Lignine in p-Hydroxyphenyl- (H), Guaiacyl- (G), Syringyl- (S) oder Catechyleinheiten eingeordnet werden (siehe Abb. 5). Die Catechyleinheit stellt indessen eine seltene Variante dar und wurde unlängst in den Samenschalen von Vanilleschoten (*Vanilla planifolia* JACKSON EX ANDRES) und in diversen Kakteenarten (Cactoidae Subfamilie) nachgewiesen (Chen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Tobimatsu *et al.*, 2013). Typischerweise besteht das Lignin von Gymnospermen vorwiegend

aus G-Einheiten (Weichhölzer), Angiospermen bestehen sowohl aus G- als auch aus S-Einheiten (Harthölzer) und monokotyle Pflanzen (insbesondere Gräser) besitzen ein ausgeglichenes G/S-Verhältnis mit höheren Anteilen an H-Einheiten (Boerjan *et al.*, 2003). Eine Reihe weiterer Verbindungen werden als potentielle Ligninmonomere gehandelt. Zum einen werden in  $\gamma$ -Position veresterte Monolignole (Acetate, *p*-Cumarate, *p*-Hydroxybenzoate) sowie Abkömmlinge der Monolignolsynthese (Hydroxyzimtaldehyde/-alkohole) ebenfalls in Lignin eingebaut und dienen u. A. als Endgruppen. Aber auch *p*-Hydroxyzimtsäuren, allen voran die *p*-Cumarsäure und die Ferulasäure, werden in Lignin eingebaut, wobei Ferulasäure nachweislich Crosslinks zwischen Lignin und Polysacchariden bildet (Ralph *et al.*, 2004).



**Abbildung 6** Strukturen ausgewählter Ligninbindungstypen. Die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Analytik beruht auf der Spaltung der  $\beta$ -Aryl-Ether-Struktur und der Benzodioxan-Struktur. Der  $\beta$ -Aryl-Ether ist die häufigste Bindungsform in G/H/S-Lignin, während C-Lignin vorwiegend in Benzodioxan-Strukturen vorliegt. C, Catechyl; G, Guaiacyl; H, *p*-Hydroxyphenyl; S, Syringyl

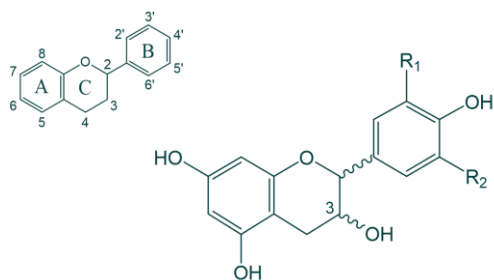
Die strukturelle Variabilität von Ligninen wird durch die vielen möglichen Kopplungen der Monomere verstärkt (siehe Abb. 6). Im Wesentlichen ermöglicht die Struktur der Monomerradikale die Kopplung über verschiedene Positionen, jedoch wird die  $\beta$ -Position bei der Biosynthese von Lignin tendenziell bevorzugt (Ralph *et al.*, 2004). Lignin „wächst“ vorwiegend durch die Kopplung eines weiteren Monolignols an das sich entwickelnde Polymer unter Bildung der  $\beta$ -Aryl-Ether- ( $\beta$ -O-4) und der Phenylcumaran-( $\beta$ -5/ $\alpha$ -O-4)-Bindung. Bei der

## 1. Einleitung

Dimerisierung zweier Monolignole, Kopplungsreaktionen von Monolignolen mit Ligninoligomeren oder von Ligninoligomeren miteinander sowie der *in vitro* Lignifizierung können weitere Bindungstypen vorkommen. Dazu gehören die Dibenzodioxocin-Struktur (5-5/ $\beta$ -O-4/ $\alpha$ -O-4), die Spirodienonstruktur ( $\beta$ -1/ $\alpha$ -O- $\alpha$ ) sowie die aus der  $\beta$ - $\beta$ -Bindung resultierenden Resinol ( $\beta$ - $\beta$ / $\gamma$ -O- $\alpha$ )- oder Tetrahydrofuran ( $\beta$ - $\beta$ / $\alpha$ -O- $\alpha$ )-Struktur (Ralph *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist die Ausbildung der Bindungstypen abhängig von verschiedenen exogenen Einflussfaktoren sowie der unterschiedlichen Methoxylierung der beteiligten Monolignole. So bilden sich in S-reichen Ligninen eher Resinol- und  $\beta$ -O-4-Bindungen und seltener Kopplungen über C-5 aus, da diese Position im Sinapylalkohol methoxyliert vorliegt. Bei dem jüngst beschriebenen Catechyl-Lignin wurde festgestellt, dass dieses fast ausschließlich in Benzodioxan-Einheiten ( $\beta$ -O-4/ $\alpha$ -O-5) koppelt (Chen *et al.*, 2012).

### III. Proanthocyanidine

PA sind polymere sekundäre Pflanzenstoffe, die im Pflanzenreich weit verbreitet, aber im Eigentlichen unabhängig von der pflanzlichen Zellwand sind. Sie entstammen der Flavonoidbiosynthese im Cytoplasma und werden in der Vakuole gelagert (Jonker & Yu, 2017). Sie können in der Rinde, den Samen, den Nüssen und den Früchten verschiedener Spezies, besonders prominent in Beeren, vorkommen und werden auch als kondensierte Tannine bezeichnet (Hellström *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2009). Die ursprüngliche Zuordnung zu den Tanninen beruht auf ihrer Eigenschaft mit Proteinen (insbesondere Kollagen) zu interagieren, welche in früherer Zeit unter anderem zum Gerben („*tanning*“) von Leder ausgenutzt wurde (Quideau *et al.*, 2011). Ergänzend zu den PA, als kondensierte Tannine, wurde die Fraktion der hydrolysierbaren Tannine oder auch Gallo-/ Ellagtannine beschrieben. Dabei handelt es sich um Polyester von Monosacchariden (hauptsächlich Glc) mit organischen Säuren (hauptsächlich Gallussäure), die ebenfalls als Gerbstoffe wirken und in Blättern, Rinde und Früchten vorkommen können (Serrano *et al.*, 2009; Quideau *et al.*, 2011). Die Gruppe der hydrolysierbaren Tannine wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eingehender betrachtet.



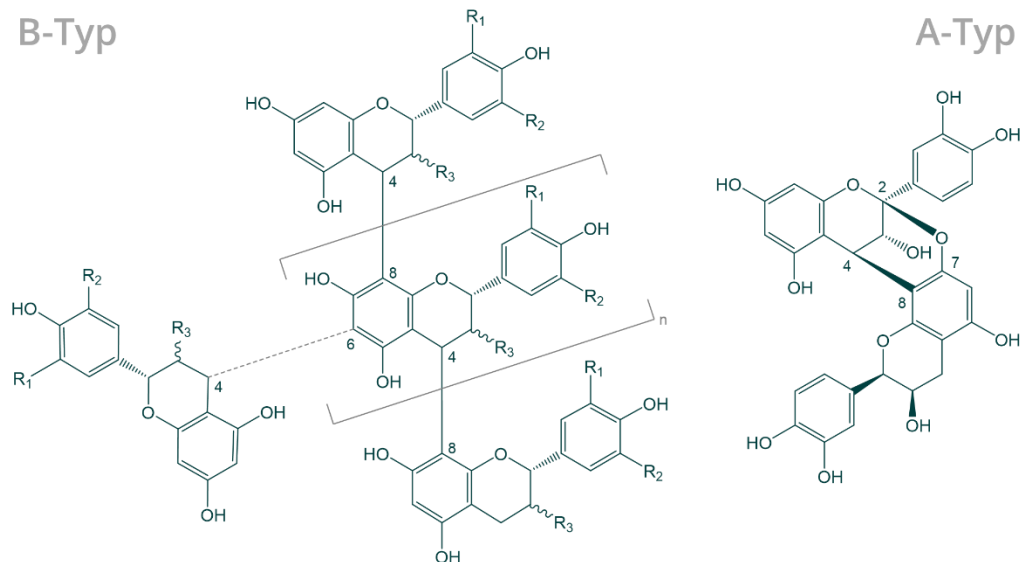
Flavan-3-ol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Stellung C-2 zu C-3	Polymer
(+)-Catechin			<i>cis</i>	Procyanidin
(-)-Epicatechin	OH	H	<i>trans</i>	
(+)-Gallocatechin			<i>cis</i>	Prodelphinidin
(-)-Epigallocatechin	OH	OH	<i>trans</i>	
(+)-Afzelechin			<i>cis</i>	Propelargonidin
(-)-Epiafzelechin	H	H	<i>trans</i>	

**Abbildung 7** Grundgerüst der Flavane (oben links) und Strukturen der häufigsten Flavan-3-ole in Proanthocyanidinen (Mitte und Tabelle)

Strukturell sind PA Oligo- bzw. Polymere aus Flavan-3-olen. Die Bezeichnung PA gründet auf der Beobachtung, dass aus PA nach Säurebehandlung intensiv rote Anthocyanidine hervorgehen. Flavan-3-ole sind Polyphenole auf Basis des Flavan-Grundgerüsts mit unterschiedlich hydroxylierten A- bzw. B-Ringen und Stereozentren an Position C-2 bzw. C-3



(siehe Abb. 7). Dementsprechend liegen die Grundbausteine jeweils als Diastereoisomere vor: Catechin und Epicatechin (C/EC), Gallocatechin und Epigallocatechin (GallC/EGallC), Afzelechin und Epiafzelechin (A/EA). Die Paare (Epi-)fisetinidol und (Epi-)robinetinidol sowie weitere potentielle Monomere mit diversen Hydroxylierungsmustern werden seltener beschrieben (Hümmer & Schreier, 2008; Serrano *et al.*, 2009). Theoretisch liegen die PA-Monomere zusätzlich als Enantiomerenpaare vor. In Abb. 7 sind die Hauptmonomere jeweils in ihrer natürlich vorkommenden Konfiguration, (+) oder (-), aufgelistet. Als homogene Polymere sind die Bezeichnungen Procyanidine (aus C/EC), Prodelphinidine (aus GallC/EGallC) und Propelargonidine (aus A/EA) geläufig. Sie leiten sich aus den resultierenden Anthocyanidinen ab, welche nach der oxidativer Depolymerisierung freigesetzt werden (siehe 3e). In manchen Fällen werden die Monomere an Position O-3 substituiert. So enthalten beispielsweise Weinbeeren und Nüsse Procyanidine die mit Gallussäure verestert vorliegen, woraus wiederum Catechingallat bzw. Epicatechingallat (CG/ECG) als erweiterte Monomere herrühren. Analog dazu konnten 3-O-Glycoside unter anderem in den PA mehrerer Bohnensorten nachgewiesen werden (Gu *et al.*, 2003; Prior & Gu, 2005).



**Abbildung 8** Bindungstypen der Proanthocyanidine. Links ist der B-Typ mit den Bindungen über Position 4 & 8 bzw. 4 & 6 (B-Typ) abgebildet. Rechts ist der der Bindungstyp A über die Positionen 4 & 8 und 2-O-7 abgebildet. Die Verbindung rechts entspricht dem Procyanidin A2. Die Abkürzungen der Reste entsprechen der Abb. 7.  $R_3 = \text{OH}$ , Gallussäure, Glycon

Die kovalente Bindung zwischen den Monomeren geschieht als C-C-Bindung über die Positionen 4→8 bzw. 4→6 (B-Typ) oder über eine Etherbindung über die Position 2→7 (A-Typ) (siehe Abb. 8). Der B-Typ stellt dabei die hauptsächliche Interflavanbindung in PA dar, während einzelne Spezies (beispielsweise die Cranberry und Erdnuss) zusätzlich den A-Typ häufig als Endgruppe aufweisen (Koerner *et al.*, 2009). Die mittlere Kettenlänge (ausgedrückt in DP) ist ein häufig erfasstes Attribut von PA, denn er beeinflusst die Bioverfügbarkeit und die Bioaktivität von PA (Hellström *et al.*, 2009). PA mit niedrigen DP ( $\leq 4$ ) können im Dünndarm resorbiert werden, während die Proteinbindungskapazität unter anderem mit der Kettenlänge ansteigt (Ou & Gu, 2014; Jonker & Yu, 2017). So stehen insbesondere die oligomeren Procyanidine (OPC) mit einem DP bis zu 8 bzw. 10 als vielfältig wirkendes

## 1. Einleitung

Nahrungsergänzungsmittel im Fokus der Ernährungsforschung. Sie werden beispielsweise für die kardioprotektiven Eigenschaften von Rotwein mitverantwortlich gemacht. Weitere diskutierte gesundheitsförderliche Wirkungen von PA werden im nachfolgenden Abschnitt 1ell aufgelistet. Die Interaktion langkettiger PA mit (Speichel-)Proteinen im Mundraum führt hingegen zu dem typischen adstringierenden Mundgefühl von Rotwein und beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (Jonker & Yu, 2017; Quideau *et al.*, 2011). Diese Bindungs- und Präzipitationsmechanismen wirken sich auch auf Polysaccharide aus und begründen die Assoziation von PA mit der pflanzlichen Zellwand (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

## e. Zellwandkomponenten und assoziierte Verbindungen in der Ernährung

### I. Als Ballaststoffe

Durch den Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln wie Gemüse, Obst und Vollkornprodukte nimmt der Mensch täglich Zellwandmaterial auf und versorgt den Körper darüber mit Ballaststoffen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. machte bereits darauf aufmerksam, dass mehr als zwei Drittel der Erwachsenen in Deutschland den empfohlenen Referenzwert für die Ballaststoffzufuhr von 30 g pro Tag nicht erreichen (DGE, 2012). Nach der Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 der europäischen Instanzen dürfen Lebensmittel mit einem Ballaststoffgehalt über 3 g/100 g als „Ballaststoffquelle“ und bei mehr als 6 g/100 g mit „hohem Ballaststoffgehalt“ gekennzeichnet werden. Ebenso sind für einzelne Lebensmittel wie Getreideballaststoffe oder Weizenkleie gesundheitsbezogene Angaben nach der Verordnung (EU) Nr. 432/2012 (auch bekannt als „*Health Claims*“-Verordnung) zulässig, die auf den Ballaststoffgehalt zurückzuführen sind. Im Rechtsraum der Bundesrepublik Deutschland sind Ballaststoffe definiert in der Verordnung Nr. 1169/2011 der Organe der Europäischen Union. Demzufolge sind Ballaststoffe natürliche oder synthetische Kohlenhydratpolymere aus drei oder mehr Monomereinheiten, die im menschlichen Dünndarm nicht verdaut oder resorbiert werden können und eine physiologisch positive Wirkung besitzen. Damit orientiert sich die Definition der EU an dem Wortlaut der Richtlinie zu Nährwertangaben des Codex Alimentarius von 2009 (zuletzt überarbeitet in 2015), ohne jedoch auf deren Fußnoten einzugehen (Codex Alimentarius Commission, 2015). Die „*American Association of Cereal Chemists*“ (AACC) führt dahingegen bereits seit 2001 eine tiefergehende Definition für Ballaststoffe. Darin sind Lignin und assoziierte Pflanzensubstanzen als Ballaststoffkomponenten integriert. Die AACC führt zusätzliche Eigenschaften der Ballaststoffe, wie die Fermentation im Dickdarm und die vorteilhaften physiologischen Effekte (Absenkung des Cholesterin- und des postprandialen Glucosespiegels im Blut) auf. Darüber hinaus werden Ballaststoffen in der Literatur viele weitere positive Wirkungen zugeschrieben: Erhöhung des Sättigungsgefühls, Gewichtsregulierung bei Adipositas, Verminderung des Krebsrisikos im Dickdarm, positive Modulation der Darmmikrobiota, Reduktion des Blutdrucks sowie Erhöhung des Stuhlvolumens bei gleichzeitiger Senkung der Transitzeit (Howlett *et al.*, 2010). Die Polysaccharide dienen der

Mikrobiota im Dickdarm als Substrat und werden unter anderem zu den kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat abgebaut. Butyrat dient den Darmepithelzellen als Energiequelle und wird als Schutzfaktor gegen die kolorektale Karzinogenese gehandelt (Scharlau *et al.*, 2009). Zudem begünstigen bestimmte Ballaststoffe als Präbiotikum selektiv das Wachstum bzw. die Aktivität von gesundheitsförderlichen Bakterienstämmen (Bifidobakterien & Lactobacillen). Eine gesunde Symbiose von Darmepithel und Mikrobiota ist ausschlaggebend für ein intaktes darmassoziiertes Immunsystem (Macpherson & Harris, 2004). Einzelnen Zellwandkomponenten konnten gesonderte positive Wirkungen nachgewiesen werden. So führen beispielsweise XGO aus Cranberries zur verringerten Adhäsion von uropathogenen *Escherichia coli* und erschweren die Biofilmbildung (Hotchkiss *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015; Coleman *et al.*, 2019; Coleman & Ferreira, 2020). Diese Mechanismen werden unter anderem für die antiinflammatorische Wirkung von Cranberries bei Harnwegseffekten verantwortlich gemacht. Anhand von lignifizierten Zellwänden konnte zudem gezeigt werden, dass das phenolische Makromolekül heterozyklische aromatische Amine adsorbiert und somit möglicherweise zu den krebspräventiven Eigenschaften von Ballaststoffen beiträgt (Funk *et al.*, 2007).

Die Struktur und Funktionalisierung der pflanzlichen Zellwand haben ebenso Einfluss auf die Ballaststoffeigenschaften ihrer Komponenten. So muss in Betracht gezogen werden, dass unterschiedliche Zellwände bzw. Pflanzengewebe ungleich zugänglich für die Fermentation sind (McDougall *et al.*, 1996). Einige der physiologischen Wirkungen von Ballaststoffen beruhen auf ihrer Eigenschaft Wasser zu binden und somit die Textur von Speisen bzw. des Speisebreis im Gastrointestinaltrakt zu verändern. Einzelne Zellwandpolysaccharide werden in der Lebensmittelindustrie aufgrund dieses funktionellen Aspekts eingesetzt. Pektine unterschiedlichen Ursprungs dienen bereits als Lebensmittelzusatzstoffe in der Funktion als Emulgatoren, Stabilisatoren, Füllstoffen, Dickungsmitteln und Geliermitteln. Doch auch Cellulosen, Mannane, Xylane und XG werden zu diesem Zweck angewandt (Scheller & Ulvskov, 2010). XyG können darüber hinaus zum Klären von Säften, in der Textilverarbeitung, zur Oberflächenmodifikation von Cellulosen und als pharmazeutischer Hilfsstoff eingesetzt werden (Gloster *et al.*, 2007).

## II. Als Antioxidantien

Auch die beschriebenen phenolischen Pflanzensubstanzen erweitern das bioaktive Spektrum von Ballaststoffen. Allgemein werden Polyphenolen aufgrund ihrer chemischen Struktur weitreichende gesundheitsförderliche Wirkungen zugeschrieben. PA beispielsweise besitzen eine sehr hohe antioxidative Kapazität. Sie fangen hochreaktive Sauerstoffspezies, in Form des Superoxid-Anions ( $O_2^{\cdot-}$ ), freien Hydroxyl ( $HO^{\cdot}$ -), Alkoxy ( $RO^{\cdot}$ -) und Peroxylradikale ( $ROO^{\cdot}$ ) ab, indem sie als Elektronendonatoren bzw. Wasserstoffdonatoren fungieren und stabile Phenoxyradikale bilden (Rasmussen *et al.*, 2005; Quideau *et al.*, 2011). Die mit Ballaststoffen assoziierten polyphenolischen Verbindungen, insbesondere PA, können bis zu 50 % der insgesamt aufgenommenen Antioxidantien ausmachen. Die polyphenolische Fraktion, die nicht durch wässrige Extraktion gewonnen werden kann, wird häufig auch als Nicht-Extrahierbare Polyphenole/Proanthocyanidine (NEPA) bezeichnet (Bravo *et al.*, 1994;

## 1. Einleitung

Pérez-Jiménez *et al.*, 2009; Saura-Calixto, 2011; Saura-Calixto, 2012; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015). Die starke Assoziation sowie die einhergehende Interferenz von PA bei der quantitativen Bestimmung von Ballaststoffen bzw. Lignin wurde bereits mehrfach beschrieben und eine Erweiterung des Konzepts und der Analytik von Ballaststoffen vorgeschlagen (Saura-Calixto *et al.*, 1991; Mañas *et al.*, 1994; Marles *et al.*, 2008; Saura-Calixto & Díaz-Rubio, 2007; Goñi *et al.*, 2009; Macagnan *et al.*, 2016). Fulgencio Saura-Calixto proklamierte 1998 dafür den Begriff „*antioxidant dietary fiber*“ (Saura-Calixto, 1998). Bisher wird dieses Konzept jedoch in der Definition, Analytik oder Bewertung von Ballaststoffen nicht berücksichtigt. Langkettige PA sind (gleichermaßen wie Polysaccharide) resistent gegen den Verdau und die Resorption im Magen bzw. Dünndarm und werden erst im Dickdarm fermentativ abgebaut. Die resorbierbaren Abbauprodukte, Phenylvalerolactone und Phenolsäuren, wirken ebenfalls (systemisch) antioxidativ und könnten mit den gesundheitsförderlichen Eigenschaften der PA in Verbindung stehen (Ou & Gu, 2014). Dazu gehören (lokale) antibakterielle und antiinflammatorische Eigenschaften sowie die Risikominderung von kardiovaskulären Krankheiten, diversen Krebserkrankungen und der Bildung von diabetischem Katarakt (Prior & Gu, 2005; Serrano *et al.*, 2009; Ou & Gu, 2014). Dabei ist allerdings zu beachten, dass diese Effekte überwiegend *in vitro* bzw. *in vivo* in Tiermodellen beobachtet wurden und, ähnlich wie die adsorptiven Eigenschaften der PA, von deren DP abhängig sind. Interessanterweise konnte die Schutzwirkung der Cranberry bei Harnwegseffekten sowohl mit ihren XGO als auch mit ihren PA in Verbindung gebracht werden. Es wird diskutiert, ob ihre gesundheitsförderlichen Wirkungen auf ihre PA, speziell der Bindungstyp A, zurückzuführen ist oder ob ein synergistischer Effekt mit weiteren bioaktiven Verbindungen verantwortlich ist (Howell *et al.*, 2005; Feliciano *et al.*, 2014; Blumberg *et al.*, 2016). PA reiche oder angereicherte Ballaststoffe sind vielversprechende physiologisch funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe, denen bisher analytisch und ernährungsphysiologisch wenig Beachtung geschenkt wurde (Arranz *et al.*, 2009; Saura-Calixto, 2011).



## 2. Zielsetzung

Die vielfältigen Früchte der Beerenobstsorten erfreuen sich hoher Beliebtheit und werden in vielen verschiedenen Formen verzehrt und dementsprechend verarbeitet. Ihre Funktion als Ballaststofflieferant wird dabei zumeist außer Acht gelassen. Zudem sind wissenschaftliche Daten bezüglich der Ballaststoff- bzw. Zellwandkomponenten vieler Beerenobstsorten nur lückenhaft vorhanden. Die Aufklärung dieser Strukturen kann dazu beitragen, den allgemeinen Kenntnisstand über die Zusammensetzung der Früchte zu erweitern und ihre ernährungsphysiologische Bewertung in neues Licht zu rücken. Durch Aufteilung der Früchte in ihre makroskopischen Komponenten, Schale, Fruchtfleisch und Samen, können auch Nebenerzeugnisse bei der Verarbeitung der Früchte neu bewertet werden. Zwar sind vereinzelt Erkenntnisse über die Zusammensetzung ausgewählter Zellwandkomponenten in den unterschiedlichen Beerenobstsorten vorhanden, jedoch existieren kaum Daten, in denen die Unterschiede zwischen den Fruchtgeweben und/oder der ganzen Frucht einheitlich betrachtet werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Früchte der Aronia, der Cranberry, der Himbeere und der Roten Johannisbeere als ganze Frucht sowie aufgeteilt in ihre Fruchtkomponenten hinsichtlich der Gehalte und der strukturellen Zusammensetzung ihrer Ballaststoffkomponenten zu charakterisieren. Die Ballaststoffgehalte sollen in Anlehnung an die aktuelle Methode der AOAC möglichst physiologisch korrekt bestimmt werden. Strukturell sollen die Ballaststoffpolysaccharide als Hauptkomponenten der Zellwand klassifiziert sowie die Anteile ihrer Monomere und die Bindungstypen in den Polysacchariden analysiert werden. Da Xyloglucane oft als wichtige Komponente der dikotylen Zellwand beschrieben werden, soll eine Profilingmethode zur Charakterisierung dieser Polysaccharide in den untersuchten Beeren entwickelt werden. Eine effiziente Xyloglucan-Profilingmethode könnte zukünftig allgemein zur umfassenden Charakterisierung der Hemicellulose-Strukturen dikotyler Pflanzen sowie zur Beobachtung von Zellwandveränderungen im Zuge weiterer Forschungsarbeiten Einsatz finden. Der gute Kenntnisstand bezüglich Xyloglucanstrukturen, die bewährte HPAEC-Technik und das Vorhandensein xyloglucanspezifischer Enzympräparate stellen vielversprechende Ausgangspunkte zur Entwicklung einer entsprechenden Methode dar. Im Zuge der Analyse der polymeren Zellwandkomponenten der Beerenobstsorten und ihrer Fruchtkomponenten soll ein besonderes Augenmerk auf die Samen gelegt werden. In den Pressrückständen der Früchte fallen die Samen neben vaskulärem und epidermalen Gewebe in nicht unerheblichen Größenordnungen als Nebenerzeugnis an. Die zumeist verhärteten Ausbreitungseinheiten der Früchte finden bereits aufgrund ihrer enthaltenen Lipide besondere Beachtung. Zudem weisen die Samen bestimmter Pflanzenspezies spezielle Speicherpolysaccharide auf, welche als funktionelle Polymere ebenfalls einen technologischen Mehrwert besitzen. Zusätzlich zu den Polysacchariden sollen die Ballaststoffe der Samen der Beerenobstsorten hinsichtlich etwaig vorhandener phenolischer Verbindungen untersucht werden. Sowohl die Quantifizierung als auch die Strukturcharakterisierung phenolischer Polymere in den Samen der ausgewählten Beerenobstsorten sollen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.



### 3. Material und Methoden

#### a. Beschreibung und Aufarbeitung des Probenmaterials

Gegenstand der Analysen im Rahmen dieser Arbeit sind verschiedene Beerenobstsorten, die in Deutschland als frisches Obst für den Verbraucher und/oder in der Lebensmittelindustrie relevant sind. Die Früchte wurden in den Erntejahren 2016 bzw. 2018 (Himbeere) bezogen. Die Aroniabeeren wurden nach der Ernte vom Großverwerter bei -18 °C gelagert und unter Kühlung über Nacht versandt. Die Gebinde der Aroniabeeren enthielten noch kleine Äste, Blätter und sonstiges Material aus der Umwelt. Die Cranberries wurden nach der Ernte ungekühlt versandt. Die Himbeeren und Roten Johannisbeeren wurden direkt am Hof bzw. im Großhandel abgeholt und am selben Tag tiefgefroren. Die Roten Johannisbeeren lagen überwiegend in Form von Trauben vor, während die Cranberries und Himbeeren als lose Früchte im Gebinde vorlagen. Alle Früchte wurden bei -40 °C gelagert. Alle vorhandenen Informationen über die Herkunft der Proben sind in Tab. 3 zusammengefasst.

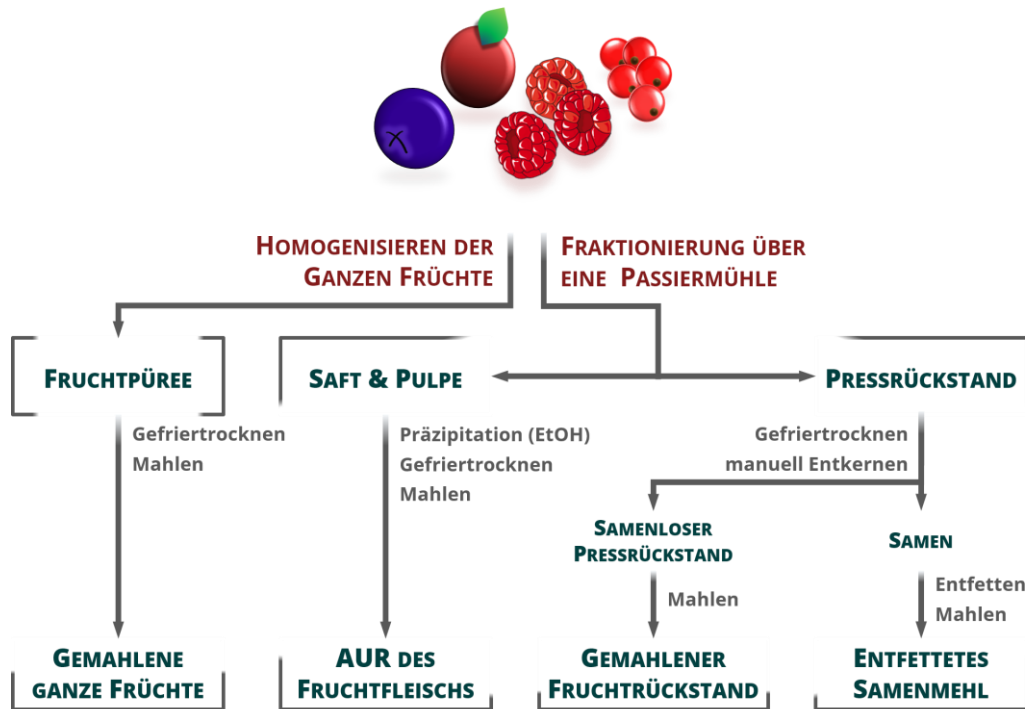
**Tabelle 3** Herkunft, Sorte und weitere Eckdaten der untersuchten Beerenobstsorten

Frucht	ARONIABEERE	CRANBERRY	HIMBEERE	ROTE JOHANNISBEERE
Sorte	Nero	Stevens	Tulameen	Rovada
Qualität	Bio	-	Klasse 1	Bio, Klasse 1
Ernte	Sommer 2016	Herbst 2016	Sommer 2018	Sommer 2016
Bezieher	Aronia ORIGINAL Naturprodukte GmbH, Dresden	Wilhelm Dierking Beerenobst, Gilten	Johanneshof Hockenheim, Schlump/Härdle GbR, Hockenheim	OGV Nordbaden, Bruchsal; Frohmadler Biohöfe KG, Großostheim
Herkunft	Deutschland (Brandenburg)	Deutschland (Niedersachsen)	Deutschland (Baden-Württemberg)	Deutschland (Bayern)

#### I. Aufarbeitung der Früchte und Fraktionierung der Gewebe

Die Gebinde wurden, falls nötig, vor der Weiterverarbeitung manuell von Ästen, Blättern, Stielen und sonstigem Material befreit. Zudem wurden Gewicht und Größe der Früchte (an mindestens 25 Exemplaren) sowie Anzahl und Gewicht der Samen (an mindestens 20 Exemplaren) gemessen. Die aufgetauten Früchte wurden im Ganzen mit einem Pürierstab homogenisiert. Daraus wurden Aliquote zur Bestimmung der Trockenmasse entnommen. Die pürierten Früchte wurden anschließend gefriergetrocknet und auf eine Partikelgröße von < 0,5 mm gemahlen. Diese Mehle aus ganzen Früchten wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.





**Abbildung 9** Schematischer Ablauf der Aufarbeitungsschritte der Beerenobstproben. AUR, alkoholunlöslicher Rückstand

Die Früchte sollten zudem möglichst in ihre Hauptkomponenten – Schale, Fruchtfleisch und Samen – aufgetrennt und diese separiert betrachtet werden (siehe Abb. 9). Zur Auftrennung im Labormaßstab wurde eine haushaltsübliche manuelle Passiermühle mit einem 1,3 mm Siebeinsatz verwendet. Auf diese Weise wurden alle Beerenfrüchte gepresst, und die Gewichtsanteile des austretenden Safts mit Pulpe bzw. des Pressrückstands ausgewogen. Es wird vorausgesetzt, dass Saft und Pulpe vorwiegend aus dem dünnwandigen Speicherparenchym des Perikarps stammen. Diese angereicherte Fraktion wird im Folgenden als Fruchtfleisch bezeichnet. Der hohe Gehalt an Zuckern und weiteren löslichen Verbindungen verhindern die vollständige Sublimation von Eiskristallen bei der Gefriertrocknung. Aus diesem Grund wurden diese Fraktionen erneut mittels eines Hochleistungsdispersierers homogenisiert und deren Trockenmasse bestimmt. Anschließend wurde das Fruchtfleischhomogenisat durch Zugabe von 99,5 %igem Ethanol (EtOH) auf 78 % EtOH verdünnt, um unlösliches und hochmolekulares wasserlösliches Zellwandmaterial zu präzipitieren (vgl. 2aII). Der resultierende alkoholunlösliche Rückstand (AUR) wurde anschließend gefriergetrocknet, gemahlen ( $< 0,5$  mm) und ausgewogen. In der Passiermühle verbleiben jeweils die Samen, diverses vaskuläres Gewebe und die Epidermiszellen bzw. Cuticula der Schalen als Pressrückstand/Trester der Früchte. Nach dem Gefriertrocknen und Auswiegen wurden daraus manuell ausreichende Mengen an Samen isoliert und gereinigt. Dementsprechend wurde je eine Fraktion aus samenfreiem Pressrückstand gewonnen und anschließend direkt vermahlen ( $< 0,5$  mm). Diese Fraktion aus Schale und Leitgewebe wird im Folgenden als Fruchtrückstand bezeichnet. Die Aufarbeitung und Untersuchung der Samen von Aronia, Cranberry und Roter Johannisbeere wurden im Rahmen der Masterarbeiten von Hendrik Eichhöfer und Florian Junker durchgeführt (Eichhöfer, 2017; Junker, 2018). Aufgrund der Speicherlipide in den Samen mussten diese vorgemahlen, entfettet und erneut auf die

### 3. Material und Methoden

gewünschte Partikelgröße von < 0,5 mm vermahlen werden (siehe 8j). Lipidgehalte von über 10 % stören bei der Isolierung und Bestimmung von Ballaststoffen nach McCleary und Mitarbeitern (McCleary *et al.*, 2015). Die Entfettung wurde in einer Soxhlet-Apparatur unter Verwendung von EtOH, Ethylacetat und *n*-Hexan durchgeführt. Vorarbeiten von Florian Junker hatten am Beispiel von Samen aus der Roten Johannisbeere gezeigt, dass der Verlust der assoziierten PA durch die dreifache Entfettung lediglich gering ausfällt (Junker, 2018). Die Samen der Himbeere wurden gleichermaßen nach Eichhöfer und Junker selbst aufgearbeitet und analysiert. Die drei resultierenden Mehle aus der Fraktionierung der Früchte in der Passiermühle - Fruchtfleisch (AUR), Fruchtrückstand und entfettete Samen - wurden ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Insgesamt lieferten die Aufarbeitungsprozesse vier für die Analytik von Ballaststoffen ausreichend fein gemahlene Mehle aus ganzen Früchten bzw. angereicherten Hauptkomponenten (Samen, Fruchtfleisch und Fruchtrückstand). Die Mehle der ganzen Früchte, des Fruchtfleischs und des Fruchtrückstands wurden auf ihren Ballaststoffgehalt, die Zusammensetzung bzw. Bindungsverhältnisse der enthaltenen Polysaccharidfraktionen und die Zusammensetzung der (enzymatisch verfügbaren) XyG untersucht. Die Samen wurden überdies auf ihren Gehalt an Lignin und assoziierten PA untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die dabei angewendeten Methoden erläutert. Die detaillierten Durchführungen sind jedoch im Abschnitt 8 einsehbar. Die dabei eingesetzten Chemikalien und Instrumente sind im Abschnitt 7a und 7d aufgelistet.

#### II. Isolierung und Quantifizierung von Ballaststofffraktionen

Sowohl die Bestimmungsmethoden als auch die Definitionen von Ballaststoffen basieren auf ihren physiologischen Eigenschaften und wurden in den vergangenen Jahrzehnten stetig überarbeitet und aneinander angepasst. Initial wurde von Prosky und Mitarbeitern eine enzymatisch-gravimetrische Methode entwickelt und von der „*Association of Official Analytical Chemists*“ (AOAC) als Methode 985.29 zur Bestimmung des Gesamtballaststoffgehalts akkreditiert (Prosky *et al.*, 1985). Das Prinzip der Methode beruht, angelehnt an die menschliche Verdauung, auf der Entfernung von verdaubaren Kohlenhydraten (Stärke) und Proteinen durch ausgewählte Enzympräparate. In den folgenden Jahren wurden Definition und Methodik parallel erweitert (Prosky *et al.*, 1994; McCleary *et al.*, 2015). So können mittlerweile resistente Stärken, durch den Wechsel von thermostabiler auf Pankreas  $\alpha$ -Amylase, korrekt als Ballaststoffkomponenten bestimmt werden. Die aktuell geltende Definition der EU sowie die Ballaststoffmethode nach McCleary und Mitarbeitern von 2015 basieren auf der Richtlinie des Codex Alimentarius von 2009 (Codex Alimentarius Commission, 2015). Diese „*Rapid Integrated Method*“ stellt hinsichtlich der physiologischen Relevanz eine Optimierung der Methode 2011.25 der AOAC dar und wurde unlängst als offizielle Methode 2017.16 bestätigt (McCleary *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit dient diese Methode als Grundlage für die Isolierung und Quantifizierung von Ballaststofffraktionen aus den Beerenproben (siehe 8a).

Die Mehle wurden in Pufferlösung bei physiologischen pH-Werten, Temperaturen und Zeitintervallen jeweils mit Pankreas  $\alpha$ -Amylase, Amyloglucosidase und Protease nacheinander

inkubiert. Die verdauten Proteine bzw. Stärke wurden anschließend zusammen mit allen weiteren gelösten nichtpolymeren und polymeren, aber wasserlöslichen Inhaltsstoffen durch mehrere Waschschriffe entfernt, während die unverdaulichen, hochmolekularen und wasserunlöslichen Bestandteile im Rückstand zurückbleiben. Abweichend zur Literatur wurden die Ballaststoffe der Proben nicht über Filtertiegeln separiert, sondern in 50 mL Reaktionsgefäßen abzentrifugiert und gewaschen. Diese Fraktion wird im Folgenden als unlösliche Ballaststoffe (UBS) bezeichnet. Aus dem wässrigen Überstand nach Zentrifugation und den vereinten wässrigen Waschfraktionen wurden anschließend durch Zugabe von EtOH (Endkonzentration = 78 % EtOH) die wasserlöslichen hochmolekularen Bestandteile präzipitiert. Diese können nun ebenfalls abzentrifugiert und gewaschen werden. Im Folgenden wird diese Fraktion als lösliche Ballaststoffe (LBS) bezeichnet. Auf die Korrektur der Asche- und Proteingehalte wird verzichtet, denn die gewonnenen Ballaststoffe sollten, im Gegensatz zur Methode nach McCleary und Mitarbeitern, für weitere Analysen erhalten bleiben (McCleary *et al.*, 2015). Auch von der Quantifizierung der niedermolekularen löslichen Ballaststoffe (NLBS) aus den Überständen bzw. Waschfraktionen nach der Präzipitation der LBS wird abgesehen. Vorversuche an ganzen Früchten der Aroniabeere, Roten Johannisbeere und Cranberry haben gezeigt, dass die angepasste Methode in den Reaktionsgefäßen, in Gegenüberstellung mit Ergebnissen nach der Methode von McCleary und Mitarbeitern, vergleichbare Werte für die unkorrigierten UBS- bzw. LBS-Gehalte liefert. Zudem konnten in keiner der drei Früchte NLBS nachgewiesen werden.

## b. Charakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide

Die Ballaststoffpolysaccharide sind das dynamische, funktionelle und stabilisierende Grundgerüst der pflanzlichen Zellwand. Die unterschiedlichen Fraktionen und Untergruppen befinden sich im ständigem Wandel und sind höchst individuell je nach Pflanze, Zellgewebe und Reifegrad zusammengesetzt (siehe 1b). Die tiefgründige Aufklärung der vorliegenden Strukturen und die umfassende Beobachtung ihrer Modifikation erweitern unser Verständnis der Zellwandarchitektur und der zugrundeliegenden Prozesse. Selbst gängige Nahrungspflanzen sind bezüglich der Zusammensetzung dieser Ballaststofffraktion nur ausschnittsweise beschrieben. Die Komplexität dieser Strukturen bedingt eine aufwendige Analytik. Um korrekte Aussagen über das Vorhandensein, die Anteile und Feinstrukturen einzelner Zellwandpolysaccharide treffen zu können, bedarf es mehrerer analytischer Herangehensweisen. So wurden im Rahmen dieser Arbeit die Polysaccharidfraktionen anhand ihrer Monosaccharidzusammensetzung eingeordnet und mittels der Methylierungsanalyse charakterisiert. Zudem wurde eine Screeningmethode zur Charakterisierung von XyG-Strukturen entwickelt, basierend auf der enzymespezifischen Freisetzung von XGO.

### I. Freisetzung von Monosacchariden durch Säurehydrolysen

Die Erfassung des Monosaccharidspektrums eignet sich, um einen ersten Überblick über vorhandene Polysaccharide zu erhalten. Dabei werden sämtliche glykosidischen Bindungen

### 3. Material und Methoden

mithilfe saurer Hydrolysen gespalten und das Verhältnis der freigesetzten Monosaccharide betrachtet. Anhand der Verteilung können somit bereits erste Rückschlüsse auf dominante Polysaccharidtypen gezogen werden. So deuten hohe Anteile von Glc auf Cellulose oder Hemicellulosen hin, da Glc in Pektinen praktisch nicht vorkommt. Je nach Zellwandtyp können zudem Anteile von Xyl, Man bzw. auch Gal, Fuc, Ara und GlcA prominenten Hemicellulosen wie XyG, Arabinoxylanen, Heteroxylanen oder Heteromannanen zugeordnet werden. Typische Monomere für Pektine sind GalA aus HG und RGI/II, Rha aus RGI/II sowie Ara und Gal aus Arabinanen (RGI) und Galactanen (RGII). Es ist jedoch zu beachten, dass das Monosaccharidspektrum lediglich Hinweise liefert. Eine zweifellose Identifizierung von einzelnen Polysaccharidtypen ermöglicht es nicht.

Das eingesetzte Hydrolysereagens muss bei der Beurteilung der Ergebnisse ebenso berücksichtigt werden. Die Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden mit Schwefelsäure nach Saeman und Mitarbeitern gilt als Standardmethode und wird weiterhin sehr häufig angewendet (Saeman *et al.*, 1945). Sie ermöglicht den Aufschluss von kristallinen Cellulosestrukturen bzw. schwerzugänglichen Hemicellulosen aus dem Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk. Jedoch erfolgt bei der Schwefelsäurehydrolyse keine vollständige Hydrolyse von Polygalacturonsäuren zu GalA. Zudem werden 6-Desoxyzucker wie Fuc und Rha diskriminiert (Saeman *et al.*, 1945; De Ruiter *et al.*, 1992). Die Schwefelsäurehydrolyse eignet sich demnach vorwiegend für die Fraktion der UBS, denn darin sind neben Cellulose vermehrt unlösliche Hemicellulosen und üblicherweise wenige Pektine enthalten (siehe 8bI). In den LBS ist dagegen das Vorhandensein kristalliner Cellulose ausgeschlossen. Demnach genügen für die Hydrolyse der Polysaccharide aus LBS schwächere Reagenzien wie verdünnte Salzsäure (HCl) oder Trifluoressigsäure (TFA). De Ruiter und Mitarbeiter empfiehlt für den vollständigen Aufschluss von pektinreichem Material eine Kombination aus einer Hydrolyse in methanolischer HCl (Methanolyse) gefolgt von einer TFA-Hydrolyse (siehe 8bII; De Ruiter *et al.*, 1992). Die Methanolyse spaltet selbst GalA-reiche Pektine zuverlässig auf, und die daraus resultierenden Methylglykoside werden durch die TFA wieder demethyliert. Beide Hydrolysereagenzien sind problemlos durch Evaporation zu entfernen (De Ruiter *et al.*, 1992). Damit werden die Beschränkungen der Schwefelsäurehydrolyse umgangen und GalA-basierte Polysaccharide realitätsnäher abgebildet.

#### II. Verfahren zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Aufgrund ihrer Struktureigenschaften (polare Stereoisomere) und der fehlenden Absorption von ultravioletten oder sichtbaren Licht (UV/VIS-Detektion) ist die Auswahl an geeigneten Analyse- bzw. Detektionsmethoden für Mono-, Oligo- und Polysaccharide im underivatisierten Zustand beschränkt. So empfehlen De Ruiter und Mitarbeiter im Anschluss zur kombinierten Methanolyse mit TFA-Hydrolyse die Analyse mittels „*High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*“ (HPAEC-PAD) (siehe 8bIV; De Ruiter *et al.*, 1992). Diese Art der Ionenchromatographie (IC) ist für Kohlenhydrate sehr gut geeignet (Lee, 1990). Die Trennung der Analyten (A<sup>-</sup>) geschieht auf Basis von Ionenaustauschprozessen an einer stationären Phase aus quervernetztem Polystyrol mit positiv geladenen quartären Ammonium-Gruppen (NR<sub>3</sub><sup>+</sup>). Verdünnte Natronlauge (NaOH)

stellt die mobile Phase dar. Dieses alkalische Milieu (pH = 12 - 13,5) bewirkt, dass die freigesetzten Monosaccharide teilweise deprotoniert vorliegen und mit der stationären Phase interagieren. Somit können alle Zellwandmonosaccharide nach der Hydrolyse innerhalb einer Messung ohne Derivatisierung chromatographisch getrennt werden (Lee, 1990). Unterstützt durch die alkalischen Bedingungen der Ionenchromatographie, werden die Analyten anschließend durch Oxidation an einer Goldelektrode amperometrisch detektiert. Um eine stetige Kontamination der Elektrode zu vermeiden, arbeitet dieser elektrochemische Detektor in zyklischen Pulsen. Zu Beginn wird, nach einer kurzen Equilibrationsphase, die Oxidation des Analyten (das Messsignal) als Stromfluss in Coulomb gemessen. Im Anschluss wird die Oberfläche der Gold-Elektrode zuerst durch ein höheres Potential gereinigt und vor dem nächsten Zyklus bei niedrigerem Potential reduziert. Das hohe Signal-Rausch-Verhältnis dieser Detektionsart ermöglicht die Detektion ab einem Bereich von 10 pmol (Rohrer, 2013). Die instrumentelle Kombination aus HPAEC und PAD vereint ein selektives Trennverfahren mit einer sensitiven und ebenfalls selektiven Detektion. Etwaige unerwünschte Reaktionen der Kohlenhydrate bei hohen pH-Werten, wie beispielweise die Epimerisierung oder  $\beta$ -Eliminierung, fallen während der Chromatographie nicht ins Gewicht (Rohrer, 2013).

Ein alternatives und häufig angewendetes Analyseverfahren für Monosaccharide ist die Gaschromatographie (GC). Die zwingend erforderliche Derivatisierung von Monosacchariden führt zwar zu einem höheren Arbeitsaufwand, dennoch stellt die GC eine etablierte und effiziente Analysemethode für Kohlenhydratgemische dar (Albersheim *et al.*, 1967; Sundberg *et al.*, 1996; Willför *et al.*, 2009). So können gleichwohl neutrale Monosaccharide als auch Uronsäuren in einer Messung bestimmt werden. Typischerweise werden die Analyten als Trimethylsilylether oder als Alditolacetate gemessen. Darüber hinaus ist die GC in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS) oder der Flammenionisationsdetektion (FID) zur Charakterisierung von Kohlenhydraten sehr ausgereift (siehe folgenden Abschnitt 3bIII). Das Retentionsverhalten, die Fragmentierungsmuster und Responsefaktoren üblicher Monosaccharidderivate sind bekannt (Albersheim *et al.*, 1967; Sweet *et al.*, 1975; Jansson, 1976; Bleton *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2005). Weitere Verfahren wie die klassische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) oder die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC), in variabler Kombination mit Brechungsindex- („*Refractive Index*“, RI) oder Lichtstredetektion („*Evaporative Light Scattering Detection*“, ELSD) sind für die Analyse von Monosacchariden ebenfalls etabliert. Diese Techniken wurden im Rahmen dieser Arbeit allerdings eher zur Analyse von Oligosacchariden angewendet (siehe 3cII).

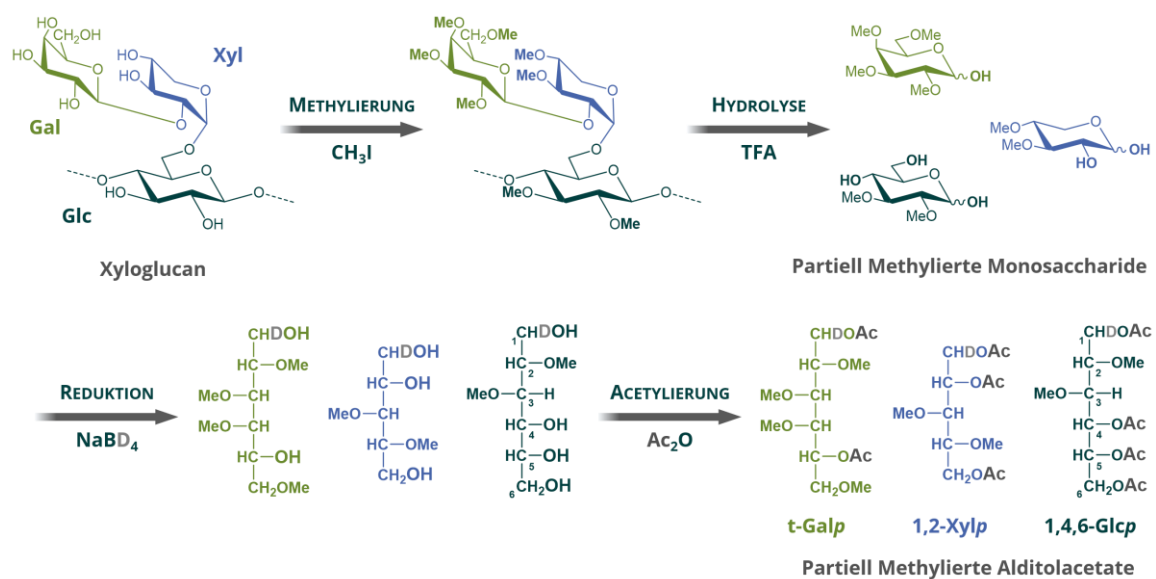
### III. Bestimmung der Monosaccharidbindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse

Die strukturelle Vielfalt von Polysacchariden, einhergehend mit ihrer variablen Funktionalität, resultiert im Wesentlichen aus den zahlreichen Bindungsmöglichkeiten, welche die vergleichsweise wenigen Monosaccharidspezies der pflanzlichen Zellwand eingehen können. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der vorhandenen glykosidischen Bindungen ein wichtiger Schritt, um strukturelle Aussagen über die Zellwandzusammensetzung treffen zu können. Die Standardmethode hierfür ist die Methylierungsanalyse (siehe Abb. 10 sowie 8c). Sie bewahrt die Information über die Bindungspositionen der einzelnen Monosaccharide in

### 3. Material und Methoden

dem nativen Polysaccharid. Die freigesetzten derivatisierten Monosaccharide können im Anschluss mittels der GC-MS bzw. -FID aufgeklärt und ins Verhältnis gesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methylierungsanalyse nach Nunes & Coimbra mit den Anpassungen nach Wefers und Mitarbeitern durchgeführt (Nunes & Coimbra, 2001; Wefers *et al.*, 2015).

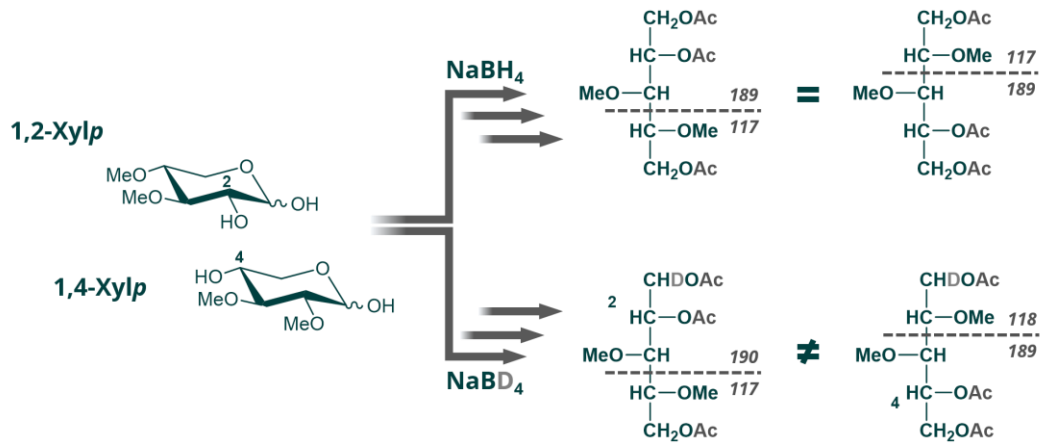
Ausgangspunkt der Methode ist die Methylierung der freien Hydroxylgruppen der Polysaccharide in Dimethylsulfoxid (DMSO) unter Zugabe von frisch gemörsertem NaOH mittels Methyljodid (siehe Abb. 10) (Ciucanu & Kerek, 1984). Für schwerlösliches Zellwandmaterial empfiehlt es sich die Proben über Nacht in DMSO quellen zu lassen bzw. die Methylierung zweifach durchzuführen (Pettolino *et al.*, 2012). Die Bindungstypen von Uronsäuren sowie ihrer Methylester lassen sich mit der Methylierungsanalyse nur bestimmen, wenn sie vor oder nach der Methylierung reduziert werden (Sims *et al.*, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk jedoch nicht auf GalA- bzw. GlcA-haltigen Polysacchariden, folglich wird auf die aufwendige Reduktion der Uronsäuren verzichtet. Anschließend werden die methylierten Polysaccharide in 2 M TFA hydrolysiert, wodurch die an den glykosidischen Bindungen beteiligten Hydroxylgruppen freigelegt werden.



**Abbildung 10** Schematischer Ablauf der Methylierungsanalyse am Beispiel eines Abschnitts eines Xyloglucanstrangs. Gal, Galactose; Glc, Glucose; p, pyranose; TFA, Trifluoressigsäure; Xyl, Xylose

Als nächstes werden die partiell methylierten Monosaccharide mittels Natriumborodeuterid ( $\text{NaBD}_4$ ) reduziert, wodurch gleichwohl die Öffnung des Ringsystems und die Markierung des anomeren C-1 mit Deuterium bewirkt wird (siehe Abb. 10). Die Information über die anomere Konfiguration ( $\alpha/\beta$ ) geht indes verloren. Die Deuterierung verhindert jedoch die Entstehung von Produkten mit identischem Substitutions- bzw. Fragmentierungsmuster. Beispielsweise führt die Reduktion von (1→2)- und (1→4)-gebundener Xylp mit Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) zu lediglich einem Monosaccharidderivat. Durch die Anwendung von  $\text{NaBD}_4$  entstehen zwei unterscheidbare Derivate (siehe Abb. 11). Im Fall von (1→2)- bzw.

(1→4)-Xylp verhindert dies zwar nicht die Koelution der Produkte, dennoch können die Anteile an (1→2)- bzw. (1→4)-Xylp anhand des Massenspektrums abgeschätzt werden (Björndal *et al.*, 1970; Nguema-Ona *et al.*, 2012).



**Abbildung 11** Vergleich der Reduktionsprodukte aus partiell methylierten Monosacchariden unter Anwendung von Natriumborhydrid (oben) bzw. -deuterid (unten). Die resultierenden permethylierten Alditolacetate (PMAA) aus der oberen Reduktion sind identisch. Aus der unteren Reduktion gehen, entsprechend der ursprünglichen Position der glykosidischen Bindung, zwei verschiedene PMAA hervor. p, pyranose; Xyl, Xylose

Zuletzt werden die freigesetzten Hydroxylgruppen, die zuvor in den glykosidischen Bindungen und dem Ringschluss involviert waren, mit Acetanhydrid und 1-Methylimidazol als Katalysator acetyliert (siehe Abb. 10). Letztlich resultieren aus der Methylierungsanalyse partiell methylierte Alditolacetate (PMAA) mit deutlich erhöhter Flüchtigkeit im Vergleich zu den entsprechenden Monosacchariden. Infolgedessen gestattet die Derivatisierung die Analyse unterschiedlich verknüpften Monomere mittels GC-MS sowie die Zuordnung der Spektren im Vergleich mit Literaturquellen und Onlinedatenbanken (Jansson, 1976; Sasaki *et al.*, 2005; Sims *et al.*, 2018; CCRC, 2007). Zur Vereinfachung werden, stellvertretend zur exakten Bezeichnung aller Substituenten, im Folgenden die PMAA entsprechend ihrer Verknüpfungen in verkürzter Schreibweise benannt (1,4-Glcp statt 1,4,5-O-Triacetyl-1-deutero-2,3,6-O-trimethyl-D-glucitol). Ergänzend zur Elutionsreihenfolge wird die eindeutige Identifizierung der PMAA durch eine standardisierte Ionisationstechnik gewährleistet. Bereits publizierte Fragmentierungsmuster von PMAA sind ebenfalls mittels Elektronenstoßionisation (EI) bei einem Ionisationspotential (Beschleunigungsspannung der Primärelektronen) von 70 V (woraus Elektronen mit einer kinetischen Energie von 70 eV resultieren) aufgezeichnet und stimmen, trotz instrumenteller Unterschiede, sehr gut mit gegenwärtigen Spektren überein (Jansson, 1976; Sasaki *et al.*, 2005; Sims *et al.*, 2018). Die Analyten in der Gasphase kollidieren in der EI-Quelle mit dem Strahl der definiert beschleunigten Elektronen, werden ionisiert und unterliegen gut reproduzierbaren Fragmentierungsreaktionen. Aussagen über die Verhältnisse der PMAA können mithilfe der GC-FID getroffen werden. Kohlenwasserstoffe verfügen bei der Detektion mittels Flammenionisation über einen großen linearen Responsebereich. Auf Basis der „Effective Carbon Response“-Theorie ermittelten Sweet und Mitarbeiter dementsprechend Responsefaktoren, die zur Quantifizierung von PMAA mittels FID geeignet sind (Sweet *et al.*, 1975). Aus den Anteilen der unterschiedlich verknüpften

### 3. Material und Methoden

Monosaccharide lassen sich letztlich Informationen über vorhandene Polysaccharidklassen sowie deren Verhältnisse und Strukturmerkmale ableiten. So kann beispielsweise anhand von unterschiedlichen Glc-Derivaten (1,4-Glcp und 1,4,6-Glcp) zwischen Glc-haltigen Polysacchariden unterschieden werden (Cellulose und Xyloglucan).

#### c. Entwicklung einer Profilingmethode für Xyloglucane

Als variable Komponente des Cellulose-Hemicellulose-Netzwerks sind XyG ein wichtiger Baustein der dikotylen Primärzellwand (siehe 1bIV). Die im Fokus stehenden Beerenobstsorten entstammen jeweils verschiedenen dikotylen Familien, demnach stellen Pektine und XyG nach Cellulose die dominanten Zellwandpolysaccharide dar. Wie zuvor erläutert, ist die Charakterisierung der XyG-Strukturen in der Zellwandmatrix allein aus der Zusammensetzung bzw. den Bindungspositionen der Monosaccharide nicht möglich. Diese Problematik soll mithilfe einer eigens entwickelten XyG-Profilingmethode gelöst werden. Unter Anwendung der XEG sollen XGO aus isoliertem Zellwandmaterial (UBS bzw. LBS) enzymatisch freigesetzt werden und anschließend mittels HPAEC-PAD quantifiziert werden. Diese Herangehensweise soll, in Anlehnung an die Profilingmethode für neutrale Pektinseitenketten nach Wefers & Bunzel, entsprechend den vorhandenen Instrumenten als Methode in die Abteilung integriert werden (Wefers & Bunzel, 2016).

Vor der Entdeckung XyG-spezifischer Enzyme war die Charakterisierung und Zuordnung von XyG-Strukturen in pflanzlichen Proben zeit- und arbeitsintensiv. Die pflanzlichen Proben mussten mittels enzymatischem Verdau, stufenweiser alkalischer Extraktion und/oder Präzipitation in organischen Lösungsmitteln fraktioniert werden. Anionenaustauschchromatographie mit Boratpuffer, Affinitätschromatographie mit Cellulose oder Gelpermeationschromatographie (GPC) wurden unter anderem zur Anreicherung von Hemicellulosen eingesetzt (Fry, 1989). Typischerweise wurden aus den angereicherten Fraktionen XGO durch unspezifische Glucanasen oder partielle chemische Hydrolysen freigesetzt. Die Entdeckung von spezifischen Glucanasen vereinfachte die Charakterisierung von XyG (Pauly *et al.*, 1999b; Yaoi *et al.*, 2005). Traditionell wurden die XyG-Bausteine anhand der Monosaccharide bzw. ihrer Bindungstypen in Kombination mit MS-Daten und/oder Kernspinresonanz-Spektroskopie („*Nuclear Magnetic Resonance*“, NMR) strukturaufgeklärt (York *et al.*, 1990).

Gemeinsam mit der HPAEC-PAD etablierte sich die „*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*“ (MALDI) gekoppelt mit der „*Time of Flight Mass Spectrometry*“ (TOF-MS) als bevorzugte Methode zur XGO-Analyse (Lerouxel *et al.*, 2002; Tuomivaara *et al.*, 2015). Die in einer kristallinen Matrix (meist 2,5-Dihydroxybenzoesäure) eingebetteten Oligosaccharide desorbieren infolge des gepulsten Laserbeschusses und bilden vorwiegend Quasimolekülonen. Durch diese Ionisationstechnik wird die Fragmentierung des Analyten unterbunden (sanfte Ionisation), wodurch sie sich besonders zur Charakterisierung größerer Moleküle eignet. Im Anschluss werden die Ionen als Bündel durch ein elektrisches Feld im TOF-MS beschleunigt, und anhand der Flugzeit ihr Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) bestimmt. Die



Massenauflösung von Analytione mit gleichem  $m/z$ , jedoch unterschiedlichen kinetischen Energien (beispielsweise infolge der Ionisierung) kann durch Einsatz eines Reflektors verbessert werden. Die Energieunschärfe wird durch die verschiedene Eindringtiefe in das Reflektorfeld und die entsprechende entgegengesetzte Beschleunigung ausgeglichen, was eine hohe Massengenauigkeit bewirkt. Lerouxel und Mitarbeiter verglichen verschiedene Analysemethoden hinsichtlich ihrer Eignung zum XGO-Fingerprinting zur Unterscheidung von *Arabidopsis* Mutanten (Lerouxel *et al.*, 2002). Dabei stellte sich die MALDI-TOF-MS als schnellste Methodik heraus, wobei zur absoluten Quantifizierung zusätzlich ein kolorimetrischer Assay oder die Etablierung eines internen Standards notwendig wäre. Im Vergleich zur HPAEC-PAD besitzt die MALDI-TOF-MS jedoch den Vorteil, dass alkalilabile O-Acetyl-Gruppen abgebildet werden können. Tuomivaara und Mitarbeiter bestimmten bereits die relativen Responsefaktoren (RRF) von sechs charakteristischen XGO für die MALDI-TOF-MS und die HPAEC-PAD (Tuomivaara *et al.*, 2015). Diese wurden jedoch willkürlich in Relation zu XXXG bestimmt. Die Autoren kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass zur relativen Quantifizierung von XGO beide Methoden geeignet sind.

Aufgrund der vorhandenen Erfahrungen und Instrumente in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie wurde eine Methode angestrebt, welche auf der Quantifizierung von enzymatisch freigesetzten XGO mittels HPAEC-PAD unter Anwendung von zuvor bestimmten RRF beruht. Das spezifische Enzym ist als rekombinantes Präparat kommerziell erhältlich (siehe 3cII), die Erkenntnisse aus bisherigen Publikationen schränken die möglichen lebensmittelrelevanten XyG-Motive ein (1cIII) und vorherige Ansätze zur Bestimmung von neutralen Pektinseitenketten haben sich in der Praxis bewährt (Wefers & Bunzel, 2016). Davon ausgehend ist zunächst die Gewinnung, Strukturcharakterisierung und RRF-Bestimmung einer zweckmäßigen Auswahl von XGO-Standardsubstanzen von zentraler Bedeutung.

### **I. Auswahl und Aufarbeitung xyloglucanreicher Ausgangsmaterialien**

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von XGO-Standardsubstanzen wurde ein XyG-Präparat aus Tamarindensamen, Tabakzellen in Suspensionskultur, der AUR von Mangofruchtfleisch und Cranberries eingesetzt (siehe 8d). Das Produkt P-XYLGLN der Fa. Megazyme (Bray, Irland) stellt ein bereits angereichertes XyG-Präparat (ca. 95 % rein) aus den Samen von *Tamarindus indica* (LINNÉ) dar. Diese enthalten große Mengen an unfucosylierten XyG als Speicherpolysaccharid (York *et al.*, 1993). Die Inkubation eines vergleichbaren Präparats mit unterschiedlichen Glucanasen führte stets zu den charakteristischen XGO XXXG, XXLG/XLXG und XLLG (Grishutin *et al.*, 2004).

Die Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* (LINNÉ) cv. Bright Yellow-2 wurde von Beate Kohn aus der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie zur Verfügung gestellt. Die Extraktion von XyG aus Zellkulturen hat den Vorteil, dass man vergleichsweise schnell eine erforderliche Menge an authentischem und leicht zugänglichem Zellwandmaterial erhält. Die sterilen, undifferenzierten Zellen bilden unter den kontrollierten Bedingungen lediglich Primärzellwände aus. Ausschlaggebend ist jedoch, dass die XyG-Strukturen der Tabakzelle bereits bekannt sind (York *et al.*, 1996; Nguema-Ona *et al.*, 2012). Tabak synthetisiert wie alle

### 3. Material und Methoden

Solanaceen, XyG mit dem Substitutionsmuster XXGG und den XyG-Motiven G, X, L und S. Die Tabakzellen wurden in Murashige-Skoog-Medium kultiviert und wöchentlich subkultiviert (siehe 7bVII und 8dI). Gefriergetrocknetes Zellmaterial wurde in wenig Wasser homogenisiert und der AUR durch Zugabe des vierfachen Volumens an EtOH präzipitiert.

Die XyG-Struktur der Früchte von *Mangifera indica* (LINNÉ) ist bisher unbekannt. Generell sind aus der Ordnung Sapindales lediglich die XyG von *Acer pseudoplatanus* (LINNÉ) beschrieben (Bauer *et al.*, 1973; Kiefer *et al.*, 1989; York *et al.*, 1990). Der Berg-Ahorn ist ebenfalls ein klassischer Modellorganismus in der Pflanzenzellkultur. Seine XyG weisen das Substitutionsmuster XXXG und die Motive G, X, L und F auf. Im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie konnte Larissa Kaufhold zeigen, dass die XyG der Mango, Orange (*Citrus sinensis* LINNÉ) und Litschi (*Litchi chinensis* SONNERAT) konform zum fernverwandten Berg-Ahorn aufgebaut sind (Kaufhold, 2019). Die geschälten und entkernten Mangofrüchte wurden homogenisiert, der AUR gebildet und UBS gewonnen. Daraus konnte Larissa Kaufhold unter anderem die XGO XFG, XXFG, XLFG als Standardsubstanzen gewinnen und zur Charakterisierung der Früchte einsetzen.

Aus Vorversuchen zeichnete sich ab, dass die Freisetzung von XGO aus Cranberries in sehr komplexen Chromatogrammen resultiert. Zudem konnte in der nahverwandten Blaubeere das weniger typische XyG-Motiv U nachgewiesen werden (siehe 1cI). In Anbetracht dessen, wurden UBS aus Cranberries ebenfalls als Quelle für XGO eingesetzt.

Während das Tamarindenpräparat direkt im präparativen Maßstab inkubiert werden konnte, mussten die UBS der Mango und Cranberry bzw. der AUR der Tabakzellen weiter angereichert werden. Zu diesem Zweck wurden die Substrate zweifach mittels 4 M NaOH extrahiert (siehe 8dIV). Die stark alkalischen Extraktionsbedingungen ermöglichen es, einen Großteil der XyG aus dem Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk zu lösen (siehe 1bIV). Die Zugabe von 20 mM NaBH<sub>4</sub> reduziert den Glc-Rest am reduzierenden Ende der XyG-Kette zum Alditol, wodurch die sukzessive Degradation des Stranges durch das sogenannte „Alkaline Peeling“ unterbunden wird. Aus dem neutralisierten Überstand, dem Hemicelluloseextrakt, wurde anschließend xyloglucanangereichertes polymeres Material erneut durch EtOH-Zugabe präzipitiert. Die mit der Extraktion und Neutralisierung eingehende Salzlast wurde mittels Dialyse gegen demineralisiertes Wasser für 24 h bei einem „Molecular Weight Cut-Off“ von 3500 Dalton entfernt (siehe 8dV).

## II. Gewinnung von Xyloglucan oligosacchariden als Standardsubstanzen

Die mit XyG angereicherten Substrate wurden im präparativen Maßstab (ca. 0,5 – 1 g/100 mL) unter Zugabe von XEG (30 – 50 U/g Substrat) in Reinstwasser bei 40 °C für 4-6 h inkubiert (siehe 8e). Das Enzympräparat aus *Paenibacillus* sp. wird bei der Fa. Megazyme unter der Artikelnummer E-XEGP geführt (siehe Tab. 4). Laut Hersteller ist das rekombinante Enzym sehr spezifisch auf XyG (Tamarinde), besitzt indes auf die Substrate  $\beta$ -Glucan (Gerste) und Carboxymethylcellulose eine relative Aktivität von < 0,02 % bzw. < 0,01 %.

Vorversuche an Tamarindenxyloglucan hatten ergeben, dass die XEG im vorgeschriebenen Natriumacetatpuffer ein identisches Produktspektrum (angezeigt durch identische Chromatogramme) lieferte wie bei Inkubationsversuchen in Reinstwasser. Somit konnte durch den Verzicht auf Pufferlösungen eine zusätzliche Salzlast in der HPAEC vermieden werden. Der pH-Wert der gelösten Substrate wurde, falls erforderlich, mittels verdünnter HCl bzw. NaOH auf das pH-Optimum im Bereich von 5,0 – 7,0 eingestellt. Durch die Zugabe des 4-fachen Volumens EtOH wurde zum einen der enzymatische Verdau gestoppt und zum anderen noch unverdautes polymeres Substrat präzipitiert. Die hydrolysierten XGO im Überstand wurden anschließend mittels GPC fraktioniert (siehe 8f). Ein Aliquot des Überstandes nach enzymatischem Verdau wurde zur Kontrolle der Inkubation mittels HPAEC-PAD analysiert. Gleichermaßen wurden alle weiteren Anreicherungs-schritte stets mittels HPAEC-PAD überprüft.

Die Vorfraktionierung der XGO-Mischungen wurde an einer Polyacrylamidphase (Bio-Gel P-2) durchgeführt. Die Säule mit einer Länge von 85 cm und einem Innendurchmesser von 2,6 cm wurde temperiert und isokratisch mit Reinstwasser als Eluent betrieben. Bio-Gel P-2 Material wird für die Anreicherung von XGO häufig als stationäre Phase eingesetzt (Hisamatsu *et al.*, 1992; York *et al.*, 1995; Vierhuis *et al.*, 2001; Eklöf *et al.*, 2012; Tuomivaara *et al.*, 2015). Es wird für die Trennung im Molmassenbereich von 100 – 1800 g/mol empfohlen. Im Vergleich zu anderen GPC-Phasen hat die Bio-Gel-Phase den Vorteil, dass die Analyten lediglich nach dem hydrodynamischen Volumen getrennt werden. Monosaccharide und nicht abgebaute und Polysaccharide können gut von den XGO separiert werden. Die Detektion erfolgte mittels RI. Diese unselektive und robuste Detektionsart bietet sich bei isokratischen Trennungen größerer Produktmengen an. Der RI-Detektor misst die Änderung der Lichtbrechung durch gelöste Analyten (Messzelle) im Vergleich zum reinen Eluenten (Referenzzelle). Die eluierenden XGO-Fractionen wurden in festen Zeitintervallen mit einem

**Tabelle 4** Datenblatt der Xyloglucan-spezifischen endo-Glucanase E-XEGP der Fa. Megazyme

<b>Xyloglucanspezifische endo-<math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>4)-Glucanase</b>	
Rekombinant aus <i>Paenibacillus</i> sp.	
E-XEGP, Lot 100701d Megazyme, Bray, Irland	
EC 3.2.1.151, GH 5	
42,3 kDa	
Spezifische Aktivität: 69 U/g Protein auf Tamarindenxyloglucan bei pH 5,5 und 40 °C	
Xyloglucan (Tamarinde)	100 %
Carboxymethylcellulose 4M	< 0,01 %
$\beta$ -Glucan (Gerste)	< 0,02 %
pH-Optimum	5,0 - 7,0
pH Stabilität	4,0 - 9,0
Temperatur-Optimum	50 °C
Temperatur Stabilität	bis 50 °C

### 3. Material und Methoden

Fraktionensammler aufgefangen und anschließend entsprechend der Chromatogramme vereinigt.

Zur weiteren Reinigung der XGO-Fractionen bietet sich die präparative HPLC an (siehe 8fII). Durch den Einsatz skaliertes Säulen können größere Mengen Analyt injiziert, getrennt und anschließend aufgefangen werden. Für underivatisierte Kohlenhydratgemische kommen die konventionellen Umkehrphasen („*Reversed Phase*“, RP) nicht in Frage. Bei stationären Phasen mit unpolare Modifikation (C18, C8, Phenyl-Hexyl) ist die Wechselwirkung mit sehr polaren Analyten zu schwach für eine zufriedenstellende Trennung. Zudem können reduzierende Saccharide aufgrund der Mutarotation zwischen dem  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Anomer auf solchen Phasen in Doppelpeaks resultieren. Alternativ stellen „*Porous Graphitic Carbon*“ (PGC)-Säulen eine geeignete stationäre Phase für die Trennung von Zellwandoligosacchariden dar (Westphal *et al.*, 2010). Die Retentionseigenschaften der sphärischen Graphitphase unterscheiden sich sehr von denen der pellicularen Silicaphasen. Bei modifizierten Silicagelen ist die Retention des Analyten von der Art der modifizierten stationären Phase und den damit einhergehenden Wechselwirkungen abhängig. In der Graphitphase interagieren freie Elektronenpaare oder aromatische  $\pi$ -Elektronen mit der flachen kristallinen Oberfläche der hexagonal angeordneten Kohlenstoffatome. Planare Analyten werden dabei stärker retardiert als nicht-planare. Diese Phase ermöglicht eine zufriedenstellende Trennung von nativen Oligosacchariden unter Anwendung eines sparsamen RP-Gradienten (wenig organisches Lösungsmittel zu Beginn der Gradientenelution). Bei einzelnen chromatographisch schwierigen Trennungen bietet sich, ergänzend zur PGC-Säule, eine Reinigung über eine HILIC-Phase an (Liu *et al.*, 2016). Die polar modifizierte Oberfläche der stationären Phase bildet mit dem Eluenten eine Pufferschicht (immobilisiertes Wasser). Aufgrund von Verteilungsmechanismen zwischen dem immobilisierten Wasser über der stationären Phase und dem Eluenten interagieren die Analyten basierend auf ihrer Polarität. Da PGC- bzw. HILIC-Säulen in präparativen Dimensionen sehr kostspielig in der Anschaffung sind, wurden analytische Säulen mit einer automatisierten Probenaufgabe und einem programmierbaren 16-Wege-Fraktionierventil kombiniert. Die Anwendung eines Gradientensystems schließt die Detektion mittels RI aus. Unter diesen Umständen bietet sich der ELSD an. Dabei werden die mittels Stickstoff zerstäubten Eluenttropfen weiter getrocknet und die Analytpartikel werden anhand von Lichtstreuung registriert. Aufgrund der hohen Flussraten (1,5 – 3 mL/min) des semipräparativen Ansatzes wurden der ELSD und das Fraktionierventil parallel im Splitverhältnis 1:20 installiert. Diese instrumentellen und chromatographischen Verfahren ermöglichten die Isolierung von XGO als Standardsubstanzen in mg-Dimensionen mit einer Reinheit von mindestens 75 %, zumeist jedoch von über 90 % (bestimmt anhand der Flächenverhältnisse mittels HPAEC-PAD).

### III. Strukturaufklärung der isolierten Standardsubstanzen

Voraussetzung für die Entwicklung eines XyG-Profilings sind charakteristische und authentische XGO-Standardsubstanzen. Diese sollten zur eindeutigen Strukturaufklärung und RRF-Bestimmung jeweils in ausreichender Menge und Reinheit vorliegen. Insbesondere aufgrund der teilweise unempfindlichen 2D-NMR-Experimente bedarf es ein bis mehrere

Milligramm an Standardsubstanz. Die Herangehensweise der XGO-Aufklärung orientiert sich an Wefers & Bunzel (Wefers & Bunzel, 2016). Der solide Bestand an wissenschaftlicher Literatur und die selektive Gewinnung der Substanzen grenzen die strukturellen Merkmale vorweg ein. Die Bestimmung der beteiligten Monosaccharide liefert bereits grundlegende Hinweise über mögliche Seitenketten, den DS und/oder den DP. Aufgrund der Abwesenheit von GalA kann die Monomierzusammensetzung der gut löslichen XGO bereits nach einer kurzen TFA-Hydrolyse (siehe 8bIII) bestimmt werden (Albersheim *et al.*, 1967). Die hohe Empfindlichkeit der HPAEC-PAD ermöglicht die Bestimmung der Monosaccharide bei sehr geringem Probeneinsatz. Daraus können jedoch nicht die Konstitution, die Konfiguration und die Molekülmasse der XGO bzw. der eingebundenen Monosaccharide abgeleitet werden.

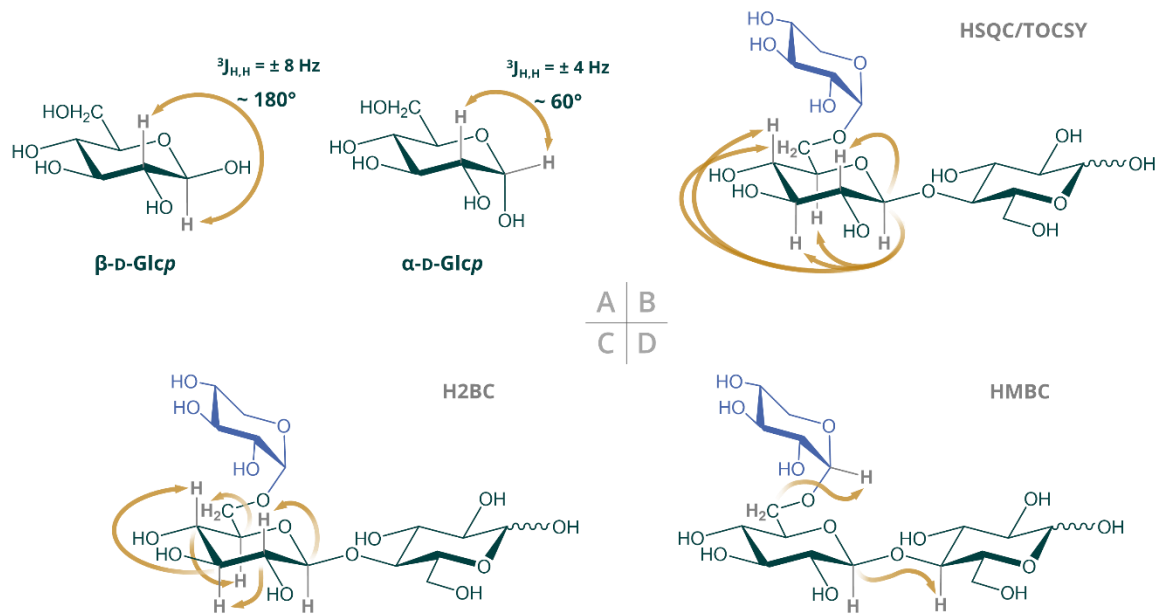
Die Charakterisierung der Standardsubstanzen mittels MS benötigt ebenfalls lediglich geringe Mengen an Standard. Je nach Anwendung können somit das Molekulargewicht und das Substitutionsmuster ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit und der Abschlussarbeit von Larissa Kaufhold wurden die underivatisierten XGO mit Lithiumchlorid (LiCl) als Adduktbildner direkt nach Elektronen-Spray-Ionisation (ESI) mittels einer linearen Ionenfalle charakterisiert (siehe 8gI). Alkali-Addukte werden bei der MS-Analyse von Oligosacchariden häufig beobachtet oder gezielt induziert (Cancilla *et al.*, 1996). Die daraus resultierenden positiven Quasimolekülonen sind gut reproduzierbar. Durch die natürliche Häufigkeit und das ubiquitäre Vorkommen ist die Entstehung von Natriumaddukten nicht auszuschließen. Ebenso muss bei großen Molekülen die Entstehung von Zweifachaddukten und das damit einhergehende ca. halbierte  $m/z$  in Betracht gezogen werden. Die ESI ermöglicht eine sanfte Ionisierung und den Übergang von gelösten Analyten in die Gasphase. Analyt und Eluent werden durch eine beheizbare Kapillare mithilfe eines Trägergases zu einem geladenen Aerosol zerstäubt. Im elektrischen Feld zwischen der Sprühkapillare und der Gegenelektrode werden die geladenen Tröpfchen mit Analyten beschleunigt. Die Verdampfung des Lösungsmittels durch eine beheizte Sprühkapillare und/oder durch Trockengas führt zu einer stetigen Reduktion der Tröpfchengröße. Der genaue Freisetzungsprozess der Analytionen in die Gasphase ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Die Ionen gelangen durch eine Mikroöffnung in der Gegenelektrode und werden durch eine Transferkapillare in Richtung Massenanalysator geführt. Die Trennung der Massen nach ihrem  $m/z$  und die gezielte stufenweise Fragmentierung der Analytionen geschieht anschließend mithilfe der linearen Ionenfalle. Durch Potentialanpassung können Ionen in der Ionenfalle selektiv zurückgehalten und durch ein Kollisionsgas fragmentiert werden (entspricht  $MS^2$ ). Dieser Vorgang kann bei ausreichender Konzentration an Analytionen mehrfach wiederholt werden. Dies ermöglicht am Beispiel von XGO die sukzessive Abspaltung von Monomerbausteinen. Massedifferenzen von 18, 30, 132, 146 oder 162 sind beispielsweise charakteristisch für die Abspaltung von Wasser,  $CH_2O$ , Pentosen (Xyl/Ara), Desoxyhexosen (Fuc) oder Hexosen (Glc/Gal). Im Falle der XGO-Standardsubstanzen konnten Experimente bis hin zu  $MS^7$  durchgeführt und anhand der Fragmentspektren Erkenntnisse bezüglich vorhandener Seitenketten gewonnen werden.

Nach Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung, der Molekülmasse und der Fragmentierung wurden die XGO-Standardsubstanzen abschließend mittels geeigneter NMR-spektroskopischer Experimente hinsichtlich ihrer Konstitution und Konfiguration eindeutig

### 3. Material und Methoden

aufgeklärt (siehe 8gII). Zu diesem Zweck wurden von jeder Standardsubstanz ein Protonen- ( $^1\text{H}$ ), "Heteronuclear Single Quantum Coherence" (HSQC)-, HSQC/"Total Correlated Spectroscopy" (TOCSY)-, "Heteronuclear Multiple Bond Correlation" (HMBC)- und ein "Heteronuclear 2-Bond Correlation" (H2BC)-Spektrum aufgezeichnet. Die Kombination aller daraus abgeleiteten Informationen liefert ein Bild der vollständigen chemischen Struktur der XGO-Standardsubstanzen (Ringform, anomere Konfiguration, Bindungspositionen). Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit bietet es sich an die NMR-Experimente mit  $\text{D}_2\text{O}$  als Lösungsmittel durchzuführen. Durch den Protonenaustauscheffekt der leicht sauren Hydroxylgruppen der Oligosaccharide, resultiert dies zudem in deutlich vereinfachten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, da lediglich die an Kohlenstoff gebundenen Protonen abgebildet werden. Es hat sich etabliert Aceton in sehr geringen Mengen als Kalibrierreferenz zuzufügen, welches anschließend gut durch Evaporation zu entfernen ist. Alle Spektren wurden auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals kalibriert ( $\delta_{\text{H}} = 2,22 \text{ ppm}$ ;  $\delta_{\text{C}} = 30,89 \text{ ppm}$ ; Gottlieb *et al.*, 1997). Zur Unterstützung und Überprüfung kann grundsätzlich auf bereits publizierte NMR-Daten zurückgegriffen werden (York *et al.*, 1990; York *et al.*, 1993; York *et al.*, 1995; Watt *et al.*, 1999; Hoffman *et al.*, 2005; Tuomivaara *et al.*, 2015). Zusätzlich wurde die Zuordnung der NMR-Signale mit Hilfe von Vergleichsspektren der Monosaccharide (Glc, Xyl, Fuc, Gal, Ara), Isoprimverose ( $\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp}$ , X), Cellobiose (GG), Cellotriose (GGG) und Cellotetraose (GGGG) von Grund auf rekapituliert.

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Oligosacchariden zeigen vielfach überlagernde Signale als Multipletts. Meist grenzen sich lediglich die anomeren C/H-Signale (im „anomeren Bereich“ im Tieffeld bei ca. 4,40 - 5,40 ppm) oder die Methylgruppen von Desoxyzuckern (im Hochfeld) ab und liefern wichtige Hinweise. Anhand der vicinalen Kopplung des anomeren Protons mit seinem einzelnen Nachbarn (H-2), kann die anomere Konfiguration ( $\alpha$  oder  $\beta$ ) der Monosaccharide aus der Kopplungskonstanten (J) des Dublettsignals bestimmt werden. Laut der Karplus-Gleichung korreliert der Diederwinkel zwischen den Protonen an Position 1 und 2 mit der Kopplungskonstanten  $^3J_{\text{H,H}}$  (Karplus, 1963). Wenn die Hydroxylgruppe an Position 2 in äquatorialer Stellung vorliegt, dann resultiert ein  $\alpha$ -konfiguriertes anomeres Proton in einer  $^3J_{\text{H,H}}$  von ca. 4 Hz bzw. ein  $\beta$ -konfiguriertes anomeres Proton in einer  $^3J_{\text{H,H}}$  von ca. 8 Hz (siehe Abb. 12). Bei der Entwicklung der Profilingmethode wurde auf eine Reduktion verzichtet, infolgedessen besitzen die XGO am nichtterminalen Ende weiterhin reduzierende Glc-Reste. Aufgrund der Mutarotation der Halbacetale bildet sich in Lösung ein Gleichgewicht zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfiguration der reduzierenden Glc-Einheit aus. Die Glc am reduzierenden Ende der XGO erzeugt folglich zwei Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Anhand der chemischen Verschiebung und der Intensität der Signale der anomeren Protonen kann die Identität, das Verhältnis und sogar das Substituenten der vorhandenen Monosaccharide in den XGO abgeschätzt werden (siehe 4dIV). Beispielsweise lässt sich aus der chemischen Verschiebung des anomeren Signals der Xyl-Einheit ableiten, ob es sich um eine terminale, mit Gal, mit Ara oder mit fucosylierter Gal verknüpfte Seitenkette handelt. Darüber hinaus kann man bei terminalen Xyl-Einheiten anhand leichter Unterschiede in der chemischen Verschiebung differenzieren, ob die Xyl-Einheiten an der terminalen Glc-Einheit im Rückgrat gebunden sind oder nicht (Hoffman *et al.*, 2005).



**Abbildung 12** NMR-Experimente, die zur Aufklärung der Xyloglucan-oligosaccharide angewendet wurden. Anhand der Karplus-Gleichung kann aus der Kopplungskonstanten ( $J$ ) der Diederwinkel bzw. die anomere Konfiguration von Monosacchariden abgeleitet werden (A). Das HSQC/TOCSY- (B) bzw. H2BC-Experiment (C) ermöglicht die Zuordnung der Korrelationen innerhalb eines Monosaccharids am Beispiel von XG. Die Bindungspositionen zwischen den Monomeren können aus Korrelationen im HMBC-Spektrum abgelesen werden (D). Glcp, Glucopyranose

Unerlässlich für die Aufklärung von organischen Strukturen ist die Abbildung direkt an Kohlenstoff gebundener Protonen durch das  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Experiment ( $^1J_{C,H}$ ). Die indirekte Abbildung der Kohlenstoffe über die Messung der heteronuklearen Korrelation ist deutlich zeiteffizienter und besitzt einen höheren Informationsgehalt als die Aufnahme entkoppelter  $^{13}\text{C}$ -Spektren. In dem 2D-Spektrum werden die chemischen Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne (F1-Dimension) gegen die der Protonen (F2-Dimension) aufgetragen. Die Auflösung der Protonensignale in die zweite Dimension ermöglicht es, die stark überlappenden Signale der C/H-2 bis C/H-4/5 von XGO besser zu differenzieren. Bei Anwendung eines „multiplicity-edited“ (phasensensitiven) HSQC-Experiments können zudem Methylengruppen (an C-6) als negative Signale gut identifiziert werden. Die anschließenden Experimente bilden ebenfalls die heteronuklearen Korrelationen der XGO ab. Insofern stellt das HSQC-Spektrum das primäre Abbild der Molekülstruktur jedes XGO dar.

Das HSQC/TOCSY-Experiment ist bei der Strukturaufklärung von Oligosacchariden von hohem Nutzen, denn es erleichtert die Zuordnung der C/H-Signale zu den beteiligten Monosacchariden. Mit einem TOCSY-Experiment können, über geminale oder vicinale Kopplungen hinaus, Korrelationen innerhalb eines gemeinsamen Spinsystems abgebildet werden. Jede Monosaccharideinheit innerhalb einer XGO stellt in diesem Zusammenhang ein geschlossenes Spinsystem dar. So werden im HSQC/TOCSY-Spektrum, beispielsweise ausgehend von den Signalen der anomeren Protonen, die Signale der übrigen C/H-Kopplungen innerhalb eines Monosaccharids sichtbar. Im Fall von XGO ermöglicht dies, dass die im HSQC-Spektrum überlagerten Signale der C/H-Kopplungen der Positionen C-2 bis C-5/6 den beteiligten Monosacchariden zugeordnet werden können (siehe Abb. 12).

### 3. Material und Methoden

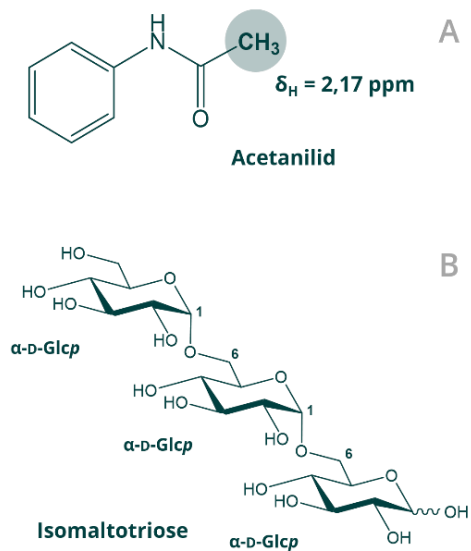
Das H2BC-Experiment offenbart ausschließlich  $C/H$ -Korrelationen über zwei Bindungen ( ${}^2J_{C,H}$ , siehe Abb. 12). Infolgedessen wird in Oligosacchariden nur der direkte Nachbar angezeigt und das Spektrum ist im Vergleich zum HMBC-Experiment zwar reduziert, jedoch liefert es nützliche Informationen. Während das HSQC/TOCSY- oder das HMBC-Experiment keine Hinweise über die Anzahl der dazwischenliegenden Bindungen liefern, kann man im H2BC-Spektrum beispielsweise, von dem anomeren  $C/H$ -Signal ausgehend, schrittweise die direkt benachbarten  $C/H$ -Kopplungen identifizieren (Petersen *et al.*, 2006). Insofern stellt es eine Erweiterung des HMBC-Experiments dar, denn ebendiese  ${}^2J_{C,H}$ -Kopplungen sind im HMBC-Spektrum häufig nicht sichtbar. Informationen über vicinale Protonen können zwar ebenso dem COSY-Experiment entnommen werden, jedoch bietet das H2BC-Experiment durch die zusätzliche F1-Dimension eine bessere Auflösung der Signale.

Keines der bisherigen Experimente ermöglicht es jedoch, Aussagen über die Bindungspositionen der Monosaccharide im XGO zu treffen. Die Tieffeldverschiebung der an der glykosidischen Bindung beteiligten  $C/H$ -Korrelationsignale im HSQC-Spektrum liefert nur unzureichende Hinweise für etwaige Bindungspositionen. Tragbare Belege ermöglicht erst das HMBC-Experiment, welches Korrelationen zwischen Kohlenstoffen und Protonen über weitere Distanzen hinweg sichtbar macht ( ${}^nJ_{C,H}$ ,  $n = 2 - 3$ ). Infolgedessen können im HMBC-Spektrum auch Korrelationen zwischen Kohlenstoffen und Protonen über die glykosidische Bindung hinweg identifiziert werden. Bei dem einfachen XGO XyG beispielsweise ist die Korrelation zwischen  $C/H-1$  und  $C/H-4$  der beiden Glc-Einheiten sowie zwischen dem  $C/H-1$  der Xyl-Einheit und dem  $C/H-6$  der Glc-Einheit als Kreuzsignale erkennbar (siehe Abb. 12).



#### IV. Quantifizierung und Bestimmung der relativen Responsefaktoren

Die NMR-Spektroskopie kann ebenfalls zur Konzentrationsbestimmung der XGO-Standardsubstanzen eingesetzt werden (siehe 8h). Selbst bei hohen Ausbeuten von mehreren mg ist das Auswiegen der Standardsubstanzen sehr erschwert. Sonstige quantitative Bestimmungsmethoden scheiden aufgrund fehlender Referenzsubstanzen oder molaren Extinktionskoeffizienten aus. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie hat sich hinsichtlich quantitativer Ansätze unter kontrollierten Bedingungen als valides und verlustfreies analytisches Messprinzip bewehrt (Bharti & Roy, 2012). Dies beruht auf dem Sachverhalt, dass die Anzahl angeregter Kerne direkt proportional zur Signalintensität im NMR-Spektrum ist. Wefers & Bunzel quantifizierten bereits unter Zugabe einer eines internen Standards verschiedene Oligosaccharide mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie (Wefers & Bunzel, 2016). Diese Vorgehensweise ist weniger aufwendig und zuverlässiger als die Quantifizierung über eine externe Kalibrierung. Bei der Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie unter Verwendung eines internen Standards sollte beachtet werden, dass Analyt und interner Standard in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich vorliegen, chemisch nicht miteinander interagieren, ähnliche Relaxationszeiten besitzen und vollständig im ausgewählten Lösungsmittel löslich sind. Von Vorteil wäre außerdem ein nicht flüchtiger oder hygroskopischer interner Standard, der im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ein gut abgetrenntes Singulet aufweist (Bharti & Roy, 2012). Da der interne Standard mit den isolierten XGO-Standardsubstanzen gemischt wird, sollte besonders beachtet werden, dass der Standard die anschließende HPAEC-PAD Analytik nicht stört. Acetanilid wurde anhand dieser Rahmenbedingungen von Wefers & Bunzel ausgewählt und soll auch bei der Quantifizierung der XGO als interner Standard eingesetzt werden (Wefers & Bunzel, 2016). Die Struktur von Acetanilid ist in Abb. 13 dargestellt. Darin ist die Methylgruppe, dessen Protonsignal bei der Quantifizierung mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie genutzt wird, samt seiner chemischen Verschiebung im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum angezeigt. Zur Vermeidung von Sättigungseffekten wurde das Relaxationsdelay (D1) der quantitativen Messung angepasst. Als Richtwert sollte D1 mindestens das fünffache der longitudinalen Relaxationszeit ( $T_1$ ) betragen. Im Rahmen ihrer Abschlussarbeit hat Larissa Kaufhold die  $T_1$ -Zeit von XXFG mit 1,43 s bestimmt (Kaufhold, 2019). Um sicher zu gehen wurde bei der  $^1\text{H}$ -NMR-basierten Quantifizierung aller XGO-Standardsubstanzen ein D1 von 15 s verwendet. Bei der Prozessierung der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurde darauf geachtet, bei allen XGO-



**Abbildung 13** Standardsubstanzen der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie (A) und der Responsefaktor-Bestimmung der HPAEC-PAD (B). In der Struktur von Acetanilid ist zudem die Methylgruppe hervorgehoben und ihre chemische Verschiebung ( $\delta_{\text{H}}$ ) angegeben.

genutzt wird, samt seiner chemischen Verschiebung im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum angezeigt. Zur Vermeidung von Sättigungseffekten wurde das Relaxationsdelay (D1) der quantitativen Messung angepasst. Als Richtwert sollte D1 mindestens das fünffache der longitudinalen Relaxationszeit ( $T_1$ ) betragen. Im Rahmen ihrer Abschlussarbeit hat Larissa Kaufhold die  $T_1$ -Zeit von XXFG mit 1,43 s bestimmt (Kaufhold, 2019). Um sicher zu gehen wurde bei der  $^1\text{H}$ -NMR-basierten Quantifizierung aller XGO-Standardsubstanzen ein D1 von 15 s verwendet. Bei der Prozessierung der quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurde darauf geachtet, bei allen XGO-

### 3. Material und Methoden

Standardsubstanzen einheitlich zu verfahren (automatische Basislinien- und Phasenkorrektur, korrekte Integration).

Anhand der Intergrale ausgewählter Protonensignale konnten die Konzentrationen der XGO-Standardlösungen bestimmt werden. Anschließend wurden daraus jeweils Stammlösungen mit einer Konzentration von 700 µM hergestellt. Die RRF für das HPAEC-PAD-basierte XyG-Profilings sollen anhand einer Kalibrierreihe aus dem jeweiligen XGO-Standard in aufsteigender Konzentration (0,1, 7, 14, 21, 28 µM) und einer geeigneten internen Standardsubstanz mit konstanter Konzentration (10 µM) ermittelt werden. Dieser interne Standard sollte gut verfügbar und chemisch verwandt sein, jedoch sollte die Substanz nicht natürlich in den Proben vorkommen und sich in die chromatographische Trennung einfügen. Somit bietet es sich an ein entsprechend strukturähnliches Oligosaccharid auszuwählen. Wefers & Bunzel verwendeten Raffinose als internen Standard zur Quantifizierung von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden (Wefers & Bunzel, 2016). Larissa Kaufhold testete verschiedene Oligosaccharide hinsichtlich der Anwendung als interner Standard, wobei Isomaltotriose (siehe Abb. 13), insbesondere aufgrund dessen chromatographischen Eigenschaften, dem Zweck am besten diene (Kaufhold, 2019). Jeder Kalibrierpunkt wurde dreifach mittels HPAEC-PAD bestimmt. Das Produkt aus der Fläche der Isomaltotriose mit der Konzentration des XGO ( $y$ ) wurde gegen das Produkt aus der Fläche der XGO mit der Konzentration der Isomaltotriose ( $x$ ) aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgerade beider Größen entspricht dem RRF.

#### V. Anwendung der Profilingmethode und Implementierung der HPAEC-PAD/MS

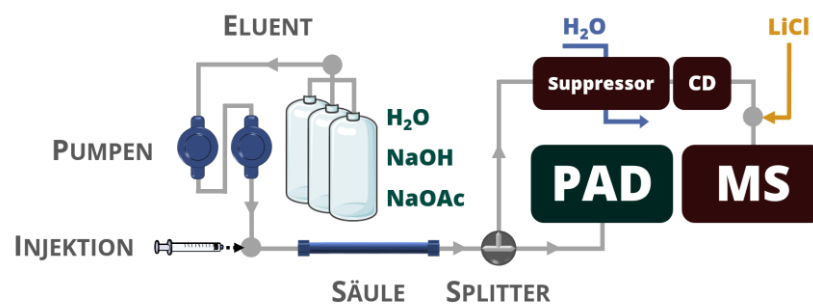
Die zuvor beschriebene Herangehensweise erübrigt zukünftig die Notwendigkeit von Standardsubstanzen bei der Quantifizierung von XGO, denn die RRF sind alleinig von dem ausgewählten internen Standard abhängig und somit (bei identischen Bedingungen) universell für die HPAEC-PAD einsetzbar. Unbekannte Konzentrationen der hier isolierten XGO können anhand der folgenden Formel errechnet werden:

$$c(XGO) = RRF * c(IMT) * \frac{A(XGO)}{A(IMT)} \quad (1)$$

Im Rahmen ihrer Masterarbeit konnte Larissa Kaufhold bereits die Anwendbarkeit der RRF auf UBS von Mango, Orangen und Litschi testen. Darauf aufbauend konnten zusätzlich die XyG-Zusammensetzung von UBS aus den verzehrbaren Geweben von Riesen-Kürbis (*Cucurbita maxima* DUCHESNE), Avocados (*Persea americana* MILLER) und Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* LINNÉ) erfolgreich charakterisiert werden. Im analytischen Ansatz wurden die UBS-Mehle in Reinstwasser mit XEG inkubiert und die freigesetzten XGO aus dem Überstand nach EtOH-Präzipitation analysiert (siehe 8i). Die Zuordnung der Signale im Chromatogramm erfolgte im Vergleich mit Standardsubstanzen. Allgemein können bei etwaigen Retentionszeitverschiebungen in erster Instanz die Signale anhand der relativen Retentionszeiten (RRT) den bekannten Standardsubstanzen zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Charakterisierung der XyG-Zusammensetzung sind im Anhang in Tab. A1 aufgelistet. Bei diesen Analysen wurden weitere analytische Beeinträchtigungen offenbart. Zum einen kann bei manchen Proben die Zuordnung der bekannten XGO durch das Auftreten

weiterer prägnanter Signale erschwert werden. Zudem unterliegt die HPAEC geringfügigen Schwankungen die dem Fließmittelzustand und/oder Matrixeffekten aus den natürlichen Proben zuzuordnen sind. Durch den regelmäßigen Einsatz von Standardlösungen als Zuordnungshilfe, können solche Schwierigkeiten leicht ausgeglichen bzw. entsprechend berücksichtigt werden, obgleich auf Kosten der limitiert vorhandenen Standardsubstanzen.

Diese Schwierigkeiten bei der Zuordnung können alternativ ebenso auf instrumenteller Ebene ausgeräumt werden. In der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie konnte unlängst die noch unkonventionelle Kombination aus HPAEC-PAD mit paralleler MS-Detektion implementiert werden (siehe Abb. 14). Üblicherweise verhinderten die hohen pH-Werte bzw. Salzgehalte des HPAEC-Eluenten die parallele elektrochemische und massenspektrometrische Analyse. Der alkalische Eluent wird nach der chromatographischen Trennung gesplittet und ein Teil zum PAD geleitet. Der restliche Eluent wird über einen elektrolytisch regenerierenden Suppressor entsalzt. Im Gegenfluss wird Wasser elektrolytisch gespalten und durch eine Membran  $\text{Na}^+$  durch  $\text{H}_3\text{O}^+$  ausgetauscht. Während die Analyten im Eluenten verbleiben, wird der Regenerent mit Natronlauge,  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2$  angereichert. Zum Schutz des MS-Systems überwacht ein Leitfähigkeitsdetektor („*Conductivity Detector*“, CD) die Funktionstüchtigkeit der Entsalzung. Zur Adduktbildung werden extern geringe Mengen an  $\text{LiCl}$  zugeführt. Schließlich erfolgt die Analyse mittels ESI-MS. Der einfache Quadrupol-Massenfilter separiert Ionen unterschiedlicher  $m/z$ , indem diese zwischen vier Stabelektroden auf stabile bzw. instabile Flugbahnen gebracht werden. Die Elektroden erzeugen durch Variation der Spannungsverhältnisse ein veränderliches elektrisches Feld, das nur definierte  $m/z$  passieren lässt. Diese Art der MS ermöglicht zwar keine gezielte Fragmentierung, dennoch können einfache Modi wie das „*Total Ion Chromatogram*“ (TIC) und das „*Selected Ion Monitoring*“ (SIM) angewendet werden.



**Abbildung 14** Schematischer Aufbau der Kopplung von Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit paralleler Detektion mittels gepulster Amperometrie und Massenspektrometrie (HPAEC-PAD/MS). CD, Leitfähigkeitsdetektor

Bezogen auf die angestrebte Profilingmethode für XGO erlaubt diese instrumentelle Erweiterung, dass trotz etwaiger Zuordnungsschwierigkeiten die bekannten Analyten anhand ihrer  $m/z$  korrekt identifiziert werden können. Der Zusammenschluss aus der leistungsfähigen HPAEC-Trennung und der sensitiven PAD-Detektion mit simultaner MS-Detektion stellt eine vielversprechende Analysenmethode für Oligosaccharide dar.

#### d. Ligninanalytik

Aufgrund der verhärteten Gewebestruktur der Samen der unterschiedlichen Früchte wurde die analytische Herangehensweise um Methoden der Ligninquantifizierung und -charakterisierung erweitert. In Samen verschiedener Vanille und Kaktus-Spezies wurde Caffeylalkohol als „exotisches“ Monolignol identifiziert (siehe 1dII), weshalb auch dieser Aspekt im Rahmen dieser Arbeit Berücksichtigung finden sollte. Die Einlagerung von Lignin in die sekundäre Zellwand verleiht pflanzlichem Gewebe zusätzliche Festigkeit und reduziert die Wasserdurchlässigkeit. Durch die vernetzte Struktur und die im Polymer vorhandenen Bindungstypen, ist das phenolische Makromolekül sehr robust und schwerlöslich und bedarf einer speziellen Analytik. Ursprünglich wurden die Methoden zur Bestimmung von Ligningehalten bzw. -strukturen zur Anwendung auf Hölzer und lignifizierte krautige Pflanzen entwickelt. Über pflanzliche Lebensmittel, wie Zerealien, Obst und Gemüse, ist Lignin gleichwohl Bestandteil der täglichen Ernährung (Bunzel *et al.*, 2004; Bunzel *et al.*, 2005b). Die Analysemethoden von Lignin beruhen auf verschiedenen Prinzipien. Das phenolische Polymer kann beispielsweise durch Entfernen aller Nicht-Lignin Komponenten isoliert, partiell in Lösung gebracht und/oder in die Grundbausteine aufgespalten werden. Die Samen der Aroniabeere, der Cranberry und der Roten Johannisbeere wurden im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Eichhöfer hinsichtlich der Polysaccharide und der Ligninstrukturen untersucht (Eichhöfer, 2017). Die Daten der Himbeersamen wurden entsprechend ergänzt.

##### **I. Bestimmung der Ligningehalte**

Derzeit existiert keine Standardmethode für die akkurate Bestimmung des Ligningehalts (Hatfield & Fukushima, 2005). Aus diesem Grund sollten stets mehrere analytisch unterschiedliche Verfahren zur Quantifizierung angewendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit und der Masterarbeit von Hendrik Eichhöfer wurde gravimetrisch das Klason-Lignin bzw. kolorimetrisch das acetylbromidlösliche Lignin (ABSL) bestimmt (siehe 8k+I). Die erste Methode basiert auf der zweistufigen Behandlung des Zellwandmaterials mit konzentrierter Schwefelsäure (Bunzel *et al.*, 2011). Dabei wird in Kauf genommen, dass einerseits säurelösliche Ligninbestandteile verloren gehen und andererseits weitere säureunlösliche Komponenten (Suberin, Cutin, Wachse, Strukturproteine und Proanthocyanidine) fälschlich als Lignin mit ausgewogen werden (Saura-Calixto *et al.*, 1991; Mañas *et al.*, 1994; Hatfield *et al.*, 1994; Bunzel *et al.*, 2011). Die Bestimmung des Klason-Lignins wurde nach Bunzel und Mitarbeitern an den UBS der Samenmehle samt Korrektur des Restproteins und des Aschegehalts durchgeführt (Bunzel *et al.*, 2011). Die zweite Methode basiert auf der Bromierung ( $\alpha$ -Position) und Acetylierung (Hydroxylgruppen) sowie der damit einhergehenden verbesserten Löslichkeit des Lignins in Essigsäure (Iiyama & Wallis, 1990; Hatfield *et al.*, 1999; Fukushima & Hatfield, 2001). Problematisch hierbei ist, dass zur akkuraten Quantifizierung des Ligningehalts ein geeigneter Standard bzw. dessen Absorptionskoeffizient für jede Probe, d. h. für verschieden zusammengesetzte Lignine, vorhanden sein sollte. Darüber hinaus kann die unspezifische Messung der Absorption bei 280 nm durch phenolische Säuren, die nicht dem Lignin entstammen, oder durch Abbauprodukte von

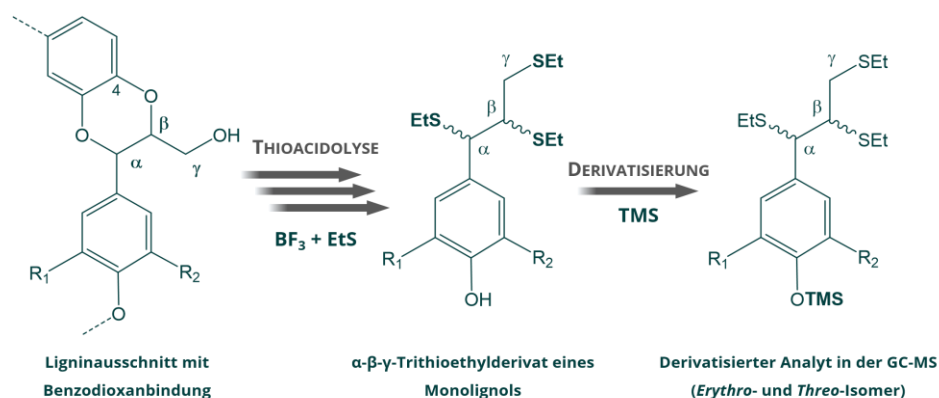
Xylanen beeinflusst werden (Hatfield *et al.*, 1999). In der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie wird stets der Absorptionskoeffizient krautiger Pflanzen von 20 mL/(cm · mg) nach Iiyama & Wallis (1990) angewendet. Um Störeffekte von Polysacchariden zu reduzieren, wurde die Bestimmung des ABSL an Driselase-verdauten UBS der Beerensamen nach Bunzel und Mitarbeitern durchgeführt (Bunzel *et al.*, 2005a). Driselase ist ein Enzymgemisch aus *Basidiomycetes* sp. mit breitem Aktivitätsspektrum auf Cellulose, Hemicellulosen und Pektine. Im Rahmen ihrer Masterarbeiten konnten Hendrik Eichhöfer und Florian Junker nachweisen, dass die angewendete Driselase eine nicht deklarierte Aktivität gegenüber Mannanen aufweist (Eichhöfer, 2017; Junker, 2018).

## II. Charakterisierung der Ligninstrukturen

Zur Aufklärung der Feinstrukturen des dreidimensionalen Makromoleküls wurden ebenfalls mehrere Verfahren angewendet. Die Literatur unterscheidet zwischen invasiven/degradativen Methoden, die zur Spaltung gewisser Bindungstypen führen und somit die Monolignole analytisch zugänglich machen, und nicht-invasiven Methoden, die Lignin weitgehend nativ und somit intakt durch beispielsweise spektrometrische Verfahren charakterisieren. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass keine invasive Methode eine quantitative Spaltung des gesamten Ligninkomplexes bewirkt. Die von der Arbeitsgruppe um John Ralph erarbeitete „*Derivatization Followed by Reductive Cleavage*“ (DFRC)-Methode gehört zu den invasiven Verfahren und wurde in der Abteilung für die Analyse von geringlignifiziertem Pflanzenmaterial optimiert (Schäfer *et al.*, 2015; Lu & Ralph, 1997a). Sie wurde als Alternative für die am häufigsten angewendete degradative Methode entwickelt, die Thioacidolyse (Lapierre *et al.*, 1985; Lapierre *et al.*, 1986). Aufgrund der olfaktorisch stark beanspruchenden Reagenzien ist die Thioacidolyse unangenehm in der Durchführung. Beide Methoden, die DFRC-Methode und die Thioacidolyse, spalten selektiv  $\beta$ -O-4-Bindungen, die üblicherweise den höchsten Anteil der Bindungen innerhalb des Komplexes darstellen. Der Mechanismus der DFRC-Methode nutzt Acetylbromid aus, um die  $\beta$ -O-4-Bindung, durch Bromierung an der  $\alpha$ -Position bzw. Acetylierung der Hydroxylgruppen, der anschließenden reduktiven Spaltung mittels Zink zugänglich zu machen (Lu & Ralph, 1997b). Die Thioacidolyse hingegen nutzt Bortrifluorid-diethyletherat in Dioxan, um die Spaltung der  $\beta$ -O-4-Bindung durch sukzessive Substitution der Hydroxylgruppen mit Ethanthiol zu katalysieren. Im Laufe der Zeit wurde die ursprüngliche Methode nach Lapierre und Mitarbeitern optimiert und für höhere Probandendurchsätze skaliert (Robinson & Mansfield, 2009; Yamamura *et al.*, 2012). Die Reaktion resultiert in  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -Trithioethylderivaten der beteiligten Monolignole (siehe Abb. 15). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die UBS der Beerensamen auf das Vorhandensein von Catechyl-Lignin überprüft. Diese unübliche Ligninstruktur wurde unter Anwendung der Thioacidolyse entdeckt. Im Catechyl-Lignin überwiegt die ebenso unübliche Benzodioxan-Bindung, die der Thioacidolyse zugänglich scheint (Chen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Tobimatsu *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde die Thioacidolyse zur qualitativen Analyse von Ligninstrukturen in der Abteilung etabliert (siehe 8n). Die freien bzw. freigesetzten Hydroxylgruppen der Monolignoleinheiten werden nach der Thioacidolyse in Form der Trimethylsilylether (TMS-)

### 3. Material und Methoden

derivatisiert und als Doppelpeaks (*Erythro*- und *Threo*-Isomer) mittels GC-MS nachgewiesen (siehe Abb. 15).



Monolignol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<i>p</i> -Cumarylalkohol	H	H
Coniferylalkohol	H	OMe
Sinapylalkohol	OMe	OMe
Caffeylalkohol	H	OH/OTMS

**Abbildung 15** Reaktionsschema der Thioacidolyse am Beispiel eines Ligninausschnitts mit dem Bindungstyp Benzodioxan. Aus der Reaktion und der Derivatisierung resultieren je Monolignol zwei Hauptanalyten, die als Doppelpeak erscheinen. BF<sub>3</sub>, Bortrifluorid; EtS, Ethanthiol; TMS, Trimethylsilan

Ergänzend zur Thioacidolyse konnten Chen und Mitarbeiter die neuartigen Ligninstrukturen mittels NMR-Spektroskopie nachweisen (siehe 80). Die Zellwandgel-NMR ist ein Fingerprinting-Verfahren zur nicht-destruktiven Charakterisierung von Lignin- und Polysaccharidstrukturen aus Zellwandmaterial (Kim & Ralph, 2010; Mansfield *et al.*, 2012). Driselase-verdaute Probenmehle werden mittels einer Kugelmühle fein gemahlen und in DMSO-*d*<sub>6</sub>/Pyridin-*d*<sub>5</sub> (4 : 1, v/v) durch Ultraschallbehandlung im NMR-Röhrchen zu einem homogenen Gel aufgequollen. Zu beachten ist, dass die starke Mahlbeanspruchung der Zellwände auch zu strukturellen Veränderungen im Lignin führen kann (Guerra *et al.*, 2006). Im HSQC-Spektrum können, durch im Vergleich mit Spektren und Daten aus der Literatur und der Abteilung die auftretenden Signale verschiedenen polymeren Zellwandkomponenten zugeordnet werden. Im aromatischen Bereich, im Tieffeld des Spektrums, sind die charakteristischen *C/H*-Kopplungen der Positionen 2, 5 und 6 der Monolignole zu finden. Unter anderem können jedoch aromatische Aminosäuren aus Restproteinen und assoziierte PA in der Zellwandmatrix zu überlappenden Signalen in diesem Bereich führen (Wawer *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017; Eichhöfer, 2017). Generell ist die Empfindlichkeit der NMR-Methode geringer als der Nachweis der Monolignole mittels GC-MS. Proben mit einem geringen Ligningehalt sind durch alleinige Anwendung dieser Methode schwer zu beurteilen.

## e. Analyse von Proanthocyanidinen

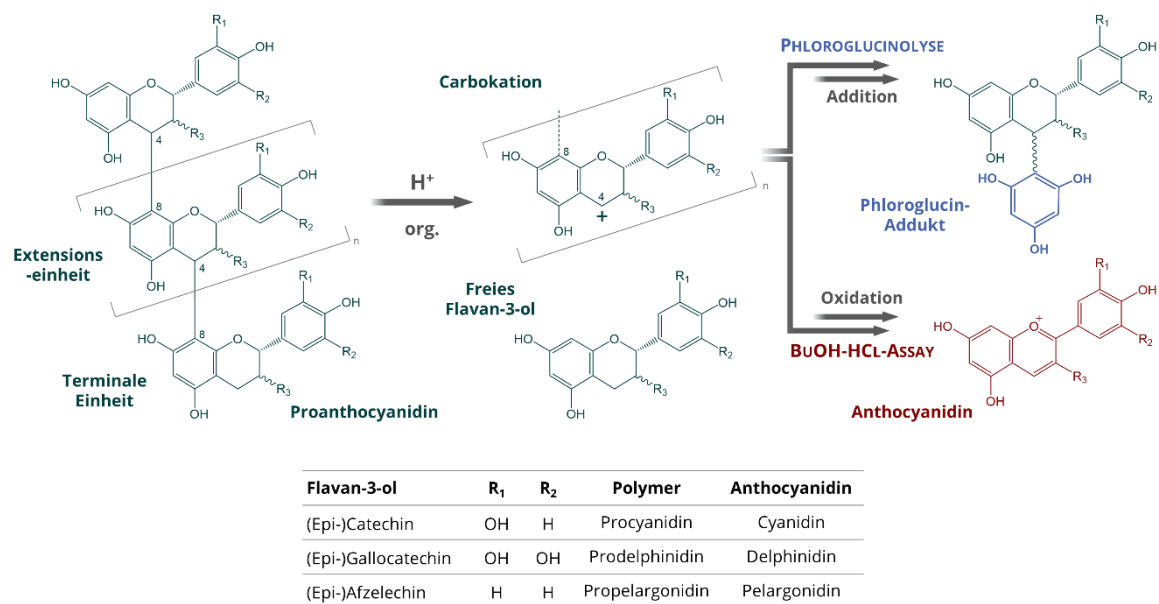
Im Laufe der Masterarbeit von Hendrik Eichhöfer wurde deutlich, dass bei der Charakterisierung der Zellwände aus Beerensamen die PA nicht unbeachtet bleiben dürfen (Eichhöfer, 2017). Auch aus der Literatur ist bereits bekannt, dass hohe PA-Gehalte in den Proben zu Überbestimmungen bei der Ballaststoff- und der Klason-Lignin-Bestimmung führen können (Saura-Calixto, 1988; Saura-Calixto *et al.*, 1991; Bravo *et al.*, 1994; Saura-Calixto *et al.*, 2007). Die ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften von Beerenobst werden unter anderem den PA zugesprochen, und insbesondere die Aroniabeere ist für ihre hohen PA-Gehalte bekannt. Hendrik Eichhöfer führte daraufhin erste Vorversuche zur Identifizierung der PA in den Beerensamenmehlen durch. Im Rahmen der Masterarbeit von Florian Junker konnten schließlich Methoden zur Gehaltsbestimmung und zur Strukturcharakterisierung der PA etabliert und angewendet werden (Junker, 2018). Die Analytik von PA basiert vorwiegend auf der oxidativen Depolymerisation der Flavan-3-ol-Kette in organischen Lösungsmitteln mit anschließender Analyse der freigesetzten nativen oder derivatisierten Monomere (siehe Abb. 16). Die Problematik und Analyse von ballaststoffassoziierten PA geht häufig auf die Charakterisierung von Weinbeeren, Traubentrester oder Traubenkerne zurück (Saura-Calixto *et al.*, 1991; Kennedy & Jones, 2001; Sarneckis *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2011; Hixson *et al.*, 2015). Die PA-Gehalte und -Strukturen von Weinbeeren und ihren Samen sind bereits bekannt (Kennedy & Jones, 2001; Schofield *et al.*, 2001; Kennedy & Taylor, 2003). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Masterarbeit von Florian Junker entfettetes Traubenkernmehl als Ausgangssubstanz zur Gewinnung eines PA-Standards ausgewählt. Im Zuge dessen konnten die Samen der Aroniabeere, der Cranberry und der Roten Johannisbeere hinsichtlich der Strukturen und Gehalte ihrer PA aufgeklärt werden (Junker, 2018). Die Daten der Himbeersamen wurden mit den etablierten Methoden entsprechend ergänzt.

### I. Gehaltsbestimmung der Proanthocyanidine

Analog zur Ligninanalytik wird die PA-Analytik durch den Mangel an Referenzstandardsubstanzen und die hohe Variabilität der PA erschwert. Manche Methoden berücksichtigen lediglich Extrahierbare PA (EPA), während der Großteil der hochpolymeren und unlöslichen NEPA diskriminiert wird. Dementsprechend existiert für die Gehaltsbestimmung von PA keine allgemeingültige Standardmethode. Der Ansatz nach Swain & Hillis (der sogenannte Butanol(BuOH)-HCl-Assay) ist durch stetige Optimierungen und Erweiterungen bis heute ein häufig angewendetes kolorimetrisches Verfahren zur Quantifizierung von PA (Swain & Hillis, 1959; Porter *et al.*, 1986; Grabber *et al.*, 2013; Shay *et al.*, 2017). Die Methode beruht auf der sukzessiven Abspaltung der PA-Monomere ausgehend vom terminalen Ende (siehe Abb. 16). Die Extensionseinheiten gehen als Carbokationen aus der Reaktion hervor und werden durch Autoxidation zu den analogen Anthocyanidinen oxidiert. Diese können anhand ihrer Absorption bei 550 nm photometrisch detektiert werden. Die terminalen Einheiten werden als Flavan-3-ole freigesetzt und photometrisch nicht erfasst. Demzufolge ist die Farbausbeute der Reaktion abhängig vom mittleren DP der vorliegenden PA (Hümmer & Schreier, 2008). Die Quantifizierung der PA erfolgt über eine externe

### 3. Material und Methoden

Kalibrierung mit einem geeigneten Standard. Aufgrund der Variabilität der PA-Monomere und ihrer unterschiedlichen Absorptionsmaxima sollte der Referenzstandard idealerweise aus der zu untersuchenden Probe individuell extrahiert werden. Florian Junker hat im Rahmen seiner Masterarbeit den BuOH-HCl-Assay nach Shay und Mitarbeitern, welcher sowohl EPA- als auch NEPA-Fractionen erfasst, adaptiert und angewendet (siehe 8p; Shay *et al.*, 2017). Zusätzlich wurde für diesen Zweck ein PA-Standard aus Weinbeersamenmehl isoliert und charakterisiert (Junker, 2018). Die ermittelten PA-Gehalte der Ballaststofffraktionen der Beersamen sind dementsprechend als Weinbeersamen-Äquivalente („*Grape Seed Equivalent*“, GSE) angegeben.



**Abbildung 16** Reaktionsablauf der Phloroglucinolyse und des Butanol-HCl-Assays am Beispiel eines Proanthocyanidinausschnitts. R<sub>3</sub> = OH, Gallussäure, Glycon

## II. Charakterisierung der Proanthocyanidinstrukturen

Entsprechend dem BuOH-HCl-Assay basieren die Methoden zur Strukturcharakterisierung von PA auf der säurekatalysierten Spaltung der PA-Kette, ausgehend vom terminalen Ende (siehe Abb. 16). Die freigesetzten Carbokationen werden jedoch in Anwesenheit von Nukleophilen wie Phloroglucin (Phloroglucinolyse) oder Benzylmercaptan (Thiolyse) durch Addition an Position C-4 umgesetzt (Kennedy & Jones, 2001). Diese Addukte und die freien Flavan-3-ole der terminalen Einheiten können anschließend mittels RP-HPLC analysiert werden (siehe 8q). Kennedy & Jones entwickelten die Phloroglucinolyse als alternative Methode zur Thiolyse. Laut der Autoren konnten damit reproduzierbarere Ergebnisse erzielt werden als mit der Thiolyse (Kennedy & Jones, 2001). In Cranberries konnten mittels der Phloroglucinolyse bereits PA mit dem seltenen Bindungstyp A nachgewiesen werden (Koerner *et al.*, 2009). Diese Verknüpfung ist resistent gegenüber der Säurehydrolyse. Dennoch können entsprechende Einheiten anschließend als Dimere identifiziert werden. Für die Phloroglucinolyse sind relative molare Responsefaktoren ausgewählter Flavan-3-ole, Addukte und Dimere für die UV-Detektion bei 280 nm publiziert (Kennedy & Jones, 2001; Koerner *et al.*, 2009). Unter Anwendung dieser Responsefaktoren lassen sich die molaren Verhältnisse der PA-Bausteine zueinander bzw. der mittlere DP, das *cis/trans*-Verhältnis und der



Galloylierungsgrad der PA berechnen. Der mittlere DP entspricht dem Verhältnis der terminalen Einheiten zu den Extensionseinheiten. Das *cis/trans*-Verhältnis resultiert aus dem Verhältnis der summierten Epimere, während der Galloylierungsgrad den Anteil der Gallussäureveresterten PA widerspiegelt. Aufgrund der mildereren Säurehydrolyse während der Phloroglucinolyse sind die resultierenden Konzentrationen der frei- bzw. umgesetzten Flavan-3-ole hinsichtlich der PA-Quantifizierung weniger aussagekräftig als der BuOH-HCl-Assay (Hixson *et al.*, 2015). Durch HPLC-MS-Kopplungen können unbekannte PA-Bausteine charakterisiert werden. Die Fragmentierungsreaktionen der Flavan-3-ole und Phloroglucinaddukte mittels ESI-MS sind bekannt (Li & Deinzer, 2007; Liang *et al.*, 2012). Im Rahmen der Masterarbeit von Florian Junker wurde die Phloroglucinolyse zur Strukturcharakterisierung der PA aus den Beerensamen in der Abteilung etabliert und angewendet (Kennedy & Jones, 2001; Downey *et al.*, 2003; Koerner *et al.*, 2009). Die qualitative Analyse mittels MS wurde durch eine quantitative Analyse mittels Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie (UHPLC) ergänzt. Die UHPLC gekoppelt an einen „*Dioden-Array*“-Detektor (DAD) ermöglicht eine deutlich zeiteffizientere Bestimmung der UV-aktiven Analyten. Alternativ können PA mit geringeren DP anhand von bekannten Referenzstandardsubstanzen mittels verschiedener GPC- bzw. HPLC-Methoden bestimmt werden (Hümmer & Schreier, 2008). In Anbetracht des zu analysierenden Probenmaterials (Ballaststofffraktionen mit assoziierten PA) ist eine solche Herangehensweise jedoch nicht zielführend.



## 4. Ergebnisse und Diskussion

### a. Aufarbeitung und Fraktionierung der Früchte

Anhand einer repräsentativen Anzahl an Früchten wurde für jede Beerenobstsorte das durchschnittliche Gewicht sowie die Anzahl an Samen und wiederum deren durchschnittliches Trockengewicht bestimmt. Zudem wurde aus homogenisierten ganzen Früchten die Trockenmasse bestimmt und daraus auf den Wassergehalt zurückgeschlossen. Infolgedessen können die Anteile der Einzelkomponenten an der gesamten Frucht eingeordnet werden. Die Daten sind in Tab. 5 aufgelistet. Die Kenngrößen der Früchte und Samen sind als Durchschnittswert aus mindestens 20 Exemplaren ermittelt und werden ohne Fehler angegeben. Im Anhang befinden sich Aufnahmen der einzelnen Samen unter einem Stereomikroskop (siehe Abb. A2).

#### I. Kennzahlen der Früchte und Samen

Die ganzen Früchte der Aroniabeere wiesen mit 26,2 g/100 g FW die höchste Trockenmasse auf. Die Früchte machten bei Anlieferung bereits einen leicht eingetrockneten Eindruck. Dennoch liegt die Trockenmasse im Bereich bisher veröffentlichter Daten (17 – 29 %; Kulling & Rawel, 2008). Die Apfelfrucht besitzt ein Gewicht von 0,96 g und trägt 4,1 längliche Samen mit einem Gewicht von jeweils 2,8 mg. Damit machen die Samen keinen hohen Gewichtsanteil an der gesamten Aroniabeere aus. Aus Anzahl und Gewicht der Samen lässt sich näherungsweise ein Anteil der Samen an der Trockenmasse von 4,6 % errechnen.

Die Trockenmasse der Cranberry entspricht mit 15,2 g/100 g FW dem in der „*Food Composition Database*“ des US-amerikanischen Landwirtschaftsministeriums angegebenen Wert (USDA) (vgl. Tab. 1). Die Beerenfrucht weist ein Gewicht von 1,13 g auf, und die 9,1 kugeligen Samen in jeder Beere besitzen jeweils ein Gewicht von 0,33 mg. Der Gewichtsanteil der Cranberrysamen ist mit 1,7 % der Trockenmasse der geringste unter den untersuchten Proben.

Mit 15,5 g/100 g FW konnten die Literaturwerte zur Trockenmasse der Himbeere ebenfalls bestätigt werden (USDA, 2016d). Die Himbeere wies mit 64 Stück die höchste durchschnittliche Anzahl an Samen pro Frucht auf, was wiederum ein Merkmal des zusammengesetzten Fruchttyps ist. Jede der kugeligen Steinfrüchte im Verband der 4,16 g schweren Sammelfrucht trägt einen 1,82 mg schweren Samen. Damit machen die Steine mit 17,1 % einen wesentlichen Anteil an der Trockenmasse der Himbeere aus.

Die Trockenmasse der Roten Johannisbeere beträgt 18,9 g/100 g FW und entspricht ebenfalls den berichteten Werten (USDA, 2016b). Die kleinen Beeren mit einem Gewicht von 0,58 g tragen 5,6 verhältnismäßig große und mit 3,66 mg Einzelgewicht die schwersten Samen im Rahmen dieser Arbeit. Damit besitzen die Samen einen Gewichtsanteil von 18,7 % der

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Trockenmasse der Roten Johannisbeere und markieren den entsprechenden höchsten Wert innerhalb der Fruchtauswahl.

Reißner und Mitarbeiter untersuchten unter anderem die Zusammensetzung von industriellen Pressrückständen von Aroniabeeren und Roten Johannisbeeren (Reißner *et al.*, 2019). Darin ermittelten sie einen Anteil der Samen am Pressrückstand bei der Aroniabeere von 22,1 % und bei der Roten Johannisbeere von 40,4 %. Unter Einbeziehung des Anteils des Pressrückstands an der Trockenmasse (39,3 % bzw. 34,8 %) kann für die Aroniasamen ein Anteil am Pressrückstand von ca. 12 % und für Rote Johannisbeeren von ca. 48 % errechnet werden. Der Anteil der Samen an der Trockensubstanz der Himbeere wurde mit 23,9 % angegeben (Salo & Suomi, 1972). Die jeweiligen Differenzen sind in Anbetracht der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (Sorte, Herkunft, Aufarbeitung) und der behelfsmäßigen Hochrechnung der Werte plausibel.

**Table 5** Ermittelte Kennzahlen und -größen der ganzen und fraktionierten Früchte. Das Gewicht der Früchte bzw. Samen und die Anzahl an Samen pro Beere wurde anhand von mindestens 20 Exemplaren als Durchschnitt ermittelt. Die übrigen Werte wurden einfach bestimmt. AUR, alkoholunlöslicher Rückstand; FW, Frischgewicht

	Aroniabeere	Cranberry	Himbeere	Rote Johannisbeere
<b>GANZE FRUCHT</b>				
<b>Gewicht [g]</b>	0,96	1,13	4,16	0,58
<b>Trockenmasse [g/100 g FW]</b>	26,2	15,2	15,5	18,9
<b>SAMEN</b>				
<b>Anzahl Samen /Frucht</b>	4,1	9,1	64,2	5,6
<b>Durchschnittsgewicht der Samen [mg]</b>	2,8	0,33	1,72	3,66
<b>Anteil Samen an der Trockenmasse [%]</b>	4,6	1,7	17,1	18,7
<b>FRAKTIONIERTE FRUCHT</b>				
<b>Fruchtfleisch, Nass [g/100 g FW]</b>	72,4	55,4	81,8	76,5
<b>Fruchtfleisch (AUR), Trocken [g/100 g FW]</b>	0,14	0,18	1,5	1,38
<b>Anteil Fruchtfleisch (AUR) an der Trockenmasse [%]</b>	0,5	1,2	9,7	7,3
<b>Pressrückstand, Nass [g/100 g FW]</b>	27,6	44,6	18,2	23,5
<b>Pressrückstand, Trocken [g/100 g FW]</b>	10,3	8,3	5,4	7,3
<b>Anteil Pressrückstand an der Trockenmasse [%]</b>	39,3	54,6	34,8	38,6

## II. Fraktionierung der Früchte

Zur separaten Analyse der einzelnen Fruchtkomponenten wurden die Beerenobstsorten manuell mittels einer haushaltsüblichen Passiermühle aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen getrocknet (siehe Tab. 5). Entsprechend der hohen Wassergehalte der frischen Früchte konnten auf diese Weise 55,4 bis 81,8 g/100 g FW als Fruchtfleisch (Perikarp) gewonnen werden. Die verhältnismäßig geringe Ausbeute von 55,4 g/100 g bei der Cranberry ist der robusten Schale und dem festen Fruchtfleisch geschuldet. Aufgrund der vielfältigen gelösten Verbindungen (Zucker, organische Säuren, Polyphenole) konnten die separierten Fruchtfleischfraktionen nicht vollständig gefriergetrocknet werden. Infolgedessen wurde das enthaltene Zellwandmaterial der Fruchtfleischfraktionen als AUR präzipitiert (0,14 – 1,5 g/100 g FW). Verrechnet mit den Trockenmassen zeigt sich, dass die polymeren Komponenten aus dem saftigen Fruchtfleisch lediglich geringe (7,3 – 9,7 %) bis sehr geringe Anteile (0,5 – 1,2 %) an der Trockensubstanz der ganzen Früchte haben. In der Passiermühle verbleiben hauptsächlich die Samen sowie das vaskuläre und epidermale Gewebe der Früchte. Die Pressrückstände besitzen einen Anteil von 18,2 – 44,6 g/100 g am FW der Früchte und weisen immer noch einen hohen Wassergehalt (62,7 – 81,4 %) auf. Im getrockneten Zustand liegen die Anteile des Pressrückstands zwischen 5,4 und 10,3 g/100 g FW. Diese Werte wurden mit der Trockenmasse der ganzen Früchte verrechnet. Demzufolge gehen 34,8 bis 54,6 % der Trockensubstanz der Früchte auf den Pressrückstand zurück. Reißner und Mitarbeiter ermittelten in frischen industriellem Beerenobsttrester aus Roten Johannisbeeren einen Feuchtigkeitsgehalt von 62,2 g/100 g FW und aus Aroniabeeren einen Gehalt von 55,0 g/100 g FW (Reißner *et al.*, 2019). Diese vergleichsweise niedrigen Werte sind aufgrund der noch enthaltenen Stiele nachvollziehbar. Die generelle Vergleichbarkeit der hier gewonnenen Pressrückstände mit industriellen Pressrückständen ist jedoch eingeschränkt. Die maschinelle Gewinnung und die etwaige Anwendung von pektinolytischen Enzympräparaten zur Steigerung der Saftausbeute führen zweifelsohne zu anderen Pressrückständen als die hier angewendete manuelle Gewinnung. Zudem wurden die hier untersuchten Beeren vor dem Pressen vollständig von Fruchtstielen und Fremdmaterial befreit. Die Unterschiede zur kommerziellen Fruchtverarbeitung sind jedoch dem Anspruch dieser Arbeit geschuldet, die einzelnen Fruchtgewebe nach botanischen bzw. textuellen Gesichtspunkten zu separieren und deren Zellwände möglichst nativ zu beschreiben.

Die Aufbereitung der Beerenobstsorten führte schließlich zu vier unterschiedlichen Probenmaterialien pro Frucht: der ganzen Frucht, der Fruchtrückstand, der AUR des Fruchtfleischs und der Samen (vgl. Abb. 9). Der Samen wurde manuell aus dem Pressrückstand entfernt. Der samenlose Pressrückstand entspricht dem Fruchtrückstand und enthält die Schale (epidermales Gewebe) und das Leitgewebe (vaskuläres Gewebe) der Früchte. Zur Analyse der enthaltenen Zellwände wurden die Materialien zu Mehl vermahlen und im Falle der Samen zusätzlich entfettet.

### b. Bestimmung der Ballaststoffgehalte

In Anlehnung an die AOAC-Methode 2017.16 wurden aus den Mehlen der angereicherten Fruchtkomponenten und der ganzen Früchte Ballaststoffe isoliert und gravimetrisch bestimmt. In Abweichung zur Literatur wurden die Ballaststofffraktionen UBS und LBS nicht um den Gehalt an Restprotein und Asche korrigiert. Die Vorgehensweise wurde ausgewählt, um möglichst wenig Probenmaterial durch diese Korrekturen zu verlieren. Die Gewinnung des Zellwandmaterials des Fruchtfleischs als AUR erübrigte zudem die Bestimmung der NLBS. Vorversuche an ganzen Früchten der Aroniabeere, Cranberry und Roten Johannisbeere nach der AOAC-Methode 2017.16 ergaben ohne Asche- bzw. Restproteinkorrektur vergleichbare UBS- bzw. LBS-Gehalte und erwiesen die Abwesenheit von NLBS in allen Früchten. Auf diese Weise konnten ausreichende Mengen an UBS und LBS jeder Frucht bzw. jeder Gewebefraktion gewonnen werden. Die Daten sind in Tab. 6 zusammengestellt.

#### I. Die Ballaststoffgehalte der Beerenobstsorten

**ARONIABEEREN.** Bezogen auf die Trockenmasse weisen die ganzen Früchte der Aroniabeeren den geringsten unkorrigierten Ballaststoffgehalt von insgesamt 25,8 g/100 g DW auf, wobei UBS und LBS im Verhältnis von 4,2 : 1 vorliegen. Der Gehalt in ungetrockneten Beeren liegt dagegen bei 6,8 g/100 g FW, jedoch ist dies dem leichten Wasserverlust durch den Transport geschuldet. Für frische Aroniabeeren ist in der Literatur ein Gesamtballaststoffgehalt von 5,6 g/100 g FW und ein Pektingehalt von 0,34 - 0,58 g/100 g FW beschrieben (Kulling & Rawel, 2008). Die beiden Werte stammen jedoch aus unterschiedlichen Veröffentlichungen und die Varietät der untersuchten Aroniabeeren oder die angewendete Methodik ist nicht bekannt. Die Onlinedatenbank des finnischen Instituts für Gesundheit und Wohlstand (THL) führt lediglich für die Hybride *x Sorbaronia mitschurinii* einen Gesamtballaststoffgehalt von 5,2 g/100 g FW auf ((THL), 2017). Der Datenbank der USDA kann für getrocknete Aroniabeeren ein Wert von 25 g/100 g entnommen werden, doch auch hier fehlen Angaben über Sorte, Herkunft und Methodik (USDA, 2016c).

**CRANBERRIES.** Die ganzen Früchte der Cranberry wiesen einen Gesamtballaststoffgehalt von 4,4 g/100 g FW bzw. 29,1 g/100 g DW und das niedrigste UBS/LBS-Verhältnis von 2,2 : 1 auf. Die Datenbanken führen für Cranberries einen Gesamtgehalt an Ballaststoffen von 3,5 - 3,6 g/100 g FW ((THL), 2016a; USDA, 2016a). Dabei wird in der Datenbank der THL zusätzlich differenziert in 2,8 g/100g FW wasserunlösliche Ballaststoffe und 0,5 g/100 g FW wasserlösliche Polysaccharide. Der Wert für die wasserlöslichen Polysaccharide stammt aus einer externen Veröffentlichung und wurde mittels einer angepassten Englyst-Methode ermittelt (Varo *et al.*, 1984a; Varo *et al.*, 1984b). Die Vergleichbarkeit dieser Werte mit den hier ermittelten Gehalten ist aufgrund der abweichenden Methodik stark begrenzt. So wurden bei Varo und Mitarbeitern die Ballaststoffgehalte aus den summierten Monosaccharidgehalten mittels GC bzw. Kolorimetrie nach enzymatischem Stärkeabbau bestimmt.

**Tabelle 6** Ballaststoffgehalte (g/100 g  $\pm$  Range/2, n = 2) der ganzen Früchte und isolierten Gewebefractionen der Beerenobstsorten und die daraus resultierenden Verhältnisse der unlöslichen Ballaststoffe (UBS) zu den löslichen Ballaststoffen (LBS). Die Ballaststoffe aus dem alkoholunlöslichen Rückstand des Fruchtfleischs konnten lediglich einfach bestimmt bzw. isoliert werden. Die Gehalte in den Samenfraktionen sind auf das mittels Soxhlet-Apparatur entfettete Trockengewicht bezogen. Die Entfettung des Samenmehls der Himbeere erfolgte lediglich in einem Ansatz. Die Werte der Samen aus der Aroniabeere, Cranberry und Roten Johannisbeere wurden von Hendrik Eichhöfer ermittelt (Eichhöfer et al., 2017). AUR, alkoholunlöslicher Rückstand; DW, Trockengewicht; FW, Frischgewicht

Ballaststoffe	Aroniabeere	Cranberry	Himbeere	Rote Johannisbeere
<b>GANZE FRUCHT</b>				
LBS [g/100 g FW]	1,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1
LBS [g/100 g DW]	5,0 $\pm$ 0,1	9,1 $\pm$ 0,2	9,6 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 0,2
UBS [g/100 g FW]	5,4 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,1
UBS [g/100 g DW]	20,8 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,8	28,2 $\pm$ 1,9	28,0 $\pm$ 0,2
Gesamt [g/100 g FW]	6,8 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,1
Gesamt [g/100 g DW]	25,8 $\pm$ 0,4	29,1 $\pm$ 1,0	37,9 $\pm$ 1,5	35,5 $\pm$ 0,1
UBS/LBS-Verhältnis	4,2 : 1	2,2 : 1	2,9 : 1	3,7 : 1
<b>FRUCHTRÜCKSTAND</b>				
LBS [g/100 g DW]	12,5 $\pm$ 0,1	17,0 $\pm$ 0,2	14,2 $\pm$ 1,1	24,3 $\pm$ 0,1
UBS [g/100 g DW]	37,7 $\pm$ 1,0	37,7 $\pm$ 0,1	32,0 $\pm$ 1,1	44,6 $\pm$ 0,5
Gesamt [g/100 g DW]	50,2 $\pm$ 1,0	54,7 $\pm$ 0,2	46,2 $\pm$ 2,2	69,0 $\pm$ 0,4
UBS/LBS-Verhältnis	3,0 : 1	2,2 : 1	2,3 : 1	1,8 : 1
<b>FRUCHTFLEISCH (AUR)</b>				
LBS [g/100 g DW]	15,0	46,2	52,1	48,3
UBS [g/100 g DW]	75,5	53,8	26,4	49,0
Gesamt [g/100 g DW]	90,5	100,0	78,6	97,3
UBS/LBS-Verhältnis	5,0 : 1	1,2 : 1	0,5 : 1	1,0 : 1
<b>SAMEN</b>				
Soxhlerückstand [g/100 g DW]	76,0 $\pm$ 1,3	73,0 $\pm$ 3,9	82,6	72,2 $\pm$ 0,1
LBS [g/100 g]	12,5 $\pm$ 0,3	16,0 $\pm$ 0,8	4,6 $\pm$ 0,1	9,7 $\pm$ 0,4
UBS [g/100 g]	56,7 $\pm$ 1,7	64,8 $\pm$ 1,7	91,1 $\pm$ 0,1	67,0 $\pm$ 1,0
Gesamt [g/100 g]	69,2 $\pm$ 2,0	80,8 $\pm$ 2,4	95,7 $\pm$ 0,2	76,7 $\pm$ 1,4
UBS/LBS-Verhältnis	4,5 : 1	4,1 : 1	19,8 : 1	6,9 : 1

**HIMBEEREN.** Die Himbeere weist mit 37,9 g/100 g DW den höchsten Gesamtballaststoffgehalt auf. Bezogen auf das FW beträgt dieser 5,9 g/100 g bei einem UBS/LBS-Verhältnis von 2,9 : 1. In der Literatur werden unterschiedliche Werte für den Ballaststoffgehalt von Himbeeren angegeben. Während die THL und Varo und Mitarbeiter einen Gesamtgehalt von 3,7 g/100 g FW auflisten, liefert die USDA einen Wert von 6,5 g/100 g FW (Varo *et al.*, 1984a; (THL), 2016b; USDA, 2016d). Andere Autoren ermittelten unter Anwendung der AOAC-Methode 985.29 mit 4,4 bzw. 5,5 g/100 g FW ebenfalls einen höheren Gehalt als der THL (Marlett & Vollendorf, 1994; Dodevska *et al.*, 2015).

**ROTE JOHANNISBEEREN.** Bei der Roten Johannisbeere konnte im Rahmen dieser Arbeit ein unkorrigierter Gesamtballaststoffgehalt von 35,5 g/100 g DW mit einem UBS/LBS-Verhältnis von 3,7 : 1 ermittelt werden. Unter Einberechnung der Trockenmasse ergibt dies einen Ballaststoffgehalt von 6,7 g/100 g bezogen auf die frische Beere. Hinsichtlich wissenschaftlicher Literatur wurde die Schwarze Johannisbeere bisher deutlich umfangreicher beschrieben als ihre rote Schwesterart, wobei diese im europäischen Raum ebenfalls häufig verzehrt und verarbeitet wird. Der Ballaststoffgehalt der Roten Johannisbeere ist dennoch bei der USDA mit 4,3 g/100 g FW, bei der THL mit 5,0 g/100 g FW und bei Varo *et al.* mit 3,4 g/100 g FW gelistet (Varo *et al.*, 1984a; THL, 2016; USDA, 2016b).

Unter Anbetracht fehlender Informationen bei manchen Literaturwerten (wie Sorte, Herkunft oder Methodik) und der Tatsache, dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte unkorrigiert vorliegen, sind die Ballaststoffgehalte hinsichtlich der Dimension und dem Verhältnis von UBS zu LBS plausibel.

## II. Die Ballaststoffgehalte der Fruchtgewebe und Samen

Die Fraktionen der Fruchtrückstände der Beerenobstsorten bestehen zu 46,2 bis 69,0 g/100 g DW aus Ballaststoffen (siehe Tab. 6). Die hohen Werte sind aufgrund der darin enthaltenen epidermalen und vaskulären Gewebe nicht überraschend. Der Schutz vor äußeren Einflussfaktoren und die Sicherstellung des Nährstofftransports sind zentrale Funktionen der pflanzlichen Zellwand. Die Verhältnisse von UBS zu LBS liegen in dieser Fraktion im Bereich von 1,8 : 1 bis 3,0 : 1. Die AUR der Fruchtfleischfraktionen weisen ebenfalls sehr hohe Ballaststoffgehalte von 78,6 bis 100 g/100 g DW auf. Durch die Präzipitation der polymeren Komponenten aus dem Fruchtfleisch in 78 %igem EtOH ist die hohe Anreicherung mit Ballaststoffen nicht verwunderlich. Abgesehen von Polysacchariden und assoziierten Polyphenolen enthalten die AUR vermutlich mitausgefällte Proteine und Salze. Auffällig sind hierbei die stark variierenden UBS/LBS-Verhältnisse der Früchte untereinander. Während in Cranberries und Roten Johannisbeeren die Verhältnisse mit ca. 1 : 1 ausgeglichen sind, weisen Aronia- und Himbeeren sehr unterschiedliche UBS/LBS-Verhältnisse von 5,0 : 1 bzw. 0,5 : 1 auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ballaststoffgehalte in angereicherten Fruchtgeweben lassen sich nur bedingt mit Werten aus der Literatur vergleichen. Bestenfalls liegen Vergleichswerte zu den Ballaststoffgehalten von Pressrückständen vor. So konnte mittels der AOAC-Methode 991.43 ein Gesamtballaststoffgehalt in Aroniabeertrester von 59,5 g/100 g DW und in Trester aus Roten Johannisbeeren von 58,1 g/100 g DW ermittelt



werden (Reißner *et al.*, 2019). In Cranberrytrester wurde unter Anwendung der AOAC-Methode 985.29 ein Gesamtballaststoffgehalt von 71,2 g/100 g DW festgestellt (White *et al.*, 2010). Wawer und Mitarbeiter beschreiben für ein industrielles Nebenprodukt, welches laut den Autoren aus Aroniabeerschalen besteht, einen Ballaststoffgehalt nach enzymatischer Hydrolyse von 72,0 g/100 g DW. Leider geben die Autoren nicht an, welche Bestimmungsmethode zur Anwendung kam oder welche Komponenten enzymatisch hydrolysiert wurden (Wawer *et al.*, 2006). Zudem sind diese Literaturwerte in anbetracht der unterschiedlich gewonnenen Probematerialien generell schwer einzuordnen. So enthalten Pressrückstände häufiger noch fremdes Material. Die Enzymierung vor der Pressung resultiert zudem, aufgrund des Pektinabbaus, in geringeren Anteilen an LBS im Pressrückstand. Aus veröffentlichten Ballaststoffgehalten von enzymbehandeltem Himbeer- bzw. Cranberrytrester können sogar UBS/LBS-Verhältnisse von 112 : 1 bzw. 77 : 1 errechnet werden (Gouw *et al.*, 2017). Anhand der Arbeiten von Sójka und Mitarbeiter wird zudem deutlich, dass der Ballaststoffgehalt unterschiedlicher Fraktionen aus Pressrückständen stark schwanken kann. Die Autoren separierten Aroniabeertrester nach Partikelgröße, sodass verschiedene samenlose Fraktionen und eine angereicherte Samenfraktion entstanden. Der Ballaststoffgehalt schwankt dabei zwischen 63,5 und 77,9 g/100 g DW (Sójka *et al.*, 2013).

Die Ballaststoffe der Samen von Aroniabeeren, Cranberries und Roten Johannisbeeren wurden im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Eichhöfer charakterisiert und eingeordnet (Eichhöfer, 2017). Alle Samenmehle mussten zuvor unter Anwendung diverser organischer Lösungsmittel entfettet werden. Dabei wiesen die Samen der unterschiedlichen Beerenobstsorten Gehalte an entfetteten Rückständen zwischen 72,2 und 82,6 g/100 g DW auf, wobei die Himbeersamen den höchsten Gehalt an entfettetem Rückstand aufwiesen (siehe Tab. 6). Daraus resultiert ein Lipidgehalt für Himbeersamen von 17,4 g/100 g DW, was vergleichbar mit zuvor berichteten Werten ist (Oomah *et al.*, 2000; Pieszka *et al.*, 2015). Im Anschluss konnten in den entfetteten Samenmehlen Ballaststoffgehalte von 69,2 bis 95,7 g/100 g festgestellt werden. Den höchsten Gehalt lieferten erneut die Samen der Himbeere. Unter Anwendung der AOAC Methode 985.29 konnte bereits in entfetteten Himbeersamen einen Gesamtballaststoffgehalt von 73,7 g/100 g DW bestimmt werden (Kosmala *et al.*, 2015). Diese Differenz könnte auf unterschiedliche Fruchtmerkmale oder die abweichende Methodik (AOAC-985.29) zurückzuführen sein. Die hohen Ballaststoffgehalte deuten darauf, dass die Samen entweder zum Schutz oder als zusätzlicher Energiespeicher verstärkte Zellwände aufweisen. Die UBS/LBS-Verhältnisse der Samen liegen mit 4,5 : 1 bei Aroniabeeren, 4,1 : 1 bei Cranberries, 19,8 : 1 bei Himbeeren und 6,9 : 1 bei Roten Johannisbeeren deutlich auf Seite der UBS. Diese Verhältnisse deuten darauf hin, dass die Samen möglicherweise verhärtete sekundäre Zellwände besitzen. Die Pflanze könnte, beispielsweise durch Einlagerung von Lignin in die Zellwände, den Samen als Verbreitungsorgan zusätzlich vor externen Einflüssen schützen.

Unter Einbeziehung der Gewebeanteile an der Trockenmasse (vgl. Tab 5) können die Anteile die einzelnen Gewebe am Gesamtballaststoffgehalt der Früchte abgeschätzt werden. Die Fraktionen aus Fruchtfleisch (AUR) erweisen mitunter die höchsten Ballaststoffgehalte. Doch fallen diese aufgrund ihres geringen Anteils an der Trockenmasse der Früchte wenig ins

Gewicht. Im Fall der Aroniabeere und der Cranberry ist der Anteil der Samen an der Trockensubstanz der Frucht verhältnismäßig gering. Bei der Himbeere und den Roten Johannisbeeren machen die Samen indessen einen sehr hohen Anteil der Pressrückstände aus. Unter Anbetracht der hohen Ballaststoffgehalte der Fruchtrückstände und entfetteten Samen kann angenommen werden, dass die Pressrückstände der Früchte mindestens zur Hälfte aus Ballaststoffen bestehen. Anhand dessen wird deutlich, dass die Komponenten des Pressrückstands, Samen und Fruchtrückstand, den Hauptanteil der Ballaststoffgehalte der Früchte ausmachen.

#### c. Charakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide in Beerenobstsorten

Aus allen Beerenobstsorten konnten jeweils die Fraktion der UBS und der LBS aus der ganzen Frucht bzw. aus den drei angereicherten Gewebefractionen der Früchte gewonnen werden. Um einen ersten Überblick der vorliegenden Polysaccharide zu erhalten, wurden die Ballaststofffraktionen unterschiedlichen Säurehydrolysen unterzogen. Aus den molaren Verhältnissen der freigesetzten Monosaccharide lassen sich erste Hinweise auf vorhandene Polysaccharidgruppen ableiten. Neben der allgemeinen Einordnung der vorliegenden Strukturen sollen Unterschiede in der Ballaststoffstruktur der Beerenobstsorten sowie zwischen den jeweiligen Fruchtkomponenten ermittelt werden. Die detaillierten Daten sind in tabellarischer Form im Anhang unter Tab. A3 – A6 aufgelistet.

Darüber hinaus wurden die UBS und LBS der ganzen Früchte und der Samenfraktion der Methylierungsanalyse unterzogen. Die Polysaccharide in den Samen von Aroniabeeren, Cranberries und Roten Johannisbeeren wurden im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Eichhöfer umfassend charakterisiert (Eichhöfer, 2017). Die Zuordnung der ermittelten Monosaccharide zu den unterschiedlichen Polysaccharidgruppen wird zumeist erst anhand ihrer Bindungspositionen möglich (vgl. 1dI und 3cIII). Die Monosaccharidzusammensetzung aus der jeweiligen Säurehydrolyse und die, über die Bindungstypen aufsummierte, Monosaccharidverteilung der Methylierungsanalyse können, insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Hydrolysebedingungen, merklich voneinander abweichen. Die Schwefelsäurehydrolyse ermöglicht bei den UBS den Aufschluss von Cellulose, jedoch werden Uronsäuren (GlcA & GalA) und 6-Desoxyzucker (Fuc & Rha) unterbestimmt. Die kombinierte Methanolyse/TFA-Hydrolyse hingegen eignet sich zum Aufschluss von uronsäurehaltigen Polysacchariden, jedoch nicht für kristalline Strukturen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methylierungsanalyse bildet ebenfalls keine Uronsäuren ab und die Quantifizierung der PMAA beruht auf der Theorie des „*Effective Carbon Response*“ (Sweet *et al.*, 1975). Zudem war die Zuordnung der Peaks und Massenspektren zu bestimmten PMAA nicht immer möglich, sodass hauptsächlich PMAA aus Ara-, Gal-, Glc-, Man-, Rha- und Xyl-Einheiten bestimmt werden konnten. Api und Fuc konnten demnach mittels Methylierungsanalyse ebenfalls nicht abgebildet werden. Bei der folgenden Betrachtung und Diskussion der Ergebnisse der Methylierungsanalyse werden zur Vereinfachung die

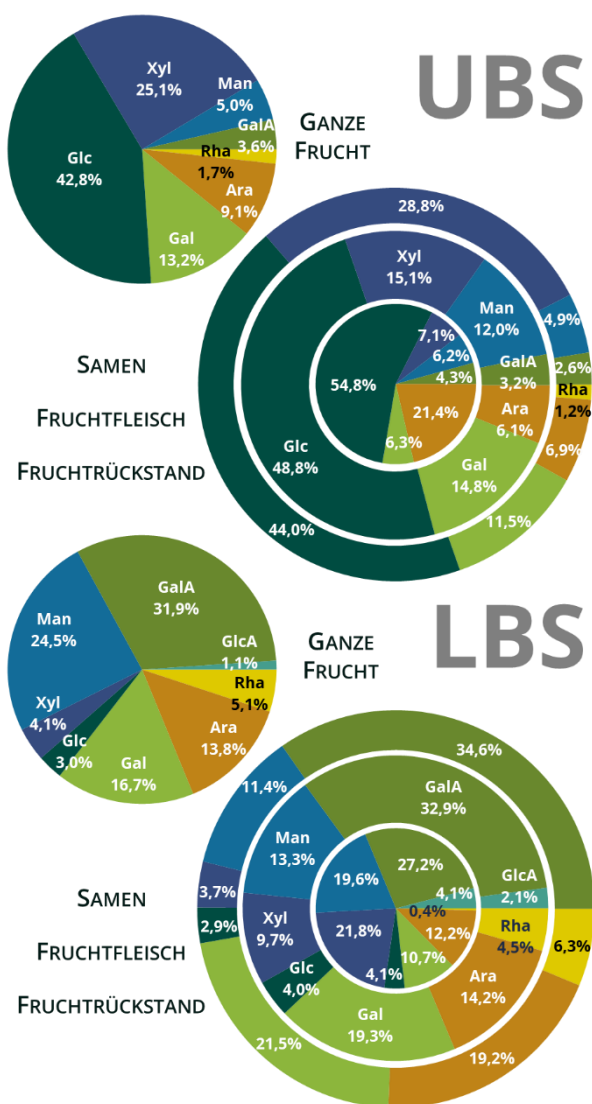
unterschiedlichen verknüpften Zuckerbausteine synonym zu den daraus resultierenden PMAA behandelt.

In der Literatur finden sich bisher nur spärliche Daten zu den Zellwandpolysacchariden der hier analysierten Beerenobstsorten. Zumeist wurden die Polysaccharidgruppen lediglich durch Extraktionsschritte separiert und bestimmt. Nawirska & Kwaśniewska quantifizierten beispielsweise in Pressrückständen von Aronia- und Schwarzen Johannisbeeren Cellulose, Pektine, Hemicellulosen und Lignin anhand ihrer Löslichkeit in ausgewählten Medien. Diese Vorgehensweise ist jedoch zu unspezifisch, um konkret auf besagte Zellwandpolymere schließen zu können, und die Autoren geben selbst an, dass die bestimmten Fraktionen nicht eindeutig definiert sind (Nawirska & Kwaśniewska, 2005). Darüber hinaus existiert bisher keine detailliertere Beschreibung der Zellwandzusammensetzung der Aroniabeere. Auch bei den übrigen Früchten wurden die Zellwandfraktionen nur vereinzelt bis auf die Ebene der Polysaccharide charakterisiert und verglichen (Salo & Suomi, 1972; Marlett & Vollendorf, 1994; Stewart *et al.*, 2001; Hilz *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2007). Selbst in diesen Fällen unterscheidet sich die Isolierung und Aufarbeitung des Zellwandmaterials mitunter stark. Die Vergleichbarkeit der folgenden Ergebnisse mit Literaturdaten (sofern vorhanden) ist schlussendlich aufgrund angepasster Definitionen und methodischer Unterschiede eingeschränkt.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 7** Daten der Methylierungsanalyse (mol% ± Range/2, n = 2) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) jeweils aus den ganzen Früchten der **Aroniabeere** und den Aroniabeersamen. Ara, Arabinose; f, -furanose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Man, Mannose; n.d., nicht detektiert; p, -pyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

PMAA	Ganze Frucht		Samen	
	UBS [mol%]	LBS [mol%]	UBS [mol%]	LBS [mol%]
t-Araf	3,9 ± 1,3	12,3 ± 0,8	9,8 ± 0,1	13,6 ± 0,1
t-Arap	1,5 ± 0,1	11,2 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2
1,2-Araf	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1	n.d.
1,3-Araf	1,5 ± 0,1	4,4 ± 0,3	2,0 ± 0,1	5,2 ± 0,2
1,5-Araf	18,7 ± 1,7	19,8 ± 0,9	10,3 ± 0,1	7,1 ± 0,3
1,2,5-Araf	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
1,3,5-Araf	3,0 ± 0,2	2,6 ± 0,2	9,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1
1,2,3,5-Araf	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>30,1 ± 0,7</b>	<b>52,7 ± 0,6</b>	<b>32,9 ± 0,3</b>	<b>28,2 ± 0,6</b>
t-Galp	3,3 ± 0,1	9,2 ± 0,3	1,9 ± 0,2	7,7 ± 0,9
1,2-Galp	n.d.	1,5 ± 0,1	n.d.	1,4 ± 0,1
1,3-Galp	0,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1
1,4-Galp	3,8 ± 0,2	3,4 ± 0,4	0,9 ± 0,1	5,0 ± 0,9
1,6-Galp	0,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1
1,3,4-Galp	0,5 ± 0,1	n.d.	0,4 ± 0,1	n.d.
1,3,6-Galp	0,9 ± 0,1	7,8 ± 0,4	0,3 ± 0,1	5,8 ± 0,3
<b>Summe</b>	<b>9,8 ± 0,2</b>	<b>26,7 ± 0,5</b>	<b>4,0 ± 0,2</b>	<b>24,7 ± 1,6</b>
t-Glcp	0,7 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1
1,3-Glcp	0,6 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
1,4-Glcp	30,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	47,5 ± 0,1	9,2 ± 0,5
1,4,6-Glcp	4,7 ± 0,3	n.d.	1,7 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>36,2 ± 0,3</b>	<b>4,6 ± 0,5</b>	<b>51,2 ± 0,2</b>	<b>11,1 ± 0,6</b>
t-Manp	0,2 ± 0,1	5,0 ± 0,7	0,2 ± 0,1	7,5 ± 0,2
1,4-Manp	2,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1	7,7 ± 1,9
1,2,4-Manp	n.d.	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	n.d.
1,4,6-Manp	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2
<b>Summe</b>	<b>2,9 ± 0,2</b>	<b>6,5 ± 0,6</b>	<b>4,6 ± 0,1</b>	<b>15,7 ± 2,3</b>
1,2-Rhap	1,4 ± 0,7	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1
1,2,4-Rhap	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>2,1 ± 0,5</b>	<b>1,8 ± 0,2</b>	<b>0,7 ± 0,1</b>	<b>0,2 ± 0,1</b>
t-Xylp	3,3 ± 0,9	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1
1,2-Xylp	2,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1
1,4-Xylp	12,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,8 ± 0,1	13,3 ± 0,5
<b>Summe</b>	<b>18,8 ± 1,0</b>	<b>7,6 ± 0,3</b>	<b>6,5 ± 0,1</b>	<b>20,1 ± 0,7</b>



**Abbildung 17** Daten der Monosaccharidanalyse (mol%, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse jeweils aus den ganzen Früchten der **Aroniabeere** (kleines Kreisdiagramm), dem Fruchtrückstand (außen), dem alkalolunlöslichen Rückstand (AUR) des Fruchtfleischs (mitte) und den Aroniabeersamen (innen). Ara, Arabinose; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

## I. Die Polysaccharidstrukturen der Aroniabeere

**UBS DER GANZEN ARONIABEERE.** Der Schwefelsäurehydrolyse zufolge bestehen die Polysaccharide der UBS der Aroniabeere hauptsächlich aus Glc, Xyl, Gal und Ara (siehe Abb. 17). Hohe Glc-Gehalte (42,8 mol%) in dieser Fraktion lassen sich zumeist auf Cellulose zurückführen. Anteile an Xyl und Man (insg. 30 mol%) dagegen deuten auf Hemicellulosen wie Xylane, XyG und Mannane hin. Die 9,1 bzw. 13,2 mol% an Ara und Gal könnten einerseits Nebenkomponenten dieser Hemicellulosen darstellen, andererseits deuten GalA (3,4 mol%) und Rha (1,7 mol%) auf das Vorkommen unlöslicher Pektine hin. So könnten Ara und Gal ihren Ursprung ebenso in den Seitenketten des RGI haben – den Arabinanen, Galactanen oder dem AGI. Das Vorhandensein von Xylogalacturonan ist aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Apfel ebenfalls möglich (Schols *et al.*, 1995). Das Fehlen von Api, Fuc und GlcA sind entweder auf die Säurebehandlung oder auf die Abwesenheit von RGII, fucosyliertem XyG oder Glucuronoxylane zurückzuführen. Die Methylierungsanalyse bestätigt, dass Glc hauptsächlich 1→4-verknüpft vorliegt (siehe Tab. 7). Der Zellwandtyp schließen MLG als Quelle für 1,4-, 1,3- und 1,4,6- Glc $\beta$  in allen Proben aus. Aufgrund der enzymatischen Aufbereitung mittels Pankreas- $\alpha$ -Amylase, könnten in den Zellwandmaterialien jedoch Überreste an nativer, resistenter Stärke vorhanden sein. Anhand der Anteile an 1,4,6-Glc $\beta$  und 1,4-Man $\beta$  kann ein Teil der 1,4-Glc $\beta$  ggf. XyG und Glucomannanen zugeordnet werden, wobei Glucomannane trotz Anwendung der Methylierungsanalyse nicht zweifelsfrei bestätigt werden können. Aufgrund des hohen Überschusses an 1,4-Glc $\beta$  (30,3 mol%) steht dennoch fest, dass diese hauptsächlich aus Cellulosen freigesetzt wurde. Neben t-Xyl $\beta$  konnten zudem 2,7 mol% 1,2-Xyl $\beta$  und 12,8 mol% 1,4-Xyl $\beta$  quantifiziert werden. Diese zwei Bindungspositionen lassen sich lediglich anhand charakteristischer Fragmente unterscheiden bzw. anhand der entsprechenden Flächenverhältnisse bestimmen (siehe 3cIII). Die Verhältnisse lassen den Schluss zu, dass die Xyl in UBS von Aroniabeeren vorwiegend den Xylanen zuzuordnen ist, und XyG eine untergeordnete Rolle spielen. Xylane basieren auf 1,4-Xyl $\beta$  als Rückgrat, während XyG typischerweise 1,2-Xyl $\beta$  in verlängerten Seitenketten aufweisen. Ohne Informationen über den DS und die Seitenkettenszusammensetzung der XyG in Aroniabeeren kann anhand der Anteile an 1,4,6-Glc $\beta$  bzw. t- oder 1,2-Xyl $\beta$  dennoch keine präzise Aussage über das Ausmaß des Vorkommens an XyG in der Probe getroffen werden. So können terminale Xyl-Einheiten aus XyG, aber ebenso aus Xylogalacturonan stammen. Die PMAA der Man lassen sich auf verzweigte und womöglich auch lineare (Hetero-)Mannane zurückführen. Der geringe Anteil an 1,4,6-Man $\beta$  ist ein Hinweis auf Galactomannane, demzufolge ist vermutlich ein gewisser Anteil der t-Gal $\beta$  den Hemicellulosen zuzuordnen. Wie zuvor erwähnt, kann anhand der Methylierungsanalyse nicht nachgewiesen werden, ob 1,4-Man $\beta$  den Galactomannanen oder linearen (Gluco-)Mannanen zuzuordnen ist. Auf Seiten der charakteristischen Pektinmonomere verteilen sich die Gal- und Ara-Monomere jeweils auf zahlreiche Bindungstypen. Terminale und 1,4-Gal $\beta$  machen mit insgesamt 7 mol% den Großteil aus und in Kombination mit 1,3,4-Gal $\beta$  deutet dies auf das Vorhandensein von AGI. Die ersten beiden Elemente können jedoch ebenso den Galactanen zugeordnet werden. 1,3-, 1,6- und 1,3,6-Gal $\beta$  zeigen an, dass AGII ebenfalls in geringen Mengen vorhanden ist. Unter der Annahme, dass die XyG von Aroniabeeren analog zu denen aus Äpfeln aufgebaut sind, kann t-Gal $\beta$  anteilig den

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

XyG-Seitenketten zugeordnet werden. Die Anteile an 1,2- und 1,2,4-Rhap bestätigen RGI als Komponente in den UBS. Die meisten PMAA der Ara können den Arabinseitenketten aus RGI zugeordnet werden. Dazu gehören 1,3-, 1,5-, 1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-Araf sowie der Großteil der t-Araf, wobei das 1,2,3,5-Araf-entsprechende PMAA ebenso aus einer Untermethylierung resultieren kann. T-Arap entstammt entweder Galactanen oder, gemeinsam mit der 1,2-Araf, dem AGII (Pettolino *et al.*, 2012; Wefers & Bunzel, 2016). Allgemein liegt der Prozentsatz der aufsummierten PMAA aus Ara-Einheiten häufig höher als der Ara-Anteil aus der Monosaccharidanalyse. Aus dem Verhältnis der verzweigten (1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-Araf) zu den linearen (1,5-Araf) Bausteinen lässt sich der Verzweigungsgrad des Polymers abschätzen. Ausgehend von einer vollständigen Methylierung des Probenmaterials fallen die Anteile an 1,2,3,5-Araf als Verzweigungspunkt doppelt ins Gewicht. Im Fall der UBS der Aroniabeere existiert mit 18,7 mol% 1,5-Araf dennoch ein deutlicher Überschuss an linearen Elementen.

**LBS DER GANZEN ARONIABEERE.** Die LBS der Aroniabeere weisen eine vielfältigere Monosaccharidverteilung auf als die UBS. GalA (31,9 mol%), Man (24,5 mol%), Gal (16,7 mol%) und Ara (13,8 mol%) sind die dominierenden Bausteine der Fraktion. Der Großteil der Monomere lässt sich demnach Pektinen zuordnen. Dafür spricht auch der mit 5,1 mol% deutlich höhere Anteil an Rha. In den LBS konnten zudem nur geringe Anteile an Glc und Xyl nachgewiesen werden (insg. 7 mol%). Wie bereits in den UBS können aus der Verteilung der PMAA einzelne Polysaccharidgruppen abgeleitet werden. Die Methylierungsanalyse bestätigt das höhere Vorkommen von Gal und Ara. In Summe machen die Anteile der entsprechenden PMAA knapp 80 mol% aus. Die GalA wird durch diese Analyse generell nicht abgebildet. Die Daten sprechen dennoch dafür, dass sich in den LBS neben HG größere Anteile an RGI, Arabinanen, Galactanen und AGII befinden. Die Verhältnisse der Arabinanstrukturelemente bzw. der Verzweigungsgrad der Arabinane ist vergleichbar mit denen der UBS. Auffällig ist indessen ein deutlich höherer Anteil an t-Araf. Dieser Baustein kann jedoch seinen Ursprung ebenso in den Galactanen oder dem AGII haben. Die Verteilung der PMAA der Gal deutet, aufgrund der Abwesenheit von 1,3,4- und 1,4,6-Galp, auf das Vorhandensein von Galactanen und AGII hin. Dafür sprechen auch die 11,2 mol% an t-Arap und die 1,2-Araf. Neben Pektinen konnten zudem deutliche Anteile an löslichen Hemicellulosen nachgewiesen werden. Die Monosaccharidzusammensetzung wies verhältnismäßig hohe Anteile an Man auf. Der Methylierungsanalyse zufolge entfällt mit 5,0 mol% der Hauptteil davon auf t-Manp. Die übrigen PMAA der Man deuten zwar erneut auf teilweise verzweigte Mannane, dennoch ist der Überschuss an t-Manp schwer einzuordnen. Anteile der t-Galp (9,2 mol%) bzw. 1,4-Glcp (2,8 mol%) könnten erneut ihren Ursprung ebenso in Gluco- bzw. Galactoglucomannanen haben. Die Verhältnisse der PMAA der Xyl lassen den Schluss zu, dass in den LBS vorwiegend Xylane vorhanden sind. In Kombination mit den geringen Anteilen an GlcA könnte die 1,4-Xylp möglicherweise als Glucuronoxylane vorliegen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die GlcA dem RGI entspringt. Api und Fuc konnten erneut nicht bestimmt werden.

**UBS DER FRUCHTGEWEBE.** Die angereicherten Fruchtgewebe wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung analysiert (siehe Abb. 17). So weisen die Polysaccharide der UBS aus Fruchtfleisch und Fruchtrückstand der Aroniabeere ebenfalls Glc,

Xyl, Gal und Ara als Hauptmonomere auf. Zwischen dem Fruchtrückstand und der ganzen Frucht sind lediglich geringe Differenzen in den Anteilen der jeweiligen Monomere (maximal 4 mol%) auszumachen. In Anbetracht des hohen Anteils des Pressrückstands an der Trockensubstanz der ganzen Beere (siehe Tab.5), ist es folgerichtig, dass die Monosaccharidzusammensetzung dieser beiden Fraktionen gut übereinstimmen. Samen und Fruchtfleisch (AUR) haben nur einen jeweils geringen Anteil an der Trockensubstanz der Aroniabeere. Markantere Unterschiede zeigen sich im Vergleich der ganzen Frucht und des Fruchtrückstands mit der Fruchtfleischfraktion. Das Fruchtfleisch der Aroniabeere weist höhere Anteile an Glc, Man und Gal auf, während die Anteile an Xyl und Ara verringert sind. Rha konnte lediglich in der ganzen Aroniabeere und ihrem Fruchtrückstand bestimmt werden. In Anbetracht der Methylierungsdaten der ganzen Frucht könnte dies auf höhere Anteile an Heteromannanen im Fruchtfleisch hinweisen. Dementsprechend würde der Anteil an Xylanen und Pektinen insgesamt sinken.

**LBS DER FRUCHTGEWEBE.** Die LBS der Fruchtgewebe zeigen bezüglich der Polysaccharidzusammensetzung ähnliche Trends auf wie die UBS. Ausgehend vom Fruchtrückstand nehmen in den LBS die Anteile an charakteristischen Monomeren der Hemicellulosen (Xyl, Man, Glc und GlcA) im Fruchtfleisch zu. Gegenläufig verringern sich die Anteile an GalA, Gal, Ara und Rha. In Anbetracht der Daten aus der Methylierungsanalyse der ganzen Frucht, kann daraus eine Verschiebung der Zellwandzusammensetzung von Pektinen hin zu löslichen Hemicellulosen vermutet werden.

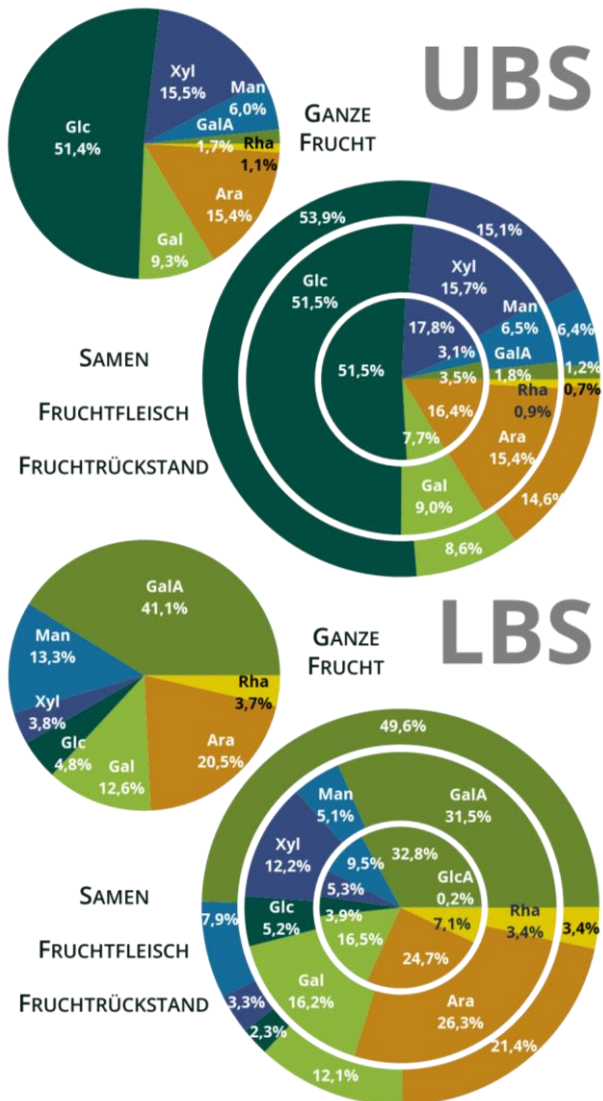
**UBS DER ARONIASAMEN.** Die Monosaccharidzusammensetzung der UBS im Samen ist im Vergleich zu den übrigen Geweben und der ganzen Frucht durch deutlich höhere Anteile von Glc (54,8 mol%) und Ara (21,4 mol%) geprägt. Im Vergleich zu den UBS in der ganzen Frucht sind die Anteile der Man und GalA leicht höher (+ 0,7 bzw. + 1,2 mol%), während die Anteile an Xyl und Gal in den Samen deutlich geringer ausfallen (- 18 bzw. - 7 mol%). Diese Trends lassen sich anhand der Daten aus der Methylierungsanalyse ebenfalls feststellen: die Anteile der PMAA aus Glc-, Ara- und Man-Einheiten sind in Samen höher als in der ganzen Frucht, die Anteile der PMAA aus Gal- und Xyl-Einheiten nehmen ab. Mittels der Methylierungsanalyse konnten im Samen PMAA der Rha bestimmt werden, während Rha in der Monosaccharidanalyse (vermutlich aufgrund Hydrolysebedingungen) nicht bestimmt werden konnte. Die Bindungstypen in den Polysacchariden der UBS der Samen unterscheiden sich von denen der ganzen Frucht vorwiegend hinsichtlich der Verhältnisse. Die identifizierten PMAA stimmen mit denen der ganzen Frucht überein. Die PMAA der Ara zeigen in den Samen ein höheres Verhältnis von verzweigten (insb. 1,3,5-Araf) zu unverzweigten (1,5-Araf) Arabinan-Elementen. Demzufolge sind die Arabinane der Samen stärker verzweigt als die der ganzen Frucht. Galactane scheinen in Aroniabeersamen eine geringere Rolle zu spielen. Der verringerte Anteil an Gal lässt sich vorwiegend auf 1,4-Galp und t-Galp zurückführen. Aus den weiteren PMAA der Gal lassen sich AGI sowie AGII ableiten. Anhand der PMAA der Glc- bzw. Xyl wird ersichtlich, dass die Samen weniger XyG (1,4,6-Glcp ↓) und Xylane (1,4-Xylp ↓) aufweisen, jedoch deutlich mehr Cellulose (1,4-Glcp ↑) ausbilden. Besonders Xylane sind im Gegensatz zur ganzen Frucht weniger dominant ausgeprägt.

**LBS DER ARONIASAMEN.** Die LBS der Aroniasamen zeichnen sich, im Vergleich zur ganzen Frucht, durch fünffach höhere Anteile an Xyl aus (21,8 mol%). Parallel steigen die Anteile an GlcA (+ 3 mol%) und Glc (+ 1 mol%). Einhergehend mit der starken Erhöhung der Xyl-Anteile verringern sich die Anteile aller übrigen Monosaccharide. Dennoch stechen die deutlich niedrigeren Anteile an Gal und Rha mit - 6 mol% bzw. - 4,7 mol% heraus. Die Daten der Methylierungsanalyse zeigen, dass die Zunahme der Xyl insbesondere auf 1,4-Xyl $\beta$  (+ 10 mol%) zurückgeht. Trotz der hohen Anteile an GlcA in der Monosaccharidanalyse konnten keine verzweigten Xyl-Elemente (1,2,4- bzw. 1,3,4-Xyl $\beta$ ) identifiziert werden. Dennoch sprechen die Daten für das Vorhandensein von (Hetero-)Xylanen. Die Verhältnisse der PMAA der Xyl entsprechen eher den UBS der ganzen Frucht, wobei jedoch charakteristische Rückgrateinheiten von XyG (1,4,6-Glc $\beta$ ) nicht detektiert werden konnten. Die Anwesenheit von Xylogalacturonan muss ebenfalls in Betracht gezogen werden. Die PMAA der Gal bleiben in Summe und ihren Verhältnissen laut der Methylierungsanalyse konstant und können demnach ebenfalls auf Galactane und AGII zurückgeführt werden. Dagegen zeigt sich in den Methylierungsdaten ein markanter Anstieg an 1,4-Man $\beta$  (+ 7 mol%). Dies könnte erneut mit der ebenso ansteigenden 1,4-Glc $\beta$  in Verbindung gebracht werden und auf Glucomannane hinweisen. Überdies weisen die LBS der Samen deutlich geringere Mengen an Ara-Einheiten auf als in der ganzen Frucht. Insbesondere die Anteile an t-Ara $\beta$  und den verzweigten Arabinanbausteinen sind stark verringert. Dies lässt darauf schließen, dass die Arabinane der LBS aus Aroniabeersamen ebenfalls einen geringeren Verzweigungsgrad aufweisen.



**Tabelle 8** Daten der Methylierungsanalyse (mol% ± Range/2, n = 2) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) jeweils aus den ganzen Früchten der **Cranberry** und den Cranberrysamen. Ara, Arabinose; f, -furanose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Man, Mannose; n.d., nicht detektiert; p, -pyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

PMAA	Ganze Frucht		Samen	
	UBS [mol%]	LBS [mol%]	UBS [mol%]	LBS [mol%]
t-Araf	3,2 ± 0,1	30,3 ± 0,3	8,0 ± 0,6	27,5 ± 0,8
t-Arap	0,2 ± 0,1	2,6 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1
1,2-Araf	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1
1,3-Araf	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,1
1,5-Araf	4,3 ± 1,6	16,5 ± 0,5	5,9 ± 0,1	19,6 ± 0,9
1,2,5-Araf	0,3 ± 0,1	3,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
1,3,5-Araf	0,7 ± 0,1	4,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2	4,9 ± 0,2
1,2,3,5-Araf	0,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>9,7 ± 1,5</b>	<b>63,0 ± 0,7</b>	<b>18,5 ± 0,5</b>	<b>58,0 ± 1,9</b>
t-Galp	3,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,6	5,6 ± 0,7
1,2-Galp	n.d.	0,9 ± 0,1	n.d.	n.d.
1,3-Galp	0,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,6 ± 0,1	6,5 ± 0,4
1,4-Galp	n.d.	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	4,0 ± 0,5
1,6-Galp	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
1,3,4-Galp	0,3 ± 0,1	n.d.	0,3 ± 0,1	n.d.
1,3,6-Galp	0,5 ± 0,1	5,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>4,8 ± 0,2</b>	<b>14,5 ± 0,5</b>	<b>7,3 ± 0,8</b>	<b>21,0 ± 1,7</b>
t-Glcp	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1
1,4-Glcp	52,7 ± 2,2	4,4 ± 0,7	43,0 ± 1,1	3,4 ± 0,1
1,4,6-Glcp	4,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2	2,4 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>58,4 ± 2,3</b>	<b>7,7 ± 0,7</b>	<b>50,0 ± 1,5</b>	<b>6,4 ± 0,1</b>
t-Manp	0,3 ± 0,1	3,6 ± 0,1	0,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1
1,4-Manp	2,1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1
1,2,4-Manp	n.d.	n.d.	1,6 ± 0,2	n.d.
1,3,4-Manp	n.d.	n.d.	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,1
1,4,6-Manp	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>3,6 ± 0,3</b>	<b>5,4 ± 0,1</b>	<b>3,7 ± 0,2</b>	<b>5,0 ± 0,1</b>
1,2-Rhap	0,9 ± 0,2	3,3 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1
1,2,4-Rhap	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>1,3 ± 0,2</b>	<b>4,3 ± 0,9</b>	<b>1,2 ± 0,1</b>	<b>3,6 ± 0,1</b>
t-Xylp	5,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	7,3 ± 0,6	3,7 ± 0,1
1,2-Xylp	2,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	4,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1
1,4-Xylp	14,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>22,3 ± 0,1</b>	<b>5,1 ± 0,1</b>	<b>19,4 ± 0,3</b>	<b>6,0 ± 0,1</b>



**Abbildung 18** Daten der Monosaccharidanalyse (mol%, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse jeweils aus den ganzen Früchten der **Cranberry** (kleines Kreisdiagramm), dem Fruchtrückstand (außen), dem alkokolunlöslichen Rückstand (AUR) des Fruchtfleisches (mitte) und den Cranberrysamen (innen). Ara, Arabinose; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

### II. Die Polysaccharidstrukturen der Cranberry

**UBS DER GANZEN CRANBERRY.** Die Polysaccharidfraktion der UBS aus ganzen Cranberries besteht, analog zur Aroniabeere, hauptsächlich aus Glc, Xyl, Ara und Gal (siehe Abb. 18). Darüber hinaus sind Man, GalA und Rha ebenfalls Bestandteile der Zellwandpolysaccharide in den UBS. Glc stellt 51,4 mol% der freigesetzten Monosaccharide dar, was auf einen höheren Celluloseanteil in den UBS der Cranberries schließen lässt als bei Aroniabeeren. Dies wird durch die sehr hohen Anteile an 1,4-Glcp in der Methylierungsanalyse bestätigt (siehe Tab. 8). Das zweithäufigste Monomer Xyl liegt in den UBS mit 14,4 mol% als 1,4-Xylp vor, was Xylane als häufigste Hemicellulose vermuten lässt. Anhand der Anteile an 1,4,6-Glcp (4,4 mol%) und 1,2-Xylp (2,7 mol%) kann auch das Vorhandensein von XyG bestätigt werden. An dritter Stelle und etwas ausgeprägter als in Aroniabeeren folgt Ara (15,4 mol%). Anhand der PMAA lässt sich Ara erneut vorwiegend auf verzweigte Arabinane zurückführen. Das Verhältnis von linearen (4,3 mol%) zu verzweigten (1,6 mol%) Arabinanbausteinen ist vergleichbar mit den UBS der Aroniabeere. Allgemein sind die Anteile charakteristischer Pektinmonosaccharide in den UBS der Cranberry jedoch geringer als in den UBS der Aroniabeere. In Summe kommen GalA und Rha lediglich auf knapp 3 mol%. Zudem fallen die Gal Anteile hauptsächlich auf t-Galp zurück und können ebenso den Seitenketten von XyG und Heteromannanen entspringen. Die übrigen PMAA der Gal deuten auf geringe Mengen an AGII hin. Die Anteile an 1,4- bzw. 1,4,6-Manp sprechen ebenfalls für das Vorkommen von Galactomannanen. Galactane und AGI sind aufgrund des Fehlens von 1,4-Galp nicht von Bedeutung. Die übrigen Bausteine können anhand der Methylierungsanalyse dem RGI und AGII zugeschrieben werden. Fuc und Api sind in keiner Gewebe- oder Ballaststofffraktion der Cranberry bestimmbar, weshalb fucosylierte XyG und RGI nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorkommen.

**LBS DER GANZEN CRANBERRY.** Die Polysaccharide der LBS aus der ganzen Cranberry basieren weitestgehend auf den Pektinmonomeren GalA, Ara und Gal. Die hohen Anteile an GalA (41,1 mol%) und die Rha (3,7 mol%) sprechen für HG und RGI. Die PMAA der Ara und Gal lassen erneut auf Arabinane und AGII schließen. Geringe Anteile an Galactanen sind in dieser Fraktion jedoch nicht auszuschließen. Das Verhältnis von linearen zu verzweigten Grundbausteinen lässt auf sehr stark verzweigte Arabinane zurückschließen. Die verzweigten Bausteine 1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-Araf besitzen jeweils einen Anteil von 3,0 – 4,4 mol%. Da 1,2,3,5-Araf einer zweifachen Verzweigung entspricht, liegen die verzweigten Ara-Einheiten in Summe zu ungefähr gleichen Anteilen vor wie die linearen Ara-Einheiten. Auffällig ist dennoch der mit 30,3 mol% sehr hohe Anteil an t-Araf. Dies kann darauf deuten, dass Ara nicht nur in Arabinanen, sondern auch in AGII oder XyG als Endgruppe vorliegt. Die charakteristischen Grundbausteine von Hemicellulosen, Man, Xyl und Glc, sind, im Vergleich mit den LBS aus Aroniabeeren, von geringerer Bedeutung. Aus dieser Gruppe stellt Man mit 13,3 mol% das häufigste Monosaccharid dar und die PMAA deuten auf lösliche (Galacto-)Mannane in den LBS der Cranberry hin. Die identifizierten PMAA unterschiedlich verknüpfter Xyl- und Glc-Einheiten weisen auf das Vorhandensein von Xylanen und XyG hin.

**UBS DER FRUCHTGEWEBE.** Die Monosaccharidzusammensetzung der UBS ist über die Gewebefractionen der Cranberry hinweg erstaunlich homogen. Die Anteile der Monomere aus

Fruchtrückstand und –fleisch stimmen weitgehend mit der Monosaccharidzusammensetzung der ganzen Frucht überein. Dies lässt sich mit dem hohen Anteil des Pressrückstands an der Trockensubstanz der ganzen Cranberry begründen. Dennoch ist diese hohe Übereinstimmung bei diesen makroskopisch sehr unterschiedlichen Fruchtgeweben bemerkenswert.

**LBS DER FRUCHTGEWEBE.** Zwischen den Monosaccharidzusammensetzungen der LBS sind markantere Unterschiede festzustellen. Im Fruchtrückstand macht GalA die Hälfte der freigesetzten Monosaccharide aus, und der Anteil der Hemicellulosefraktion in den LBS nimmt stark ab. In Summe kommen Man, Xyl und Glc lediglich auf 14 mol%. In den LBS der ganzen Frucht erreichen diese Monomere insgesamt noch 22 mol%. Die Ara-Anteile sind mit ca. 21 mol% identisch zu den LBS der ganzen Frucht. In den AUR des Fruchtfleischs verschiebt sich die Zusammensetzung erneut. Das Verhältnis an charakteristischen Pektin- bzw. Hemicellulosemonomeren ist vergleichbar zur ganzen Frucht, doch dominiert bei den klassischen Hemicellulosemonomeren nun die Xyl (12,2 mol%), und der Anteil der GalA (31,5 mol%) in den Pektinen nimmt zugunsten der Ara (26,3 mol%) ab. Der Anteil der Rha ist in der ganzen Frucht, dem Fruchtrückstand und dem Fruchtfleisch mit 3,4 - 3,7 mol% sehr konstant. Während in der Aroniabeere zwischen den Ballaststofffraktionen gewisse Trends abzulesen sind, zeigt sich bei der Cranberry auf der einen Seite eine hohe Konstanz in der Zusammensetzung der UBS und auf der anderen Seite eine hohe Variation in der Zusammensetzung der LBS.

**UBS DER CRANBERRYSAMEN.** Die Polysaccharide in den UBS der Cranberrysamen weisen geringfügig (max. 2,7 mol%) höhere Anteile an Xyl, Ara und GalA als in den übrigen Geweben auf. Die Anteile an Gal sowie Man nehmen geringfügig ab (max. 3,4 mol%), und Rha konnte in den Samen nicht bestimmt werden. Allgemein kann nicht von einer markanten Verschiebung der Verhältnisse hin zu Cellulose, Hemicellulosen oder Pektinen gesprochen werden. Die Summenverhältnisse aus der Methylierungsanalyse weisen zwischen der ganzen Frucht und den Samen ebenfalls nur geringe Unterschiede auf. Auffällig ist jedoch, dass vereinzelte Bindungsverhältnisse unterschiedlich sind. Die PMAA der Xyl deuten nun auf einen höheren Anteil an XyG (1,2-Xylp 1) hin. Die höheren Anteile an 1,4,6-Glcp bestätigen dies. Bei den PMAA der Ara-Einheiten stechen höhere Anteile an 1,3,5-Araf und t-Araf hervor, woraus ein leicht erhöhter Verzweigungsgrad abgeleitet werden kann. Die Verteilung der PMAA der Gal lassen auf das Vorhandensein von AGI schließen. 1,4-Galp war in der ganzen Frucht nicht nachweisbar, in den Samen jedoch ist es gleichsam mit 1,3-Galp vorhanden. In den Samen liegen verstärkt 1,2,4- anstatt 1,4,6-Manp vor. Dies deuten darauf, dass in den Cranberrysamen eher Galactoglucomannane anstatt Galactomannane vorhanden sind (siehe 1bIV). Die Rha konnte durch die Methylierungsanalyse im Gegensatz zur Schwefelsäurehydrolyse noch abgebildet werden. Die hohen Anteile an 1,2,4-Rhap im Vergleich zu 1,2-Rhap lassen ebenfalls auf eine hohe Dichte an Seitenketten innerhalb des RGI schließen.

**LBS DER CRANBERRYSAMEN.** Entsprechend den anderen Gewebefractionen zeigen auch die LBS der Samen deutlichere Unterschiede in der Monosaccharidzusammensetzung auf als die UBS. Hauptkomponenten bleiben GalA, Ara und Gal, deren Anteile mit 32,8 mol%, 24,7 mol% und 16,5 mol% vergleichbar mit denen im AUR des Fruchtfleischs sind. Am auffälligsten ist

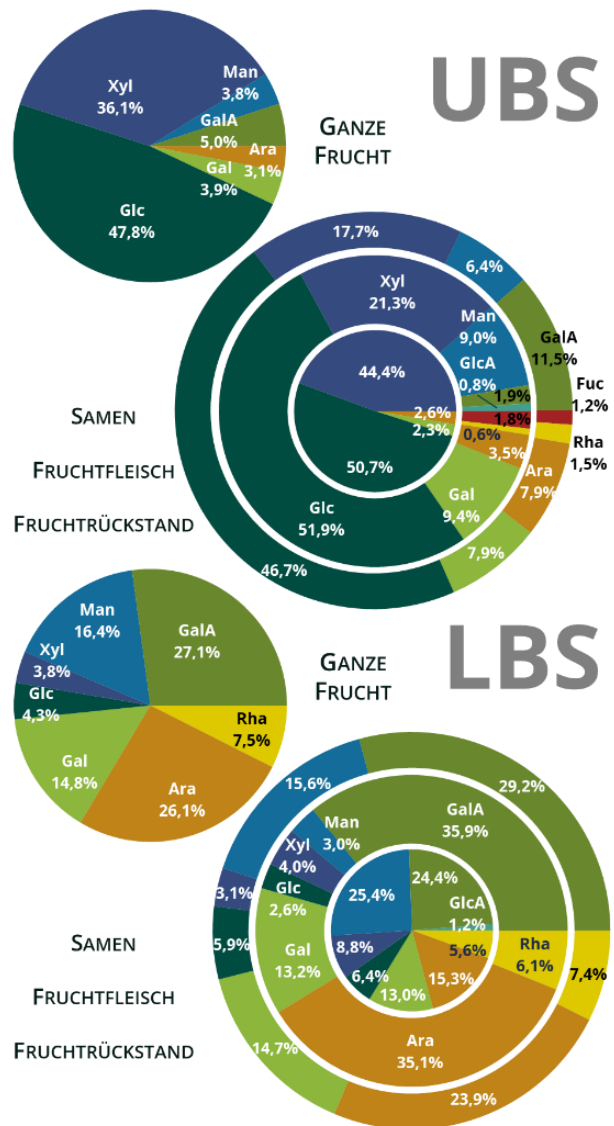
#### 4. Ergebnisse und Diskussion

jedoch Rha, welche mit 7,1 mol% doppelt so häufig vorkommt wie in den übrigen Geweben oder der ganzen Frucht. Dies lässt deutlich höhere Anteile an RGI in der Pektinfraktion der Samen vermuten. Die Anteile an Ara und Gal sind in der Samenfraktion mit am höchsten und könnten ergänzend dazu auf vermehrte Seitenketten des RGI zurückzuführen sein. Die Daten der Methylierungsanalyse bestätigen dies mit hohen Anteilen an 1,2,4-Rhap. Im Vergleich zur ganzen Frucht sind zudem vermehrt t-, 1,3- und 1,4-Galp vorhanden. Demnach sind in den Samen Galactane und AGII vorhanden und dominanter als in der ganzen Frucht. Die auffällig hohen Anteile an t-Araf könnten ebenso darauf zurückzuführen sein. Die Verhältnisse der weiteren PMAA der Ara lassen den Schluss zu, dass in den LBS der Cranberrysamen geringer verzweigte Arabinane vorhanden sind als in der ganzen Frucht (1,5-Araf ↑ bzw. 1,2,5- & 1,2,3,5-Araf ↓). Die erneut sehr schwach ausgeprägte Hemicellulosefraktion weist Ähnlichkeiten zu den LBS der ganzen Frucht auf. Jedoch deuten die Verhältnisse der entsprechenden PMAA auf veränderte Bindungspositionen bei den (Hetero-)Mannanen (1,3,4- statt 1,4,6-Manp) und auf leicht höhere Anteile an XyG (mehr 1,2- als 1,4-Xylp) als in der ganzen Frucht hin.

Salo & Suomi beschrieben unter anderem die Zusammensetzung von wilden Cranberries und ermittelten Ara-reiche Hemicellulosen, Cellulose und Lignin (Salo & Suomi, 1972). Holmes & Rha bestätigten in entkerntem Cranberrypüree das Vorkommen von Cellulose, Hemicellulose und Pektin sowie von Ara-haltigen Polysacchariden (Holmes & Rha, 1978). Eine Übersicht der Monosaccharidzusammensetzung von Ballaststofffraktionen aus Cranberrysoße lieferten Marlett & Vollendorf. Sie quantifizierten die Neutralzucker nach Säurehydrolyse mittels HPLC, wobei Gal und Rha aufgrund von Koelution zusammen bestimmt wurden (Marlett & Vollendorf, 1994). Die Mengenverhältnisse der aus der unlöslichen Fraktion freigesetzten Neutralzucker sind gut mit den ermittelten Werten vergleichbar. Mit 64 % fällt der Hauptanteil auf Glc zurück, gefolgt von Xyl und Ara mit jeweils 11 % sowie Gal/Rha mit 9 % und Man mit 5 %. In der löslichen Fraktion konnten sie ebenfalls Ara und Gal/Rha als wichtige Hauptkomponenten nachweisen, jedoch ebenfalls einen auffällig hohen Anteil an Glc (Marlett & Vollendorf, 1994). Im Rückblick weisen diese Werte möglicherweise auf die mittlerweile nachgewiesenen Arabinoxylglucane der Cranberry hin (Hotchkiss *et al.*, 2015).

**Tabelle 9** Daten der Methylierungsanalyse (mol% ± Range/2, n = 2) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) jeweils aus den ganzen Früchten der **Himbeere** und den Himbeersamen. Ara, Arabinose; f, -furanose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Man, Mannose; n.d., nicht detektiert; p, -pyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

PMAA	Ganze Frucht		Samen	
	UBS [mol%]	LBS [mol%]	UBS [mol%]	LBS [mol%]
t-Araf	11,9 ± 0,1	26,9 ± 0,8	7,1 ± 0,5	20,1 ± 0,8
t-Arap	0,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	4,6 ± 0,3
1,2-Araf	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
1,3-Araf	0,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,9 ± 0,2
1,5-Araf	4,5 ± 0,5	19,9 ± 0,2	9,8 ± 1,3	15,8 ± 0,5
1,2,5-Araf	0,3 ± 0,1	3,8 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1
1,3,5-Araf	1,8 ± 0,1	5,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,8 ± 0,1
1,2,3,5-Araf	1,0 ± 0,1	5,4 ± 0,5	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>20,4 ± 0,6</b>	<b>68,1 ± 0,6</b>	<b>21,6 ± 1,2</b>	<b>49,2 ± 0,3</b>
t-Galp	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,1	5,0 ± 0,1
1,2-Galp	n.d.	0,5 ± 0,1	n.d.	2,9 ± 0,1
1,3-Galp	0,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1
1,4-Galp	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,8 ± 0,1
1,6-Galp	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1
1,3,4-Galp	0,2 ± 0,1	n.d.	0,3 ± 0,1	n.d.
1,3,6-Galp	0,1 ± 0,1	6,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	6,6 ± 0,5
<b>Summe</b>	<b>3,7 ± 0,1</b>	<b>14,7 ± 0,1</b>	<b>6,1 ± 0,2</b>	<b>23,0 ± 0,4</b>
t-Glcp	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1
1,4-Glcp	49,0 ± 0,9	4,1 ± 0,3	37,0 ± 0,8	2,4 ± 0,1
1,4,6-Glcp	8,9 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>58,9 ± 0,8</b>	<b>7,0 ± 0,4</b>	<b>40,6 ± 0,9</b>	<b>3,8 ± 0,1</b>
t-Manp	0,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	8,0 ± 0,7
1,4-Manp	1,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1
1,2,4-Manp	0,2 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
1,3,4-Manp	0,1 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
1,4,6-Manp	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>2,8 ± 0,1</b>	<b>3,1 ± 0,2</b>	<b>1,5 ± 0,1</b>	<b>8,6 ± 0,7</b>
1,2-Rhap	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2
1,2,4-Rhap	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>0,8 ± 0,1</b>	<b>1,7 ± 0,1</b>	<b>1,5 ± 0,2</b>	<b>2,2 ± 0,2</b>
t-Xylp	5,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1	5,0 ± 0,4	5,3 ± 0,3
1,2-Xylp	6,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1
1,4-Xylp	1,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	21,1 ± 0,1	6,8 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>13,4 ± 0,2</b>	<b>5,4 ± 0,1</b>	<b>28,7 ± 0,5</b>	<b>13,1 ± 0,2</b>



**Abbildung 19** Daten der Monosaccharidanalyse (mol%, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse jeweils aus den ganzen Früchten der der **Himbeere** (kleines Kreisdiagramm), dem Fruchtrückstand (außen), dem alkalolunlöslichen Rückstand (AUR) des Fruchtfleischs (mitte) und den Himbeersamen (innen). Ara, Arabinose; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

### III. Die Polysaccharidstrukturen der Himbeere

**UBS DER GANZEN HIMBEERE.** Die Polysaccharide der UBS der ganzen Himbeere sind stark geprägt von Cellulose und Hemicellulosen. In Summe fallen alleine auf deren charakteristische Monomere Glc, Xyl und Man über 85 mol% der freigesetzten Monosaccharide, wobei Glc und Xyl zusammen bereits über 80 mol% liefern (siehe Abb. 19). Auf Seiten der vorwiegend eher den Pektinen zugehörigen Monosaccharide kommen mit 3,1 – 5,0 mol% Ara, Gal und GalA vor. Die übrigen Monosaccharide der Zellwandpolysaccharide, Rha, Fuc, GlcA und Api konnten nicht bestimmt werden. Die Methylierungsanalyse zeigt in Summe erneut leicht abweichende Verhältnisse, dennoch werden Cellulose und Hemicellulosen als dominante Polysaccharidgruppen bestätigt (siehe Tab. 9). 1,4-Glcp stellt mit 49,0 mol% das mit Abstand häufigste Monosaccharid dar, gefolgt von t-Araf mit 11,9 mol% und 1,4,6-Glcp mit 8,9 mol%. Letzteres deutet zusammen mit den verhältnismäßig hohen Anteilen an 1,2-Xylp (6,7 mol%) auf das Vorhandensein von XyG hin. Dieses charakteristische XyG-Seitenkettenelement besitzt in den UBS der Himbeere die höchsten Anteile unter allen untersuchten Proben. Heteromannane sind, angesichts der unterschiedlich verknüpften Man-Einheiten, ebenfalls in gewissen Mengen vorhanden. Die Anteile an PMAA aus Ara- bzw. Rha-Einheiten lassen auf unlösliche Pektinkomponenten in den UBS schließen, konkret auf RGI mit Arabinanseitenketten. Abgesehen von den auffällig hohen Anteilen an t-Araf deuten die übrigen PMAA auf vielfältig verzweigte Arabinane hin. Das Verhältnis der linearen zu den verzweigten Bausteinen ist ausgeglichen. Die Verteilung der PMAA der Gal deutet zudem auf sehr geringe Mengen an AGI und AGII. In Gegenüberstellung mit den UBS aus Aroniabeeren und Cranberries liegt die Polysaccharidverteilung der UBS der Himbeere noch stärker auf Seiten der Cellulose und Hemicellulosen.

**LBS DER GANZEN HIMBEERE.** Die Monosaccharidzusammensetzung der LBS der ganzen Himbeeren ist deutlich heterogener als die der UBS. In dieser Fraktion teilen sich 85 mol% der freigesetzten Monomere auf vier verschiedene Monosaccharide auf. Die zwei markantesten stellen GalA und Ara mit 27,1 bzw. 26,1 mol% dar, gefolgt von Man und Gal mit einem Anteil von 16,4 bzw. 14,8 mol%. Anschließend folgen Rha, Glc und Xyl. Die Daten der Methylierungsanalyse lassen keine Rückschlüsse auf GalA zu, wodurch die PMAA der Ara darin am häufigsten auftreten. Auffällig ist erneut der sehr hohe Anteil an t-Araf gefolgt von 1,5-Araf und den weiteren verknüpften Arabinanmonomeren. Die Häufigkeit der vorliegenden Elemente lässt auf eine vielfältige und sehr ausgeprägte Verzweigung der RGI-Seitenketten schließen. Das Verhältnis an verzweigten (1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-Araf) zu linearen (1,5-Araf) Bausteinen ist noch höher als bei den UBS. Die bestimmten PMAA der Gal können sowohl auf Galactane (1,4-Galp) als auch auf AGII (1,3-, 1,6- und 1,3,6-Galp) zurückgeführt werden. Auch die Anteile an 1,2- und 1,2,4-Rhap (insg. knapp 2 mol%) sprechen für RGI-Seitenketten. Die Mannane zeigen im Vergleich zu den UBS ein höheres Verhältnis von verzweigten zu linearen Elementen auf. 1,4-Manp und 1,4,6-Manp liegen im Verhältnis 1 : 1 vor. Möglicherweise sind auch Anteile der t-Galp und der 1,4-Glcp auf Heteromannane zurückzuführen. Darüber hinaus lassen die Anteile an 1,4,6-Glcp (2,5 mol%) und 1,2-Xylp auf geringe Mengen an XyG schließen. Xylane sind angesichts der 2,2 mol% 1,4-Xylp in ähnlichen Dimensionen vorhanden.

**UBS DER FRUCHTGEWEBE.** Im Gegensatz zu der ganzen Frucht lassen sich in den UBS des Fruchtrückstands und Fruchtfleischs (AUR) eine breitere Auswahl an freigesetzten Monomeren nachweisen. So wurden in den UBS des Fruchtrückstands Fuc und Rha in geringen Anteilen (1,2 – 1,5 mol%) und im Fruchtfleisch zusätzlich GlcA bestimmt werden. Obwohl Glc (46,7 – 51,9 mol%) und Xyl (17,7 – 21,3 mol%) weiterhin dominieren, weisen diese beiden Fraktionen in der Monosaccharidzusammensetzung deutliche Unterschiede untereinander und zur ganzen Frucht auf. Der Fruchtrückstand enthielt beispielsweise mehr Pektine, angezeigt durch das höhere Vorkommen an GalA, Rha, Gal und Ara. Die UBS des Himbeerfruchtfleischs hingegen weisen zwar noch höhere Anteile an Gal auf, jedoch sind die Anteile an GalA deutlich verringert und die Anteile an Ara sind vergleichbar mit den Ara-Anteilen in den UBS der ganzen Frucht. Die Fruchtfleischfraktion weist darüber hinaus die höchsten Anteile an Man auf (9,0 mol%). Der parallele Anstieg von Gal und Man kann auf größere Anteile an Galactomannanen hinweisen. Die GlcA entstammt möglicherweise Heteroxylenen oder RGII. Der Nachweis von Fuc in beiden Fraktionen könnte auf Seitenketten des XyG zurückgeführt werden.

**LBS DER FRUCHTGEWEBE.** Die Polysaccharide der LBS der Fruchtfleisch- und Fruchtrückstandsfraktion unterscheiden sich deutlich voneinander. Im Fruchtfleisch konnten deutlich höhere Anteile an GalA (+ 7 mol%) und Ara (+ 11 mol%) nachgewiesen werden. Dies geht insbesondere auf Kosten der Man, die deutlich geringere Anteile besitzt als in der ganzen Frucht und dem Fruchtrückstand (jeweils – 13 mol%). In Summe erreichen die charakteristischen Pektinmonomere im Fruchtfleisch (AUR) der LBS aus Cranberries ungefähr 90 mol%. Die Fruchtfleischfraktion der Cranberry stach bereits aufgrund des vergleichsweise hohen Gehalts an LBS hervor (siehe Tab. 6). Unterm Strich erscheint das Perikarp der Cranberry reich an löslichen Pektinen zu sein. Zwischen dem Fruchtrückstand und der ganzen Frucht bestehen derweil nur geringe Unterschiede.

**UBS DER HIMBEERSAMEN.** Die Polysaccharide in den UBS der Himbeersamen bestehen hauptsächlich aus Glc (50,7 mol%) und Xyl (44,4 mol%). Die Monosaccharidzusammensetzung ist demnach noch monotoner als die der UBS der ganzen Frucht. Lediglich 5 mol% teilen sich etwa zu gleichen Teilen in Ara und Gal auf. Die übrigen fünf Monomere (GalA, Man, Rha, Fuc, GlcA), die im Fruchtfleisch bzw. dem Fruchtrückstand vorhanden sind, konnten in den Samen nicht bestimmt werden. Anhand der PMAA wird deutlich, dass die beiden Hauptmonosaccharide vorwiegend Cellulose und Xylanen zugeschrieben werden können. 37,0 mol% gehen auf 1,4-Glc $\beta$  und 21,1 mol% gehen auf 1,4-Xyl $\beta$  zurück. Anhand der 1,4,6-Glc $\beta$  sind XyG in den Samen zwar ebenfalls nachweisbar, dennoch ist die Diskrepanz zwischen dem hohen Xylananteil im Samen und dem hohen XyG-Anteil in der ganzen Frucht bemerkenswert. Aufgrund der unterschiedlichen Hydrolysebedingungen wurde in den UBS mittels der Methylierungsanalyse abermals ein höherer Ara-Anteil nachgewiesen als nach der Schwefelsäurehydrolyse. Die PMAA aus Ara-Einheiten gehen erneut hauptsächlich auf Arabinane zurück. Ihr Verzweigungsgrad kann aufgrund des höheren Anteils an 1,5-Araf als geringer eingeschätzt werden als in den Arabinanen der ganzen Frucht. Die übrigen PMAA deuten auf das Vorhandensein von RGI mit Seitenketten aus AGI sowie von AGII und (Hetero-)Mannanen. Die Trockensubstanz der Himbeere wird im Gegensatz zu den beiden

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

zuvor behandelten Beeren stärker von den Samen und dem Fruchtfleisch mitbestimmt. Dies ist im Rückblick auf die Zusammensetzung der UBS der ganzen Frucht gut ersichtlich. Der summierte Anteil der Samen und des Fruchtfleischs an der Trockenmasse liegt bei der Aroniabeere und der Cranberry bei insgesamt 5,1 bzw. 2,9 %, bei der Himbeere und der Roten Johannisbeere jedoch bei 26,8 bzw. 26,0 %.

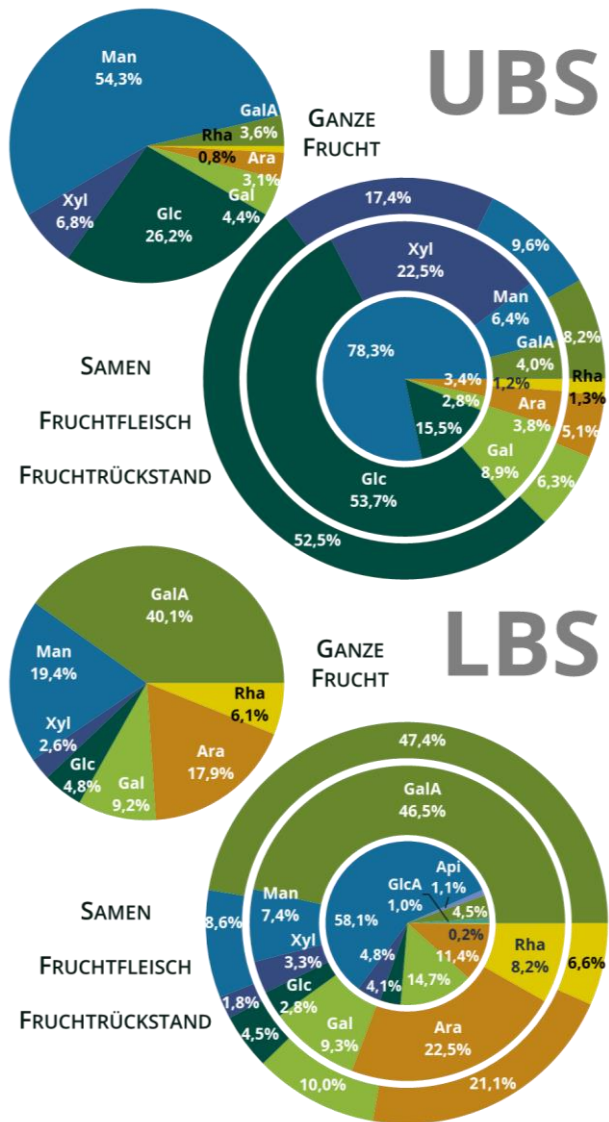
**LBS DER HIMBEERSAMEN.** Die Zusammensetzung der Polysaccharide der LBS aus den Himbeersamen basiert weitestgehend auf den Pektinmonomeren GalA (24,4 mol%), Ara (15,3 mol%), Gal (13,0 mol%) und Rha (5,6 mol%). Die Man macht gut ein Viertel der freigesetzten Monosaccharide aus, gefolgt von Xyl, Glc und GlcA. Im Vergleich mit den übrigen Gewebefractionen weisen die Samen den höchsten Anteil an charakteristischen Hemicellulosemonomeren auf (insg. 41 mol%). Anhand der Methylierungsanalyse können (Hetero-)Mannane (1,4-Manp) und Xylane (1,4-Xylp) als lösliche Hemicellulosen identifiziert werden. Das Fragmentierungsspektrum des PMAA der 1,4,6-Glcp im MS-Chromatogramm weist eine Reihe unbekannter Signale auf konnte dementsprechend nicht zweifelsfrei quantifiziert werden. Demnach könnten XyG ebenfalls vorhanden sein, nichtsdestotrotz fallen Xylane in den LBS der Himbeersamen stärker ins Gewicht. Bezüglich der Man-Einheiten fällt auf, dass fast ausschließlich terminale Einheiten vorkommen. Deren Ursprung ist Mangels entsprechend kettenverlängernder Einheiten unklar und könnte auf eine unvollständige Hydrolyse der Mannane zurückzuführen sein. Auf Seiten der Pektine kann auf HG und RGI mit entsprechenden Seitenketten zurückgeschlossen werden. Die PMAA der Ara weisen geringere Anteile an verzweigten Arabinanelementen (1,2,5- und 1,2,3,5-Araf ↓) auf als in der ganzen Frucht. Die Verteilung deutet folglich darauf hin, dass in den LBS der Samen die Arabinane einen geringeren Verzweigungsgrad aufweisen als die LBS der ganzen Frucht. Dies konnte bereits bei der Aroniabeere und der Cranberry beobachtet werden. Aus den PMAA der Gal-Einheiten können deutliche Anteile an AGII und gewisse Mengen an Galactanen abgelesen werden. Die hohen Anteile an t-Arap (4,6 mol%) können ebenfalls dem AGII zugeschrieben werden (Pettolino *et al.*, 2012).

Die Himbeere wurde ebenfalls von Salo & Suomi hinsichtlich ihrer Kohlenhydratzusammensetzung untersucht. Dabei konnten sowohl in wilden als auch in kultivierten Früchten, neben Cellulose, Xyl-reiche Hemicellulosen nachgewiesen werden (Salo & Suomi, 1972). In den Samen konnten die Autoren ebenfalls Xylane als Hauptkomponenten der Hemicellulosen identifizieren. Marlett & Vollendorf ermittelten in der unlöslichen Ballaststofffraktion neben 51 % Glc einen Xyl-Anteil von 34 % (Marlett & Vollendorf, 1994). In der löslichen Fraktion dominierten Ara mit 50 % und Gal/Rha mit 35 %. Unter Vernachlässigung der GalA stimmen die beschriebenen Verhältnisse der Neutralzucker mit der hier ermittelten Monosaccharidzusammensetzung gut überein. Vicente und Mitarbeiter analysierten den AUR aus entkernten Himbeeren hinsichtlich der Neutralzucker nach TFA-Hydrolyse mittels GC-MS. Dementsprechend wurden lediglich die Nicht-Cellulose-Polysaccharide hydrolysiert und als Alditolacetate quantifiziert. Die Autoren ermittelten Ara mit knapp 40 % als Hauptkomponente gefolgt von Xyl mit 26 % und Gal mit 13 % (Vicente *et al.*, 2007). Angesichts des Probenmaterials und der Methodik sind diese Vergleichswerte ebenfalls plausibel.



**Tabelle 10** Daten der Methylierungsanalyse (mol% ± Range/2, n = 2) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) jeweils aus den ganzen Früchten der **Roten Johannisbeere** und den Samen der Roten Johannisbeere. Ara, Arabinose; f, -furanose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Man, Mannose; n.d., nicht detektiert; p, -pyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

PMAA	Ganze Frucht		Samen	
	UBS [mol%]	LBS [mol%]	UBS [mol%]	LBS [mol%]
t-Araf	4,2 ± 0,3	23,9 ± 2,4	2,0 ± 0,1	9,3 ± 0,2
t-Arap	0,4 ± 0,1	2,4 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1
1,2-Araf	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
1,3-Araf	0,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1
1,5-Araf	5,8 ± 1,1	22,7 ± 0,9	1,3 ± 0,1	3,6 ± 0,1
1,2,5-Araf	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	n.d.	1,1 ± 0,1
1,3,5-Araf	1,4 ± 0,1	6,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1
1,2,3,5-Araf	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>13,2 ± 0,7</b>	<b>62,3 ± 0,9</b>	<b>5,2 ± 0,2</b>	<b>16,8 ± 0,3</b>
t-Galp	2,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1
1,2-Galp	n.d.	0,5 ± 0,1	n.d.	n.d.
1,3-Galp	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1
1,4-Galp	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2
1,6-Galp	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1
1,3,4-Galp	0,3 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
1,3,6-Galp	0,8 ± 0,1	4,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,6 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>5,4 ± 0,1</b>	<b>12,4 ± 0,6</b>	<b>2,6 ± 0,4</b>	<b>13,4 ± 0,1</b>
t-Glcp	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
1,4-Glcp	35,8 ± 1,8	6,0 ± 0,1	14,5 ± 0,4	3,7 ± 0,1
1,4,6-Glcp	2,9 ± 0,4	5,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>39,4 ± 2,2</b>	<b>12,6 ± 0,1</b>	<b>15,5 ± 0,5</b>	<b>6,8 ± 0,1</b>
t-Manp	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,3	4,6 ± 0,1
1,4-Manp	21,8 ± 2	0,4 ± 0,1	72,0 ± 0,7	53,0 ± 0,3
1,2,4-Manp	n.d.	n.d.	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
1,3,4-Manp	n.d.	0,3 ± 0,1	n.d.	n.d.
1,4,6-Manp	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	n.d.
<b>Summe</b>	<b>23,7 ± 2,1</b>	<b>3,1 ± 0,1</b>	<b>75,2 ± 0,4</b>	<b>57,8 ± 0,4</b>
1,2-Rhap	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
1,2,4-Rhap	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	n.d.	n.d.
<b>Summe</b>	<b>2,2 ± 0,1</b>	<b>2,0 ± 0,4</b>	<b>0,2 ± 0,1</b>	<b>0,2 ± 0,1</b>
t-Xylp	4,1 ± 0,3	3,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1
1,2-Xylp	2,0 ± 0,3	3,7 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
1,4-Xylp	10,0 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1
<b>Summe</b>	<b>16,1 ± 1</b>	<b>7,7 ± 0,2</b>	<b>1,2 ± 0,1</b>	<b>5,0 ± 0,1</b>



**Abbildung 20** Daten der Monosaccharidanalyse (mol%, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse jeweils aus den ganzen Früchten der **Roten Johannisbeere** (kleines Kreisdiagramm), dem Fruchtrückstand (außen), dem alkokolunlöslichen Rückstand (AUR) des Fruchtfleischs (mitte) und den Samen (innen). Ara, Arabinose; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

### IV. Die Polysaccharidstrukturen der Roten Johannisbeere

**UBS DER GANZEN ROTEN JOHANNISBEERE.** Die Rote Johannisbeere stellt hinsichtlich der Polysaccharide der UBS eine Besonderheit dar. Bei den durch Schwefelsäure freigesetzten Monosacchariden dominiert mit über 50 mol% die Man und nicht die Glc (siehe Abb. 20). In den UBS der Roten Johannisbeere lassen sich lediglich 26 mol% auf Glc zurückführen. Darüber hinaus konnten Xyl, Gal, GalA, Ara und Rha bestimmt werden, Fuc, Api und GlcA jedoch erneut nicht. Demzufolge spielen fucosylierte XyG und RGII keine entscheidende Rolle in den Polysacchariden der UBS der Roten Johannisbeere. Die Daten der Methylierungsanalyse zeigen ein etwas anderes Bild als die Monosaccharidanalyse (siehe Tab. 10). Darin überwiegen die Anteile der PMAA aus Glc-Einheiten (insg. 40 mol%), dennoch weist die Rote Johannisbeere mit 21,8 mol% den höchsten Gehalt an 1,4-Man $\alpha$  innerhalb der untersuchten Proben auf. Die Verteilung der PMAA macht deutlich, dass die Hauptkomponenten auf Cellulose und lineare Mannane zurückzuführen sind. Angesichts von 2,9 mol% 1,4,6-Glc $\beta$  entfällt ein Teil der 1,4-Glc $\beta$  auf XyG. Wie bereits beschrieben ermöglichen die Daten der Methylierungsanalyse jedoch nicht eine Differenzierung zwischen Cellulose und Glucomannanen. Ergänzend zu den Anteilen an 1,4,6-Glc $\beta$  wird anhand des Massenspektrums des Signals der PMAA aus 1,2-Xyl $\beta$  (2 mol%) bzw. 1,4-Xyl $\beta$  (10 mol%) deutlich, dass Xylane erneut den Vorrang vor XyG haben. Die Verhältnisse der übrigen PMAA lassen sich durch das Vorliegen unlöslicher Pektine erklären. Die Arabinane sind anhand der Verhältnisse der Bausteine vergleichbar zu den UBS der ganzen Cranberry. Der Anteil am linearen Arabinanrückgrat (1,5-Ara $\beta$ ) überwiegt vor den (über die Positionen O-2 und/oder O-3) verzweigten Bausteinen. Zudem lassen die PMAA der Gal Rückschlüsse auf das Vorhandensein von AGI und AGII zu.

**LBS DER GANZEN ROTEN JOHANNISBEERE.** Die Methanolyse der Polysaccharide der LBS der ganzen Früchte ergab erneut, dass GalA mit 40,1 mol% die Hauptkomponente darstellt. Doch auch in dieser Fraktion konnte ein hoher Anteil an Man (19,4 mol%) festgestellt werden. Die übrigen Anteile verteilen sich vorwiegend auf die Pektinmonomere Ara, Gal und Rha. Die weiteren Monomere der Hemicellulosen, Glc und Xyl, stellen mit insgesamt 7,4 mol% lediglich Nebenkomponten dar. Abgesehen von den hohen Man-Anteilen ist die Monosaccharidzusammensetzung der LBS aus Roten Johannisbeeren gut vergleichbar mit der Monosaccharidzusammensetzung von LBS aus Cranberries. Dies wird ebenso anhand der Methylierungsanalyse deutlich. Bei den Arabinanbausteinen fallen insbesondere t- und 1,5-Ara $\beta$  ins Gewicht. Das Verhältnis von verzweigten zu linearen Elementen lässt auf Arabinane schließen, die einen geringeren Verzweigungsgrad aufweisen als die LBS aus Cranberries oder Himbeeren. Neben den Arabinanen können Galactane und AGII als weitere Komponenten der LBS aus Roten Johannisbeeren bestätigt werden. Im Gegensatz zu den UBS lassen sich die PMAA der Xyl-Einheiten mit 3,7 mol% 1,2-Xyl $\beta$  vermehrt auf XyG zurückführen. Auch der Anteil an 1,4,6-Glc $\beta$  (5,9 mol%) spricht für XyG als lösliche Hemicellulosen. Auffällig ist, dass PMAA aus Man-Einheiten mittels der Methylierungsanalyse erneut in deutlich geringerem Maßstab abgebildet werden als aus der Methanolyse zu erwarten wäre.

**UBS DER FRUCHTGEWEBE.** Die Monosaccharidzusammensetzungen der UBS aus den angereicherten Gewebefraktionen machen deutlich, dass die beachtlichen Man-Anteile nicht

aus dem AUR des Fruchtfleischs oder dem Fruchtrückstand stammen. Beide Fraktionen zeigen eine eher gängige Konstitution der UBS mit über 50 mol% Glc gefolgt von Xyl (17,4 – 22,5 mol%). Die Anteile an Man sind in vergleichbaren Dimensionen wie in den UBS der Beerenobstsorten und -geweben zuvor. Darüber hinaus lassen die Anteile an GalA, Gal, Ara und Rha auf unlösliche Pektine schließen (insg. 18 – 21 mol%). Allgemein unterscheiden sich die Verteilungen der Monosaccharide in Fruchtrückstand und -fleisch lediglich in geringen Prozentbereichen (max. 5,1 mol%). Der Fruchtrückstand weist mehr Man, GalA und Ara auf, während das Fruchtfleisch höhere Anteile an Xyl und Gal besitzt.

**LBS DER FRUCHTGEWEBE.** In den Polysacchariden der LBS des Fruchtrückstands und -fleischs der Roten Johannisbeere ist die Man ebenfalls weniger dominant als in den LBS der ganzen Frucht. Die Zusammensetzung der Monosaccharide zwischen den beiden Fraktionen ist, mit einer maximalen Differenz von 1,7 mol%, beinahe identisch. Dieser Zusammenhang konnte bereits zuvor in den UBS und in der Literatur anhand von AUR ähnlicher Gewebefractionen aus Schwarzen Johannisbeeren beobachtet werden (Hilz *et al.*, 2005). GalA stellt die primäre Komponente der LBS dar (46,5 – 47,4 mol%). Darauf folgen die übrigen charakteristischen Pektinmonomere Ara (21,1 – 22,5 mol%), Gal (9,3 – 10,0 mol%) und Rha (6,6 - 8,2 mol%). Auf Seiten der Hemicellulosen enthalten die LBS im Gegensatz zu den UBS mehr Man als Xyl, doch insgesamt stellen die Hemicellulosen die Nebenkompenten in LBS dar (insg. 13,5 – 14,9 mol% der Monomere).

**UBS DER SAMEN DER ROTEN JOHANNISBEERE.** Anhand der Monosaccharidzusammensetzung der UBS wird direkt ersichtlich, dass die Samen der Roten Johannisbeere den Ursprung der außerordentlich hohen Man-Anteile darstellen. Beinahe 80 mol% der durch Schwefelsäure freigesetzten Monosaccharide gehen auf Man zurück. Dies veranschaulicht, ähnlich wie bei der Himbeere, dass die Samen einen deutlich höheren Anteil an der Trockensubstanz und folglich an den Gesamtballaststoffen der ganzen Frucht besitzen. Darüber hinaus konnten lediglich Glc (15,5 mol%) und geringe Mengen an Gal (2,8 mol%) und Ara (3,4 mol%) nachgewiesen werden. Diese Verteilung lässt den Schluss zu, dass die Rote Johannisbeere in ihren Samen Mannane als Speicherpolysaccharide anlegt. Dies konnte in der Literatur bereits für Schwarze Johannisbeeren aufgezeigt werden (Hilz *et al.*, 2005). Die Methylierungsanalyse bestätigt die Erkenntnisse aus der Säurehydrolyse, denn 1,4-Man<sub>p</sub> stellt mit weitem Abstand die häufigste PMAA-Spezies dar (72 mol%). Der immense Überschuss dieser Einheit deutet darauf hin, dass 1,4-Glc<sub>p</sub> als zweithäufigste Komponente aus Cellulose und nicht aus Glucomannanen freigesetzt wurde. Die sehr geringen Anteile an PMAA der verzweigten Man-Einheiten lassen den Schluss zu, dass die Mannane der Roten Johannisbeersamen überwiegend linear vorliegen. Die übrigen PMAA deuten wie zuvor in der ganzen Frucht auf Arabinane, Galactane, AGII, Xylane und XyG als Nebenkompenten der UBS hin. Die Verhältnisse der PMAA aus Ara-Einheiten lassen einen hohen Verzweigungsgrad der Arabinane vermuten, sind aufgrund des Übermaß an 1,4-Man<sub>p</sub> jedoch schwieriger einzuschätzen.

**LBS DER SAMEN DER ROTEN JOHANNISBEERE.** Man dominiert auch die Zusammensetzung der Polysaccharide der LBS aus Roten Johannisbeersamen. Neben den knapp 60 mol% Man

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

konnte in dieser Fraktion jedoch eine höhere Anzahl an Nebenkomponenten nachgewiesen werden. Auf Seiten der Pektine zeigen die Verhältnisse von GalA (4,5 mol%) zu Gal (14,7 mol%) und Ara (11,4 mol%), dass die RGI-Seitenketten eine größere Rolle einnehmen als HG. In den LBS der Samen konnten zudem geringe Anteile an GlcA und Api quantifiziert werden. Letzteres konnte bisher in keiner der untersuchten Proben bestimmt werden. Dies stellt ein Hinweis auf das Vorliegen von RGII dar. Eine Zuordnung weiterer Bausteine zu RGII ist anhand der Daten jedoch nicht möglich. Auf Seiten der Hemicellulosen weisen die Samen zudem Xyl und Glc auf (4,8 bzw. 4,1 mol%). Unter Einbeziehung der Methylierungsanalyse deutet dies auf das Vorhandensein von Glucuronoxylanen und XyG. Die außerordentlich hohen Man-Gehalte lassen sich erneut auf überwiegend lineare Mannane zurückführen. Die Verteilung der PMAA der Ara- und Gal-Einheiten weisen erneut auf Arabinane, AGII und Galactane hin. Der Verzweigungsgrad der Arabinane in den LBS der Samen erscheint höher als in den LBS der ganzen Frucht. Auffällig ist zudem der verhältnismäßig hohe Anteil an 1,2,5-Araf (1,1 mol%) gegenüber 1,3,5-Araf (0,4 mol%). In allen anderen Proben wiesen die Arabinane stets mehr Verzweigungen über Position O-3 auf als über O-2.

Die Rote Johannisbeere wurde ebenfalls bereits von Salo & Suomi charakterisiert. Dabei fiel auf, dass sie und ihre Verwandten, die Schwarze Johannisbeere und die Stachelbeere, im Gegensatz zu den anderen Beeren hohe Man-Gehalte in den Hemicellulosen aufweisen (Salo & Suomi, 1972). Die Autoren weisen den Samen als Ursprung der Mannane aus. Die Arbeiten von Varo und Mitarbeitern bestätigen den verhältnismäßig hohen Anteil an Man in wasserunlöslichen Nicht-Cellulose-Polysacchariden aus Schwarzen Johannisbeeren (Varo *et al.*, 1984a). Die bisher umfangreichste Charakterisierung von Zellwandpolysacchariden aus Schwarzen Johannisbeeren wurde von Hilz und Mitarbeitern durchgeführt. Die Autoren untersuchten den AUR mehrerer Fruchtgewebe und stufenweise extrahierte Zellwandfraktionen hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung und ihrer Monomerbindungstypen. Die Monosaccharide wurden als Neutralzucker aus der Schwefelsäurehydrolyse mittels GC bestimmt und mit den Uronsäuregehalten aus dem *m*-Hydroxydiphenyl-Assay ergänzt (Hilz *et al.*, 2005). Der direkte Vergleich der Werte wird erschwert durch den Fakt, dass die Autoren die Zellwand als AUR betrachtet haben, während in dieser Arbeit UBS und LBS getrennt charakterisiert wurden. Bei Betrachtung der Daten analoger Proben (Schale, Pulpe, Samen vs. Fruchtrückstand, Fruchtfleisch, Samen) fällt dennoch auf, dass die Man-Gehalte der Roten Johannisbeere in allen Proben höher ausfallen. So weisen beispielsweise UBS und LBS der Samen der Roten Johannisbeere Man-Gehalte von 78 mol% bzw. 58 mol% auf, während Hilz und Mitarbeiter in den AUR der Samen der Schwarzen Johannisbeere lediglich 37 mol% bestimmten (Hilz *et al.*, 2005). Stattdessen wiesen sie auffällig hohe Anteile an GalA nach (40 mol%). Unter der Annahme, dass AUR ungefähr der Kombination aus UBS und LBS entspricht, wurde mit Einberechnung des UBS/LBS-Verhältnisses aus den hier ermittelten Werten die Monosaccharidzusammensetzung eines theoretischen „AUR“ der Roten Johannisbeere berechnet. Unter dieser Annahme stehen 47 mol% Man bei der Roten Johannisbeere gegenüber von 13 mol% Man bei der Schwarzen Johannisbeere. Selbst unter Ausschluss der (durch unterschiedliche Methoden bestimmten) GalA liegen die Man-Anteile in der Roten Johannisbeere höher als in der Schwarzen. Laut

Methylierungsanalyse weisen jedoch beide Johannisbeerarten überwiegend lineare Mannane auf. Bei Betrachtung der Daten ist auffällig, dass in der Schwarzen Johannisbeere deutlich geringere Anteile an PMAA der Ara nachgewiesen wurden als in der roten Schwesterart. Darüber hinaus unterscheiden sich die Methylierungsdaten lediglich in den Gehalten und dem Vorkommen von Minorkomponenten (wie bspw. 1,6-Galp). Allgemein stimmen die Rote und die Schwarze Johannisbeere hinsichtlich der strukturellen Aspekte der Zellwandpolysaccharide verhältnismäßig gut überein.

#### d. Entwicklung und Anwendung einer Profilingmethode für Xyloglucane aus pflanzlichen Lebensmitteln

Im Zuge der Strukturcharakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide der Beerenobstsorten zeigte sich, dass die Daten aus den Säurehydrolysen und der Methylierungsanalyse mitunter inhomogene Ergebnisse liefern. Zudem wurde deutlich, dass die Erkenntnisse über die Verhältnisse und Bindungspositionen der Monomere nicht immer ausreichen, um bestimmte Polysaccharidgruppen (beispielsweise XyG und Mannane) eindeutig zu identifizieren bzw. zu charakterisieren. Dies ist mitunter der Komplexität und Diversität der pflanzlichen Zellwand geschuldet. Demgemäß fordert eine detaillierte Beschreibung der Zellwand stets mehrere analytische Blickwinkel. Die bisher durchgeführten Methoden dienen vorrangig dem Zweck einen Gesamtüberblick zu verschaffen. Ergänzend dazu können Einzelmethoden für spezifische Polymere innerhalb der Zellwandmatrix eingesetzt werden. Bezüglich der Polysaccharide wurden in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie bereits Profilingmethoden entwickelt, um ferulasäurehaltige Arabinoxylane und neutrale Pektinseitenketten der pflanzlichen Zellwand aufzuklären (Schendel *et al.*, 2016; Wefers & Bunzel, 2016). Ebenso können spezifische Methoden zur Bestimmung und Charakterisierung von assoziierten phenolischen Verbindungen der pflanzlichen Zellwand (Lignin und PA) angewendet werden (siehe 3d+e).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur spezifischen Aufklärung von XyG in lebensmittelrelevanten Pflanzenproben. Die Beteiligung und Funktion der XyG an der Architektur der Zellwand ist bereits umfassend beschrieben (siehe 1c), dennoch fehlt die Möglichkeit dieses ubiquitäre Polysaccharid im Rahmen weiterer Forschungsfragen gezielt und effizient zu charakterisieren. Wie bereits dargelegt, sind die Methoden zur Analyse der Monosaccharidzusammensetzung und -bindungsverhältnisse dafür ungeeignet. So können die Grundbausteine der XyG anhand der Daten der Methylierungsanalyse nur schwierig bzw. nicht eindeutig zugeordnet werden. Dies liegt unter anderem an der Struktur der XyG selbst, denn 1→4-verknüpfte Glc kann ebenso auf Cellulose, Glucomannane zurückgeführt werden. Resistente Stärken sind, aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Vorgehensweise zur Ballaststoffgewinnung, als Ursprung ebenfalls nicht auszuschließen. Die Beurteilung anhand des verzweigten Rückgrats (1,4,6-Glcp) ist, aufgrund des variablen DS der XyG innerhalb des Pflanzenreichs, ebenfalls unzuverlässig. Darüber hinaus können die variablen Seitenkettenelemente zumeist nicht zweifelsfrei allein den XyG

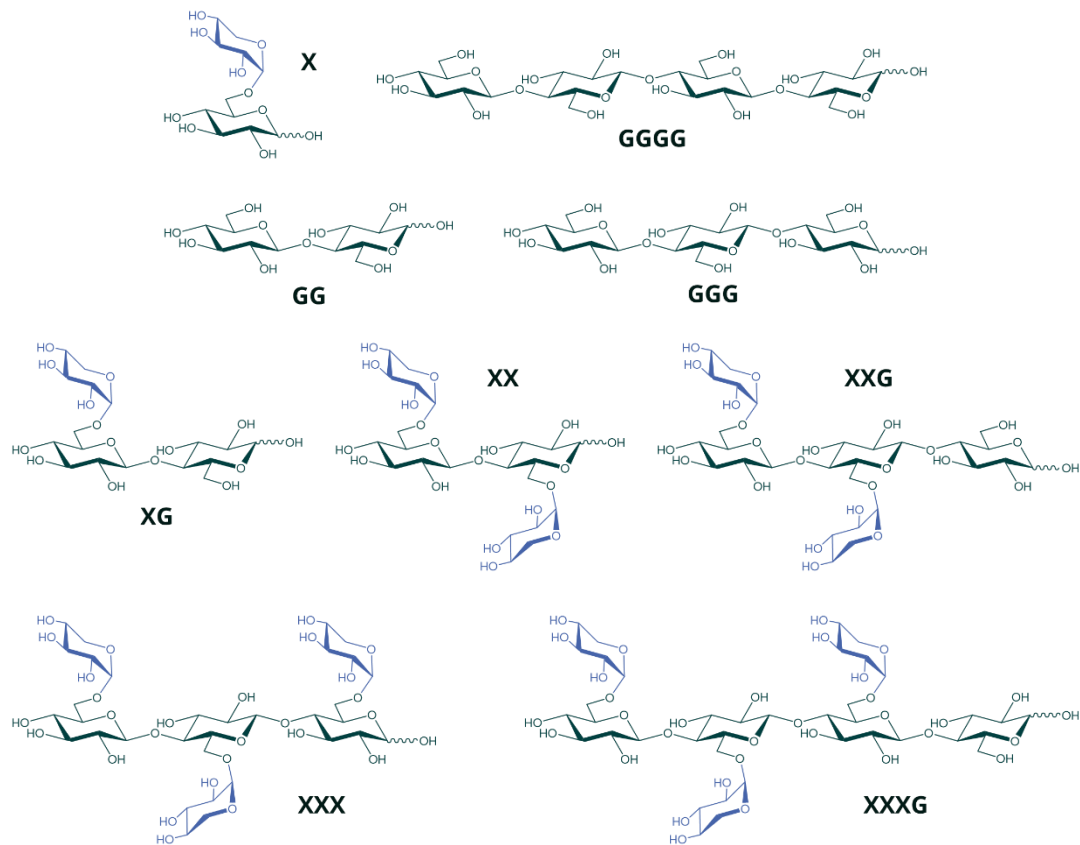
zugeordnet werden. So existieren beispielsweise mehrere mögliche Quellen für t-Xylp, t-Galp und t-Araf in der pflanzlichen Zellwand. Hinzu kommt die Problematik, dass anhand der Methylierungsanalyse die verknüpfte Seitenkette (1,2-Xylp) chromatographisch nur indirekt bestimmbar ist (siehe 3bIII). Generell können seltene Monosaccharide aus XyG-Seitenketten, wie beispielsweise Fuc, sowohl bei der Monosaccharid- als auch bei der Methylierungsanalyse häufig nicht bestimmt werden.

Schlussendlich ist der Bedarf einer zielgerichteten Methode zur Charakterisierung von XyG-Strukturen aus Zellwandkomponenten offenkundig. Die Verfügbarkeit der spezifischen Glucanase und die nachgewiesene Anwendbarkeit und Erfahrung am Beispiel des Arabinan- und Galactanprofilings von Wefers & Bunzel bieten günstige Ausgangspunkte zur Entwicklung einer enzymbasierten HPAEC-Methode (Wefers & Bunzel, 2016). Im Rahmen der Masterarbeit von Larissa Kaufhold konnten die ersten Grundsteine dafür gelegt werden. Die bisher noch unbekannt XyG-Strukturen von Mango, Orange und Litschi konnten mithilfe zuvor isolierter XGO-Standardsubstanzen aufgeklärt werden. Die Standards wurden aus authentischen Lebensmittelproben unter Einsatz der XEG freigesetzt, chromatographisch aufgereinigt und mittels LC-MS bzw. NMR-Experimenten strukturcharakterisiert. In Zusammenarbeit mit Larissa Kaufhold konnten auf diese Weise die XGO-Standardsubstanzen XG, XX, XXG, XFG, XXXG, XXFG und XLFG gewonnen und deren RRF bestimmt werden. Die Methodik wurde anschließend um weitere XGO erweitert, um ein größeres Spektrum lebensmittelrelevanter Pflanzenproben analytisch zu erfassen. Im Folgenden soll die Aufklärung der Standardsubstanzen, die Ermittlung ihrer RRF sowie die Entwicklung und Anwendung der XyG-Profilierungsmethode dargelegt werden.

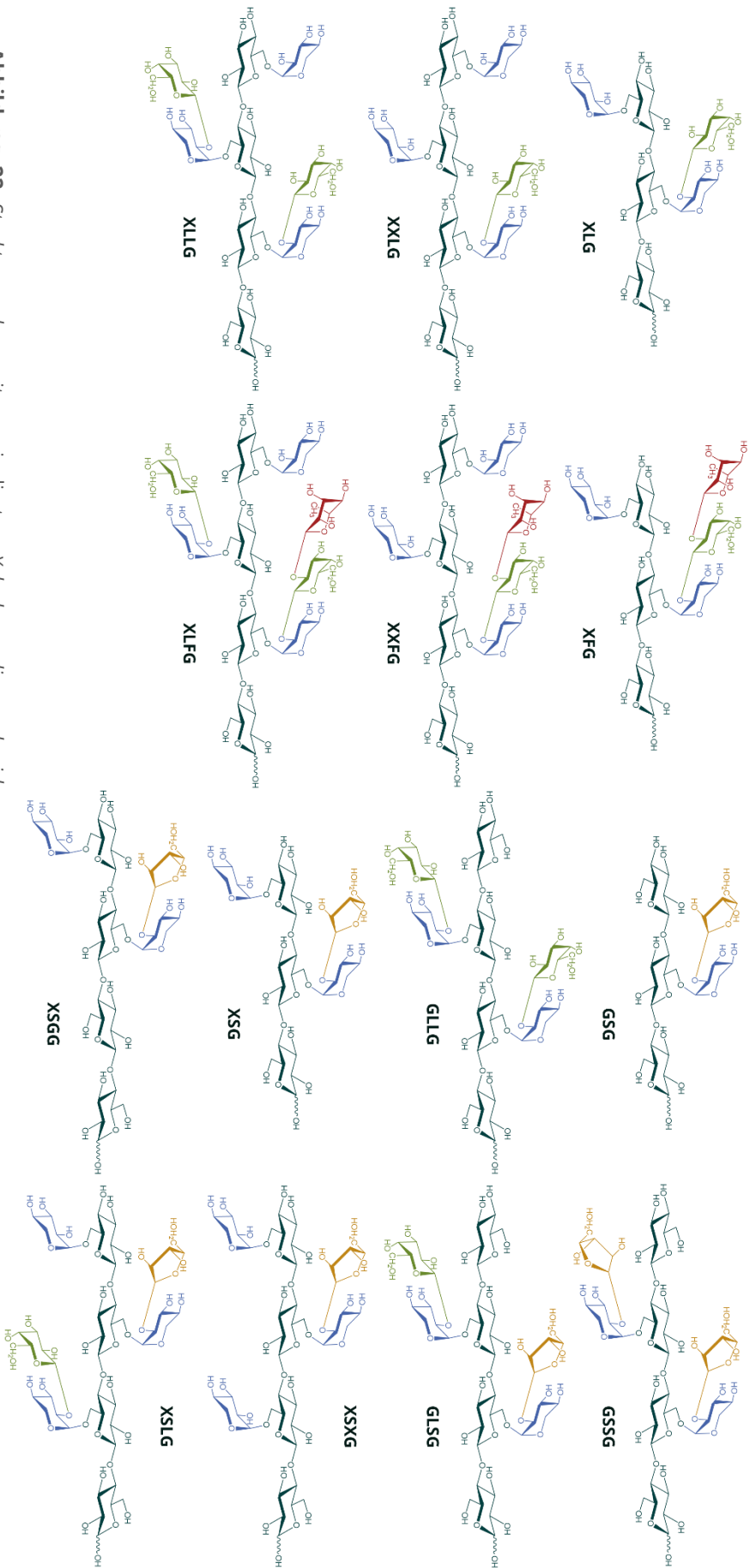
##### **I. Isolierung der Xyloglucanooligosaccharid-Standardsubstanzen**

Unter Anwendung der XEG und verschiedener chromatographischer Techniken wurden aus verschiedenen Quellen pflanzlichen Ursprungs XGO-Standardsubstanzen gewonnen (siehe 3cI). Während die Analyse des präparativen Ansatzes der Tamarindensamen-XyG zu verhältnismäßig wenigen Signalen im HPAEC-Chromatogramm führte, resultierte die chromatographische Trennung der enzymatisch hydrolysierten Hemicellulosen aus Cranberries in einem sehr komplexen Chromatogramm, bestehend aus dutzenden Signalen. Die Chromatogramme der übrigen Ausgangsmaterialien reihten sich zwischen diesen beiden Extremen ein. Dies lässt sich teilweise auf die Variabilität der XyG-Seitenketten zurückführen, da Tamarindensamen lediglich G, L und X als XyG-Bausteine aufweisen. Aus Solanaceen sind S-Motive bekannt, welche bereits in XGO der Cranberry bestätigt wurden (siehe 1cIII). Dementsprechend erforderte die Entwicklung der Methode die Isolierung und Reinigung möglichst vieler XGO aus den präparativen Ansätzen. Insgesamt konnten 19 XGO in ausreichender Menge als Standardsubstanzen isoliert werden. Einzelne XyG-assoziierte Oligosaccharide wurden ergänzend als Reinsubstanzen erworben, wodurch der Aufarbeitungsaufwand verringert und die strukturelle Aufklärung vereinfacht wurde. So konnten X, GG und GGG zwar ebenfalls aus den Ausgangsmaterialien gewonnen werden, jedoch nur in sehr geringem Umfang. Später erwies sich zudem GGGG in einer Probe als mögliches XGO. Aus diesen Gründen wurden diese vier Bausteine kommerziell erworben und

mit in die Liste bestimmbarer XGO aufgenommen. Anschließend wurden die möglichen Standardsubstanzen anhand ihrer Monosaccharidzusammensetzungen, ihrer  $m/z$ , ihrer Fragmentierungsmuster und anhand NMR-spektroskopischer Daten strukturell aufgeklärt. Die Vorgehensweise der Strukturaufklärung wird in den folgenden Abschnitten am Beispiel des XGO XLFG veranschaulicht. Gemeinsam mit den NMR-Daten der einzelnen Monosaccharide unterstützten die kommerziellen XGO-Standardsubstanzen die Strukturaufklärung. Die insgesamt 23 XGO-Standardsubstanzen sind in Abb. 21 und 22 dargestellt und in Tab. 11 nach ihrer Elutionsreihenfolge in der HPAEC aufgelistet. Zudem sind die  $m/z$  beobachteter Quasimoleküle, die beobachteten Fragmentationen und die ermittelte Monosaccharidzusammensetzung der Standardsubstanzen aufgeführt. Die  $m/z$  der Fragmentationen sind sowohl in Tab. 11 als auch in den folgenden Abschnitten zur Vereinfachung ohne Nachkommastellen angegeben. Die vollständigen MS- und NMR-Spektren bzw. -Daten sind im Anhang unter A10 - A75 einzusehen.



**Abbildung 21** Strukturen der vier erworbenen und der übrigen isolierten Xyloglucan oligosaccharid-Standardsubstanzen welche lediglich aus G- und X-Bausteinen bestehen. Die Nomenklatur entspricht den gängigen Richtlinien (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).



**Abbildung 22** Strukturen der weiteren isolierten Xyloglucanoligosaccharid-Standardsubstanzen mit zusätzlich L-, F- und S-Bausteinen. Die Nomenklatur entspricht den gängigen Richtlinien (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).



d. Entwicklung und Anwendung einer Profilingmethode für Xyloglucane aus pflanzlichen Lebensmitteln

**Tabelle 51** Auflistung der Xyloglucanoligosaccharide (XGO) mit den im Rahmen der Strukturaufklärung gesammelten Daten der Massenspektrometrie und Monosaccharidanalyse. Die Verbindungen X, GG, GGG und GGGG (offizielle Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015)) wurden kommerziell erworben und nicht der Monosaccharidanalyse unterworfen. Die mit \* markierten XGO wurden von Larissa Kaufhold im Rahmen ihrer Masterarbeit gewonnen (Kaufhold, 2019). Ara, Arabinose; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose;  $m/z$ , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis; Xyl, Xylose

XGO	$m/z$ [M+Li] <sup>+</sup>	$m/z$ [M+2·Li] <sup>2+</sup>	$m/z$ [M+Na] <sup>+</sup>	Charakteristische Fragmentionen	Monosaccharide [mol%]				
					Glc	Xyl	Gal	Fuc	Ara
X	319,1	/	335,0	169	/	/	/	/	/
GG	349,1	/	365,1	169	/	/	/	/	/
XG	481,4	/	497,4	349, 319, 169	64	36	-	-	-
GGG	511,4	/	527,4	/	/	/	/	/	/
XX	613,2	/	629,2	481, 349, 319	50	50	-	-	-
GGGG	673,5	/	689,6	/	/	/	/	/	/
XXG	775,3	391,3	791,3	643, 511, 349, 169	69	31	-	-	-
XXX	907,4	457,2	923,3	775, 643, 511, 349	47	43	3	-	5
XFG*	1083,4	545,4	1099,9	937, 805, 775, 643	51	25	12	12	-
XLG	937,4	472,2	953,3	775, 643, 511	45	37	17	-	2
XXXG	1069,4	538,2	1085,4	937, 805, 673, 511, 349	58	40	1	-	-
XXFG*	1378,6	709,5 <sup>a</sup>	1393,5	1232, 1099, 937, 805, 643	49	30	10	10	-
GLLG	1261,6	634,4	1277,5	1099, 967, 937, 805, 673, 643	53	22	20	-	6
GSG	775,4	391,3	791,4	643, 511, 331	62	18	-	-	19
XXLG	1231,5	619,3	1247,4	1099, 1069, 967, 937, 805, 673, 493	50	38	12	-	-
XLFG*	1539,6	781,5 <sup>a</sup>	1555,6	1394, 1232, 1099, 937, 805, 673	43	29	19	9	-
XLLG	1393,6	700,4	1409,5	1232, 1262, 1099, 1069, 967, 937, 805	43	35	22	-	-
XSG	907,5	457,2	923,5	775, 643, 511, 331	53	31	-	-	17
XSXG	1201,4	604,4	1217,4	1069, 937, 805, 673, 493, 331	47	39	1	-	13
GLSG	1231,5	619,4	1247,5	1099, 1069, 967, 937, 805, 613	51	25	12	-	13
XSGG	1069,5	538,3	1085,4	937, 805, 673, 493, 331	55	31	-	-	14
XSLG	1363,5	685,5	1379,5	1231, 1201, 1099, 1069, 967, 937, 805	46	34	10	-	10
GSSG	1201,5	604,4	1217,5	1069, 937, 805, 673	52	23	-	-	25

<sup>a</sup>  $m/z$  [M+Li+Na]<sup>2+</sup>

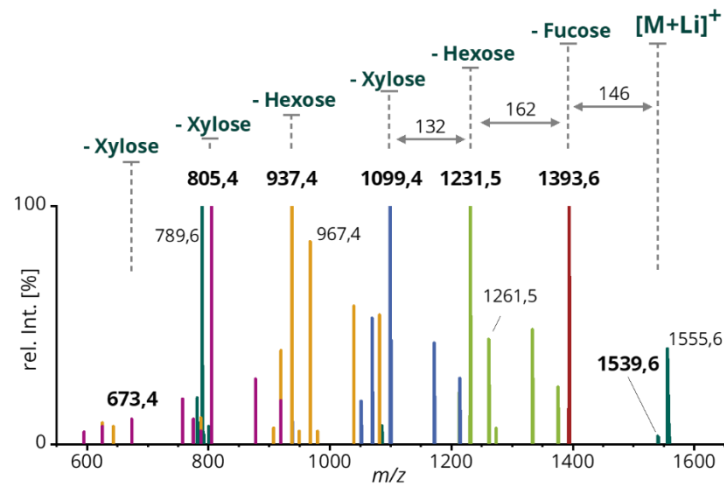
### II. Strukturaufklärung der Xyloglucanoligosaccharidstandardsubstanzen - Monosaccharidzusammensetzung

Bei ausreichender Reinheit, bestimmt mittels HPAEC-PAD, wurde die Monosaccharidzusammensetzung der XGO-Standardsubstanzen nach TFA-Hydrolyse ermittelt. So konnten am Beispiel von XLFG das Vorkommen von Glc, Xyl, Gal und Fuc nachgewiesen und ihre molaren Verhältnisse mit 4,6 : 3,1 : 2,1 : 1 bestimmt werden (vgl. Tab. 11). In vielen Fällen weisen die bestimmten Monosaccharidverhältnisse gewisse Abweichungen von den theoretischen Verhältnissen auf. Diese könnten auf geringe Verunreinigungen oder auf eine Unterbestimmung TFA-labiler Analyten zurückgeführt werden. York und Mitarbeiter bestimmten die Monosaccharidzusammensetzung von XLFG nach TFA-Hydrolyse und ermittelten ebenso ein eher unscharfes Verhältnis von 3,2 : 3,0 : 1,7 : 1 (York *et al.* (1990)). Die Autoren stellen dar, dass bei der Hydrolyse der Oligosaccharide stets ein Kompromiss aus der vollständigen Spaltung der  $\beta$ -Glc-Reste und des Abbaus der Xyl-Reste gefunden werden muss (York *et al.*, 1990). Nichtsdestotrotz ist die Identität der vorhandenen Monomere die ausschlaggebende Information, denn ihre Verhältnisse können spätestens in Kombination mit den MS- sowie NMR-Daten eindeutig abgeleitet werden.

### III. Strukturaufklärung der Xyloglucanoligosaccharidstandardsubstanzen - Massenspektrometrie

Trotz direkter Injektion der XGO-Standardsubstanzen in verdünnter LiCl-Lösung weisen viele MS-Spektren im Full-Scan-Modus sowohl die Quasimolekülonen der Li- als auch die der Na-Addukte auf. Zudem erscheinen ab einem  $m/z$  von ca. 700 verstärkt Quasimolekülonen aus Zweifachaddukten. So können bei XLFG im Full-Scan-Spektrum die  $m/z$  1540 ( $[M+Li]^+$ ) und 1556 ( $[M+Na]^+$ ) sowie 781 ( $[M+Li+Na]^{2+}$ ) und 789 ( $[M+2\cdot Na]^{2+}$ ) identifiziert werden (siehe Abb. 23 sowie Abb. A23). In Kombination mit den Erkenntnissen der Monosaccharidzusammensetzung ist nun gesichert, dass XLFG aus vier Glc-, drei Xyl-, zwei Gal- und einem Fuc-Baustein aufgebaut sein muss. Ausgehend von einem Quasimolekülion wurden anschließend gezielt Fragmentierungsreaktionen durchgeführt. Die entstehenden Tochterionen wurden detektiert und anschließend erneut gezielt fragmentiert. Diese stufenweise Dissoziation ist am Beispiel von XLFG in Abb. 23 dargestellt. Anhand der charakteristischen Massendifferenzen ( $\Delta(m/z)$ ) 132, 146 und 162 kann jeweils auf die Abspaltung einer Xyl-, der Fuc- oder einer Glc- bzw. Gal-Einheit (jeweils ohne die glykosidische Bindung) zurückgeschlossen werden. Die Dissoziation von Wasser ( $\Delta(m/z) = 18$ ) und charakteristische Cross-Ring-Fragmentierungen von Kohlenhydraten ( $\Delta(m/z) = 30$ ,  $\Delta(m/z) = 60$ ) sind ebenfalls häufig zu beobachten. Dementsprechend kann aus den Fragmentionen mit den  $m/z$  1394, 1232, 1099, 937, 805 und 673 abgeleitet werden, dass aus dem Oligosaccharid zunächst die Fuc-Einheit abgespalten wird. Anschließend werden wiederholt je eine Hexose und eine Xyl-Einheit abgespalten. Schließlich bleibt nach der Dissoziation der letzten Xyl-Einheit formal nur noch ein Oligosaccharid aus vier Hexosen übrig. Anhand der bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur bezüglich XyG und der eingesetzten XEG kann angenommen werden, dass es sich bei dem Fragment mit dem  $m/z$  673 um das Li-Addukt der Cellotetraose (GGGG) handelt. Die XGO-

Standardsubstanzen konnten vereinzelt bis auf drei bzw. zwei Monomereinheiten, entsprechend der Cellotriose ( $m/z$   $[M+Li]^+ = 511$ ) bzw. Cellobiose ( $m/z$   $[M+Li]^+ = 349$ ), fragmentiert werden. Je nach Anzahl und Aufbau der Seitenketten kann der Verlauf dieses Fragmentierungspfades parallel über ein oder mehrere alternative Abspaltungswege verlaufen. Am Beispiel von XLFG konnte der Pfad ebenfalls über die  $m/z$  1394, 1262, 1099, 967 und 805 oder ausgehend vom Na-Addukt nachverfolgt werden. Zur Aufklärung von XG-Strukturen mittels MS sind in der Literatur bereits zahlreiche Erkenntnisse gesammelt und Methoden entwickelt worden (York *et al.*, 1990; Lerouxel *et al.*, 2002; Bauer, 2012; Quéméner *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). Für die Zwecke dieser Arbeit genügen jedoch die Informationen zur Molekülmasse und Seitenkettenfragmentierung der XGO-Standardsubstanzen.



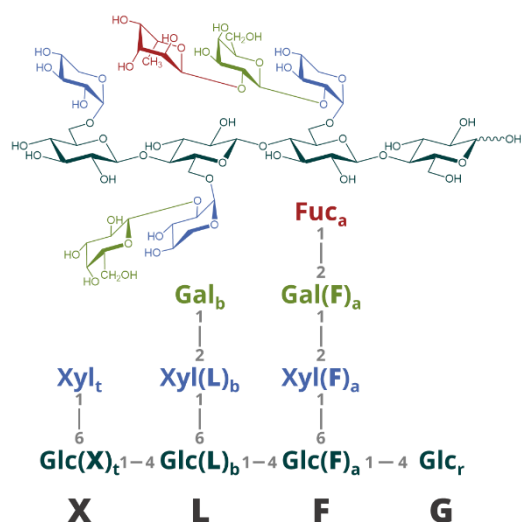
**Abbildung 23** Fragmentierungspfad des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XLFG, ausgehend vom Quasimolekülion mit dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) des Lithiumaddukts ( $[M+Li]^+ = 1539,6$ ). Die einzelnen Fragmentierungsstufen wurden in ein MS-Spektrum zusammengefügt. Die einzelnen Fragmentspektren sind im Anhang unter Abb. A23 einzusehen.

#### IV. Strukturaufklärung der Xyloglucanoligosaccharidstandardsubstanzen - NMR-Spektroskopie

Die Charakterisierung der aufgelisteten XGO-Standardsubstanzen wurde schließlich unter Anwendung diverser ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente vervollständigt (vgl. 3cIII). Alle entsprechenden  $^1H$ -NMR- sowie HSQC-Spektren sowie die zugehörigen Tabellen der zugeordneten Kreuzpeaks sind im Anhang aufgeführt (siehe Abb. A7 - A9 sowie A31 - A75). Mit den Erkenntnissen aus der Monosaccharid- und der MS-Analyse als Basis gelang die Zuordnung der Signale unter Zuhilfenahme von Vergleichsspektren der beteiligten Monosaccharide und der kommerziellen Standardsubstanzen (X, GG, GGG und GGGG). Bei den mit steigender Anzahl an Monomeren immer komplexeren Spektren, die stellenweise stark überlappende Signale aufweisen, dienen die Spektren der strukturell ähnlichen XGO geringerer Komplexität und die daraus abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten als Vorlage zur Entschlüsselung der komplexeren XGO. So vereinfachten beispielsweise die Spektren von X und GG die Aufklärung von XG und XX. Davon ausgehend konnten mithilfe von GGG und GGGG die Spektren von XXG und XXXG leichter erschlossen werden. Die deduzierten Strukturen

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

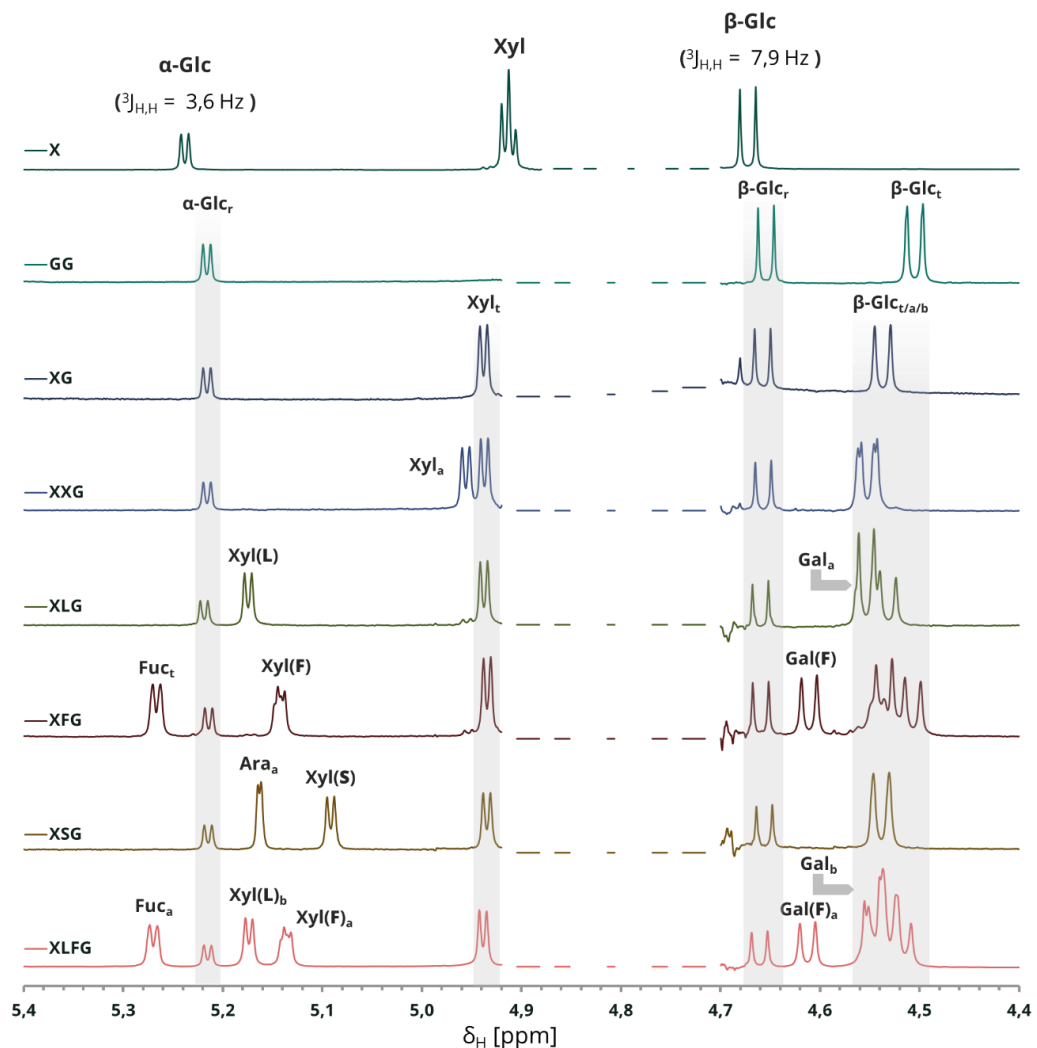
konnten zusätzlich mithilfe veröffentlichter NMR-Daten abgeglichen werden. So sind in der Literatur bereits zahlreiche diagnostische  $^1\text{H-NMR}$ -Signale von XGO beschrieben (Kiefer *et al.*, 1990; York *et al.*, 1990; York *et al.*, 1993; York *et al.*, 1996; Vierhuis *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2005). Hervorzuheben ist die Arbeit von York und Mitarbeitern, worin die chemischen Verschiebungen der anomeren Protonen der einzelnen Monosaccharide je nach XG-Baustein und Stellung im Oligosaccharid aufgelistet sind (York *et al.*, 1995). Die Daten dieser Studien wurden jedoch überwiegend anhand von reduzierten XGO erhoben und die berichteten chemischen Verschiebungen können abweichen. Dennoch lieferten die chemischen Verschiebungen, Abstände und Integralverhältnisse der veröffentlichten Signale wertvolle Hinweise zur Aufklärung der XGO-Strukturen. Darüber hinaus führen Tuomivaara und Mitarbeiter weitere NMR-Daten von zahlreichen nativen XGO auf (Tuomivaara *et al.*, 2015). Im Folgenden wird die Auswertung der NMR-Daten erneut am Beispiel von XLFG erläutert. Die Struktur und die Bezeichnung der Positionen im Molekül von XLFG sind in Abb. 24 dargestellt.



**Abbildung 24** Struktur (oben) und Bezeichnung der Bausteine und Positionen von XLFG, entsprechend der gängigen Nomenklatur (Fry *et al.*, 1993; Tuomivaara *et al.*, 2015). In grau sind die Positionen der glykosidischen Bindungen ohne Konfiguration angegeben. Die Positionen im Molekül werden im Subskript von rechts nach links, ausgehend vom reduzierenden Ende (r) bis zum terminalen Ende (t), alphabetisch beschriftet. Die Seitenketten werden in Klammern durch die offiziellen Kürzel der entsprechenden Xyloglucanbausteine angeführt. Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose

**IDENTITÄT UND KONFIGURATION DER MONOSACCHARIDBAUSTEINE.** Zunächst können anhand der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren die beteiligten Monosaccharide der XGO bestätigt werden (vgl. Abb. 25). Nach Integration der Signale der anomeren Protonen im Bereich von  $\delta_{\text{H}} = 4,40 - 5,40$  ppm können zusätzlich deren Integralverhältnisse zur Kontrolle der Monosaccharidanalyse bestimmt werden. Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden unter Anwendung der Karplus-Beziehung, zudem genutzt, um die Konfiguration der Monosaccharide im XGO zu bestimmen. Mit Ausnahme der Ara und Fuc kann anhand der Kopplungskonstanten von  $H-1$  mit  $H-2$  der Diederwinkel und daraus schließlich die  $\alpha/\beta$ -Konfiguration der Monosaccharide im XGO abgelesen werden (vgl. 3cIII). Am Beispiel von XLFG kann die  $\alpha$ -Konfiguration der Xyl-Einheiten aus ihren vicinalen Kopplungskonstanten ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) von 3,4 - 3,6 Hz abgeleitet werden (siehe Tab. A57). Die Gal-Einheit der F-Seitenkette weist eine  $^3J_{\text{H,H}}$  von 7,6 Hz auf und liegt folglich in  $\beta$ -Konfiguration vor. Die reduzierende Glc-Einheit liegt in einem Gleichgewicht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Konfiguration vor und erzeugt folglich ein Duplett bei  $\delta_{\text{H}} = 5,22$  ppm mit einer  $^3J_{\text{H,H}}$  von 3,6 Hz und ein weiteres Duplett bei  $\delta_{\text{H}} = 4,66$  ppm mit einer  $^3J_{\text{H,H}}$  von 7,9 Hz. Die unterschiedlichen Kopplungskonstanten der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Glc sind am Beispiel des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von X in

Abb. 25 aufgezeigt. Aufgrund der Furanoseform bzw. der axial Stellung des  $H-2$  kann die jeweilige Konfiguration von Ara $f$ - und Fuc-Einheiten nicht durch Anwendung der Karplus-Beziehung bestimmt werden. Die Kopplungskonstanten von  $\alpha$ -Fuc und  $\alpha$ -Ara können lediglich mit Literaturdaten verglichen werden. So berichteten Kiefer und Mitarbeiter für  $\alpha$ -Fuc in reduziertem XXFG eine  $^3J_{H,H}$  von 4,0 Hz und York und Mitarbeiter für  $\alpha$ -Ara in reduziertem XSG eine  $^3J_{H,H}$  von 1,8 Hz (Kiefer *et al.*, 1990; York *et al.*, 1996). Die anomeren Protonen der Fuc-Einheiten aus den isolierten Standardsubstanzen XFG, XXFG und XLFG weisen eine  $^3J_{H,H}$  von 3,8 Hz auf, während die der anomeren Protonen der Ara-Einheit aus den Ara-haltigen XGO 1,4 – 1,7 Hz beträgt (siehe Tab. A47, A53 und A57). Die lediglich geringen Differenzen zu den Literaturwerten werden als Bestätigung der  $\alpha$ -Konfiguration der beteiligten Fuc- bzw. Ara-Einheiten der XGO gewertet.



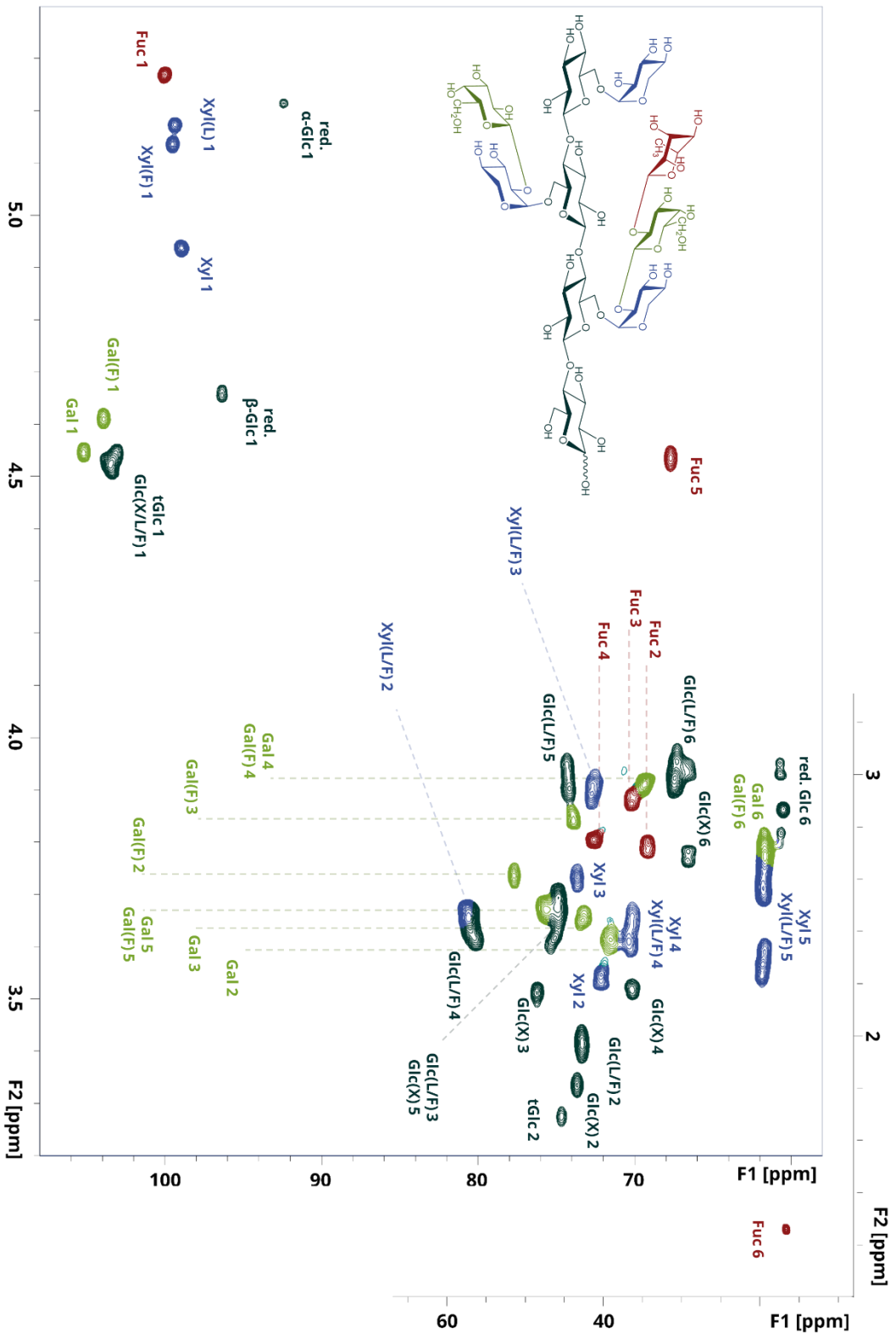
**Abbildung 25** Ausschnitte der  $^1H$ -NMR-Spektren der Xyloglucanligosaccharide (XGO) X, GG, XG, XXG, XLG, XFG, XSG und XLFG. Die Spektren wurden in  $D_2O$  mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals kalibriert ( $\delta_H = 2,22$  ppm). Der Ausschnitt zeigt den Bereich der Signale der anomeren Protonen. Die jeweiligen Abschnitte des Wassersignals sind retuschiert. Die vollständigen Spektren der XGO-Standardsubstanzen sind im Anhang unter Abb. A7 – A9 einzusehen. Die Nomenklatur entspricht den gängigen Richtlinien (Fry *et al.*, 1993; Tuomivaara *et al.*, 2015). Die Positionen im Molekül werden im Subskript von rechts nach links, ausgehend vom reduzierenden Ende (r) bis zum terminalen Ende (t), alphabetisch beschriftet. Die Seitenketten werden in Klammern durch die offiziellen Kürzel der entsprechenden Xyloglucanbausteine angeführt. Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose

**IDENTIFIZIERUNG DES TERMINALEN UND REDUZIERENDEN ENDES.** Das reduzierende Ende der XGO wird stets durch die Glc-Einheit im Rückgrat markiert, die aufgrund der Mutarotation als  $\alpha$ -Glc<sub>r</sub> und  $\beta$ -Glc<sub>r</sub> vorliegt. In nur seltenen Fällen trägt die reduzierende Glc-Einheit eine Xyl-Seitenkette (X, XX, XXX). Dies ist jedoch durch eine leichte Tieffeldverschiebung der Signale der anomeren Protonen gekennzeichnet. So beträgt die chemische Verschiebung des anomeren Protons der reduzierenden  $\alpha$ -Glc in X, XX und XXX zwischen 5,226 und 5,238 ppm, während die der entsprechenden Signale aller übrigen XGOs 5,213 – 5,219 ppm beträgt (siehe Tab. A39, A41 und A45). Die Identifizierung der terminalen Glc-Einheit ist dahingegen schwieriger. In den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von GGG und GGGG können die Signale der terminalen (Glc<sub>t</sub>,  $\delta_H = 4,50$  ppm) von denen der mittleren Glc-Einheit/en (Glc<sub>a/b</sub>,  $\delta_H = 4,52$  ppm) bei guter Auflösung noch differenziert werden (siehe Abb. A7). Bei den übrigen XGO indessen, überlappen diese beiden Signale aufgrund der Seitenkettensubstituenten häufig. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von XLFG sind beispielsweise im Bereich von  $\delta_H = 4,50 - 4,56$  ppm keine diagnostischen Signale differenzierbar (siehe Abb. 25). Laut Literatur spaltet das angewendete Enzym lediglich zwischen einer unsubstituierten und einer Xyl-substituierten Glc-Einheit (Yaoi *et al.*, 2005; Gloster *et al.*, 2007). Verlängerte Xyl-Seitenketten sind demnach am terminalen Ende nicht zu erwarten. Bei genauer Betrachtung der Protonenspektren von XG, XXG und XXXG wird deutlich, dass bei ausreichender Auflösung eine Xyl-Einheit am terminalen Ende des Oligosaccharidrückgrats (Xyl<sub>t</sub>,  $\delta_H = 4,94$  ppm) von unsubstituierten Xyl-Einheiten an den übrigen Positionen (Xyl<sub>a/b</sub>,  $\delta_H = 4,96$  ppm) unterschieden werden kann (vgl. Abb. 25; York *et al.*, 1990). Im Umkehrschluss spricht die Abwesenheit von Signalen mit entsprechender  $\delta_H$  für unsubstituierte Glc-Reste am terminalen Ende. Anhand dieses Zusammenhangs konnten die unsubstituierten Glc-Einheiten an dem nicht-reduzierenden Ende des Rückgrats von GSG, GSSG, GLSG und GLLG bestätigt werden. Im Fall von XLFG deutet das Signal bei  $\delta_H = 4,939$  ppm auf einen X-Baustein am terminalen Ende hin (siehe Abb. 25).

**ZUORDNUNG UND PLATZIERUNG DER SEITENKETTENSUBSTITUENTEN.** Auch die Verknüpfung mit weiteren Substituenten (Gal, Ara, Fuc-Gal) kann anhand der Protonenspektren nachverfolgt werden. So sind, unter Einbeziehung der Monosaccharid- bzw. MS-Daten homologe Strukturen wie XXG, XLG, XFG und XSG gut vergleichbar und bei Betrachtung ihrer <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zeichnen sich charakteristische Muster ab (siehe Abb. 25). Die zusätzlichen Fuc- oder Ara-Einheiten lassen sich anhand von isolierten anomeren Protonensignalen bei  $\delta_H = 5,2666$  ppm bzw. 5,1633 ppm identifizieren, während das Signal des anomeren Protons der unsubstituierten Gal-Einheit (Gal<sub>a</sub>) mit denen der nicht-reduzierenden Glc-Einheiten ( $\beta$ -Glc<sub>t/a/b</sub>) zusammenfällt ( $\delta_H = 4,50 - 4,56$  ppm). Die Fuc-Einheit in XFG hebt sich zudem durch das markante Protonensignal der Methylgruppe (C-6) bei  $\delta_H = 1,25$  ppm ab (siehe Abb. 26). Die Substitution der Xyl-Seitenkette an Position O-2 wirkt sich nur geringfügig auf die chemische Verschiebung des anomeren Protons der Glc-Einheit im Rückgrat aus. Jedoch führt die Verlängerung der Xyl-Seitenkette zu einer deutlichen Tieffeldverschiebung ihres anomeren Protonensignals (Xyl<sub>a</sub>,  $\delta_H = 4,96$  ppm). So weist das entsprechende anomere Proton der Xyl-Einheit im L-Baustein (Xyl(L)) eine chemische Verschiebung von 5,175 ppm, im F-Baustein (Xyl(F)) von 5,1414 ppm und im S-Baustein (Xyl(S)) von 5,092 ppm auf. Gleichermaßen führt die Fucosylierung der Gal-Einheit an Position O-2 zur Tieffeldverschiebung ihres anomeren

Protonensignals von ca.  $\delta_H = 4,55$  ppm nach  $\delta_H = 4,611$  ppm (Gal(F)). Auf Grundlage dieser Zusammenhänge kann beispielsweise für XLFG nachgewiesen werden, dass zwischen der unsubstituierten Glc-Einheit am reduzierenden Ende und dem X-Baustein am terminalen Ende jeweils ein L- und ein F-Baustein vorkommen müssen. Ab einer Kettenlänge von vier Glc-Einheiten im Rückgrat stellt die eindeutige Zuordnung der Bausteine zu den beiden mittleren Positionen im XGO eine Herausforderung dar. So konnte die Platzierung der Bausteine L, F und S in zahlreichen XGO erst durch Erkenntnisse aus Literaturdaten bestätigt werden. Ausschlaggebend sind hier die geringfügig veränderten chemischen Verschiebungen der freien und substituierten Xyl-Einheiten je nach Stellung im Oligosaccharid. So konnte im Vergleich mit den NMR-Daten von Toumivaara und Mitarbeiter bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten XGO-Standardsubstanz um XXLG handelt und nicht um XLXG (Tuomivaara *et al.*, 2015). Die chemischen Verschiebungen und Abstände von  $Xyl_{a/b}$  und  $Xyl(L)_{a/b}$  zu  $Xyl_t$  weisen je nach Position des L-Bausteins im Molekül feine Unterschiede auf. Gleichermäßen konnten so die Konstitutionen von XXFG und XLFG bestätigt werden. Unter Einbeziehung weiterer Erkenntnisse aus der Literatur wurden ebenso die Strukturen von XSXG, XSLG und GLSG aufgeklärt (York *et al.*, 1996; Vierhuis *et al.*, 2001). Vierhuis und Mitarbeiter untersuchten beispielsweise die reduzierte Form der Konstitutionsisomere XLXG und XXSG. Auch hier konnten anhand der chemischen Verschiebungen und der Abstände der Xyl-Einheiten die Positionen der S- bzw. L-Bausteine abgeleitet werden.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



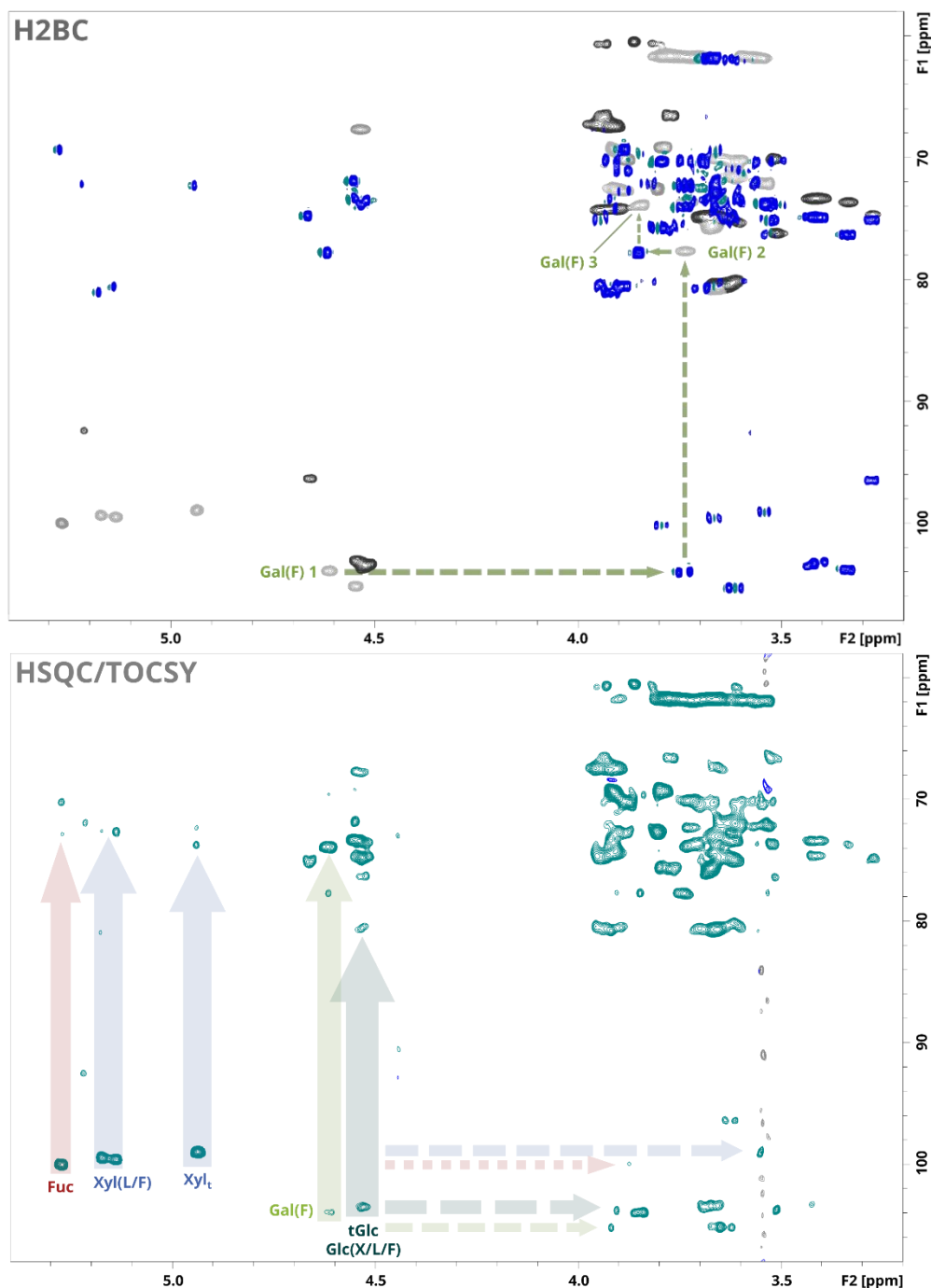
**Abbildung 26** HSQC-Spektrum von XLFG, aufgenommen in D<sub>2</sub>O mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals ( $\delta_{H/C} = 2,22/30,89$  ppm). Der Ausschnitt rechts oben zeigt das Kreuzsignal der Position C/H-6 der Fuc-Einheit. Die Kürzel der Bausteine, die Bezeichnung der Positionen und das Farbschema entsprechen denen aus Abb. 24 & 25.



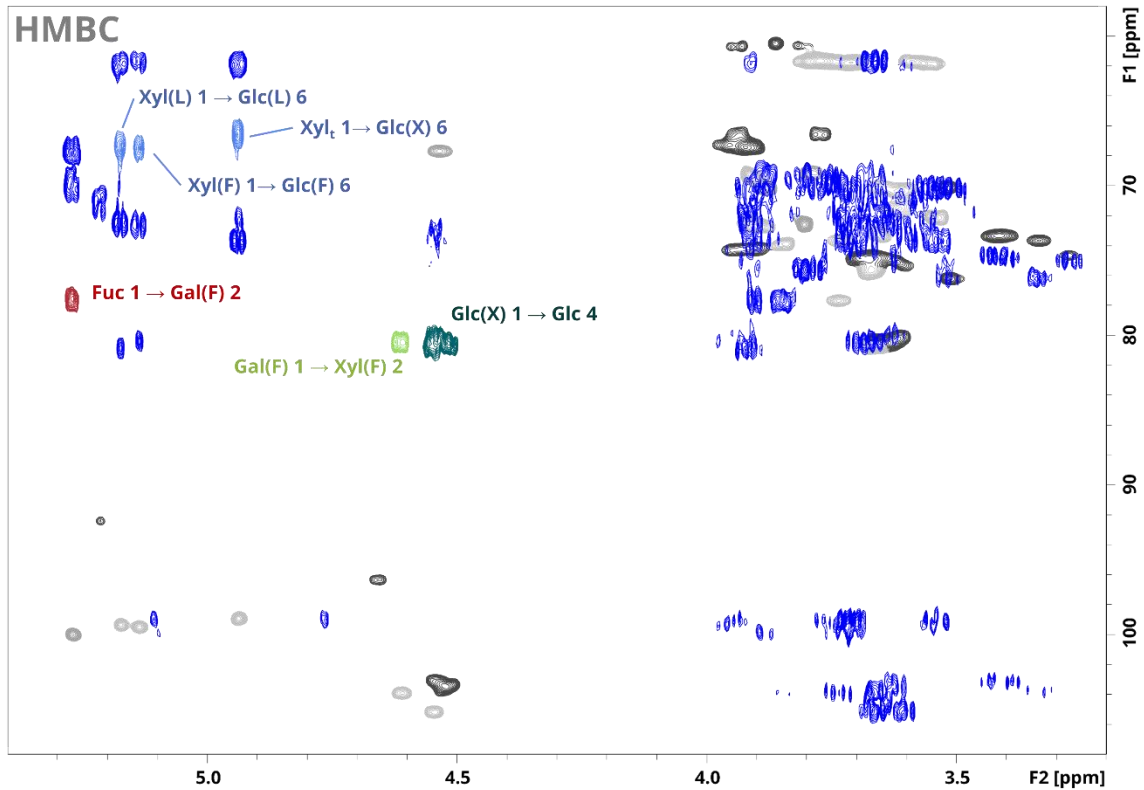
**ERKENNTNISSE AUS 2D-NMR-EXPERIMENTEN.** Die XGO können bereits anhand ihrer  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren weitestgehend strukturell charakterisiert werden. Der Aufklärungsprozess wird jedoch durch 2D-NMR-Experimente deutlich erleichtert, und die daraus resultierenden Erkenntnisse helfen die deduzierten Strukturen zu bestätigen. So wird durch die Erweiterung in die  $^{13}\text{C}$ -Dimension die Auflösung verbessert, und Signale die im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum überlagern, können ausgewertet werden. Darüber hinaus können Nachbarschaftsbeziehungen und Bindungen abgeleitet werden. Nach Auswertung der HSQC/TOCSY-, HMBC- und H2BC-Spektren können alle  $C/H$ -Kreuzsignale in den  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren der isolierten XGO den jeweiligen Positionen in den Monosacchariden zugeordnet werden (siehe Abb. 26 und 27). Das HSQC-Spektrum von XLFG ermöglicht beispielsweise die Aufklärung der überlagerten Signale im Bereich der anomeren Protonen der nicht reduzierenden Glc-Einheiten ( $\delta_{\text{H}} = 4,50 - 4,55$  ppm, vgl. Abb. 25 und 26). In der  $^1\text{H}$ -Dimension befinden sich in diesem Bereich zusätzlich das anomere Kreuzsignal der unsubstituierten Gal-Einheit des L-Bausteins ( $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 4,54/105,19$  ppm) und das Kreuzsignal der Position  $C/H-5$  der Fuc-Einheit bei  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 4,54/67,68$  ppm. Im HSQC-Spektrum können zudem die Veränderungen der chemischen Verschiebungen der an den glykosidischen Bindungen beteiligten Positionen ( $C/H-2, -4$  bzw.  $-6$ ) beobachtet werden. Im Vergleich der Spektren von GG und XG wird beispielsweise die Verlagerung der  $C/H-6$  Kreuzsignale in der F1-Dimension von  $\delta_{\text{C}} = 60,60$  nach  $\delta_{\text{C}} = 66,5$  ppm deutlich. Durch die Xylosylierung der terminalen Glc-Einheit an C-6 in XG erfährt das entsprechende Signal an Position  $C/H-4$  eine Tieffeldverschiebung in der F2-Dimension von 3,41 nach 3,51 ppm. Vergleichbares kann anhand des Signals der Position  $C/H-4$  ( $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 3,72/80,14$  ppm) der reduzierenden Glc bei XX beobachtet werden. Die Erweiterung der Xyl-Seitenkette über die Position C-2 hat ebenfalls einen markanten Einfluss auf die chemische Verschiebung des entsprechenden Kreuzpeaks. Bei der unsubstituierten X-Seitenkette von XLFG befindet sich das entsprechende Signal bei  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 3,54/72,07$  ppm. In den Bausteinen L oder F von XLFG befindet sich das Signal des  $C/H-2$  der Xyl-Einheit bei  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 3,66/80,68$  ppm (siehe Abb. 26). Durch die Verknüpfung mit Ara in XSG befinden sich das Kreuzsignal bei  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 3,57/79,46$  ppm. Die S-Seitenkette zeichnet sich zudem durch gut isolierte Kreuzsignale der Kopplungen  $C/H-2, -3$  und  $-4$  der terminalen Ara-Einheit aus (siehe A65 und A66). Ihre chemischen Verschiebungen betragen  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 4,19/81,79$  ppm,  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 3,93/77,04$  ppm und  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 4,08/84,37$  ppm. Die Protonensignale von  $C/H-2$  und  $-4$  sind bereits im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum gut isoliert und einzeln auszumachen (siehe Abb. A9). Die Aufklärung der Molekülstruktur von XSGG gelang ebenfalls erst durch Erkenntnisse aus HSQC-Daten. So konnte im Vergleich mit den Spektren von GGG und GGGG das Kreuzsignal  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 3,64/79,27$  ppm der Position  $C/H-4$  einer reduzierenden Glc-Einheit, welche mit einer ebenfalls unsubstituierten Glc-Einheit verknüpft ist, zugeordnet werden. Schließlich können anhand der HMBC-Spektren die Positionen der glykosidischen Bindungen in den XGO bestätigt werden. So weist das HMBC-Spektrum von XLFG bei  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 4,54/80,50$  ppm das intensive Kreuzsignal der (1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Glc-Einheiten im Rückgrat auf (siehe Abb. 28). Die Verzweigungen des Rückgrats über die (1 $\rightarrow$ 6)-glykosidische Bindung mit den verschiedenen Xyl-Einheiten, wird durch die Kreuzsignale bei  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 4,94/66,65$  ppm (Xyl<sub>t</sub> an Glc<sub>t</sub>),  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 5,14/67,51$  ppm (Xyl(F)<sub>a</sub> an Glc<sub>a</sub>) und  $\delta_{\text{H}/\text{C}} = 5,17/67,45$  ppm (Xyl(L)<sub>b</sub> an Glc<sub>b</sub>) angezeigt.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Während sich das der (1→2)-Verknüpfung zwischen der terminalen Gal-Einheit und der Xyl<sub>b</sub>-Einheit entsprechende Kreuzsignal mit dem Kreuzsignal des Rückgrats überlagert, kann die entsprechende Verknüpfung zwischen der substituierten Gal-Einheit (Gal(F)<sub>a</sub>) anhand des Kreuzsignals bei  $\delta_{H/C} = 4,62/80,46$  ppm identifiziert werden. Abschließend bestätigt das Kreuzsignal bei  $\delta_{H/C} = 5,27/77,56$  ppm die (1→2)-Verknüpfung zwischen der Fuc-Einheit und der Gal(F)<sub>a</sub>.



**Abbildung 27** Das H2BC- (oben) bzw. das HSQC/TOCSY-Spektrum (unten) von XLFG, aufgenommen in D<sub>2</sub>O mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals ( $\delta_{H/C} = 2,22/30,89$  ppm). Im H2BC-Spektrum ist zusätzlich in grau das HSQC-Spektrum hinterlegt. Die Pfeile deuten einen möglichen Pfad der korrelierenden Kreuzpeaks an, der zur Zuordnung der Positionen in den Monosacchariden genutzt wurde. Die Kürzel der Bausteine, die Bezeichnung der Positionen und das Farbschema entsprechen denen in Abb. 24 & 25.



**Abbildung 28** Das HMBC-Spektrum von XLFG, aufgenommen in  $D_2O$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals ( $\delta_{HC} = 2,22/30,89$  ppm). In grau ist zusätzlich das HSQC-Spektrum hinterlegt. Die markierten Signale entsprechen den korrelierenden Kreuzpeaks der jeweiligen glykosidischen Bindungen zwischen den Monosacchariden. Die Kürzel der Bausteine, die Bezeichnung der Positionen und das Farbschema entsprechend den Abb. 24 & 25.

## V. Bestimmung der relativen Responsefaktoren in der HPAEC-PAD

Im Anschluss an die Strukturaufklärung wurde mittels  $^1H$ -NMR-Spektroskopie die Konzentration der XGO-Standardsubstanzen bestimmt (vgl. 3cIV). Die Quantifizierung erfolgte relativ zum internen Standard Acetanilid unter Beachtung eines ausreichenden Relaxationsdelays. Diese Herangehensweise ermöglichte eine präzise Quantifizierung der geringen Standardmengen. Als Referenzsignal zur Methylgruppe des Acetanilids (drei Protonen mit  $\delta_H = 2,17$  ppm) wurde nach Möglichkeit ein isoliertes Signal, resultierend aus einer bekannten Anzahl an Protonen, ausgewählt. Bei den meisten Standardsubstanzen wurde dafür das Signal des anomeren Protons der unsubstituierten Xyl-Einheiten integriert ( $\delta_H = 4,94$  ppm). Für die XGO GSG, GSSG und GLSG wurde alternativ das anomere Signal der Ara-substituierten Xyl-Einheit ( $\delta_H = 5,09$  ppm) ausgewählt. Im Fall von XLSG wurde das überlagerte Signal der anomeren Protonen der Gal-Einheit und der nicht-reduzierenden Glc-Einheiten integriert ( $\delta_H = 4,54$  ppm).

Aus den Standardlösungen wurden für jedes XGO eine Stammlösung und eine Kalibrierreihe mit Isomaltotriose als internem Standard hergestellt. Die fünf (vier) äquidistanten Kalibrierpunkte im Messbereich von 0,1- 28  $\mu M$  (21  $\mu M$  bei XXX und XLLG) wurden je dreifach in die HPAEC-PAD injiziert. Auf Grundlage der Erkenntnisse des Isolierungsprozesses wurden geeignete Gradienten zur Trennung der XGO-Gemische

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

entwickelt. Die Gradienten und alle weiteren chromatographischen Bedingungen der HPAEC-PAD sind unter 8i beschrieben. Der Quotient aus den Retentionszeiten des internen Standards (ca. 10,3 min) zum entsprechenden XGO entspricht der RRT des jeweiligen Analyten. Anhand der Flächenverhältnisse von internem Standard zum XGO konnten für jede Standardsubstanz der RRF zu Isomaltotriose in der HPAEC-PAD bestimmt werden. Die RRF entsprechen der Steigung der Regressionsgeraden aus den gegeneinander aufgetragenen Produkten der Flächen und Konzentrationen von XGO und Standard (siehe 3cIV). Die Regressionsgeraden der XGO-Standardsubstanzen wiesen eine Pearson-Korrelation zwischen 0,990 und 0,999 auf. Zur Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen („*Limit of Detection/Quantification*“, LOD bzw. LOQ) wurden die Stammlösungen soweit verdünnt, bis die Signalhöhen der Analyten dem dreifachen bzw. zehnfachen des Signal-Rauschverhältnisses entsprachen. Zur Überprüfung der Robustheit der RRF wurde der RRF von XXFG an einer weiteren HPAEC-PAD-Anlage erneut bestimmt. Mit einer Abweichung von 6,5 % (berechnet als Range-Halbe aus dem Mittelwert) werden die ermittelten RRF der Standardsubstanzen als ausreichend robust bewertet. In Tab. 12 sind die ermittelten RRT, RRF, der Konzentrationsbereich und die LOD bzw. LOQ der XGO-Standardsubstanzen aufgelistet.

#### d. Entwicklung und Anwendung einer Profilingmethode für Xyloglucane aus pflanzlichen Lebensmitteln

**Tabelle 62** Auflistung der Xyloglucan oligosaccharide (XGO) mit ihren relativen Retentionszeiten (RRT), ihren relativen Responsefaktoren (RRF), ihren Molekülmassen, den Messdaten zur Detektion mittels HPAEC-PAD/MS, dem Konzentrationsbereich, Nachweisgrenze (LOD), Bestimmungsgrenze (LOQ) und der zugeordneten Standardmischung. Die Nomenklatur der XGO entspricht den Literaturvorgaben (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). Die RRT wurden in Relation zu Isomaltotriose (ca. 10,3 min) bestimmt. HPAEC-PAD/MS; Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit paralleler gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion;  $m/z$ , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

XGO	RRT	RRF	Molekül -massen [g/mol]	$m/z$ HPAEC- PAD/MS	Quasi- molekülon	Konzentrations -bereich [µM]	LOD [µM]	LOQ [µM]	XGO- Mischung
X	0,636	1,371	312,3	319,2	[M+Li] <sup>+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
GG	0,868	1,599	342,3	349,2	[M+Li] <sup>+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
XG	1,576	0,738	474,4	481,4	[M+Li] <sup>+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
GGG	1,767	1,070	504,4	511,4	[M+Li] <sup>+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
XX	1,871	0,639	606,5	613,5	[M+Li] <sup>+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
GGGG	2,520	0,952	666,6	673,5	[M+Li] <sup>+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
XXG	2,621	0,498	768,7	391,3	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	Basis
XXX	2,657	0,551	900,8	457,3	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 21	0,050	0,100	Basis
XFG	2,939	0,535	1076,9	545,4	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	F-Mix
XLG	3,136	0,670	930,8	472,3	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	Basis
XXXG	3,529	0,816	1062,9	538,4	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	Basis
XXFG	3,913	0,843	1371,2	692,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	F-Mix
GLLG	3,934	0,732	1255,1	634,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	G-Mix
GSG	4,234	1,170	768,7	391,3	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,100	G-Mix
XXLG	4,312	0,896	1225,1	619,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	Basis
XLFG	4,426	0,736	1533,3	773,6	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	F-Mix
XLLG	4,817	1,571	1387,2	700,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 21	0,050	0,100	Basis
XSG	5,227	0,964	900,8	457,3	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	S-Mix
XSXG	6,314	1,367	1195,0	604,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	S-Mix
GLSG	6,329	1,605	1225,1	619,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,100	G-Mix
XSGG	6,380	0,594	1062,9	538,4	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	S-Mix
XSLG	6,564	1,747	1357,2	685,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,025	0,050	S-Mix
GSSG	7,745	1,101	1195,0	604,5	[M+2·Li] <sup>2+</sup>	0,1 - 28	0,050	0,100	G-Mix

### VI. Optimierung und Evaluation der XG-Profilierungsmethode

Unter Einsatz der RRF können die Konzentrationen bzw. die relative Zusammensetzung enzymatisch freigesetzter XGO aus dikotylen Lebensmittelpflanzen bestimmt werden. Im Rahmen ihrer Masterarbeit erprobte Larissa Kaufhold die Anwendbarkeit einer frühen Version einer XyG-Profilierungsmethode mittels HPAEC-PAD an ausgewählten Früchten mit noch unbekannter XyG-Struktur (Kaufhold, 2019). Die Etablierung der RRF macht die Analyse der XGO robuster gegenüber Schwankungen in der Eluentenzusammensetzung und der, damit einhergehenden veränderlichen Detektorresponse. Folglich erübrigt sich die Messung einer Kalibrierreihe zu jedem Eluentenwechsel. Somit ist die Injektion der raren Standardsubstanzen zukünftig einzig zur Zuordnung bzw. Bestätigung mutmaßlicher XGO-Signale in der HPAEC-PAD erforderlich. Larissa Kaufhold konnte auf diese Weise die XGO-Strukturen der Mango, Orange und Litschi abbilden und nachweisen, dass deren XyG fucosyliert sind, und im Substitutionsmuster XXXG vorliegen (Kaufhold, 2019). Durch die anschließende Erweiterung der Profilingmethode um weitere Standardsubstanzen konnten die Proben der analytischen Inkubationsansätze von Larissa Kaufhold reevaluiert werden. Die überarbeiteten Daten der UBS der Mango und Orange sowie die XGO-Zusammensetzung von UBS aus weiteren Testproben sind im Anhang unter Tab. A1 einsehbar.

In Anbetracht der bisher bekannten XyG-Strukturen dikotyler Lebensmittelpflanzen lassen sich aus den vorhandenen XGO angepasste Standardmischungen erstellen (vgl. 1cIII). So weisen manche XyG-Quellen lediglich die Bausteine G, X und L sowie einem DS von ca. 75 % (Substitutionsmuster XXXG) auf. Demnach genügt für solche Proben eine Basismischung aus X, GG, XG, GGG, XX, GGGG, XXG, XXX, XLG, XXXG, XXLG und XLLG (siehe Tab. 12). Fucosylierte XyG sind im Pflanzenreich weit verbreitet, demnach bietet sich, ergänzend zu den Basis-XGO, eine Mischung der Oligosaccharide XFG, XXFG und XLFG an (F-Mix). Ara-haltige XyG-Strukturen mit dem Substitutionsmuster XXGG wurden bisher nur in wenigen Pflanzenfamilien nachgewiesen und liegen üblicherweise unfucosyliert vor. Von den verbleibenden XGO-Standardsubstanzen neigen jedoch XSXG, GLSG und XSGG zur Koelution. Folglich werden die übrigen Standardsubstanzen in zwei ergänzenden Mischungen zusammengefasst. Eine Mischung beinhaltet die XGO mit einem X-Baustein am terminalen Ende (S-Mix: XSG, XSXG, XSGG, XSLG) und die andere Mischung enthält die XGO mit einer unsubstituierten Glc-Einheit am terminalen Ende (G-Mix: GLLG, GSG, GLSG, GSSG). Die Kopplung der HPAEC-PAD mit einer anschließenden MS-Detektion stellt eine noch effizientere Analysemethode für XGO dar. Die Detektion der XGO als positive Li-Addukte kann eine Injektion der Standardmischungen vollständig erübrigen. Die Zuordnung freigesetzter XGO aus analytischen Inkubationsansätzen kann demnach einzig anhand ihrer  $m/z$  und RRT erfolgen. Zudem erlaubt diese Kopplung etwaige Koelutionen und Signale unbekannter XGO besser einzuschätzen. In Tab. 12 sind die  $m/z$  und die Identität der ausgenutzten Quasimoleküle der XGO-Standardsubstanzen aufgelistet.

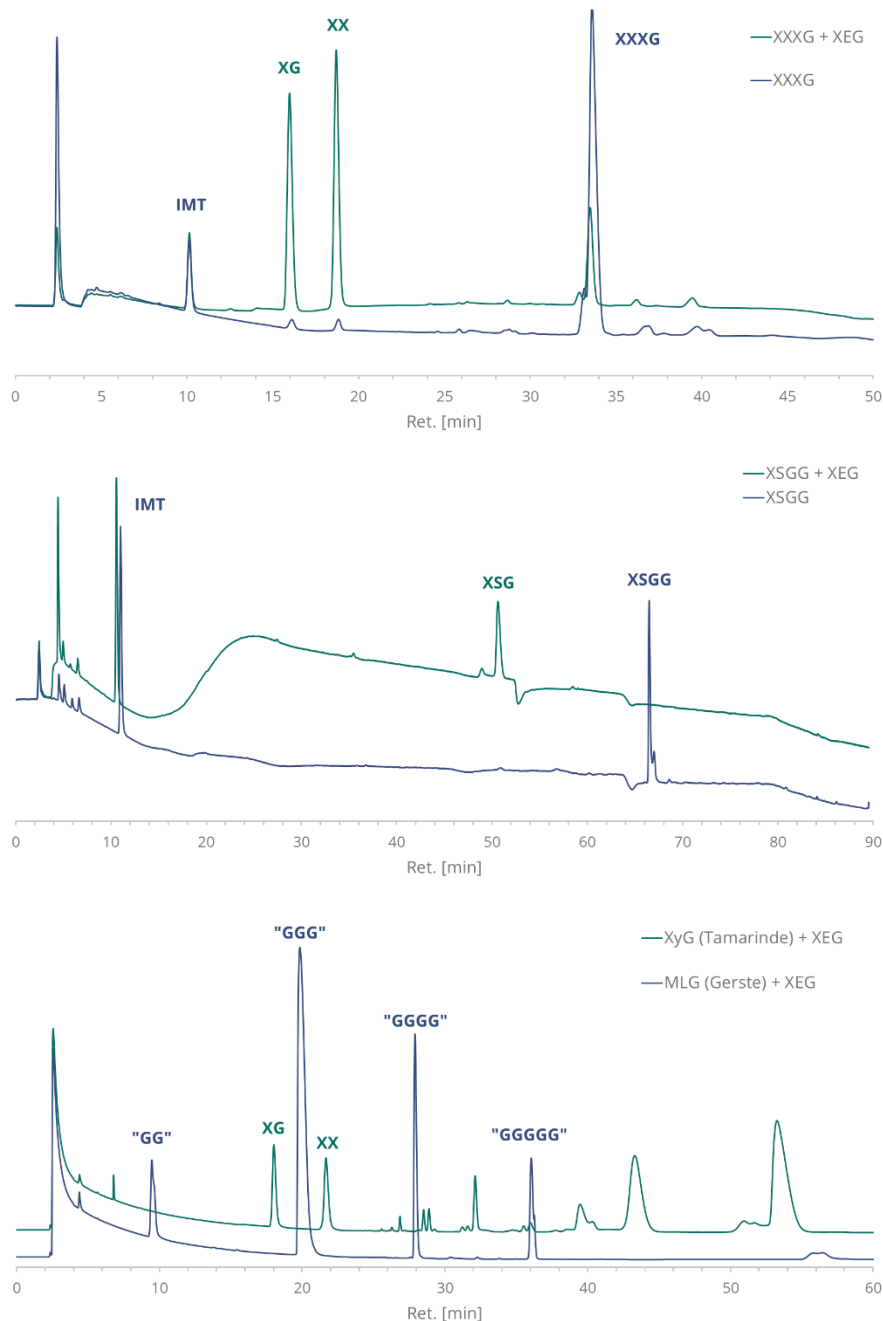
Die praktische Erprobung lieferte hilfreiche Hinweise und daraus abgeleitete Maßnahmen zur zielgerechten Anwendung der Profilingmethode. So weisen viele Chromatogramme der enzymatisch abgebauten Ballaststoffpräparate im Bereich von 0 - 10 min, zusätzlich zu den

freigesetzten XGO, zahlreiche weitere intensive Signale von Mono- und Disacchariden auf (vgl. Abb. 33). Chromatogramme von LBS-Fractionen zeigen in manchen Fällen in den mitgeführten Kontrollen ohne Enzymzugabe (demnach ohne freigesetzte XGO) auch zu späteren Retentionszeiten Signale von vermutlich freien Oligosacchariden. Diese können bei der Zuordnung und Integration der Signale von XGO stören. Bei UBS-Proben waren solche Störpeaks allgemein weniger vorhanden. Diese Umstände verdeutlichen die Wichtigkeit der Mitführung von enzymfreien Kontrollproben. Darüber hinaus empfiehlt es sich bei der Anwendung der Profilingmethode auf eine gründliche und einheitliche Aufarbeitung (beispielsweise bei den Waschschritten) des Ausgangsmaterials zu achten. So wiesen die Chromatogramme von extrahierten und dialysierten Ausgangsmaterialien zur Generierung von XGO deutlich weniger Störsignale in der HPAEC-PAD auf. Üblicherweise werden LBS mittels Präzipitation aus Pufferlösungen gewonnen und erhalten erfahrungsgemäß höhere Salzgehalte und unter Umständen auch niedermolekulare Oligosaccharide. Demnach ist die Anwendbarkeit der Profilingmethode für LBS-Fractionen für jedes Probenmaterial im Voraus zu testen. Die eindeutige Identifizierung und akkurate Integration der niedermolekularen XGO X und GG ist dennoch häufig aufgrund der Störsignale von Mono- und Disacchariden nicht möglich.

Auffällig nach Inkubation verschiedener Ausgangsmaterialien mit XEG ist das beachtliche Vorkommen der niedermolekularen XGO XG und XX. Laut Literatur liefert der Verdau von Tamarindensamen-XyG mit XEG lediglich die XGO XXXG, XLXG, XXLG und XLLG (York *et al.*, 1993; Yaoi *et al.*, 2005; Gloster *et al.*, 2007). Anhand von Vorversuchen des Inkubationsverlaufs von Tamarinden-XyG mit der XEG, konnte jedoch beobachtet werden, dass die Integrale der Signale von XG und XX über eine Inkubationszeit von 0,25 – 24 h zunahm, während das XXXG entsprechende Integral abnahm. Anhand von Inkubationsversuchen mit isoliertem XXXG konnte anschließend mittels HPAEC-PAD/MS bestätigt werden, dass die XEG das Substrat in XX und XG aufspaltet (siehe Abb. 29). Diese XGO sind folglich nicht nativ aus den Zellwänden freigesetzt, sondern Produkte einer Nebenaktivität der XEG. Das Vorkommen des XGO XXX ist ebenfalls unüblich, konnte jedoch nicht auf einen Präkursor zurückgeführt werden. Im Laufe der Arbeit konnte ebenso gezeigt werden, dass die XEG XSGG zu XSG abbaut (siehe Abb. 29). Bei den XGO XXLG, XXFG und XSXG zeigte das Enzympräparat keine entsprechende Aktivität. Vergleichbare Aktivitäten wurden bereits an anderen XyG-aktiven Enzympräparaten nachgewiesen. So berichten Fry und Mitarbeiter von einer  $\beta$ -Glucosidase aus *Aspergillus oryzae* die XXXG in XXX und G aufspaltet (Fry, 1989). Weitere spezifische Xyloglucanasen aus der Enzymfamilie GH74 spalten XXXG gleichermaßen zu XX und XG, jedoch auch XXLG in XX und LG (Tuomivaara *et al.*, 2015). Für die im Rahmen dieser Arbeit angewendete rekombinante, spezifische XEG der Enzymfamilie GH5 aus *Paenibacillus* sp. ist die hier beobachtete Aktivität bisher nicht beschrieben worden. Ein später erworbenes identisches XEG-Präparat mit einer anderen Losnummer lieferte in analytischen Inkubationsansätzen identische Chromatogramme. Insofern ist eine Verunreinigung des Präparats als Ursprung der Nebenaktivitäten unwahrscheinlich. In Vorversuchen zur Überprüfung der Substratspezifität der XEG auf unterschiedliche Polysaccharide wurde zudem festgestellt, dass das XEG-Präparat eine Aktivität gegenüber MLG aufweist (siehe Abb. 29).

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Auch diese Aktivität wurde in der Literatur ausgeschlossen (Yaoi *et al.*, 2005; Gloster *et al.*, 2007). Die Vorversuche und Anwendungsversuche lieferten jedoch, in Übereinstimmung mit der Literatur, keine Hinweise auf eine transglycosylierende Aktivität der XEG. Die beobachteten Nebenaktivitäten des Enzympräparats müssen bei der Auswertung der Daten des XyG-Profilings berücksichtigt werden.



**Abbildung 29** Chromatogramme zu den Versuchen zur Inkubation von ausgewählten Xyloglucanoligosaccharid-Standardsubstanzen (oben: XXXG, mittig: XSGG) und „Mixed-Linked- $\beta$ -Glucans“ (MLG, unten) mit der Xyloglucanspezifischen endo- $\beta$ -Glucanase (XEG). Die Identität von XG und XX konnte anhand von Vergleichschromatogrammen der isolierten Standardsubstanzen bestätigt werden. Die Identität von XSG wurde aus dem Massenspektrum abgeleitet. Die freigesetzten Oligosaccharide aus MLG sind, ohne konkreten Identitätsnachweis, als Cellodextrine deklariert und in Anführungszeichen gesetzt. Die Retention von GG, GGG und GGGG ist jedoch mit den Cellodextrinen aus Abb. A77 vergleichbar. Die Nomenklatur der XGO entspricht den gängigen Vorgaben (Fry *et al.*, 1993; Tuomivaara *et al.*, 2015). IMT, Isomaltotriose



Die Anwendung des Profiling zur absoluten Quantifizierung von XGO wird durch einige Sachverhalte limitiert. Der Anwendungsbereich der Methode sind isolierte Ballaststofffraktionen aus dikotylen Pflanzen. Die Komplexität und etwaige assoziierte Verbindungen der pflanzlichen Zellwand können die Effektivität der XEG negativ beeinflussen. Zudem sind lediglich bestimmte XyG-Domänen der Zellwandmatrix enzymatisch zugänglich (vgl. 1cIV). Aus diesem Grund ist eine absolute Quantifizierung bzw. der Vergleich einzelner XGO-Gehalte zwischen unterschiedlichen Pflanzenspezies oder –geweben anhand der Daten der Profilingmethode nicht sinnvoll. Denkbar wäre eine absolute Quantifizierung lediglich bei Anwendung der XyG-Profilingmethode zum Monitoring von Veränderungen der XyG-Struktur einzelner Spezies durch Reifung, Züchtung, Lagerung oder Prozessierung. Aufgrund der Bedingungen der HPAEC und der Isolierungsprozesse der XGO-Standardsubstanzen eignet sich die XyG-Profilingmethode nicht zur Analyse des Acetylierungsgrads von XGO. Etwaige Acetylgruppen werden aufgrund der hohen pH-Werte während der NaOH-Extraktion (vollständig) oder der Ionenchromatographie (teilweise) dissoziiert.

### VII. Die Xyloglucanstrukturen der ausgewählten Beerenobstsorten

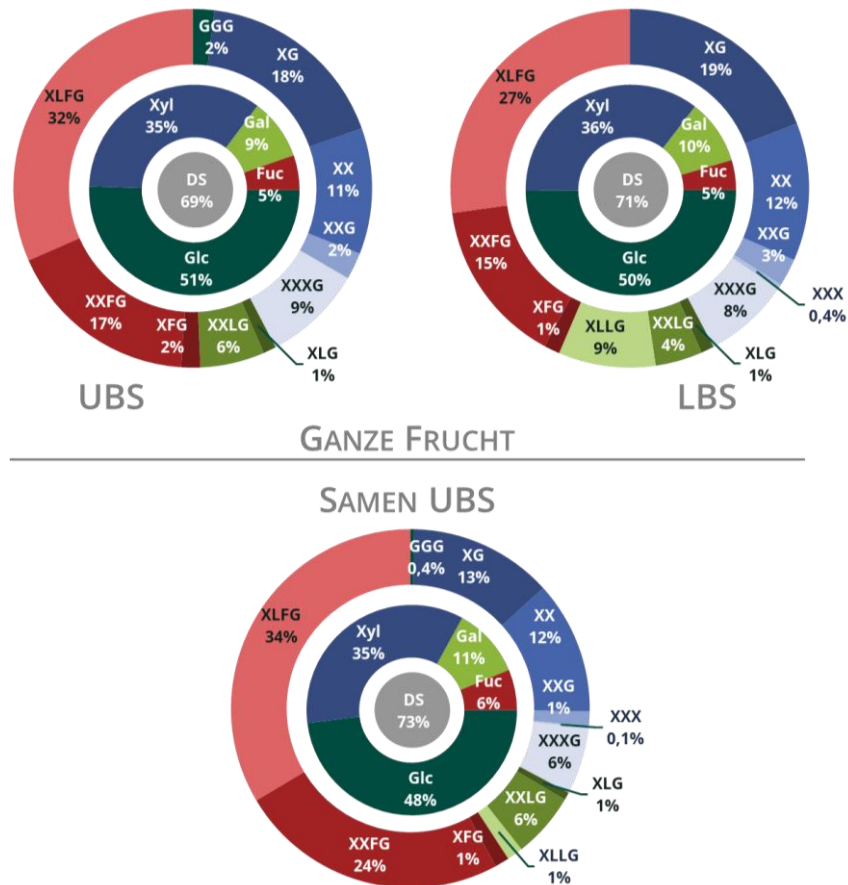
Die neue XyG-Profilingmethode mittels HPAEC-PAD/MS wurde zur Analyse der Ballaststofffraktionen der Beerenobstsorten angewendet. Sowohl UBS als auch LBS der ganzen Früchte und Samen wurden analysiert. Die ersten Inkubationsansätze der LBS der Samen wiesen jedoch zu geringe Signale auf, und das Probenmaterial war nicht ausreichend für eine Wiederholung im größeren Maßstab. Ausgewählte Chromatogramme der verdauten Ballaststoffe jeder Frucht und der UBS ihrer Samen sind im Anhang unter Abb. A76 & A77 dargestellt. Allgemein wiesen die Chromatogramme der UBS der Samen höhere XGO-Signale und weniger Störsignale auf. Infolgedessen war die Auswertung der Chromatogramme der Ballaststoffe aus den Samen leichter als die der ganzen Früchte. Dies könnte entweder auf größere Anteile an zugänglichen XyG in den Samen oder auf eine Hemmung der XEG durch Nebenkomponenten in den Ballaststoffen der ganzen Früchte zurückzuführen sein. Die ausgewerteten Daten sind in den Abb. 30 – 32 zusammengefasst. Der äußere Ring veranschaulicht die relative XGO-Zusammensetzung und der innere Ring bildet die daraus berechnete Monosaccharidverteilung ab. Die Monosaccharidverteilung der XGO wurde anhand der Anteile der einzelnen Monosaccharide in jedem bestimmten XGO sowie deren jeweiligen Anteilen in der Probe berechnet. Im mittleren Kreis ist der jeweilige DS angegeben, berechnet aus dem Verhältnis von Glc zu Xyl. Die vollständigen Daten sind im Anhang in Tab. A78 & A79 aufgeführt. Die Analysen wurden in Doppelbestimmung mit einer zusätzlichen enzymfreien Kontrolle durchgeführt. Die relativen halben Spannweiten („Range/2“) der bestimmten Anteile einzelner XGO betragen nur in Ausnahmefällen > 10 %. Im Rahmen ihres Anwendungsbereichs wird die Präzision des XyG-Profiling als ausreichend bewertet.

**ARONIABEERE.** Die Zusammensetzung der XGO aus Ballaststofffraktionen der Aroniabeere ist in Abb. 29 dargestellt. Mit 32 mol% stellt XLFG das häufigste XGO in den UBS der Aroniabeere dar. Ganze 51 mol% der freigesetzten XGO tragen eine Fuc-Einheit (Block aus XLFG, XXFG und XFG). In Summe lassen sich 40 mol% auf XGO ohne verlängerte Xyl-Seitenketten (Block aus XG, XX, XXG und XXXG) zurückführen. Der XGO-Block mit

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

unfucosylierten Gal-Seitenketten XLG und XXLG stellen mit 7 mol% die Minderheit dar. XLLG konnte nicht detektiert werden. Nur 2 mol% der XGO liegen als unsubstituiertes Glucanrückgrat GGG vor. GG und X konnten aufgrund von Koelutionen nicht bestimmt werden. Die XyG der LBS-Fraktion der Aroniabeere zeichnen sich durch höhere Anteile an L-Bausteinen aus. XLLG konnte mit einem Anteil von 9 mol% bestimmt werden. Mit 0,4 mol% konnten auch sehr geringe Anteile des unüblichen XGO XXX bestimmt werden, während in dieser Fraktion GGG nicht detektiert werden konnte. Der Anstieg der Anteile an XGO mit lediglich L-Bausteinen geschieht eher auf Kosten der fucosylierten XGO. Die Summe der XGO ohne verlängerte Xyl-Seitenkette liegt bei 42 mol% während XLFG, XXFG und XFG insgesamt nur noch 43 mol% ausmachen. Demzufolge ist der Fucosylierungsgrad bei den LBS geringer als bei den UBS. Dieser Unterschied lässt sich anhand der XGO-Zusammensetzung der Ballaststofffraktionen gut ableiten, die daraus errechneten Monosaccharidverteilungen der XGO sind jedoch beinahe identisch. Der DS der UBS aus der ganzen Frucht beträgt 69 %, während der DS der LBS 71 % beträgt. Die XyG-Strukturen der UBS der Aroniabeersamen konnten ebenfalls bestimmt werden. Darin sind alle XGO der LBS und UBS der ganzen Frucht bestimmbar. Das häufigste XGO ist erneut XLFG, doch weist die UBS-Fraktion der Samen mit 24 mol% zudem höhere Anteile an XXFG auf als die Fraktionen der ganzen Frucht. Die summierten Anteile der XGO mit L-Bausteinen oder unsubstituierten Xyl-Seitenketten liegen bei 8 mol% bzw. 33 mol%. Der Fucosylierungsgrad der XyG aus UBS der Aroniabeersamen scheint höher zu sein als in der ganzen Frucht. Dieser Unterschied in der XGO-Zusammensetzung ist erneut anhand der Monosaccharidverteilung der XGO nicht ablesbar. Der DS ist mit 73 % etwas höher als in den Ballaststofffraktionen der ganzen Frucht. Zusammengefasst weisen Aroniabeeren XyG mit fucosylierten Seitenketten und dem Substitutionsmuster XXXG auf. Innerhalb ihrer botanischen Familie (Rosaceae) wurden bereits die XyG von Äpfeln und Pfirsichen beschrieben (vgl. 1cIII). Die XyG-Struktur der Aroniabeeren entspricht damit im allgemeinen den üblichen XyG-Strukturen innerhalb ihrer phylogenetischen Gruppe (Schultink *et al.*, 2014).

d. Entwicklung und Anwendung einer Profilingmethode für Xyloglucane aus pflanzlichen Lebensmitteln

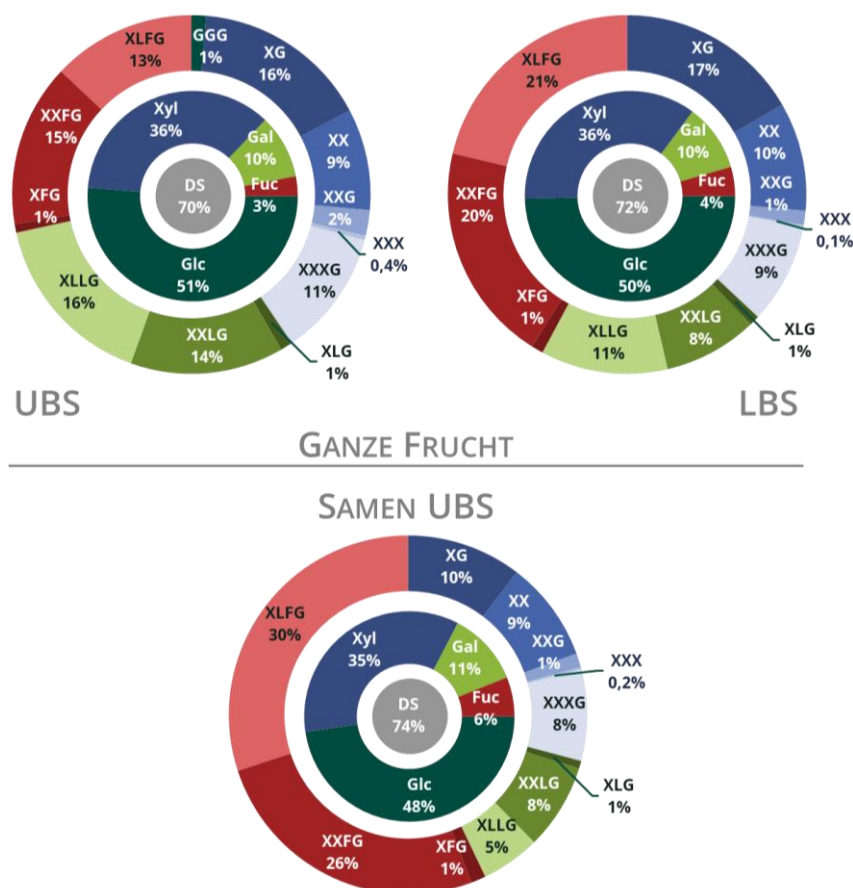


**Abbildung 30** Zusammensetzung (mol%) der Xyloglucan oligosaccharide (XGO) der Ballaststofffraktionen aus **Aroniabeeren** und deren Samen (äußerer Ring). Zusätzlich sind die daraus errechnete Monosaccharidverteilung der XGO (innerer Ring) und der Substitutionsgrad (grauer Kreis) angegeben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). DS, Substitutionsgrad; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; LBS, lösliche Ballaststoffe; UBS, unlösliche Ballaststoffe; Xyl, Xylose

**HIMBEERE.** Die XGO-Zusammensetzung der Ballaststofffraktionen aus Himbeeren ist in Abb. 30 dargestellt. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die Seitenketten mit unfucosylierten Gal-Einheiten einen deutlich höheren Anteil ausmachen als in den Ballaststoffen der Aroniabeere. XLLG stellt mit 16 mol% sogar das häufigste XGO in den UBS der ganzen Himbeere dar. Darauf folgen XG mit ebenfalls 16 mol%, XXFG mit 15 mol% und XXLG mit 14 mol%. In Summe liegen 31 mol% der XGO mit L-Bausteinen, 29 mol% mit F-Bausteinen und 38 mol% ohne verlängerte Xyl-Seitenketten vor. GGG konnte mit einem Anteil von 1 mol% und XXX mit einem Anteil von 0,4 mol% nachgewiesen werden. X und GG waren erneut nicht eindeutig zu identifizieren. Aus den LBS der Himbeere konnten mehr fucosylierte XGO freigesetzt werden. Das häufigste Oligosaccharid wird mit 21 mol% von XLFG gestellt, gefolgt von 20 mol% XXFG. Die Gruppe der XGO mit L-Bausteinen kommt insgesamt auf 19 mol%, wobei 11 mol% auf XLLG und 8 mol% auf XXLG zurückgehen. Die XGO aus lediglich X- und G-Bausteinen kommen auf 37 mol% und die Verhältnisse untereinander sind vergleichbar mit den UBS der Himbeere. XXX besitzt in den LBS einen Anteil von 0,1 mol%, während GGG nicht detektierbar war. Im Gegensatz zur ganzen Aroniabeere weisen die LBS der Himbeere einen höheren Fucosylierungsgrad auf als ihre UBS. Die merklichen Unterschiede zwischen der XGO-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Zusammensetzung der Ballaststoffe der Aroniabeere und der Himbeere spiegeln sich in der Monosaccharidverteilung durch einen nur leicht geringeren Fuc-Anteil wider. Mit 70 % bei den UBS bzw. 72 % bei den LBS der ganzen Himbeere liegen die DS ebenfalls nur um jeweils 1 mol% höher als in den Ballaststofffraktionen der Aroniabeere. In den UBS der Himbeersamen ist der Anteil an fucosylierten XGO noch höher als in den UBS oder LBS der ganzen Beere. XLFG ist mit 30 mol% das häufigste XGO und XXFG steht mit 26 mol% an zweiter Stelle. Dem gegenüber nehmen die summierten Anteile von XGO mit L-Bausteinen (14 mol%) und die mit unsubstituierten Xyl-Seitenketten (28 mol%) im Vergleich zu den UBS und LBS der ganzen Frucht ab. Folglich weisen die Himbeersamen in der UBS einen höheren Fucosylierungsgrad der XyG auf als die Ballaststoffe der ganzen Frucht. Diese Trends schlagen sich in einem höheren DS (74 %) sowie Fuc-Anteil in der Monosaccharidverteilung nieder. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte zuvor auch an den Daten der Aroniabeersamen festgestellt werden, jedoch spiegelten sich dabei die Unterschiede im Fucosylierungsgrad nicht in der Monosaccharidverteilung wider. Somit weist die Himbeere ebenfalls für ihre phylogenetische Gruppe charakteristische XyG-Strukturen auf. Entsprechend den Rosaceen aus der Literatur und der Aroniabeere zuvor, sind die XyG der Himbeere fucosyliert und liegen im Substitutionsmuster XXXG vor.

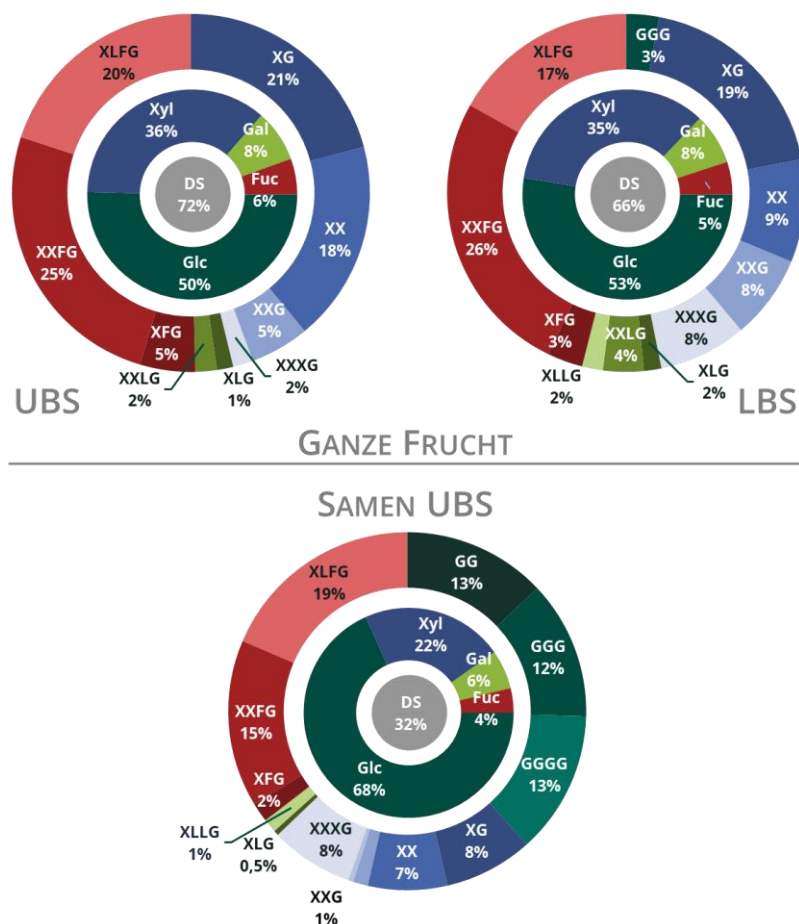


**Abbildung 31** Zusammensetzung (mol%) der Xyloglucan oligosaccharide (XGO) der Ballaststofffraktionen aus **Himbeeren** und deren Samen (äußerer Ring). Zusätzlich sind die daraus errechnete Monosaccharidverteilung der XGO (innerer Ring) und der Substitutionsgrad (grauer Kreis) angegeben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). DS, Substitutionsgrad; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; LBS, lösliche Ballaststoffe; UBS, unlösliche Ballaststoffe; Xyl, Xylose

**ROTE JOHANNISBEERE.** Die Zusammensetzung der freigesetzten XGO aus den Ballaststofffraktionen der Roten Johannisbeere ist in Abb. 31 dargestellt. In den UBS teilen sich die Anteile hauptsächlich in 50 mol% fucosylierte XGO und 46 mol% XGO mit X-Seitenketten auf. XGO mit L-Bausteinen sind nur in sehr geringen Anteilen vorhanden. Das häufigste XGO ist XXFG mit 25 mol%. Die XGO XX, XLFG und XG liegen mit 18 mol%, 20 mol% und 21 mol% in vergleichbaren Dimensionen vor. Mit 5 mol% enthalten die UBS der Roten Johannisbeere die bisher höchsten Anteile an XFG. GGG und XLLG konnten nicht detektiert werden. Die Konzentration von XXX lag unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Summen der nach Substitution bzw. XyG-Baustein aufgeteilten Blöcke sind laut der XGO-Zusammensetzung der LBS der Roten Johannisbeere vergleichbar zu denen der UBS. Die fucosylierten XGO besitzen einen summierten Anteil von 46 mol%, während die XGO aus X- und G-Bausteinen einen Gesamtanteil von 44 mol% einnehmen. Die XyG der LBS unterscheiden sich von denen der UBS jedoch anhand der Verhältnisse der XGO innerhalb dieser Blöcke. Darin besitzt XXFG als häufigstes XGO der LBS einen Anteil von 26 mol%. Auf Seiten der XGO mit nicht verlängerten Xyl-Seitenketten dominiert XG mit 19 mol% vor XXXG, XXG und XX mit 8 - 9 mol%. In Anbetracht der in 4dIII beschriebenen Nebenaktivität der XEG (XXXG-Abbau zu XX und XG) ist dieser starke Überschuss von XG gegenüber XX überraschend. Insofern müssen weitere Edukte für XG in Betracht gezogen werden. Die LBS der Roten Johannisbeere weisen im Vergleich zu den übrigen Proben mit 8 mol% die höchsten Anteile an XXG auf. X und GG konnten erneut in keiner der beiden Fraktionen zweifelsfrei identifiziert bzw. integriert werden. Die Unterschiede zwischen den XGO-Zusammensetzungen der UBS und LBS spiegeln sich in den daraus errechneten Monosaccharidverteilungen nicht wider. Jedoch schlagen sich die höheren Anteile an XG und GGG in den XyG der LBS in einem niedrigeren DS (66 %) im Vergleich zum DS der UBS (72 %) nieder. Aufgrund der ungefähr gleichverteilten Anteile der jeweiligen Blöcke ist der Fucosylierungsgrad der UBS und der LBS ähnlich. Die Chromatogramme der XGO der UBS aus den Samen der Roten Johannisbeere weisen gegenüber den Chromatogrammen der bisherigen Fraktionen außergewöhnliche Peaks auf. Zusätzlich zum markanten Signal von GGG (12 mol%) konnte erstmalig GG (13 mol%) korrekt zugeordnet und darüber hinaus GGGG (13 mol%) nachgewiesen werden. In Summe sind folglich 38 mol% der enzymatisch zugänglichen XyG-Strukturen der UBS aus Samen der Roten Johannisbeere ohne Seitenkette. Ein derart stark unsubstituiertes Glucanrückgrat ist untypisch für XyG aus dikotylen Pflanzen. Unter Berücksichtigung der beobachteten Aktivität gegenüber MLG müssen diese als Quelle für die Cellodextrine ebenfalls in Betracht gezogen werden. Das Vorkommen von MLG in dikotylen Pflanzen ist jedoch ebenfalls äußerst unwahrscheinlich. Die Methylierungsanalyse zeigte zudem die Abwesenheit von (1→3)-verknüpfter Glc<sub>p</sub>, welche für MLG charakteristisch ist. Eine weitere Hypothese ist, dass diese unsubstituierten XyG-Abschnitte der Aufarbeitung geschuldet sind. Die Samen der Roten Johannisbeere zeichneten sich durch ihre mechanische Härte aus. Die erforderliche Partikelgröße konnte erst durch mehrfache Mahlgänge erreicht werden. Dies resultiert in einem erhöhten mechanischen Energieeintrag bei der Vermahlung der Samen der Roten Johannisbeere. In der nahverwandten Schwarzen Johannisbeere wurden unter Anwendung einer anderen XEG (*Aspergillus aculeatus*, EC 3.2.1.4), lediglich die XGO XXG, XXXG, XLXG, XXLG, XXFG, XLFG und XLLG nachgewiesen (Hilz *et al.*, 2006). Durch die hier

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

entwickelte Profilingmethode wurde in den UBS der Roten Johannisbeere das Vorhandensein von XLFG (19 mol%), XXFG (15 mol%), XXXG (8 mol%), XG (8 mol%), XX (7 mol%) und von weiteren XGO mit Anteilen < 1 mol% (XLLG, XXG, XXX, XLG) nachgewiesen. Aufgrund der Cellodextrine zeigen die UBS der Samen der Roten Johannisbeere in der Monosaccharidverteilung der XGO deutlich höhere Anteile an Glc-Einheiten. Der DS liegt ebenfalls bei lediglich 32 %.

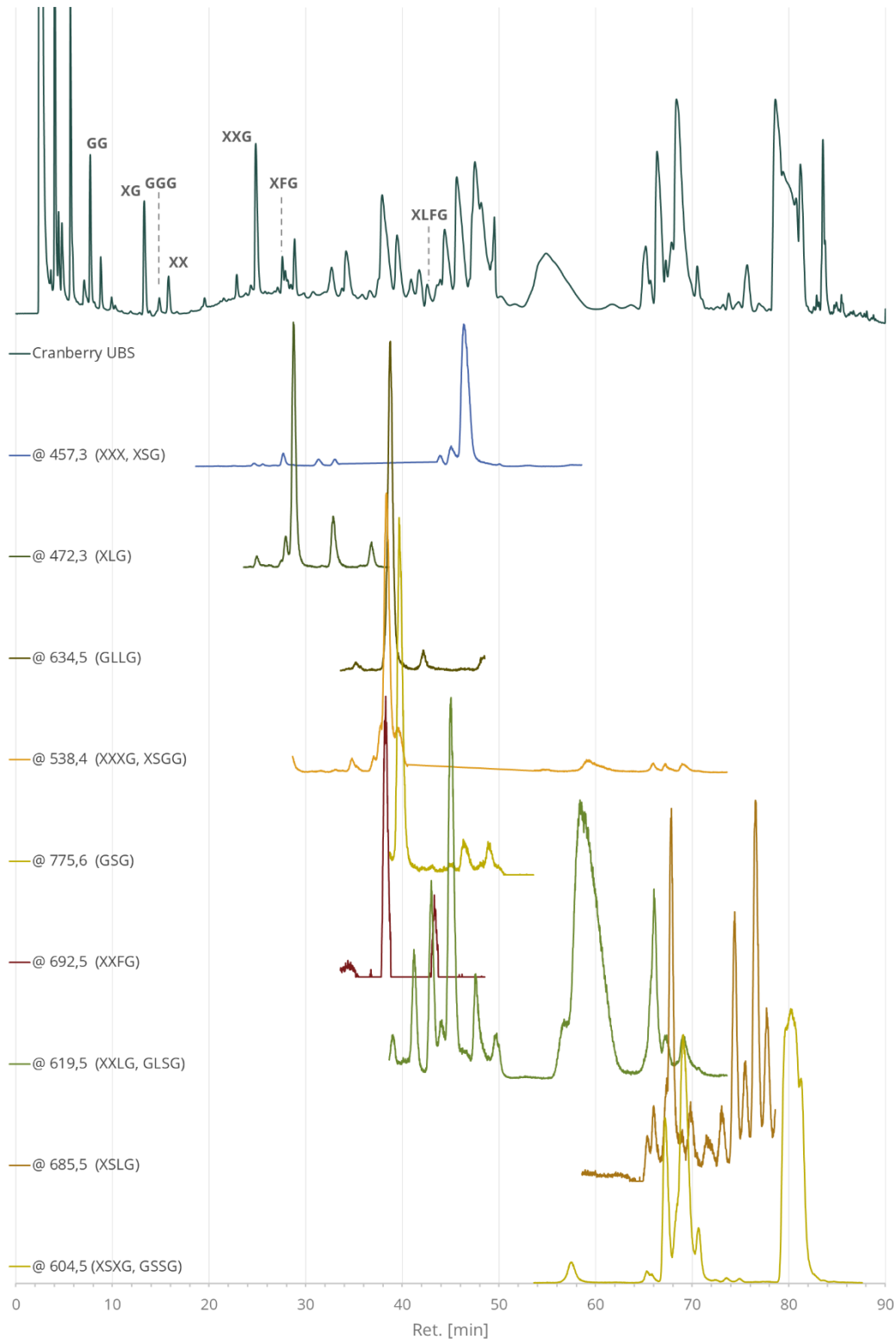


**Abbildung 32** Zusammensetzung (mol%) der Xyloglucan oligosaccharide (XGO) der Ballaststofffraktionen aus **Roten Johannisbeeren** und deren Samen (äußerer Ring). Zusätzlich sind die daraus errechnete Monosaccharidverteilung der XGO (innerer Ring) und der Substitutionsgrad (grauer Kreis) angegeben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). DS, Substitutionsgrad; Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; LBS, lösliche Ballaststoffe; UBS, unlösliche Ballaststoffe; Xyl, Xylose

**CRANBERRY.** Die Chromatogramme der Inkubationsansätze von Ballaststofffraktionen aus ganzen Cranberries und Cranberrysamen mit XEG sind in Abb. A77 dargestellt. Ein detailliertes Chromatogramm der HPAEC-PAD/MS der UBS der ganzen Früchte ist samt MS-Spuren in Abb. 33 dargestellt. Aufgrund der zahlreichen Signale sowie der unzureichenden Trennung konnten aus den Chromatogrammen der Cranberry keine quantitativen Daten gewonnen werden. Einzelne Signale mithilfe der RRF der isolierten XGO-Standards zu quantifizieren wäre selbst für die Maßstäbe eines Profilingansatzes nicht zielführend. Aus diesem Grund wurden die Chromatogramme, durch Zuordnung bekannter  $m/z$  und RRT, lediglich qualitativ

ausgewertet. Auf diese Weise konnten GG, XG, GGG, XX, XXG, XFG und XLFG identifiziert werden. Die MS-Spuren weiterer XGO weisen mehrere Signale auf, was eine eindeutige Zuordnung erschwert (siehe Abb. 33). So kann bei dem Signal mit einer Retentionszeit von 38 min anhand der MS-Daten nicht eindeutig belegt werden, ob dieses auf XXXG, GLLG oder XXFG zurückgeht bzw. welche der Kandidaten darin koeluieren. Die Spuren, welche den XGO XXLG/GLSG, XSLG und XSXG/GSSG entsprechen, weisen besonders viele Signale auf. Einzig bei den  $m/z$  von GGGG und XLLG konnten in den Chromatogrammen der XGO aus den UBS der Cranberry keinerlei Signale beobachtet werden. Folglich gelten diese beiden XGO in den UBS als nicht nachgewiesen. Die Chromatogramme der XGO aus den LBS der Cranberry weisen hingegen für das  $m/z$  von XLLG Signale auf. Davon abgesehen konnten in den Chromatogrammen der LBS aus ganzen Cranberries und der UBS aus Cranberrysamen gleiche XGO-Verteilungen beobachtet werden. In Anbetracht der Tatsache, dass Cranberry als Ausgangsmaterial für die Gewinnung vieler XGO-Standardsubstanzen diente, ist davon auszugehen, dass alle Signale der daraus isolierten XGO-Standardsubstanzen in den Ballaststofffraktionen der Cranberry vorhanden sein müssen. Diese außerordentliche Vielfalt an XyG-Bausteinen ist insofern erstaunlich, da üblicherweise fucosylierte und Ara-haltige Seitenketten innerhalb einer Spezies nicht zusammen auftreten. Dies konnte bisher lediglich in Blättern des Oleanders (*Nerium oleander* LINNÉ) und in Leinsamen (*Linum usitatissimum* LINNÉ) mittels MALDI-TOF/MS und NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Hoffman *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2016). Oleander und Gemeiner Lein entstammen der Ordnung der Enzianartigen (Gentianales) bzw. der Malpighienartigen (Malpighiales) und stehen demnach in keinem nahen Verwandtschaftsverhältnis zur Cranberry. Aus der Ordnung der Cranberry (Ericales) sind bisher die XyG von Blättern und Früchten des Arganbaumes und von Blaubeeren beschrieben (Ray *et al.*, 2004; Hilz *et al.*, 2007; Aboughe-Angone *et al.*, 2008). In beiden Spezies konnten XGO mit den Bausteinen X, L, F und U sowie mit dem Substitutionsmuster XXXG nachgewiesen werden. Trotz der nahen Verwandtschaft zur Blaubeere (Gattung *Vaccinium*) konnte aus der Cranberry kein XGO mit dem U-Baustein isoliert oder charakterisiert werden. Das Vorkommen von S-Seitenketten in freien XGO (nicht gezielt aus Polysacchariden freigesetzten XGO) aus Cranberries wurde bereits nachgewiesen (Hotchkiss *et al.*, 2015; Auker *et al.*, 2019; Coleman *et al.*, 2019). Konkret konnten die XGO GSSG, GXGS und GSGS strukturell aufgeklärt werden. Die Strukturen von SSG, GSS, XSXG, GSXG und SSGG wurden anhand von MS/MS-Fragmentierungsmustern vorgeschlagen (Coleman & Ferreira, 2020). XGO mit L- und F-Bausteinen aus den XyG der Zellwände der Cranberry wurden bisher noch nicht beschrieben.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 33** Chromatogramme (HPAEC-PAD/MS) der mittels Xyloglucanspezifischer endo- $\beta$ -Glucanase verdauten, unlöslichen Ballaststoffe (UBS) der **Cranberry**. Ganz oben sind das Signal des PAD sowie die Xyloglucanoligosaccharide (XGO) angezeigt, welche anhand der MS-Daten eindeutig zugeordnet wurden. Darunter sind die übrigen Spuren der MS-Detektion dargestellt. Die Beschriftungen der Spuren geben die beobachteten Masse-zu-Ladung-Verhältnisse und die entsprechenden XGO-Standardsubstanzen an. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).



Die entwickelte Profilingmethode lieferte neue Erkenntnisse zu den XyG-Strukturen der Ballaststoffe der Beerenobstsorten. Mithilfe der spezifischen XEG und der sensitiven HPAEC-PAD/MS-Analyse der freigesetzten XGO konnten Feinstrukturen der pflanzlichen Zellwand identifiziert und die Verhältnisse dieser Strukturelemente bestimmt werden. Im Vergleich zu den berechneten Monosaccharidverteilungen (Abb. 30 - 32) wird zudem deutlich, dass die Profilingmethode einen höheren Informationsgehalt besitzt als beispielsweise die Bestimmung der Monomeren- oder Bindungsverhältnisse. Mit Ausnahme der UBS der Samen aus Roten Johannisbeeren weisen alle Proben eine ähnliche Monosaccharidverteilung (errechnet aus den freigesetzten XGO) auf. Dabei liegen die Anteile von Glc zwischen 48 - 53 mol%, von Xyl bei 35 - 36 mol%, von Gal zwischen 8 - 11 mol% Gal und von Fuc zwischen 3 - 6 mol%. Doch anhand der XGO-Verhältnisse aus dem Profiling können nun auch sehr feine Unterschiede zwischen den Proben abgebildet werden.

Die Analyse der Beerenobstsorten zeigte ebenso die Grenzen der Profilingmethode auf. Die Zuordnung und Integration der XGO-Signale ist stark vom Probenmaterial abhängig. Dieses sollte bestenfalls sehr weit aufgereinigt bzw. mit XyG angereichert sein und in den Kontrollproben ohne Enzymzugabe möglichst wenige Störsignale aufweisen. Der starke Einfluss des Eluenten muss bei der Zuordnung ebenfalls berücksichtigt werden. In dieser Hinsicht stellt die MS-Detektion eine wertvolle Stütze dar und wird zur Analyse unbekannter Proben bzw. unübersichtlicher Chromatogramme empfohlen. Die Cranberry stellt hinsichtlich ihrer XyG-Struktur eine größere Herausforderung dar als die allermeisten dikotylen Lebensmittelpflanzen. Ihr Reichtum an Seitenkettenmotiven konnte anhand der hier angewendeten Gradienten und isolierten XGO-Standardsubstanzen nicht vollständig abgebildet werden. Dennoch ist die Methode ausreichend, um das Vorkommen einzelner Verbindungen qualitativ nachzuweisen. Der Nachweis der Anwendbarkeit der Profilingmethode auf unfucosylierte XyG-Proben mit S-Bausteinen (die beispielsweise in Solanaceen vorkommen) steht noch aus. Zudem könnte die Methode durch weitere XGO-Standardsubstanzen ergänzt werden. So erfordert eine korrekte Abbildung von XyG mit einem DS von etwa 50 % voraussichtlich das XGO XXGG. Der Vollständigkeit halber könnten XLXG, XFXG und XFFG ebenfalls als Standardsubstanzen mit aufgenommen werden.

Generell konnten bisherige Berichte aus der Literatur bezüglich der Spaltung von XyG-Strukturen mittels XEG bestätigt werden. Trotz der Nebenaktivitäten der XEG wurden vorzugsweise XGO mit vier Glc-Einheiten im Rückgrat freigesetzt. Aufgrund der langen Inkubationszeit muss davon ausgegangen werden, dass erhebliche Anteile von XX und XG ursprünglich aus XXXG stammen.

### e. Charakterisierung assoziierter phenolischer Polymere in den Samen der Beerenobstsorten

Die Analyse der Samen der Aroniabeere, Cranberry und Roten Johannisbeere hinsichtlich phenolischer Polymere führte zu einem bekannten Problem der Zellwandanalytik. Die mit der pflanzlichen Zellwand assoziierten phenolischen Verbindungen Lignin und PA sorgen für gegenseitige Interferenzen bei Anwendung entsprechender Analysemethoden (vgl. 3e). Im Rahmen der Masterarbeit von Hendrik Eichhöfer konnte in den Samen der Beerenobstsorten eine Überbestimmung der Ligningehalte nach der Klason-Methode beobachtet und auf PA zurückgeführt werden (Eichhöfer, 2017). Darüber hinaus wurden die Ligninstrukturen der jeweiligen Samen unter Anwendung der Thioacidolyse und der NMR-Spektroskopie untersucht. Im Laufe der daran anknüpfenden Masterarbeit von Florian Junker erfolgte die Differenzierung und Quantifizierung der zellwandassoziierten PA in den Ballaststoffen der drei unterschiedlichen Samen (Junker, 2018). Zu diesem Zweck wurden die Phloroglucinolyse und das BuOH-HCl-Assay als PA-spezifische Methoden in der Abteilung etabliert und ein PA-Standard, basierend auf entfettetem Weinbeersamenmehl, gewonnen. Die Erkenntnisse und methodischen Vorarbeiten aus den studentischen Abschlussarbeiten wurden anschließend zur Aufklärung der Lignin- bzw. PA-Strukturen in den Himbeersamen angewandt. Im Folgenden werden die Erkenntnisse der Lignin- und PA-Analytik rekapituliert und um die Ergebnisse der Himbeersamen ergänzt. Ausgangsmaterial zur Analyse von Lignin und PA-Strukturen sind die Ballaststoffe der jeweiligen entfetteten Samen. Die Anteile der Rückstände nach Entfettung mittels Soxhlet-Extraktion und die Ballaststoffgehalte der Samen sind in Tab. 6 dargestellt.

#### I. Bestimmung des Ligningehalts

Die bestimmten Ligningehalte der Samen sind in Tab. 13 aufgelistet. Die gravimetrische Bestimmung nach Schwefelsäurebehandlung ergab für Himbeersamen einen säureunlöslichen Rückstand von 37,9 g/100 g UBS. Mit einem Restproteingehalt des säureunlöslichen Rückstandes von 5,6 % aber keinem Ascherückstand ergibt sich für die UBS der Himbeersamen ein Gehalt an Klason-Lignin von 34,9 g/100 g UBS. Von den übrigen Proben weisen lediglich die Aroniabeersamen mit 38,5 g/100 g UBS einen höheren Gehalt an Klason-Lignin auf. Die Bestimmung des Ligningehalts als ABSL und die Zellwandgel-NMR erfordern Driselase-verdaute UBS. Die Himbeersamen weisen mit 90,8 g/100 g UBS den höchsten Rückstand nach Inkubation mit Driselase auf. Aufgrund der sehr breiten Aktivität des Enzympräparats gegenüber zahlreichen Zellwandpolysacchariden deutet dies auf einen hohen Anteil an Nicht-Polysaccharid-Komponenten in den UBS der Himbeersamen hin. Die Bestimmung des ABSL ergab für die Samen der Himbeere einen Gehalt von 23,1 g/100 g UBS. Demnach ist die Diskrepanz zwischen den zwei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden für den Ligningehalt bei den Samen der Himbeere deutlich geringer ausgeprägt als in den übrigen untersuchten Samen. Ein um 50 % höherer Ligningehalt nach Klason ist, aufgrund der sehr unterschiedlichen Methodenprinzipien, nicht ungewöhnlich, wird jedoch häufig bei Geweben mit geringer Lignifizierung beobachtet. Während die ABSL-Methode durch den gewählten

Absorptionskoeffizienten und absorbierende Nebenkomponenten fehlerbehaftet sein kann, führt die Methode nach Klason häufig durch etwaige säureunlösliche Nebenkomponenten zur Überbestimmung (vgl. 3dl). Bei den Samen der Aroniabeere, Cranberry und Roten Johannisbeere liegen die Klason-Ligningehalte vier- bis neunfach höher als die ABSL-Gehalte (siehe Tab. 13).

**Tabelle 13** Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe (UBS) aus den entfetteten Samen der Beerenobstsorten. Die mit \* gekennzeichneten Proben wurden von Hendrik Eichhöfer im Rahmen seiner Masterarbeit bearbeitet (Eichhöfer, 2017). Die Bestimmung des Klason-Lignins wurde in Doppelbestimmung (Mittelwert  $\pm$  Range/2) und die des acetylbromidlöslichen Lignins (ABSL) in Dreifachbestimmung (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) durchgeführt. Die Gehalte an Restprotein und Asche wurden einfach bestimmt. Dris, Driselase-verdaut

	Aroniabeer-samen *	Cranberry-samen *	Himbeer-samen	Rote Johannisbeer-samen *
<b>KLASON-LIGNIN</b>				
<b>Unkorrigierter Gehalt</b> [g/100 g UBS]	42,0 $\pm$ 0,1	29,6 $\pm$ 0,3	37,0 $\pm$ 0,9	11,1 $\pm$ 0,8
<b>Proteingehalt</b> [%]	8,3	14,4	5,6	2,3
<b>Aschegehalt</b> [%]	-	1,6	-	0,3
<b>korrigierter Gehalt</b> [g/100 g UBS]	38,5 $\pm$ 0,1	24,9 $\pm$ 0,2	34,9 $\pm$ 0,8	10,8 $\pm$ 0,8
<b>ABSL</b>				
<b>Driselase-Rückstand</b> [g/100g UBS]	79,6 $\pm$ 0,1	67,0 $\pm$ 0,1	90,8 $\pm$ 0,2	29,2 $\pm$ 0,6
<b>Gehalt</b> [g/100 g DrisUBS]	12,1 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,3	25,4 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,1
<b>Gehalt</b> [g/100 g UBS]	9,6 $\pm$ 0,7	6,3 $\pm$ 0,2	23,1 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,1

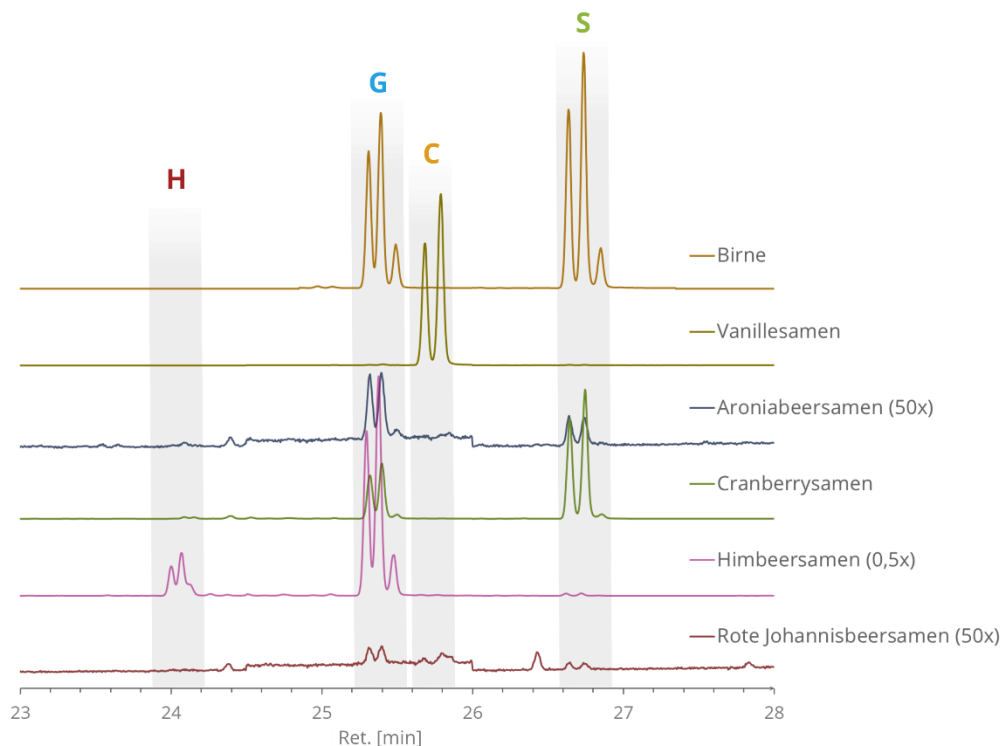
Lignin aus Himbeersamen ist in der Literatur bisher nicht ausführlich beschrieben. In der Arbeit von Salo & Suomi ist der Gehalt an Rohlignin in Samen aus wilden Himbeeren aufgeführt, ohne jedoch die Methodik zu beschreiben. Die Autoren geben einen Wert von 25,5 g/100 g DW an (Salo & Suomi, 1972). Im Zuge dieser Arbeit wurde unter Einberechnung des Ballaststoff- und Lipidgehalts für Himbeersamen ein Klason-Ligningehalt von 26,3 g/100 g DW und ein ABSL-Gehalt von 17,4 g/100 g DW bestimmt.

## II. Analyse der Ligninstrukturen

Für die strukturelle Analyse der Lignine in den Samen der Beerenobstsorten wurde zunächst die Thioacidolyse durchgeführt. Die Methode ermöglicht, den Nachweis der H-, G- und S-Lignineinheiten sowie der vor Kurzem beschriebenen Catechyleinheiten (vgl. 1dII & 3dII). Als Vergleichsprobe wurden Driselase-verdaute UBS aus Birnen verwendet, da diese sowohl G- als auch S-Lignineinheiten enthalten (Bunzel & Ralph, 2006). Zudem wurden die Samen aus Vanilleschoten aufgearbeitet und als Vergleichsprobe zum Nachweis von Catechyllignineinheiten eingesetzt (Chen *et al.*, 2012). In Abb. 34 sind die Chromatogramme der GC-MS-Analyse aller Proben übereinandergelegt. Zur Vereinfachung wurden die addierten

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

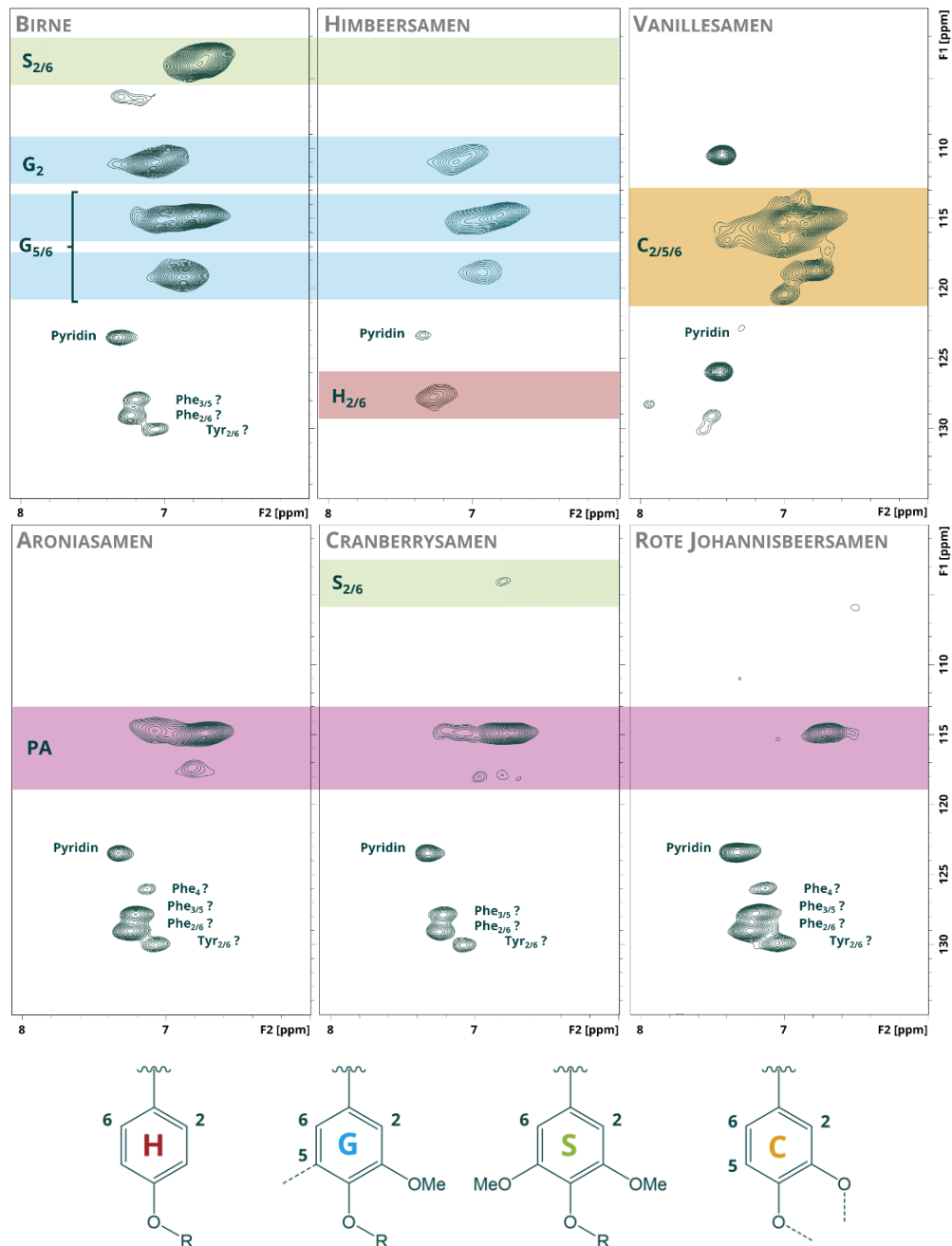
SIM-Spuren der jeweiligen Proben ausgewählt. Jedes Monolignol resultiert in einem Doppelpeak des *Erythro*- und *Threo*-Isomers der TMS- $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -Trithioethyl-derivate und (teilweise) in einem zusätzlichen kleinen Signal des TMS- $\beta$ - $\gamma$ - $\gamma$ -Trithioethyl-derivats. Im Chromatogramm der Birnenprobe erscheinen bei ungefähr 25,4 min und 26,7 min die aus G- bzw. S-Einheiten resultierenden Signale. Das Chromatogramm der Vanillesamen enthält lediglich das Signal der Catechyleinheiten bei ca. 25,7 min. Trotz vergleichbarer Einwaagen wurden im Chromatogramm der Aroniabeersamen nur sehr schwache Signale von G- und S-Einheiten detektiert. Gleiches gilt für die Samen der Roten Johannisbeere. Dahingegen wies das Chromatogramm der Cranberrysamen deutliche Signale für G- und S-Lignineinheiten auf. Die Himbeersamen zeigen neben starken Signalen der G-Einheit und schwachen Signalen für die S-Einheit, zusätzlich Signale der H-Einheit. Demnach konnte in keinem Samen der Beerenobstsorten das Vorkommen von Catechyl-Lignin nachgewiesen werden. Eine semiquantitative Bestimmung der H/G/S- bzw. G/S-Verhältnisse der Lignineinheiten nach Thioacidolyse ist hier, in Ermangelung einer internen Standardsubstanz, nicht möglich. Die Chromatogramme sind zwar quantitativ nur bedingt vergleichbar, jedoch erscheinen die Signale der Monolignoleinheiten bei Aroniabeersamen in Anbetracht des hohen Gehalts an Klason-Lignin überraschend gering. Gleiches gilt für die Samen der Roten Johannisbeere, wobei deren UBS geringere Gehalte an Klason-Lignin aufweisen als die der Aroniabeersamen. Dagegen erscheinen die Chromatogramme der Cranberry- und Himbeersamen plausibel.



**Abbildung 34** Chromatogramme (GC-MS) der Produkte der Thioacidolyse nach Analyse der unlöslichen Ballaststoffe (UBS) aus den Samen der Beerenobstsorten und der Vergleichsproben (UBS Birne, Vanillesamen). Die grau hinterlegten Bereiche markieren die Position der Signale der entsprechenden Monolignole. Die Spuren entsprechen den summierten „Selected Ion Monitoring“-Spuren der beobachteten Analytfragmente. In Klammern ist angegeben, um welchen Faktor die Intensität des Signalwerts vergrößert wurde, wobei keine Angabe x1 entspricht. C, Catechyleinheit; G, Guaiacyleinheit; H, p-Hydroxyphenyleinheit; S, Syringyleinheit

Zusätzlich zur Thioacidolyse wurde die Zellwandgel-NMR zur Analyse der Ligninstruktur angewandt (siehe 3ell). Üblicherweise dient das Experiment zur raschen Bestimmung des G/S-Verhältnisses in lignifizierten Zellwänden. Die Driselase-verdauten und fein gemahlene Zellwandproben wurden in DMSO- $d_6$ /Pyridin- $d_5$  zu homogenen Gelen aufgequollen, und ein HSQC-Experiment wurde durchgeführt. In Abb. 35 sind Ausschnitte der Spektren der Beerenobst- und Vergleichsproben dargestellt. Innerhalb des ausgewählten Bereichs ( $\delta_{H/C} = 6,0/90,0 - 8,0/135,0$  ppm) treten üblicherweise die Kreuzsignale der aromatischen direkt gebundenen der Monolignole auf. So sind beispielsweise im Spektrum der Birnenprobe die Signale der G- und S-Einheiten deutlich auszumachen. Die S-Einheit liefert für die Positionen C/H-2 und C/H-6 aufgrund ihrer identischen Abschirmung ein einzelnes Kreuzsignal mit  $\delta_{H/C} = 6,76/103,9$  ppm. Die G-Einheiten erzeugen ein Kreuzsignal bei  $\delta_{H/C} = 7,07/111,0$  ppm (C/H-2) sowie bei  $\delta_{H/C} = 6,79/114,8$  ppm bzw.  $6,87/119,2$  ppm (C/H-5/6). Das Signal bei  $\delta_{H/C} = 7,35/123,4$  ppm lässt sich in allen Spektren auf Überreste von unvollständig deuteriertem Pyridin im Lösungsmittel zurückführen. Das HSQC-Spektrum des Zellwandgels der Vanillesamen weist diverse Signale auf, die auf den ersten Blick hinsichtlich Anzahl und Lage mit der G-Einheit verwechselt werden könnten. Jedoch konnte die Thioacidolyse bereits die Dominanz der Catechyleinheit bestätigen. Zudem wurde ein entsprechend diffuses Signal für Catechyl-Lignin bei der Zellwandgel-NMR in der Literatur bereits beschrieben (Chen *et al.*, 2012). Das Spektrum des Zellwandgels aus UBS der Himbeersamen weist die drei markanten Signale der G-Einheit auf (siehe Abb. 35). Signale für die S-Einheit sind nicht erkennbar. Das Spektrum weist jedoch bei  $\delta_{H/C} = 7,28/127,7$  ppm ein Signal auf, das ggf. der H-Einheit zugeordnet werden kann. Es ist jedoch bekannt, dass in diesem Bereich auch aromatische Aminosäuren wie beispielsweise Phenylalanin und Tyrosin Kreuzpeaks erzeugen (Kim *et al.*, 2017). Aufgrund der Lage und Beschaffenheit des Signals sowie des Nachweises von H-Einheiten in der Thioacidolyse, wird das beschriebene Signal als Bestätigung für das Vorkommen von H-Lignin in Himbeersamen gewertet. In den HSQC-Spektren der Samen aus Aroniabeeren, Cranberries und Roten Johannisbeeren treten weniger eindeutige Signale auf. Einzig das Spektrum des Zellwandgels der Cranberrysamen weist ein schwaches Signal auf, das auf S-Lignineinheiten zurückzuschließen werden kann (siehe Abb. 35). Das Vorhandensein von S-Lignin in Cranberrysamen wurde bereits durch die Thioacidolyse angezeigt. Die Zellwandgele der drei Samen weisen Kreuzsignale auf, die den Positionen C/H-5/6 der G-Einheit entsprechen könnten, jedoch fehlen jeweils die zur Bestätigung erforderlichen Signale für die Position C/H-2. Demnach kann anhand der Spektren das Vorkommen von G-Einheiten nicht nachgewiesen werden. Muster und Position der Signale lassen ebenfalls nicht auf C- oder H-Einheiten schließen. Hendrik Eichhöfer konnte diese unbekanntem Signale schließlich den PA zuordnen (Eichhöfer, 2017). Insbesondere das HSQC-Spektrum des Zellwandgels aus den UBS der Aroniabeersamen weist Signale auf, die gut mit jenen der PA-NMR-Methode nach Zeller und Mitarbeiter vergleichbar sind (siehe Abb. A80; Zeller *et al.*, 2015). Die übrigen Signale sind erneut auf Restproteine und das Lösungsmittel zurückzuführen.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 35** Ausschnitte aus den HSQC-Spektren der Zellwandgele der Driselase-verdauten unlöslichen Ballaststoffe (UBS) der Samen der Beerenobstsorten und der Vergleichsproben (UBS Birne, Vanillesamen). Die Spektren wurden in Dimethylsulfoxid- $d_6$ /Pyridin- $d_5$  mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung von Dimethylsulfoxid ( $\delta_{H/C} = 2,50/39,52$  ppm) kalibriert. Farblich hinterlegte Bereiche markieren die Signale der entsprechenden Monolignoleinheiten (unten). C, Catechyleinheit; G, Guaiacyleinheit; H, p-Hydroxyphenyleinheit; PA, Proanthocyanidine; Phe, Phenylalanin; S, Syringyleinheit; Tyr, Tyrosin

Insgesamt bestätigt die Zellwandgel-NMR die Erkenntnisse der Thioacidolyse. Lediglich die Cranberry- und Himbeersamen weisen in den UBS signifikante Anteile von Lignin auf. Die Gehalte an Klason-Lignin in Aroniabeersamen und den Samen der Roten Johannisbeere sind vermutlich zum größten Teil auf andere säureunlösliche Verbindungen zurückzuführen. Catechyl-Lignin ist in keiner der vier Proben vorzufinden. Eine Bestimmung der H/G/S-Verhältnisse ist unter anderem aufgrund überlappender Signale nicht möglich. Zudem wurde

deutlich, dass bei der Auswertung der HSQC-Spektren der Zellwandgele einige Einflussfaktoren berücksichtigt werden müssen. So können Catechyleinheiten, Restproteine und PA zu Störsignalen führen. Um korrekte Aussagen über das Vorkommen und die Zusammensetzung von Ligninstrukturen treffen zu können, müssen die Signale der Monolignole vollzählig sein und die korrekte chemische Verschiebung aufweisen. Die Überprüfung dieser trivial anzumutenden Voraussetzungen wird oftmals erschwert, unter anderem durch das Auftreten unbekannter Störsignale.

### III. Bestimmung des Gehalts an Proanthocyanidinen

Aufgrund der Unstimmigkeiten bei der Ligninanalytik wurden die Ballaststoffe der Samen zusätzlich auf das Vorkommen von zellwandassoziierten PA untersucht. Die Ergebnisse des BuOH-HCl-Assays sind in Tab. 14 aufgelistet. Die Methode wurde im Rahmen der Masterarbeit von Florian Junker etabliert und zur Aufklärung der PA-Gehalte in den Ballaststofffraktionen der Samen aus Aroniabeeren, Cranberries und Roten Johannisbeeren angewendet. Darüber hinaus wurden die Einflussfaktoren der Probenvorbereitung auf assoziierte PA bewertet. So konnte Florian Junker zeigen, dass die dreifache Entfettung mittels Soxhlet-Extraktion die Gehalte der assoziierten PA in den Roten Johannisbeersamen nur geringfügig beeinflusst (Junker, 2018). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass sich der Mahlvorgang negativ auf die PA-Gehalte und -Strukturen auswirkt. Aufgrund der Verringerung der PA-Gehalte durch starke Mahlbeanspruchung muss die Vermahlung je nach erforderlichem Mahlgrad und Härte des Mahlguts sorgsam angepasst werden. Ein zusätzlicher Verlust an PA ist aufgrund der multiplen Waschschrte bei der Gewinnung der Ballaststofffraktionen zu verzeichnen. So sind etwaige Reduktionen der PA-Gehalte nach Verdau der UBS mit Driselase den Waschungen geschuldet und nicht auf Nebenaktivitäten des Enzympräparats zurückzuführen. Auch in den LBS-Fraktionen wurden die PA-Gehalte bestimmt. Aufgrund der angestrebten Differenzierung von PA und Lignin liegt das Hauptaugenmerk im Folgenden jedoch auf den UBS-Fraktionen.

Die Isolierung eines individuellen Standards aus jeder einzelnen Samenfraktion der Beerenobstsorten war aufgrund der geringen Probenmengen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde ein PA-Standard aus den Samen von Weinbeeren gewonnen, aufgereinigt, strukturell charakterisiert und zur Erstellung der Kalibriergeraden eingesetzt (Junker, 2018). In Abb. A81 ist das HSQC-Spektrum des PA-Standards und die Zuordnung der Signale anhand eines Strukturausschnitts von PA dargestellt. Am Beispiel des entfetteten Weinbeersamenmehls lässt sich die beobachtete Problematik der Lignin- und der PA-Analytik ebenfalls nachvollziehen. Die ermittelten PA-Gehalte sind aufgrund der Tatsache, dass der PA-Standard aus demselben Weinbeersamenmehl gewonnenen wurde, authentisch. Das Mehl aus entfetteten Weinbeersamen besteht zu 82,0 g/100 g DW aus UBS und der Verdau mit Driselase resultierte in einem Rückstand aus driselaseresistenten Komponenten von 84,1 g/100 g UBS (Junker, 2018). Demzufolge machen mittels Driselase verdaubare Polysaccharide nur einen geringen Anteil der UBS aus Weinbeersamen aus. Die Bestimmung des Klason-Lignins lieferte 50,6 g/100 g UBS, während der ABSL-Gehalt 15,7 g/100 g UBS beträgt. Die beiden Methoden zur Bestimmung des Ligningehalts liefern demnach auch in den Weinbeersamen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Ergebnisse der Thioacidolyse

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

bestätigten jedoch, dass in den UBS der Weinbeersamen S- und G-Lignineinheiten vorhanden sind (Junker, 2018). Indessen konnte durch Anwendung des BuOH-HCl-Assays in den UBS der Weinbeersamen ein PA-Gehalt von 45,9 g/100 g bestimmt werden. Auch im Rückstand des Klason-Lignins konnte trotz der Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure ein PA-Gehalt von 4,6 g/100 g nachgewiesen werden. Schließlich wurde der extrahierte PA-Standard ebenfalls der ABSL-Methode unterzogen. Die Analyse ergab für den PA-Standard einen ABSL-Gehalt von 62,3 g/100 g. Demnach ist bewiesen, dass die assoziierten PA in Weinbeersamen in beiden etablierten Standardmethoden zur Überbestimmung des Ligningehalts führen.

**Tabelle 14** Ergebnisse des Butanol-HCl-Assays zur Bestimmung des Proanthocyanidingehalts der Ballaststofffraktionen der Samen der Beerenobstsorten. Die mit \* gekennzeichneten Proben wurden von Florian Junker im Rahmen seiner Masterarbeit bearbeitet (Junker, 2018). Die Werte sind aufgrund des verwendeten Standards als Weinbeersamen-Äquivalente angegeben (GSE). Die Analyse wurde in Dreifachbestimmung (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) durchgeführt. Durchgestrichene Zellen bedeuten, dass die entsprechende Analyse nicht durchgeführt wurde. EPA, Extrahierbare Proanthocyanidine; NEPA, Nicht-Extrahierbare Proanthocyanidine

	Aroniabeersamen *	Cranberry-samen *	Himbeersamen	Rote Johannisbeersamen *
<b>LÖSLICHE BALLASTSTOFFE</b>				
<b>EPA</b> [g GSE/100 g]	4,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	-	-
<b>NEPA</b> [g GSE/100 g]	7,1 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,1	-	0,7 $\pm$ 0,1
<b>Gesamt</b> [g GSE/100 g]	11,7 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,1	-	0,7 $\pm$ 0,1
<b>UNLÖSLICHE BALLASTSTOFFE</b>				
<b>EPA</b> [g GSE/100 g]	2,2 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	-	0,3 $\pm$ 0,1
<b>NEPA</b> [g GSE/100 g]	54,7 $\pm$ 2,8	8,8 $\pm$ 1,3	-	8,3 $\pm$ 0,9
<b>Gesamt</b> [g GSE/100 g]	56,8 $\pm$ 2,6	9,8 $\pm$ 1,3	-	8,6 $\pm$ 0,9
<b>DRISELASE-VERDAUTE UNLÖSLICHE BALLASTSTOFFE</b>				
<b>EPA</b> [g GSE/100 g]	1,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	-	1,6 $\pm$ 0,1
<b>NEPA</b> [g GSE/100 g]	65,3 $\pm$ 7,6	10,5 $\pm$ 0,4	-	6,5 $\pm$ 0,5
<b>Gesamt</b> [g GSE/100 g]	66,7 $\pm$ 7,7	11,5 $\pm$ 0,5	-	8,1 $\pm$ 1,2
<b>KLASON-LIGNIN-RÜCKSTAND DER UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFE</b>				
<b>Gesamt</b> (nur NEPA) [g GSE/100 g]	20,1 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,4	/	4,7 $\pm$ 0,2

Wird der BuOH-HCl-Assays unter Verwendung des isolierten PA-Standards durchgeführt, sind die Ergebnisse folglich als „PA-Gehalte äquivalent zu den PA der Weinbeersamen“ (GSE) zu interpretieren. So konnten in den UBS der Aroniabeersamen insgesamt 56,8 g GSE/100 g nachgewiesen werden (siehe Tab. 14). Die UBS der Samen von Cranberries und Roten Johannisbeeren enthalten 9,8 bzw. 8,6 g GSE/100 g (Junker, 2018). Florian Junker konnte auch in den säureunlöslichen Rückständen der Bestimmung des Klason-Lignins der Beerenobstsorten Überreste von assoziierten PA quantifizieren. Im Fall der Aroniabeersamen



konnte ein PA-Gehalt von 20,1 g GSE/100 g im Klason-Rückstand quantifiziert werden. Die Klason-Lignin-Rückstände von Cranberrysamen und den Samen der Roten Johannisbeere weisen PA-Gehalte von 5,1 bzw. 4,7 g GSE/100 g auf. Die Ergebnisse zeigen, dass die vorhandenen assoziierten PA in den Beerensamen die Bestimmung des Ligningehalts ebenfalls beeinträchtigen. Besonders im Fall der Aroniabeere ist davon auszugehen, dass der Hauptanteil des Klason-Lignins in Wirklichkeit auf zellwandassoziierte PA zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit den sehr schwachen, Monolignole repräsentierenden Signalen in der Thioacidolyse der UBS der Aroniabeersamen. Im Fall der Samen der Cranberry und Roten Johannisbeere deuten die Ergebnisse eher auf ein paralleles Auftreten der beiden phenolischen Polymere hin.

In keiner der Ballaststofffraktionen der Himbeersamen konnten mittels des BuOH-HCl-Assays assoziierte PA quantifiziert werden. Die Messwerte lagen deutlich unterhalb des niedrigsten Kalibrierpunktes und teilweise nur knapp oberhalb des Blindwerts. Eine Wiederholung mit höheren Einwaagen war aufgrund des begrenzten Probenmaterials nicht möglich. Die Untersuchung lässt dennoch den Schluss zu, dass in den Samen der Himbeere nur sehr wenig zellwandassoziierte PA vorhanden sind und diese folglich nicht zu einer etwaigen Überbestimmung des Ligningehalts beitragen. Kosmala und Mitarbeiter quantifizierten die PA in entfetteten Himbeersamen unter Anwendung der Phloroglucinolyse und konnten 0,37 g/100 g bestimmen (Kosmala *et al.*, 2015). Die Autoren geben zudem ein DP von 2,2 an (Kosmala *et al.*, 2015). Im Fall der Ballaststofffraktionen aus Himbeersamen, könnten solche kurzkettigen PA bereits, aufgrund der Aufarbeitungsschritte, bereits extrahiert worden sein. Allgemein spielen in Himbeeren die hydrolysierbaren Tannine eine größere Rolle als die PA bzw. kondensierten Tannine (Nile & Park, 2014).

#### IV. Analyse der Proanthocyanidinstrukturen

Die Strukturen der PA in den Ballaststofffraktionen der Beerensamen wurden mittels Phloroglucinolyse analysiert (siehe 3ell), woraus die vorhandenen PA-Klassen charakterisiert werden können. Eine Auswahl der freigesetzten bzw. umgesetzten Monomere kann zudem mittels publizierter Responsefaktoren quantifiziert werden. Der zugrundeliegende Mechanismus der Methode führt dazu, dass die terminalen Einheiten der PA-Ketten als freie Monomere freigesetzt werden, während die Kettenglieder (sog. Extensionseinheiten) als Phloroglucinaddukte aus der Reaktion hervorgehen. Die Responsefaktoren nach Kennedy & Jones bzw. Koerner und Mitarbeiter ermöglichen lediglich die Quantifizierung der Monomere C/EC, EGallC, ECG und des dimeren Procyanidin A2 sowie deren jeweiligen Phloroglucinaddukte (Kennedy & Jones, 2001; Koerner *et al.*, 2009). Die geringere Säurestärke der Phloroglucinolyse ermöglicht zwar keine absolute Quantifizierung der PA, jedoch können aus den Verhältnissen der Monomere der mittlere DP, das *cis/trans*-Verhältnis und der Galloylierungsgrad abgeschätzt werden. Die begrenzte Anzahl an quantifizierbaren Analyten ist bei der Beurteilung der Ergebnisse und Kennwerte stets zu beachten. Die Proben wurden qualitativ mittels LC-MS und zur Quantifizierung erneut mittels UHPLC-DAD analysiert. Die Daten zu den Ballaststofffraktionen der Samen von Aroniabeeren, Cranberries und Roten Johannisbeeren sind in Tab. 15 zusammengefasst.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 15** Ergebnisse der Phloroglucinyse der Ballaststofffraktionen aus den Samen der Beerenobstsorten. Die Proben wurden von Florian Junker im Rahmen seiner Masterarbeit bearbeitet (Junker, 2018). Die terminalen (t) Einheiten entsprechen unsubstituierten Flavan-3-olen, während die Extensionseinheiten (Ext) den Phloroglucinaddukten entsprechen. Bei den Samen der Cranberry erfolgte aufgrund des Procyanidins A2 (A2) ein zusätzlicher Ansatz mit einer Reaktionszeit von 135 min (Koerner et al., 2009). C, Catechin; DP, Polymerisationsgrad; EC, Epicatechin; ECG, Epicatechingallat; PA, Proanthocyanidin; PC, Procyanidin; PD, Prodelphinidin; PP, Prodelphinidin

		Aroniabeer-samen (20 min)	Cranberry-samen (20 min)	Cranberry-samen (135 min)	Rote Johannisbeer-samen (20 min)
<b>LÖSLICHE BALLASTSTOFFE</b>					
C [mol%]	t-	55	-	14	-
	Ext-	12	-	6	-
EC [mol%]	t-	45	100	80	-
	Ext-	88	100	94	-
EGaIIc [mol%]	t-	-	-	-	-
	Ext-	-	-	-	-
ECG [mol%]	t-	-	-	-	-
	Ext-	-	-	-	-
A2 [mol%]		-	-	6	-
PA-Klassen		PC	PC	PC	-
mittlerer DP		4,7 ± 0,2	4,2 ± 0,2	5,1 ± 0,1	-
cis/trans-Verhältnis		3,8 ± 0,2	nur cis-Epimer	11,4 ± 0,1	-
Galloylierungsgrad [%]		-	-	-	-
<b>UNLÖSLICHE BALLASTSTOFFE</b>					
C [mol%]	t-	22	12	9	-
	Ext-	10	4	3	16
EC [mol%]	t-	78	72	58	-
	Ext-	90	96	97	64
EGaIIc [mol%]	t-	-	-	-	-
	Ext-	-	-	-	21
ECG [mol%]	t-	-	-	-	100
	Ext-	-	-	-	-
A2 [mol%]		-	16	32	-
PA-Klassen		PC, PP	PC	PC	PC & PD
mittlerer DP		18,6 ± 0,6	5,4 ± 0,1	4,7 ± 0,1	17,4 ± 0,7
cis/trans-Verhältnis		8,4 ± 0,1	17,5 ± 0,3	21,2 ± 0,6	5,8 ± 0,1
Galloylierungsgrad [%]		-	-	-	5,8 ± 0,2
<b>DRISELASE-VERDAUTE UNLÖSLICHE BALLASTSTOFFE</b>					
C [mol%]	t-	22	11	9	-
	Ext-	10	4	3	15
EC [mol%]	t-	78	72	58	-
	Ext-	90	96	97	69
EGaIIc [mol%]	t-	-	-	-	-
	Ext-	-	-	-	17
ECG [mol%]	t-	-	-	-	100
	Ext-	-	-	-	-
A2 [mol%]		-	17	33	-
PA-Klassen		PC	PC	PC	PC & PD
mittlerer DP		19,4 ± 0,2	5,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1	12,8 ± 0,8
cis/trans-Verhältnis		8,6 ± 0,1	18,9 ± 0,4	21,2 ± 1,0	5,6 ± 0,2
Galloylierungsgrad [%]		-	-	-	7,8 ± 0,5

In den Ballaststofffraktionen der Aroniabeersamen konnten mittels Phloroglucinolyse sehr deutliche Signale von PA-Monomeren nachgewiesen werden. Anhand des Fragmentierungsmusters und veröffentlichter Daten, wurden die Peaks den Monomeren C und EC sowie deren jeweiligen Phloroglucinaddukten zugeordnet (Junker, 2018). PA, die ausschließlich aus diesen beiden Monomeren bestehen, werden auch als Procyanidine bezeichnet. Die Anteile an EC sind höher als die von C, was sich in *cis/trans*-Verhältnissen von 3,8 in den LBS bzw. 8,4 und 8,6 in den beiden UBS-Fractionen widerspiegelt. Hinsichtlich der molaren Verhältnisse ihrer PA-Monomere sind UBS und Driselase-verdaute UBS identisch. Die Literatur beschreibt die PA der Aroniabeersamen als EC-reich mit einem mittleren DP von 15,5 (Sójka *et al.*, 2013). Die LBS der Aroniabeersamen weisen assoziierte Procyanidine mit einem mittleren DP von 4,7 auf, während die Procyanidine in den UBS und den Driselase-verdauten UBS mittlere Kettenlängen von 18,6 bzw. 19,4 erreichen. Die Autoren beobachteten den gleichen Zusammenhang mit steigendem Galloylierungsgrad und mit steigendem C-Anteil. In keiner der Ballaststofffraktionen der Aroniabeersamen konnte jedoch ECG nachgewiesen werden. In den UBS der Aroniabeersamen wurde jedoch ein zusätzliches Signal mit einem  $m/z$  von 399 und dem charakteristischen Fragmentierungsmuster der Flavan-3-ol-Phloroglucinaddukte identifiziert (Junker, 2018). In den UBS aus Weinbeersamen konnte nach Anwendung der Phloroglucinolyse das gleiche Signal beobachtet werden. Das Fragmentierungsspektrum des entsprechenden Peaks ist in Abb. 37 dargestellt. Untermauert durch publizierte Fragmentierungsmechanismen anderer Flavan-3-ole wurde dieses Signal auf die Phloroglucinaddukte von A bzw. EA zurückgeführt (Li & Deinzer, 2007; Junker, 2018). Die Fragmente mit den  $m/z$  381 und 273 sprechen für die Abspaltung von Wasser und Phloroglucin. Das Fragment mit dem  $m/z$  263 entspricht dem Produkt der Retro-Diels-Alder-Spaltung eines PA, welches am B-Ring eine Hydroxylgruppe weniger aufweist als beispielsweise C und EC. Eine analoge Fragmentierungsreaktion wurde bereits an oligomeren PA mit A-Einheiten beobachtet (Buendia *et al.*, 2010). Das Vorkommen von A/EA bzw. von Propelargonidinen ist für Aroniabeeren bisher nicht nachgewiesen. Trotz der deutlichen Hinweise in den UBS der Samen kann die Identität des Phloroglucinaddukts von A/EA jedoch ohne Vergleichsmessung einer Standardsubstanz nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

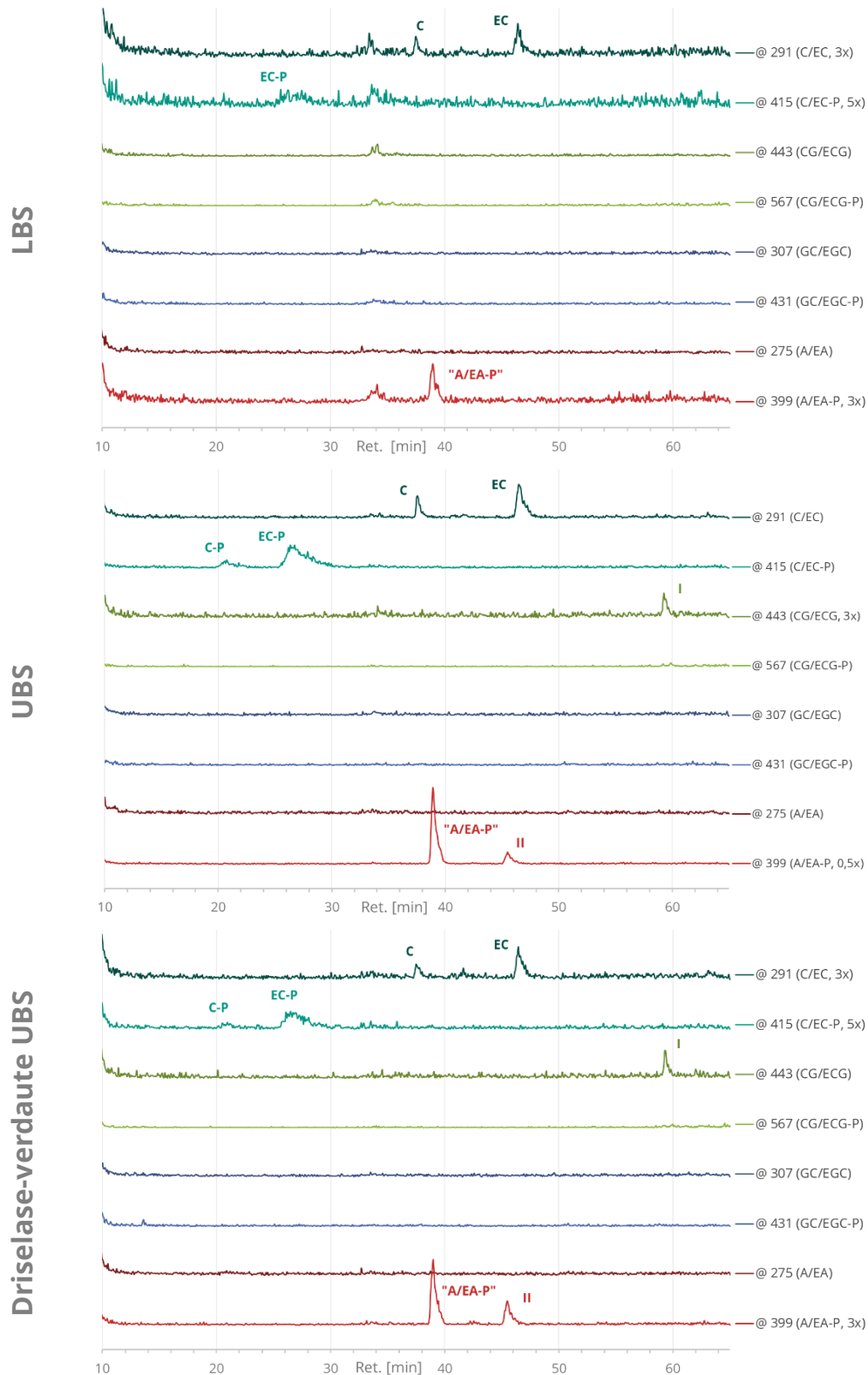
Die Ballaststofffraktionen aus den Samen der Cranberry erforderten zur strukturellen Aufklärung ihrer assoziierten PA eine Modifikation der Phloroglucinolyse. Der seltene A-Bindungstyp an den terminalen Enden der PA aus Cranberries wird erst durch verlängerte Reaktionszeiten in der Phloroglucinolyse korrekt abgebildet (Koerner *et al.*, 2009). Bei der üblichen Reaktionszeit von 20 min bleiben in solchen Fällen vermehrt PA-Trimere zurück. Erst nach der verlängerten Reaktionszeit von 135 min werden daraus Dimere mit dem A-Bindungstyp (insb. Procyanidin A2) freigesetzt. Aufgrund des zwischenzeitlich möglichen Abbaus von bereits freigesetzten Monomeren wurden beide Reaktionszeiten auf die Proben der Cranberrysamen angewendet (Junker, 2018). Aus beiden Ansätzen geht hervor, dass die zellwandassoziierten PA der Ballaststofffraktionen der Cranberrysamen ausschließlich aus Procyanidinen bestehen. Dementsprechend konnten lediglich die terminalen bzw. verlängerten Einheiten von C/EC und das Procyanidin A2 (EC-EC-Dimer) bestimmt werden. Eine Veresterung mit Gallussäure liegt ebenfalls nicht vor. Dennoch konnten in den

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Chromatogrammen im Bereich des Procyanidins A2 weitere Signale mit identischem  $m/z$  und Fragmentierungsverhalten beobachtet werden, die womöglich auf isomere Dimere zurückgehen (Junker, 2018). Die Anteile an EC sind erneut deutlich höher als die von C. Die *cis/trans*-Verhältnisse liegen zwischen 11,4 und 21,2, und in den LBS der Cranberrysamen konnten nach einer Reaktionszeit von 20 min sogar ausschließlich EC und das EC-Phloroglucinaddukt bestimmt werden. Erst nach der verlängerten Reaktionszeit waren in den LBS der Cranberrysamen C und das Procyanidin A2 bestimmbar. Auch in den übrigen Ballaststofffraktionen erhöhen sich die Anteile an Procyanidin A2 nach 135 min deutlich. Die Zusammensetzung der PA in den jeweiligen UBS und Driselase-verdauten UBS sind erneut sehr ähnlich. Die mittleren DP liegen zwischen 4,2 und 5,6. In der Literatur sind für ganze Cranberries unter Anwendung der Thiolyse mittlere DP von 15,3 beschrieben (Gu *et al.*, 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Probenmaterialien, den methodischen Unterschieden und der Problematik der Unterbestimmung durch vorhandene Di- und Trimere, sind solche Abweichungen nachvollziehbar.

Die Ballaststofffraktionen der Samen aus Roten Johannisbeeren wiesen Signale von deutlich geringerer Intensität auf als die Samen der Aroniabeere und Cranberry (Junker, 2018). In den LBS konnten beispielsweise keine PA-Monomere bestimmt werden. Indessen weisen die UBS und Driselase-verdauten UBS erneut eine beinahe identische Zusammensetzung der Monomere von zellwandassoziierten PA auf. Neben C und EC konnten ECG und EGallC als PA-Bausteine in den Samen der Roten Johannisbeere nachgewiesen werden (Junker, 2018). Die assoziierten PA der Samen von Roten Johannisbeeren können insofern als Gemisch aus (teilweise mit Gallussäure veresterten) Procyanidinen und Prodelphinidinen bezeichnet werden. Wie zuvor überwiegt der Anteil der *cis*-Isomere. Die mittleren DP der beiden Fraktionen liegen bei 17,4 und 12,8. Als einziges freies Monomer wurde ECG quantifiziert, wonach dieses theoretisch das terminale Ende jeder PA-Kette darstellt. Dies sollte jedoch aufgrund der geringen Signalintensitäten nicht als Regelfall interpretiert werden. Der Galloylierungsgrad der Fraktionen liegt bei 5,8 bzw. 7,8 %. In der Literatur ist bisher lediglich bekannt, dass die PA aus Roten Johannisbeeren, analog zu Schwarzen Johannisbeeren, langkettige Procyanidine und Prodelphinidine darstellen (Wu *et al.*, 2004; Hellström *et al.*, 2009).

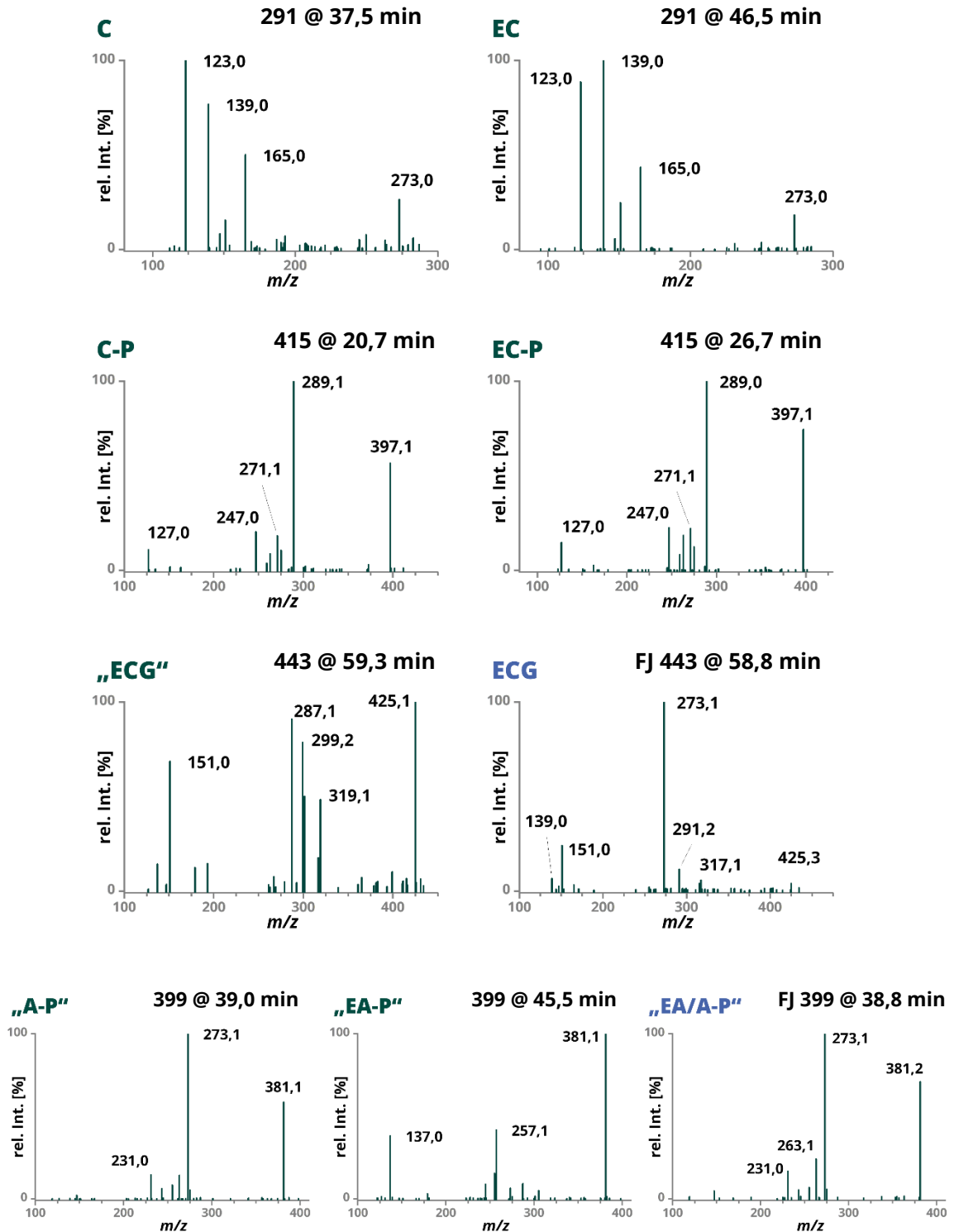
e. Charakterisierung assoziierter phenolischer Polymere in den Samen der Beerenobstsorten



**Abbildung 36** Chromatogramme (LC-MS) der Reaktionsprodukte nach Anwendung der Phloroglucinyse auf Ballaststofffraktionen aus den Samen von Himbeeren. Dargestellt sind die „Selected Ion Monitoring“-Spuren von Proanthocyanidinmonomeren und deren Phloroglucinaddukte. Anführungszeichen deuten auf Analyten hin, deren Identität nicht zweifelfrei aufgeklärt ist. Die Signale I und II konnten nicht identifiziert werden. A, Afzelechin; C, Catechin; CG, Catechingallat; EA, Epiafzelechin; EC, Epicatechin; ECG, Epicatechingallat; EGC, Epigallocatechin; GC, Gallocatechin; LBS, lösliche Ballaststoffe; -P, Phloroglucinaddukt; UBS, unlösliche Ballaststoffe

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Die Ballaststofffraktionen der Himbeersamen wurden der Phloroglucinolyse unterworfen und mittels LC-MS und UHPLC analysiert. Die mittels UHPLC-DAD detektierten Signale waren jedoch zu gering für eine Quantifizierung mittels UHPLC-DAD. Bei den übrigen Proben der Beerenobstsorten konnten den HSQC-Spektren konkrete Hinweise auf PA-Monomere entnommen werden. Im HSQC-Spektrum der UBS aus Himbeersamen sind jedoch keine entsprechenden Signale erkennbar (siehe Abb. A80). Die Strukturen der zellwandassoziierten PA der Himbeersamen können folglich nur anhand der LC-MS-Daten qualitativ analysiert werden. In Abb. 36 sind die Chromatogramme der beobachteten Massenspuren der drei Ballaststofffraktionen aus Himbeersamen dargestellt. Wie in den Proben zuvor wiesen die LBS geringere Signale auf als die UBS und die Driselase-verdauten UBS. Die Signale von C und EC und ihre jeweiligen Phloroglucinaddukte konnten anhand ihrer Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster zugeordnet werden (Li & Deinzer, 2007; Liang *et al.*, 2012; Junker, 2018). Die Fragmentierungsmuster der zugeordneten Signale sind in Abb. 37 zusammengestellt. Die Spur des  $m/z$  443 zeigt bei einer Retentionszeit von 59,3 min ein Signal (Peak I), welches auf den ersten Blick ECG zugeordnet werden könnte (siehe Abb. 36). Doch der Vergleich mit Daten aus der Masterarbeit von Florian Junker und publizierten Daten von Liang und Mitarbeitern macht deutlich, dass das Fragmentierungsmuster nicht mit dem von ECG übereinstimmt (siehe Abb. 37; Liang *et al.*, 2012; Junker, 2018). Die Identität des Analyten bleibt demnach ungewiss. Wie bereits in Aroniabeersamen finden sich in den beiden UBS-Fractionen der Himbeersamen ebenfalls Signale mit dem  $m/z$  399. Das erste Signal stimmt hinsichtlich der Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters mit dem entsprechenden Signal der Weinbeersamen überein (siehe Abb. 37). Das zweite Signal (Peak II) bei 45,5 min zeigt jedoch ein anderes Muster und kann nicht zugeordnet werden. Wie zuvor erläutert ist eine eindeutige Zuordnung des Signals zu A oder EA anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Die Daten können jedoch verwendet werden, um die Hypothese aufzustellen, dass Propelargonidine in den Ballaststoffen aus Himbeersamen zellwandassoziiert vorliegen. Das Vorkommen von Propelargonidinen in ganzen Himbeeren ist bereits nachgewiesen (Gu *et al.*, 2003; Hellström *et al.*, 2009). In den Samen einer Himbeerkreuzung, der Boysenbeere (*Rubus ursinus* × *idaeus*), konnten A/EA ebenfalls als Extensionseinheiten nachgewiesen werden (Furuuchi *et al.*, 2011). Darüber hinaus liefern die MS-Daten aus der Anwendung der Phloroglucinolyse auf die Ballaststoffe aus Himbeersamen keine Hinweise für weitere Monomere bzw. Prodelphinidine.



**Abbildung 37** MS-Spektren der Produkte nach Anwendung der Phloroglucinolyse auf die unlöslichen Ballaststoffe aus Himbeersamen. Die Spektren zeigen die Fragmentierung (vgl. Abb. 36) bestimmter Masse-zu-Ladung-Verhältnisse von Quasimolekülonen ( $[M+H]^+$ ) zu den entsprechenden Retentionszeiten ( $m/z$  @ Ret.). Anführungszeichen deuten auf Analyten hin, deren Identität nicht zweifelfrei aufgeklärt ist. Die Spektren mit blauen Titeln wurden den Daten von Florian Junker (FJ) entnommen und stammen von vergleichbaren Proben aus Weinbeersamen (Junker, 2018). A, Afzelechin; EA, Epiafzelechin; C, Catechin; EC, Epicatechin; ECG, Epicatechingallat; -P, Phloroglucinaddukt

##### f. Zusammenfassende Diskussion

Unter Anwendung bewährter, neu etablierter und speziell entwickelter Methoden wurden die polymeren Strukturen der Zellwände von Aroniabeeren, Cranberries, Himbeeren und Roten Johannisbeeren umfassend analysiert. Zudem konnten durch die Fraktionierung der Früchte die Gehalte und Zusammensetzungen der jeweiligen Zellwandkomponenten der Fruchtgewebe in Relation zueinander betrachtet werden. So erwiesen sich die frischen Beeren als gute Ballaststoffquellen. Bei deren Verarbeitung liegt das Hauptaugenmerk jedoch zumeist auf dem Saft bzw. Fruchtfleisch. Die Fraktionierung der Früchte verdeutlichte, dass dabei ein großer Teil der Trockenmasse der Früchte außer Acht gelassen wird. So zeigte sich, dass bis zur Hälfte des Trockengewichts der Früchte auf ballaststoffreiche Pflanzengewebe, wie die Samen oder vaskuläre und epidermale Gewebe, zurückgeht. Demgemäß wurden die vier Beerenobstsorten im Ganzen sowie deren jeweiligen angereicherten Fruchtgewebe erstmals umfassend hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Ballaststoffkomponenten charakterisiert.

Zunächst wurden die Ballaststoffpolysaccharide in den ganzen Früchten, den Fruchtfleischfraktionen, den Fruchtrückständen (Pressrückstand ohne Samen) und den Samen anhand ihrer Monosaccharidbausteine charakterisiert. Durch die Analyse der Bindungstypen in den Polysacchariden der ganzen Früchte und den Samen konnten die Ballaststoffpolysaccharide eingehender klassifiziert und weitere strukturelle Erkenntnisse gewonnen werden. Zusätzlich wurde eine neue Profilingmethode zur gezielten Charakterisierung von XyG-Strukturen entwickelt. Die enzymatisch-ionenchromatographische Methode ermöglicht eine spezifische und effiziente Analyse von XyG. Die XyG-Profilingmethode mittels HPAEC-PAD/MS basiert auf 23 XGO-Standardsubstanzen, von denen 19 aus Zellwandmaterial isoliert, aufgereinigt und strukturell aufgeklärt wurden. Unter Anwendung der ermittelten RRF können die XyG-Strukturen vieler lebensmittelrelevanter Dikotyledonen anhand enzymatisch freigesetzter XGO erstmalig charakterisiert werden.

Darüber hinaus wurde die Bestimmung der Ligningehalte bzw. die Aufklärung der Ligninstrukturen in den Zellwänden der Samen der vier Beerenobstsorten angestrebt. Im Zuge dieser Analysen wurde auch das Vorkommen von Catechyl-Lignin in den Samen überprüft (Chen *et al.*, 2012). Dieses konnte jedoch in keiner der vier Samenproben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Methoden zur Bestimmung des Ligningehalts erwiesen sich aufgrund von zellwandgebundenen PA als fehlerbehaftet. Die Überbestimmung des Ligningehalts aufgrund von weiteren Biopolymeren der pflanzlichen Zellwand wie Cutin, Suberin, Wachsen und PA ist ein bekanntes analytisches Problem (Saura-Calixto *et al.*, 1991; Mañas *et al.*, 1994; Goñi *et al.*, 2009; Bunzel *et al.*, 2011). Die Interferenzen der beiden Substanzklassen (Lignin und PA) konnte in der gravimetrischen, kolorimetrischen und ebenso in der NMR spektroskopischen Analytik beobachtet werden. Letztlich lieferten die Daten aus der 2D-Zellwandgel-NMR den Hinweis auf zellwandassoziierte PA in den Samen der Beerenobstsorten (Zeller *et al.*, 2015; Eichhöfer, 2017). Die daran anknüpfende Analyse der PA-Gehalte in den Samen der Beerenobstsorten erforderte die Etablierung PA-spezifischer Methoden in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie. Unter Anwendung eines aus Weinbeersamen isolierten PA-Standards im BuOH-HCl-Assay und der



Phloroglucinolyse konnten die PA-Gehalte und -Strukturen in den Samen analysiert werden (Junker, 2018). Zudem gelang anhand der ermittelten PA-Gehalte in den säureunlöslichen Rückständen der Klason-Ligninbestimmung der Nachweis, dass Klason-Ligningehalte aufgrund der teilweisen Mitbestimmung von PA überbestimmt werden. Unter Verwendung des reinen PA-Standards, wurde ebenfalls die Überbestimmung des Ligningehalts durch PA bei Anwendung der ABSL-Methode nachgewiesen. Schließlich konnte für jeden Samen das Ausmaß der Beeinflussung der Ligninanalytik durch PA eingeordnet werden. Die dargestellten Ergebnisse für die vier Beerenobstsorten sind in dieser Hinsicht exemplarisch für die nötige Vorsicht, die bei der Bewertung von Ergebnissen der Ligninanalytik aus nativen Zellwandproben walten sollte. Insbesondere bei der Analyse von Lebensmittelpflanzen sollten aufgrund der gesundheitsbezogenen Eigenschaften unterschiedlicher Lebensmittelinhaltsstoffe die Spezifität und Aussagekraft der Analyseergebnisse stets hinterfragt werden. Im Folgenden sollen nun die zusammengetragenen Erkenntnisse aus den unterschiedlichen Analysen für jede Frucht rekapituliert und eingeordnet werden.

Für die Aroniabeere konnte anhand der gesammelten Daten nachgewiesen werden, dass die Ballaststofffraktionen reich an Cellulose, Xylanen und RGI mit Arabinanseitenketten sind. Während in den LBS-Fraktionen lösliche Mannane offensichtlich eine Rolle spielen, wiesen XyG in allen Fraktionen nur geringe Anteile auf. XyG wird in den Primärzellwänden dikotyler Pflanzen aufgrund ihrer Beteiligung am Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk funktionell und quantitativ ein hoher Stellenwert zugesprochen (Fry, 1989). Die Daten der Ballaststofffraktionen aus Aroniabeeren wiesen jedoch Xylane als dominante Hemicellulose aus. Dies lässt darauf schließen, dass in Aroniabeeren entweder der Sekundärzellwandanteil deutlich überwiegt, oder dass XyG womöglich auch funktionell einen geringeren Stellenwert einnehmen. Neben HG wiesen die Pektinfraktionen der Aroniabeere moderat verzweigte Arabinane als RGI-Seitenketten auf. Während in den UBS AGI dominierte, zeigten sich in den LBS zusätzlich hohe Anteile an AGII. Die Zusammensetzung der Ballaststoffpolysaccharide in den Aroniabeersamen war vergleichbar mit der Zusammensetzung der Ballaststoffpolysaccharide der übrigen Gewebe. Die Verhältnisse deuten jedoch auf höhere Anteile an Cellulose und unlöslichen Arabinanen in den UBS sowie höhere Anteile an Hemicellulosen (Xylane und Mannane) in den LBS der Aroniabeersamen hin. Durch Anwendung der neu entwickelten XyG-Profilierungsmethode wurde gezeigt, dass Aroniabeeren und ihre Samen entsprechend ihrer phylogenetischen Gruppe fucosylierte XyG im Substitutionsmuster XXXG aufweisen. Nur wenige der XyG-Seitenketten lagen als unfucosylierter L-Baustein vor. Die Analyse der Ligninstrukturen zeigte, dass die Zellwände der Samen von Aroniabeeren in nur sehr geringem Ausmaß lignifiziert vorliegen. Sowohl die Ergebnisse der Klason-Ligninmethode als auch der ABSL-Methode wurden durch die hohen Gehalte an zellwandassoziierten Procyanidinen verfälscht. Darüber hinaus lieferten die Daten erstmalig einen Hinweis auf das Vorkommen von Propelargonidinen in Aroniabeeren.

Die Ballaststoffpolysaccharide der Cranberry und der entsprechenden Fruchtwewe zeichnen sich ebenfalls durch hohe Anteile an Cellulose, Xylane und RGI mit Arabinanseitenketten aus. Der Anteil der XyG in den Ballaststoffen der ganzen Frucht war erneut eher gering. Dies führt, wie zuvor beschrieben, zu dem Schluss, dass in Cranberries

entweder Sekundärzellwände überwiegen oder der Stellenwert von XyG allgemein geringer ausfällt. Zudem lieferten die Daten Hinweise auf das Vorliegen geringer Anteile an Galactomannanen. Sowohl in den UBS als auch in den LBS konnten beträchtliche Anteile an verzweigten Arabinanen nachgewiesen werden. Der Verzweigungsgrad der Arabinane ist mit dem der Aroniabeere vergleichbar, indessen fielen die LBS der ganzen Frucht durch einen hohen Anteil an doppelt verzweigten Ara-Bausteinen auf. Zusätzlich konnte AGII nachgewiesen werden. Die UBS der Samen wiesen eine sehr ähnliche Zusammensetzung der Monosaccharide auf wie die UBS der übrigen Gewebefractionen. Die Untersuchung der Polysaccharidbindungstypen spricht jedoch dafür, dass in den Samen vermehrt XyG und Galactane auftreten. Die Analyse der XyG-Strukturen ergab, dass die Cranberry und ihre Samen eine außerordentliche Vielfalt an XyG-Seitenketten aufweisen. Die hohe Anzahl an XGO-Signalen verhinderte eine semiquantitative Auswertung der Daten. Mit Ausnahme von GGGG wurden alle XGO nachgewiesen, die zur Entwicklung der Profilingmethode isoliert wurden. So konnten, neben den vielen unterschiedlichen XGO mit S-Baustein, auch fucosylierte XGO nachgewiesen werden. Viele der Motive, insbesondere Gal- und Fuc-haltige, wurden erstmalig in Cranberries nachgewiesen. Zudem stellt das gemeinsame Vorkommen von F- und S-Bausteinen in den XyG einer Spezies ein bisher nur selten beschriebenes Merkmal dar. Entgegen der üblichen Gesetzmäßigkeit weichen die XyG-Strukturen der Cranberry von den bisher berichteten Strukturen innerhalb ihrer phylogenetischen Gruppe ab (Schultink *et al.*, 2014). Im Gegensatz zum S-Baustein wurde das F-Motiv in der Ordnung Ericales bereits beschrieben. Die Analyse der Lignin- und PA-Strukturen in den Cranberrysamen führte zu dem Ergebnis, dass in den Samen beide phenolischen Polymere vorhanden sind und die PA zu Überbestimmungen des Ligningehalts führen können. So konnten S- und G-Lignineinheiten und kurzkettige assoziierte Procyanidine, mit Procyanidin A2 als häufig auftretender Endgruppe, nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide der Himbeere ergab, dass erneut vorwiegend Cellulose, arabinanreiches RGI und Xyl-haltige Hemicellulosen vorhanden sind. Im Fall der UBS der ganzen Himbeere konnte den XyG ein deutlicher Anteil an den Zellwänden zugeschrieben werden. Damit entspricht die Zellwandarchitektur der Himbeere eher den üblichen Merkmalen von dikotylen Pflanzenzellwänden als die der Aroniabeere und Cranberry. Im Gegensatz zu den beiden Früchten zuvor sowie zu den Himbeersamen weisen die UBS der ganzen Himbeere nur geringe Anteile an Xylanen auf. Auch der Anteil an unlöslichen Pektinen ist in den UBS der Himbeere geringer als bei den Früchten zuvor. In den LBS dominieren GalA und Ara, woraus neben HG hohe Anteile an RGI mit Arabinanseitenketten abgeleitet werden können. Die Verzweigungen der Arabinane sind häufiger und vielfältiger als in den beiden zuvor beschriebenen Früchten. Zudem konnte AGII nachgewiesen und Hinweise auf Heteromannane erbracht werden. In den UBS der Samen wurden deutlich mehr Xylane als XyG nachgewiesen. Der Anteil an unlöslichen Pektinen in den UBS ist noch geringer als in den UBS der ganzen Frucht. Die Arabinane in den LBS der Samen waren deutlich weniger verzweigt als in der ganzen Himbeere. Heteromannane wurden erneut mit geringen Anteilen als lösliche Hemicellulosen nachgewiesen. Erneut war AGII dominanter als Galactane. Das XyG-Profil zeigt, dass Himbeeren und ihre Samen fucosylierte XyG im

Substitutionsmuster XXXG aufweisen. Die Himbeere und die Aroniabeere sind als Rosaceen Mitglieder derselben phylogenetischen Gruppe. Generell weisen die beiden Früchte ähnliche XyG-Strukturen auf, jedoch konnten in den Proben der Himbeere höhere Anteile an unfucosylierten Gal-Seitenketten nachgewiesen werden. Die Untersuchungen hinsichtlich der Lignin- und PA-Gehalte zeigten, dass Lignin das dominante phenolische Polymer in den Samen der Himbeere darstellt. Der Gehalt an PA war zu gering, um mittels der etablierten Methodik bestimmt zu werden. Folglich sind die ermittelten Ligningehalte der Himbeersamen mit 23 - 35 g/100 g UBS nicht oder nur unwesentlich durch assoziierte PA verfälscht. Neben der G-Einheit als dominante Ligninstruktureinheit konnte die H-Einheit nachgewiesen werden. Anhand der qualitativen Auswertung der PA-Analytik wurden Procyanidine in den Himbeersamen nachgewiesen. Wie bei den Aroniabeersamen konnten Hinweise auf Propelargonidine erbracht werden.

Die Zusammensetzung der Ballaststoffpolysaccharide aus ganzen Roten Johannisbeeren wird durch die Speicherpolysaccharide in den Samen dominiert. So zeigte sich, dass die Ballaststoffe der Samen der Roten Johannisbeere zu großen Teilen aus Mannanen bestehen. Aufgrund des hohen Anteils der Samen an der Trockenmasse der Roten Johannisbeere spiegelte sich dies in den hohen Man-Anteilen in der Monosaccharidzusammensetzung der Ballaststoffe der ganzen Frucht wider. Während die Anteile an Man in den Ballaststofffraktionen der Samen 60 - 80 mol% erreichten, lagen die Anteile im Fruchtfleisch und dem Fruchtrückstand bei unter 10 mol%. Die Zusammenlagerung der linearen Man-Ketten zu kristallinen Strukturen könnte mitunter ein Grund für die auffällig hohe Festigkeit der Samen sein. Abgesehen von Mannanen konnten in den Samen der Roten Johannisbeere Cellulose, Arabinane und Gal-haltige Pektine nachgewiesen werden. Anhand der Daten der ganzen Frucht konnte abgeleitet werden, dass die UBS der Roten Johannisbeere, nach Mannanen und Cellulose, Xylane und AGI enthalten, während in den LBS neben RGI und HG XyG und Galactane vorliegen. AGII wurde in beiden Fraktionen festgestellt. Die Arabinane wiesen einen moderaten Verzweigungsgrad auf. Die Zellwandarchitektur des Fruchtfleischs und Fruchtrückstands wies mit hohen Anteilen an Cellulose, Pektinen (HG sowie RGI), Xyl-haltigen Hemicellulosen sowie unauffälligen Anteilen an Mannanen wieder eine charakteristischere Polysaccharidzusammensetzung von dikotylen Pflanzen auf. Die Anwendung des XyG-Profilings auf die Ballaststoffe der Roten Johannisbeere ergab, dass auch darin fucosylierte XyG im Substitutionsmuster XXXG vorliegen. Auffällig war der deutlich höhere Anteil an unsubstituierten Gal-Seitenketten in den UBS der ganzen Frucht im Vergleich zu den LBS. Noch ungewöhnlicher war jedoch das hohe Vorkommen von unsubstituierten XGO (GG, GGG und GGGG) in den UBS der Samen. Der Ursprung dieser Oligosaccharide blieb ungewiss. Anhand der Kontrollprobe ist gesichert, dass die Oligosaccharide durch die XEG freigesetzt wurden. Zudem wies das Enzym eine Nebenaktivität gegenüber MLG auf. Ansonsten könnte das Fehlen von Seitenketten auch auf die mechanische Beanspruchung bei der Vermahlung der robusten Samen zurückgeführt werden. Wie im Fall der Aroniabeersamen führte die Analyse der Ligninstrukturen in den Samen der Roten Johannisbeere mittels Thioacidolyse trotz eines Klason-Ligningehalts von 10,8 g/100 g UBS lediglich zu sehr schwachen Signalen. Die PA-Analytik bestätigte indessen das Vorkommen von PA.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Dementsprechend konnte erneut eine Überbestimmung der Ligningehalte durch zellwandassoziierte PA nachgewiesen werden. Die Strukturanalyse der PA ergab, dass die UBS der Samen der Roten Johannisbeere langkettige Procyanidine und Prodelphinidine enthalten. Zusätzlich konnte erstmals das Vorkommen von ECG in Roten Johannisbeeren beschrieben werden.

Die gewonnenen Daten erweitern den Kenntnisstand über vorhandene polymere Strukturen in Aroniabeeren, Cranberries, Himbeeren und Roten Johannisbeeren. Die vier Früchte aus verschiedenen dikotylen Pflanzen weisen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung ihrer Ballaststoffkomponenten auf. So waren in manchen Fruchtgeweben die XyG weniger dominant als in der Literatur für Zellwände des Typs I beschrieben und wurden häufig von Xylanen aus der Sekundärwand dominiert. Seitens der Pektine zeigte sich, dass RGI mit Arabinanseitenketten vergleichbar hohe und bisweilen sogar höhere Anteile an den Ballaststoffpolysacchariden einnimmt als HG. Auch die Samen der unterschiedlichen Fruchttypen unterscheiden sich untereinander hinsichtlich ihres Anteils an der gesamten Frucht, ihrer Härte, der Zusammensetzung der Ballaststoffpolysaccharide und der phenolischen Polymere. Dies unterstreicht, dass Beerenobst als heterogene Gruppe aus botanisch unterschiedlichen Früchten in ihren Eigenschaften als Nahrungsmittel differenziert betrachtet werden sollten. Die gesammelten Erkenntnisse zu den analysierten Beerenobstsorten und ihren Gewebefractionen eröffnen einen neuen Blickwinkel auf deren ernährungsphysiologischen und technologischen Wert. Die Variabilität in der Ballaststoffzusammensetzung ist jedoch aufgrund fehlender abschließender wissenschaftlicher Erkenntnisse zu den Einflüssen der Ballaststoffzusammensetzung auf die Fermentation im Dickdarm bzw. die Darmmikrobiota nur schwierig mit der Ernährungsphysiologie in Verbindung zu bringen. Es ist nicht möglich, anhand der Ballaststoffzusammensetzung konkrete ernährungsphysiologische Eigenschaften abzuleiten. Die hier gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Lignin/PA-Gehalte der Beerenobstsamen stellen einen ersten Ausgangspunkt dar, um zu bewerten, ob phenolische Polymere zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen aus Beerenobst beitragen können. Eine korrekte Differenzierung zwischen Lignin und PA in Ballaststoffen ist im Zuge solcher Fragestellungen von hoher Bedeutung. So würden beispielsweise bei den PA-reichen Samen der Aroniabeere andere physiologische Wirkungen im Fokus stehen als bei den ligninreichen Himbeersamen.

Die gesammelten Daten der einzelnen Fruchtgewebe ermöglichen zudem, die Anteile und Feinstrukturen der Ballaststoffkomponenten in den Pressrückständen der vier Früchte besser einzuordnen. In Anbetracht der flächendeckend zu geringen Aufnahme von Ballaststoffen in der Bevölkerung verdienen entsprechende Nebenprodukte der Fruchtverarbeitung mehr Beachtung. Verschiedene Beerentrester wurden bereits als wertvolle, jedoch wenig ausgeschöpfte Nebenprodukte erkannt und zur Verbesserung ernährungsphysiologischer und/oder technologischer Eigenschaften in unterschiedlicher Formulierung erprobt (Gouw *et al.*, 2017; Alba *et al.*, 2019; Reißner *et al.*, 2019). Auch aufgrund der enthaltenen Polyphenole stellen die Pressrückstände von Beerenobst sehr attraktive Ausgangsmaterialien dar. Die natürlich miteinander assoziierten Polysaccharide und phenolischen Polymere könnten

gezielt zur gleichzeitigen Anreicherung mit Ballaststoffen und Antioxidantien eingesetzt werden. Um dieses Potential bestmöglich auszunutzen, ist die Aufklärung der enthaltenen Ballaststoffkomponenten als Hauptkomponente der Pressrückstände unerlässlich. Als natürliche Quelle für technologisch funktionelle Polysaccharide weisen beispielsweise auch die Samen der Roten Johannisbeere einen potentiell lebensmitteltechnologischen Mehrwert auf. Die Daten geben Anlass zu der Annahme, dass Samen aus Roten Johannisbeeren, z.B. als Nebenprodukt der Fruchtgeleeherstellung, ein vielversprechendes Ausgangsmaterial für die Gewinnung von linearen Mannanen darstellen. Heteromannane aus Johannisbrotkern-, Guarkern- oder Konjakmehl sind bereits als Gelier- oder Verdickungsmittel zugelassen und im Einsatz. Inwiefern sich die linearen Mannane aus den Samen der Roten Johannisbeere in ihren Eigenschaften von Heteromannanen abgrenzen müssen zukünftige Arbeit zeigen.

Am Beispiel der Beerenobstsorten konnte sowohl die Anwendbarkeit als auch der Mehrwert der entwickelten XyG-Profilierungsmethode gezeigt werden. Selbst bei Proben, deren XyG-Anteil entsprechend der Monosaccharidzusammensetzung und Polysaccharidbindungstypen als gering eingeschätzt wurde, konnten Strukturinformationen zu den XyG gewonnen werden. Am Beispiel der Cranberry wird zudem der hohe Informationsgehalt der Ergebnisse deutlich. Der Reichtum an enzymatisch freigesetzten XGO aus der Cranberry war anhand der Daten der Monosaccharid- und Methylierungsanalyse nicht vorhersehbar. Selbiges gilt für den Nachweis der Fucosylierung der XyG. Die Fuc in den XyG-Seitenketten besitzt auf funktioneller Ebene für XyG eine hohe Relevanz (Levy *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2015), konnte jedoch aufgrund ihres geringen molaren Anteils mit den beiden vorigen Methoden nicht abgebildet werden. Durch Anwendung des entwickelten XyG-Profilings konnten selbst bei Proben mit ähnlichen Kennzahlen (DS, Monomerverteilung der XyG) und XyG-Bausteinen Unterschiede festgestellt werden. Aus den gesammelten Daten der Beerenobstsorten konnten keine Trends oder Zusammenhänge zwischen den Merkmalen der Früchte, Fruchtgewebe oder Ballaststoffen und den XyG-Strukturen abgeleitet werden. Generell bestätigte sich die beachtliche Variabilität der pflanzlichen Zellwand je nach Spezies, Gewebe und Funktion. Weitere polysaccharidspezifische Profilingmethoden könnten in Ergänzung zu den Übersichtsmethoden dazu beitragen, ein detailgetreueres Bild der Feinstrukturen der pflanzlichen Zellwand zu erhalten und Veränderungen der beteiligten Polysaccharidklassen auf Ebene der Monomere gezielt zu beschreiben. So könnte durch den Einsatz des XyG-Profilings ein Monitoring der Zellwandstrukturen bereits während der Züchtung bzw. Wachstum der Pflanze sowie der Reifung, Lagerung, Verarbeitung und Metabolisierung von pflanzlichem Material erfolgen. Die neue Methode stößt jedoch an ihre Grenzen, wenn absolute Quantifizierung, unbekannte XGO oder der Acetylierungsgrad von XyG im Fokus stehen. Zudem müssen stets die variable Zugänglichkeit der XyG-Domänen je nach Probenmaterial und die Nebenaktivitäten des Enzyms berücksichtigt werden.



## 5. Zusammenfassung

Die Anlage einer Zellwand ist ein zentrales Merkmal der pflanzlichen Zelle. Dieser funktionelle Komplex ist ein essentieller Bestandteil der pflanzlichen Physiologie. Darüber hinaus ist die Komposition der Zellwand von entscheidender Bedeutung für die Qualität (insbesondere die Textur) pflanzlicher Lebensmittel, und ihre Komponenten besitzen als Ballaststoffe gesundheitsförderliche Eigenschaften. So stellen Beerenobstsorten sowohl in frischer als auch in verarbeiteter Form einen beliebten und ernährungsphysiologisch positiv bewerteten Bestandteil unserer täglichen Ernährung sowie eine unterschätzte Ballaststoffquelle dar. Trotz des hohen Konsums an Beerenobst mangelt es an detaillierten wissenschaftlichen Erkenntnissen zu der Zusammensetzung und den Strukturen der polymeren Zellwandkomponenten der vielfältigen Früchte. Die strukturelle Charakterisierung der Zellwandarchitektur der Früchte kann dazu beitragen ihren ernährungsphysiologischen Wert sowie die Eigenschaften und Veränderungen ihrer Zellwandkomponenten in den Stadien der Reifung, Lagerung und Verarbeitung wissenschaftlich fundiert einzuordnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Früchte der Aroniabeere (*Aronia melanocarpa*), Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), Himbeere (*Rubus idaeus*) und Roten Johannisbeere (*Ribes rubrum*) hinsichtlich der Anteile und chemischen Zusammensetzung ihrer Ballaststoffpolysaccharide analysiert. Zusätzlich wurden die Früchte jeweils in drei Fraktionen aufgeteilt, in denen Samen, Fruchtfleisch sowie Leit- und epidermales Abschlussgewebe angereichert vorlagen. Diese Fraktionen wurden erstmals einheitlich hinsichtlich ihrer Ballaststoffgehalte und der Zusammensetzung der Ballaststoffpolysaccharide analysiert und verglichen. Die Daten zeigen, dass insbesondere die Samen und die Fraktion aus Leit- und epidermalen Gewebe zum Großteil aus Ballaststoffpolysacchariden bestehen. Diese Polysaccharide wurden nach verschiedenen Säurehydrolysen auf ihre Monosaccharidzusammensetzung sowie mittels der Methylierungsanalyse auf ihre Polysaccharidbindungstypen hin analysiert.

In dikotylen Pflanzen gelten Xyloglucane als vorherrschende und funktionell bedeutsame Hemicellulosen. Aus dem Zellwandkomplex können Xyloglucane und ihre Feinstrukturen jedoch mittels der genannten Übersichtsmethoden nur unzureichend abgebildet werden. Folglich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Xyloglucan-Profilierungsmethode entwickelt, die auf der enzymatischen Freisetzung von Xyloglucanooligosacchariden durch eine xyloglucanspezifische *endo*- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glucanase und anschließender Analyse dieser Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD/MS basiert. Zu diesem Zweck wurden 19 Xyloglucanooligosaccharide aus authentischen Pflanzenproben isoliert, massenspektrometrisch sowie NMR-spektroskopisch strukturcharakterisiert und gemeinsam mit vier kommerziellen Oligosacchariden als Standardsubstanzen etabliert. Die Kopplung aus Anionenaustauschchromatographie mit paralleler elektrochemischer und massenspektrometrischer Detektion erwies sich als optimale Technik für die Analyse der Xyloglucanooligosaccharide.

## 5. Zusammenfassung

Die Analyse der Ballaststoffpolysaccharide der ausgewählten Beerenobstsorten zeigte, dass die Zellwände der vier Früchte aus Cellulose sowie variablen Anteilen verschiedener Hemicellulosen (Xylane, Xyloglucane, Mannane) und Pektinen (Homogalacturonan, Typ I Rhamnogalacturonan mit vorwiegend Arabinanseitenketten, galactosehaltige Polysaccharide) bestehen. Unter den vier Beerenobstsorten zeichnete sich die Himbeere mit Cellulose, Xyloglucanen, arabinanreichem Rhamnogalacturonan Typ I und Homogalacturonan durch eine charakteristische Architektur entsprechend des dikotylen Zellwandtyps I aus. Die Zellwandarchitektur der Aroniabeere hingegen wies verhältnismäßig hohe Anteile an Xylanen sowie Arabinanseitenketten des Typ I Rhamnogalacturonans auf. In der Ballaststoffpolysaccharidzusammensetzung der Roten Johannisbeere dominierten die in den Samen enthaltenen Speicherpolysaccharide (lineare Mannane). Unter Anwendung der Xyloglucan-Profilierungsmethode konnten erstmalig die Strukturelemente der Xyloglucane in den Ballaststofffraktionen der Beerenobstsorten charakterisiert und semiquantitativ bestimmt werden. So entsprechen die Xyloglucanstrukturen der Aroniabeere, Himbeere und der Roten Johannisbeere im Allgemeinen denen ihrer phylogenetischen Gruppe, mit fucosylierten Seitenketten und einem Substitutionsgrad von ca. 70 %. Die Xyloglucane aus den Zellwänden der Cranberry wiesen mit sowohl fucose- als auch arabinosehaltigen Seitenketten eine große und einzigartige Vielfalt an Xyloglucanstrukturen auf.

Allgemein zeigte die Analyse der Zellwandpolysaccharide auf, dass Xyloglucane und Homogalacturonan in den Früchten sowie Fruchtkomponenten einen geringeren Stellenwert aufweisen als für die Zellwände von Dikotyledonen allgemein angenommen wird. So waren Xylane und Rhamnogalacturonan Typ I mit reichhaltigen Arabinanseitenketten als Hemicellulosen bzw. Pektinkomponente quantitativ deutlich relevanter als erwartet. Mit Ausnahme der Roten Johannisbeere unterschieden sich die Fruchtkomponenten der einzelnen Beerenobstsorten vorwiegend hinsichtlich der Anteile der einzelnen Polysaccharidgruppen und nicht in der grundsätzlichen Polysaccharidzusammensetzung. So unterschieden sich die Samen von der gesamten Frucht zumeist hinsichtlich der Anteile der Pektine und Hemicellulosen oder anhand des Verzweigungsgrads der Arabinanseitenketten des Typ I Rhamnogalacturonans.

Als verhärtetes Ausbreitungsorgan der Früchte wurden die Zellwandkomponenten der Samen zudem auf Vorkommen und Strukturen von Lignin und zellwandassoziierten Proanthocyanidinen analysiert. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass zellwandassoziierte Proanthocyanidine in den Samen bei der Anwendung verschiedener Methoden zur Ligninanalytik (Klason-Lignin, acetylbromidlösliches Lignin und Zellwandgel-NMR) zu fehlerbehafteten Ergebnissen führen können. Durch Etablierung und Anwendung des Butanol-HCl-Assays und der Phloroglucinolyse konnten erstmalig Lignin und Proanthocyanidine in den Samen der vier Beerenobstsorten korrekt differenziert werden. Die Daten legen nahe, dass Aroniabeersamen nur geringe Ligningehalte aufweisen und dass insbesondere die hohen Procyanidingehalte bei Anwendung der Ligninanalytik zu Überbestimmungen führen. Gleiches gilt für die Samen der Roten Johannisbeere. Im Fall der Cranberrysamen ist davon auszugehen, dass sowohl Lignin als auch Procyanidine vorhanden sind und dass Procyanidine die Ligninbestimmung beeinflussen können. Neben einem Klason-



Ligningehalt von 26,3 g/100 g Trockengewicht wiesen die Samen der Himbeere nur einen geringen Proanthocyanidingehalt auf, welcher die Bestimmung der Ligningehalte nicht oder nur geringfügig beeinflusst.

Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der analysierten Polysaccharide und assoziierten phenolischen Polymere der Beerenobstsorten unterstreichen die biologische Vielfalt in der Zellwand und somit in der Ballaststoffkomposition. Dies sollte im Zuge der ernährungsphysiologischen Bewertung der Beerenobstsorten und allgemein bei pflanzlichen Lebensmitteln berücksichtigt werden. Der Trester bzw. die Samen der Beerenobstsorten stellen als Nebenprodukte der Verarbeitung vielversprechende Ausgangsmaterialien zur Anreicherung mit Ballaststoffen und Polyphenolen dar. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der Variabilität der Ballaststoffpolysaccharidzusammensetzung sowie der Strukturen und Gehalte der zellwandassoziierten phenolischen Polymere der Früchte unterschiedliche ernährungsphysiologische Effekte erzielt werden können.



## 6. Literaturverzeichnis

- Aboughe-Angone S., Nguema-Ona E., Ghosh P., Lerouge P., Ishii T., Ray B. & Driouich A. (2008). Cell Wall Carbohydrates from Fruit Pulp of *Argania Spinosa*: Structural Analysis of Pectin and Xyloglucan Polysaccharides. *Carbohydrate Research* 343(1): 67-72.
- Alba K., Campbell G. M. & Kontogiorgos V. (2019). Dietary Fibre from Berry-Processing Waste and Its Impact on Bread Structure: A Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Albersheim P., Nevins D. J., English P. D. & Karr A. (1967). A Method for the Analysis of Sugars in Plant Cell-Wall Polysaccharides by Gas-Liquid Chromatography. *Carbohydrate Research* 5(3): 340-345.
- Arranz S., Saura-Calixto F., Shaha S. & Kroon P. A. (2009). High Contents of Nonextractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(16): 7298-7303.
- Auker K. M., Coleman C. M., Wang M., Avula B., Bonnet S. L., Kimble L. L., Mathison B. D., Chew B. P. & Ferreira D. (2019). Structural Characterization of Cranberry Arabinoxylglucan Oligosaccharides. *Journal of Natural Products* 82(3): 606-620.
- Basu A., Rhone M. & Lyons T. J. (2010). Berries: Emerging Impact on Cardiovascular Health. *Nutrition Reviews* 68(3): 168-177.
- Bauer S. (2012). Mass Spectrometry for Characterizing Plant Cell Wall Polysaccharides. *Frontiers in Plant Science* 3(45): 1-6.
- Bauer W. D., Talmadge K. W., Keegstra K. & Albersheim P. (1973). The Structure of Plant Cell Walls: II. The Hemicellulose of the Walls of Suspension-Cultured Sycamore Cells. *Plant Physiology* 51(1): 174-187.
- Bharti S. K. & Roy R. (2012). Quantitative <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry* 35: 5-26.
- Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B. & Svensson S. (1970). Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polysaccharides. *Angewandte Chemie* 9(8): 610-619.
- Bleton J., Mejanelle P., Sansoulet J., Goursaud S. & Tchaplal A. (1996). Characterization of Neutral Sugars and Uronic Acids after Methanolysis and Trimethylsilylation for Recognition of Plant Gums. *Journal of Chromatography A* 720(1): 27-49.
- Blumberg J. B., Basu A., Krueger C. G., Lila M. A., Neto C. C., Novotny J. A., Reed J. D., Rodriguez-Mateos A. & Toner C. D. (2016). Impact of Cranberries on Gut Microbiota and Cardiometabolic Health: Proceedings of the Cranberry Health Research Conference 2015. *Advances in Nutrition* 7(4): 759-770.
- Boerjan W., Ralph J. & Baucher M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.
- Bravo L., Abia R. & Saura-Calixto F. (1994). Polyphenols as Dietary Fiber Associated Compounds - Comparative-Study on *in Vivo* and *in Vitro* Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(7): 1481-1487.
- Buendia B., Gil M. I., Tudela J. A., Gady A. L., Medina J. J., Soria C., Lopez J. M. & Tomas-Barberan F. A. (2010). HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 3916-3926.
- Bunzel M. & Ralph J. (2006). NMR Characterization of Lignins Isolated from Fruit and Vegetable Insoluble Dietary Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(21): 8352-8361.
- Bunzel M., Ralph J., Lu F., Hatfield R. D. & Steinhart H. (2004). Lignins and Ferulate-Coniferyl Alcohol Cross-Coupling Products in Cereal Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21): 6496-6502.
- Bunzel M., Ralph J. & Steinhart H. (2005a). Association of Non-Starch Polysaccharides and Ferulic Acid in Grain Amaranth (*Amaranthus Caudatus* L.) Dietary Fiber. *Molecular Nutrition and Food Research* 49(6): 551-559.

## 6. Literaturverzeichnis

- Bunzel M., Schüßler A. & Tchetseubu Saha G. (2011). Chemical Characterization of Klason Lignin Preparations from Plant-Based Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(23): 12506-12513.
- Bunzel M., Seiler A. & Steinhart H. (2005b). Characterization of Dietary Fiber Lignins from Fruits and Vegetables Using the DFRC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(24): 9553-9559.
- Caffall K. H. & Mohnen D. (2009). The Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall Pectic Polysaccharides. *Carbohydrate Research* 344(14): 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. *Journal of the American Chemical Society* 118(28): 6736-6745.
- 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. *The Plant Journal* 3(1): 1-30.
- CCRC, Complex Carbohydrate Research Center (2007). The CCRC Spectral Database for PMAA's. Athens, GA, USA, *University of Georgia*.
- Chen F., Tobimatsu Y., Havkin-Frenkel D., Dixon R. A. & Ralph J. (2012). A Polymer of Caffeyl Alcohol in Plant Seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(5): 1772-1777.
- Chen F., Tobimatsu Y., Jackson L., Nakashima J., Ralph J. & Dixon R. A. (2013). Novel Seed Coat Lignins in the Cactaceae: Structure, Distribution and Implications for the Evolution of Lignin Diversity. *The Plant Journal* 73(2): 201-211.
- Ciucanu I. & Kerek F. (1984). A Simple and Rapid Method for the Permethylolation of Carbohydrates. *Carbohydrate Research* 131(2): 209-217.
- Coleman C. M., Auker K. M., Killday K. B., Azadi P., Black I. & Ferreira D. (2019). Arabinoxylolucan Oligosaccharides May Contribute to the Antiadhesive Properties of Porcine Urine after Cranberry Consumption. *Journal of Natural Products* 82(3): 589-605.
- Coleman C. M. & Ferreira D. (2020). Oligosaccharides and Complex Carbohydrates: A New Paradigm for Cranberry Bioactivity. *Molecules* 25(881): 1-60.
- De Ruiter G. A., Schols H. A., Voragen A. G. & 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. *Analytical Biochemistry* 207(1): 176-185.
- de Souza V. R., Pereira P. A., da Silva T. L., de Oliveira Lima L. C., Pio R. & Queiroz F. (2014). Determination of the Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Chemical Composition of Brazilian Blackberry, Red Raspberry, Strawberry, Blueberry and Sweet Cherry Fruits. *Food Chemistry* 156: 362-368.
- Deng Q., Penner M. H. & Zhao Y. (2011). Chemical Composition of Dietary Fiber and Polyphenols of Five Different Varieties of Wine Grape Pomace Skins. *Food Research International* 44(9): 2712-2720.
- DGE, Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (2012). Mehr Ballaststoffe bitte! Ballaststoffzufuhr lässt sich im Alltag leicht steigern. Presseinformation. Bonn.
- Ding H. H., Cui S. W., Goff H. D., Chen J., Guo Q. B. & Wang Q. (2016). Xyloglucans from Flaxseed Kernel Cell Wall: Structural and Conformational Characterisation. *Carbohydrate Polymers* 151: 538-545.
- Dodevska M., Sobajic S. & Djordjevic B. (2015). Fibre and Polyphenols of Selected Fruits, Nuts and Green Leafy Vegetables Used in Serbian Diet. *Journal of the Serbian Chemical Society* 80(1): 21-33.
- Downey M. O., Harvey J. S. & Robinson S. P. (2003). Analysis of Tannins in Seeds and Skins of Shiraz Grapes Throughout Berry Development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9(1): 15-27.

- Ebringerova A., Hromadkova Z. & Heinze T. (2005). Hemicellulose. In "Heinze T. ADVANCES IN POLYMER SCIENCE, POLYSACCHARIDES I". Berlin, Heidelberg, *Springer-Verlag*. 186: 1-67.
- Eichhöfer H. (2017). Untersuchung Der Zellwandzusammensetzung Von Samen Aus Beerenobst. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Steck J. & Bunzel M.
- Eklöf J. M., Ruda M. C. & Brumer H. (2012). Chapter Six - Distinguishing Xyloglucanase Activity in *Endo*- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glucanases. In "Harry J. G. METHODS IN ENZYMOLOGY". *Academic Press*. Volume 510: 97-120.
- Feliciano R. P., Meudt J. J., Shanmuganayagam D., Krueger C. G. & Reed J. D. (2014). Ratio of "A-Type" to "B-Type" Proanthocyanidin Interflavan Bonds Affects Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli* Invasion of Gut Epithelial Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(18): 3919-3925.
- Fry S. C. (1989). The Structure and Functions of Xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* 40(210): 1-11.
- Fry S. C., York W. S., Albersheim P., Darvill A., Hayashi T., Joseleau J. P., Kato Y., Lorences E. P., Maclachlan G. A., McNeil M., Mort A. J., Reid J. S. G., Seitz H. U., Selvendran R. R., Voragen A. G. J. & White A. R. (1993). An Unambiguous Nomenclature for Xyloglucan-Derived Oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* 89(1): 1-3.
- Fukushima R. S. & Hatfield R. D. (2001). Extraction and Isolation of Lignin for Utilization as a Standard to Determine Lignin Concentration Using the Acetyl Bromide Spectrophotometric Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(7): 3133-3139.
- Funk C., Braune A., Grabber J. H., Steinhart H. & Bunzel M. (2007). Model Studies of Lignified Fiber Fermentation by Human Fecal Microbiota and Its Impact on Heterocyclic Aromatic Amine Adsorption. *Mutation Research* 624(1-2): 41-48.
- Furuuchi R., Yokoyama T., Watanabe Y. & Hirayama M. (2011). Identification and Quantification of Short Oligomeric Proanthocyanidins and Other Polyphenols in Boysenberry Seeds and Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(8): 3738-3746.
- Gidley M. J. & Reid G. J. S. (2006). Galactomannans and Other Cell Wall Storage Polysaccharides in Seeds. In "FOOD POLYSACCHARIDES AND THEIR APPLICATIONS". *CRC Press*: 181-215.
- Gloster T. M., Ibatullin F. M., Macauley K., Eklöf J. M., Roberts S., Turkenburg J. P., Bjørnvad M. E., Jørgensen P. L., Danielsen S., Johansen K. S., Borchert T. V., Wilson K. S., Brumer H. & Davies G. J. (2007). Characterization and Three-Dimensional Structures of Two Distinct Bacterial Xyloglucanases from Families GH5 and GH12. *The Journal of Biological Chemistry* 282(26): 19177-19189.
- Goñi I., Elena Díaz-Rubio M., Perez-Jimenez J. & Saura-Calixto F. (2009). Towards an Updated Methodology for Measurement of Dietary Fiber, Including Associated Polyphenols, in Food and Beverages. *Food Research International* 42(7): 840-846.
- Gottlieb H. E., Kotlyar V. & Nudelman A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *Journal of Organic Chemistry* 62(21): 7512-7515.
- Gouw V. P., Jung J. & Zhao Y. (2017). Functional Properties, Bioactive Compounds, and *in Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Dried Fruit Pomace Powders as Functional Food Ingredients. *LWT - Food Science and Technology* 80: 136-144.
- Grabber J. H., Zeller W. E. & Mueller-Harvey I. (2013). Acetone Enhances the Direct Analysis of Procyanidin- and Prodelphinidin-Based Condensed Tannins in *Lotus* Species by the Butanol-HCl-Iron Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(11): 2669-2678.
- Grishutin S. G., Gusakov A. V., Markov A. V., Ustinov B. B., Semenova M. V. & Sinitsyn A. P. (2004). Specific Xyloglucanases as a New Class of Polysaccharide-Degrading Enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1674(3): 268-281.
- Gu L., Kelm M. A., Hammerstone J. F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D. & Prior R. L. (2003). Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(25): 7513-7521.

## 6. Literaturverzeichnis

- Gu L. W., Kelm M., Hammerstone J. F., Beecher G., Cunningham D., Vannozzi S. & Prior R. L. (2002). Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent Detection Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(17): 4852-4860.
- Guerra A., Filpponen I., Lucia L. A., Saquing C., Baumberger S. & Argyropoulos D. S. (2006). Toward a Better Understanding of the Lignin Isolation Process from Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(16): 5939-5947.
- Hantus S., Pauly M., Darvill A. G., Albersheim P. & York W. S. (1997). Structural Characterization of Novel L-Galactose-Containing Oligosaccharide Subunits of Jojoba Seed Xyloglucans. *Carbohydrate Research* 304(1): 11-20.
- Hatfield R. & Fukushima R. S. (2005). Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Science* 45(3): 832-839.
- Hatfield R. D., Grabber J., Ralph J. & Brei K. (1999). Using the Acetyl Bromide Assay to Determine Lignin Concentrations in Herbaceous Plants: Some Cautionary Notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 628-632.
- Hatfield R. D., Jung H.-J. G., Ralph J., Buxton D. R. & Weimer P. J. (1994). A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65(1): 51-58.
- Hayashi T. & Maclachlan G. (1984). Pea Xyloglucan and Cellulose : I. Macromolecular Organization. *Plant Physiology* 75(3): 596-604.
- Hayashi T., Marsden M. P. & Delmer D. P. (1987). Pea Xyloglucan and Cellulose: VI. Xyloglucan-Cellulose Interactions *in Vitro* and *in Vivo*. *Plant Physiology* 83(2): 384-389.
- Hellström J. K., Törrönen A. R. & Mattila P. H. (2009). Proanthocyanidins in Common Food Products of Plant Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(17): 7899-7906.
- Hilz H., Bakx E. J., Schols H. A. & Voragen A. G. J. (2005). Cell Wall Polysaccharides in Black Currants and Bilberries - Characterisation in Berries, Juice, and Press Cake. *Carbohydrate Polymers* 59(4): 477-488.
- Hilz H., de Jong L. E., Kabel M. A., Schols H. A. & Voragen A. G. J. (2006). A Comparison of Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis, and Mass Spectrometry Methods to Determine Xyloglucan Structures in Black Currants. *Journal of Chromatography A* 1133(1-2): 275-286.
- Hilz H., de Jong L. E., Kabel M. A., Verhoef R., Schols H. A. & Voragen A. G. J. (2007). Bilberry Xyloglucan - Novel Building Blocks Containing Beta-Xylose within a Complex Structure. *Carbohydrate Research* 342(2): 170-181.
- Hisamatsu M., York W. S., Darvill A. G. & Albersheim P. (1992). Characterization of Seven Xyloglucan Oligosaccharides Containing from Seventeen to Twenty Glycosyl Residues. *Carbohydrate Research* 227: 45-71.
- Hixson J. L., Bindon K. A. & Smith P. A. (2015). Evaluation of Direct Phloroglucinolysis and Colorimetric Depolymerization Assays and Their Applicability for Determining Condensed Tannins in Grape Marc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(45): 9954-9962.
- Hoffman M., Jia Z. H., Pena M. J., Cash M., Harper A., Blackburn A. R., Darvill A. & York W. S. (2005). Structural Analysis of Xyloglucans in the Primary Cell Walls of Plants in the Subclass *Asteridae*. *Carbohydrate Research* 340(11): 1826-1840.
- Holmes A. B. & Rha C. (1978). Structure and Chemical Composition of Cranberry Cell-Wall Material. *Journal of Food Science* 43: 112-120.
- Hotchkiss A. T., Jr., Nunez A., Strahan G. D., Chau H. K., White A. K., Marais J. P. J., Hom K., Vakkalanka M. S., Di R., Yam K. L. & Khoo C. (2015). Cranberry Xyloglucan Structure and Inhibition of *Escherichia Coli* Adhesion to Epithelial Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(23): 5622-5633.

- Howell A. B., Reed J. D., Krueger C. G., Winterbottom R., Cunningham D. G. & Leahy M. (2005). A-Type Cranberry Proanthocyanidins and Uropathogenic Bacterial Anti-Adhesion Activity. *Phytochemistry* 66(18): 2281-2291.
- Howlett J. F., Betteridge V. A., Champ M., Craig S. A. S., Meheust A. & Jones J. M. (2010). The Definition of Dietary Fiber - Discussions at the Ninth Vahouny Fiber Symposium: Building Scientific Agreement. *Food & Nutrition Research* 54: 1-5.
- Hsieh Y. S. & Harris P. J. (2012). Structures of Xyloglucans in Primary Cell Walls of Gymnosperms, Monilophytes (Ferns *Sensu Lato*) and Lycophytes. *Phytochemistry* 79: 87-101.
- Hümmer W. & Schreier P. (2008). Analysis of Proanthocyanidins. *Molecular Nutrition and Food Research* 52(12): 1381-1398.
- Iiyama K. & Wallis A. F. A. (1990). Determination of Lignin in Herbaceous Plants by an Improved Acetyl Bromide Procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 51(2): 145-161.
- Jansson P. E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B. & Lönngrén J. (1976). A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates. *Chemical Communications* 8: 1-85.
- Jia Z., Qin Q., Darvill A. G. & York W. S. (2003). Structure of the Xyloglucan Produced by Suspension-Cultured Tomato Cells. *Carbohydrate Research* 338(11): 1197-1208.
- Jonker A. & Yu P. (2017). The Occurrence, Biosynthesis, and Molecular Structure of Proanthocyanidins and Their Effects on Legume Forage Protein Precipitation, Digestion and Absorption in the Ruminant Digestive Tract. *International Journal of Molecular Sciences* 18(5): 1-23.
- Junker F. (2018). Differenzierung Und Charakterisierung Von Kondensiertem Tannin in Samen Aus Beerenobst. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Steck J. & Bunzel M.
- Karplus M. (1963). Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society* 85(18): 2870-2871.
- Kaufhold L. (2019). Isolierung Und Charakterisierung Von Xyloglucan-Oligosacchariden Von Früchten Der Pflanzenordnung Sapindales. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Steck J. & Bunzel M.
- Kennedy J. A. & Jones G. P. (2001). Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4): 1740-1746.
- Kennedy J. A. & Taylor A. W. (2003). Analysis of Proanthocyanidins by High-Performance Gel Permeation Chromatography. *Journal of Chromatography A* 995(1-2): 99-107.
- Kiefer L. L., York W. S., Albersheim P. & Darvill A. G. (1990). Structural Characterization of an Arabinose-Containing Heptadecasaccharide Enzymically Isolated from Sycamore Extracellular Xyloglucan. *Carbohydrate Research* 197: 139-158.
- Kiefer L. L., York W. S., Darvill A. G. & Albersheim P. (1989). Xyloglucan Isolated from Suspension-Cultured Sycamore Cell Walls Is O-Acetylated. *Phytochemistry* 28(8): 2105-2107.
- Kim H., Padmakshan D., Li Y., Rencoret J., Hatfield R. D. & Ralph J. (2017). Characterization and Elimination of Undesirable Protein Residues in Plant Cell Wall Materials for Enhancing Lignin Analysis by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biomacromolecules* 18(12): 4184-4195.
- Kim H. & Ralph J. (2010). Solution-State 2D NMR of Ball-Milled Plant Cell Wall Gels in DMSO-*d*<sub>6</sub>/Pyridine-*d*<sub>5</sub>. *Organic & Biomolecular Chemistry* 8(3): 576-591.
- Koerner J. L., Hsu V. L., Lee J. & Kennedy J. A. (2009). Determination of Proanthocyanidin A2 Content in Phenolic Polymer Isolates by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216(9): 1403-1409.

## 6. Literaturverzeichnis

- Kong Y. Z., Pena M. J., Renna L., Avci U., Pattathil S., Tuomivaara S. T., Li X. M., Reiter W. D., Brandizzi F., Hahn M. G., Darvill A. G., York W. S. & O'Neill M. A. (2015). Galactose-Depleted Xyloglucan Is Dysfunctional and Leads to Dwarfism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 167(4): 1296-1294.
- Kosmala M., Zduńczyk Z., Juśkiewicz J., Jurgoński A., Karlińska E., Macierzyński J., Jańczak R. & Rój E. (2015). Chemical Composition of Defatted Strawberry and Raspberry Seeds and the Effect of These Dietary Ingredients on Polyphenol Metabolites, Intestinal Function, and Selected Serum Parameters in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(11): 2989-2996.
- Kulling S. E. & Rawel H. M. (2008). Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) - a Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica* 74(13): 1625-1634.
- Lapierre C., Monties B. & Rolando C. (1985). Thioacidolysis of Lignin - Comparison with Acidolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 5(2): 277-292.
- Lapierre C., Monties B. & Rolando C. (1986). Thioacidolysis of Poplar Lignins - Identification of Monomeric Syringyl Products and Characterization of Guaiacyl-Syringyl Lignin Fractions. *Holzforschung* 40(2): 113-118.
- Le Bourvellec C., Guyot S. & Renard C. M. G. C. (2004). Non-Covalent Interaction between Procyanidins and Apple Cell Wall Material: Part I. Effect of Some Environmental Parameters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1672(3): 192-202.
- Lee Y. C. (1990). High-Performance Anion-Exchange Chromatography for Carbohydrate Analysis. *Analytical Biochemistry* 189(2): 151-162.
- Lerouxel O., Choo T. S., Séveno M., Usadel B., Faye L., Lerouge P. & Pauly M. (2002). Rapid Structural Phenotyping of Plant Cell Wall Mutants by Enzymatic Oligosaccharide Fingerprinting. *Plant Physiology* 130(4): 1754-1763.
- Levy S., Maclachlan G. & Staehelin L. A. (1997). Xyloglucan Sidechains Modulate Binding to Cellulose During *in Vitro* Binding Assays as Predicted by Conformational Dynamics Simulations. *The Plant Journal* 11(3): 373-386.
- Levy S., York W. S., Stuikeprill R., Meyer B. & Staehelin L. A. (1991). Simulations of the Static and Dynamic Molecular-Conformations of Xyloglucan - the Role of the Fucosylated Side-Chain in Surface-Specific Side-Chain Folding. *The Plant Journal* 1(2): 195-215.
- Li H.-J. & Deinzer M. L. (2007). Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. *Analytical Chemistry* 79(4): 1739-1748.
- Liang N. N., He F., Pan Q.-H., Jun W., Reeves M. & Duan C.-Q. (2012). Optimization of Sample Preparation and Phloroglucinol Analysis of Marselan Grape Skin Proanthocyanidins Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *South African Journal of Enology and Viticulture* 33(1): 121-131.
- Liu J., Kisonen V., Willför S., Xu C. L. & Vilaplana F. (2016). Profiling the Substitution Pattern of Xyloglucan Derivatives by Integrated Enzymatic Hydrolysis, Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1463: 110-120.
- Liu L. F., Paulitz J. & Pauly M. (2015). The Presence of Fucogalactoxyloglucan and Its Synthesis in Rice Indicates Conserved Functional Importance in Plants. *Plant Physiology* 168: 549-560.
- Lu F. C. & Ralph J. (1997a). Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC Method), a New Method for Lignin Analysis: Protocol for Analysis of DFRC Monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7): 2590-2592.
- Lu F. C. & Ralph J. (1997b). DFRC Method for Lignin Analysis. 1. New Method for  $\beta$ -Aryl-Ether Cleavage: Lignin Model Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(12): 4655-4660.
- Macagnan F. T., da Silva L. P. & Hecktheuer L. H. (2016). Dietary Fibre: The Scientific Search for an Ideal Definition and Methodology of Analysis, and Its Physiological Importance as a Carrier of Bioactive Compounds. *Food Research International* 85: 144-154.
- Macpherson A. J. & Harris N. L. (2004). Interactions between Commensal Intestinal Bacteria and the Immune System. *Nature Reviews* 4(6): 478-485.



- Mañas E., Bravo L. & Saura-Calixto F. (1994). Sources of Error in Dietary Fiber Analysis. *Food Chemistry* 50(4): 331-342.
- Mansfield S. D., Kim H., Lu F. & Ralph J. (2012). Whole Plant Cell Wall Characterization Using Solution-State 2D NMR. *Nature Protocols* 7(9): 1579-1589.
- Marles M. A. S., Coulman B. E. & Bett K. E. (2008). Interference of Condensed Tannin in Lignin Analyses of Dry Bean and Forage Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(21): 9797-9802.
- Marlett J. A. & Vollendorf N. W. (1994). Dietary Fiber Content and Composition of Different Forms of Fruits. *Food Chemistry* 51(1): 39-44.
- Mayer-Miebach E., Adamiuk M. & Behnlian D. (2012). Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols During Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product. *Agriculture* 2(3): 244-258.
- 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(9-10): 860-883.
- McDougall G. J. & Fry S. C. (1991). Purification and Analysis of Growth-Regulating Xyloglucan-derived Oligosaccharides by High-Pressure Liquid-Chromatography. *Carbohydrate Research* 219: 123-132.
- McDougall G. J., Morrison I. M., Stewart D. & Hillman J. R. (1996). Plant Cell Walls as Dietary Fibre: Range, Structure, Processing and Function. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70(2): 133-150.
- Mikulic-Petkovsek M., Schmitzer V., Slatnar A., Stampar F. & Veberic R. (2012). Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *Journal of Food Science* 77(10): 1064-1070.
- Nawirska A. & Kwaśniewska M. (2005). Dietary Fibre Fractions from Fruit and Vegetable Processing Waste. *Food Chemistry* 91(2): 221-225.
- Nguema-Ona E., Moore J. P., Fagerström A., Fangel J. U., Willats W. G. T., Hugo A. & Vivier M. A. (2012). Profiling the Main Cell Wall Polysaccharides of Tobacco Leaves Using High-Throughput and Fractionation Techniques. *Carbohydrate Polymers* 88(3): 939-949.
- Nile S. H. & Park S. W. (2014). Edible Berries: Bioactive Components and Their Effect on Human Health. *Nutrition* 30(2): 134-144.
- Nunes F. M. & Coimbra M. A. (2001). Chemical Characterization of the High Molecular Weight Material Extracted with Hot Water from Green and Roasted Arabica Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4): 1773-1782.
- Oomah B. D., Ladet S., Godfrey D. V., Liang J. & Girard B. (2000). Characteristics of Raspberry (*Rubus Idaeus* L.) Seed Oil. *Food Chemistry* 69(2): 187-193.
- Oszmiański J. & Wojdyło A. (2005). *Aronia Melanocarpa* Phenolics and Their Antioxidant Activity. *European Food Research and Technology* 221(6): 809-813.
- Ou K. & Gu L. (2014). Absorption and Metabolism of Proanthocyanidins. *Journal of Functional Foods* 7: 43-53.
- Park Y. B. & Cosgrove D. J. (2015). Xyloglucan and Its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall. *Plant and Cell Physiology* 56(2): 180-194.
- Pauly M., Albersheim P., Darvill A. & York W. S. (1999a). Molecular Domains of the Cellulose/Xyloglucan Network in the Cell Walls of Higher Plants. *The Plant Journal* 20(6): 629-639.
- Pauly M., Andersen L. N., Kauppinen S., Kofod L. V., York W. S., Albersheim P. & Darvill A. (1999b). A Xyloglucan-Specific Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase from *Aspergillus Aculeatus*: Expression Cloning in Yeast, Purification and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Glycobiology* 9(1): 93-100.
- Pauly M., Eberhard S., Albersheim P., Darvill A. & York W. S. (2001). Effects of the MUR1 Mutation on Xyloglucans Produced by Suspension-Cultured *Arabidopsis Thaliana* Cells. *Planta* 214(1): 67-74.

## 6. Literaturverzeichnis

- Pauly M. & Keegstra K. (2016). Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan. *Annual Review of Plant Biology* 67: 235-259.
- Peña M. J., Darvill A. G., Eberhard S., York W. S. & O'Neill M. A. (2008). Moss and Liverwort Xyloglucans Contain Galacturonic Acid and Are Structurally Distinct from the Xyloglucans Synthesized by Hornworts and Vascular Plants. *Glycobiology* 18(11): 891-904.
- Peña M. J., Kong Y., York W. S. & O'Neill M. A. (2012). A Galacturonic Acid-Containing Xyloglucan Is Involved in *Arabidopsis* Root Hair Tip Growth. *The Plant Cell* 24(11): 4511-4524.
- Peña M. J., Ryden P., Madson M., Smith A. C. & Carpita N. C. (2004). The Galactose Residues of Xyloglucan Are Essential to Maintain Mechanical Strength of the Primary Cell Walls in *Arabidopsis* During Growth. *Plant Physiology* 134(1): 443-451.
- Pérez-Jiménez J., Arranz S. & Saura-Calixto F. (2009). Proanthocyanidin Content in Foods Is Largely Underestimated in the Literature Data: An Approach to Quantification of the Missing Proanthocyanidins. *Food Research International* 42(10): 1381-1388.
- Pérez-Jiménez J. & Saura-Calixto F. (2015). Macromolecular Antioxidants or Non-Extractable Polyphenols in Fruit and Vegetables: Intake in Four European Countries. *Food Research International* 74: 315-323.
- Perrin R. M., DeRocher A. E., Bar-Peled M., Zeng W., Norambuena L., Orellana A., Raikhel N. V. & Keegstra K. (1999). Xyloglucan Fucosyltransferase, an Enzyme Involved in Plant Cell Wall Biosynthesis. *Science* 284(5422): 1976-1979.
- Petersen B. O., Vinogradov E., Kay W., Würtz P., Nyberg N. T., Duus J. Ø. & Sørensen O. W. (2006). H2BC: A New Technique for NMR Analysis of Complex Carbohydrates. *Carbohydrate Research* 341(4): 550-556.
- Pettolino F. A., Walsh C., Fincher G. B. & Bacic A. (2012). Determining the Polysaccharide Composition of Plant Cell Walls. *Nature Protocols* 7(9): 1590-1607.
- Pieszka M., Migdał W., Gąsior R., Rudzińska M., Bederska-Łojewska D., Pieszka M. & Szczurek P. (2015). Native Oils from Apple, Blackcurrant, Raspberry, and Strawberry Seeds as a Source of Polyenoic Fatty Acids, Tocochromanols, and Phytosterols: A Health Implication. *Journal of Chemistry* 2015: 1-8.
- Porter L. J., Hrstich L. N. & Chan B. G. (1986). The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry* 25(1): 223-230.
- Prior R. L. & Gu L. (2005). Occurrence and Biological Significance of Proanthocyanidins in the American Diet. *Phytochemistry* 66(18): 2264-2280.
- Prosky L., Asp N. G., Furda I., DeVries J. W., Schweizer T. F. & Harland B. F. (1985). Determination of Total Dietary Fiber in Foods and Food Products: Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 68(4): 677-679.
- Prosky L., Asp N. G., Schweizer T. F., DeVries J. W., Furda I. & Lee S. C. (1994). Determination of Soluble Dietary Fiber in Foods and Food Products: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 77(3): 690-694.
- Quéméner B., Vigouroux J., Rathahao E., Tabet J. C., Dimitrijevic A. & Lahaye M. (2015). Negative Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Method for Sequencing and Determining Linkage Position in Oligosaccharides from Branched Hemicelluloses. *Journal of Mass Spectrometry* 50(1): 247-264.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. & Pouységu L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie* 50(3): 586-621.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P. F., Marita J. M., Hatfield R. D., Ralph S. A., Christensen J. H. & Boerjan W. (2004). Lignins: Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenyl-Propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3(1): 29-60.

- Rasmussen S. E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K. & Poulsen L. (2005). Dietary Proanthocyanidins: Occurrence, Dietary Intake, Bioavailability, and Protection against Cardiovascular Disease. *Molecular Nutrition and Food Research* 49(2): 159-174.
- Ray B., Loutelier-Bourhis C., Lange C., Condamine E., Driouich A. & Lerouge P. (2004). Structural Investigation of Hemicellulosic Polysaccharides from *Argania Spinosa*: Characterisation of a Novel Xyloglucan Motif. *Carbohydrate Research* 339(2): 201-208.
- Reißner A. M., Al-Hamimi S., Quiles A., Schmidt C., Struck S., Hernando I., Turner C. & Rohm H. (2019). Composition and Physicochemical Properties of Dried Berry Pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(3): 1284-1293.
- Robinson A. R. & Mansfield S. D. (2009). Rapid Analysis of Poplar Lignin Monomer Composition by a Streamlined Thioacidolysis Procedure and near-Infrared Reflectance-Based Prediction Modeling. *The Plant Journal* 58(4): 706-714.
- Rohrer J. (2013). Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. Technical Note: *Thermo Fisher Scientific CA, USA*, 20: 1-12.
- Saeman J. F., Bubl J. L. & Harris E. E. (1945). Quantitative Saccharification of Wood and Cellulose. *Industrial and Engineering Chemistry* 17(1): 35-37.
- Salo M.-L. & Suomi K. (1972). Carbohydrate and Acid Composition of Finnish Berries. *Agricultural and Food Science* 44(2): 68-75.
- Sarneckis C. J., Dambergs R. G., Jones P., Mercurio M., Herderich M. J. & Smith P. A. (2006). Quantification of Condensed Tannins by Precipitation with Methyl Cellulose: Development and Validation of an Optimised Tool for Grape and Wine Analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12(1): 39-49.
- Sasaki G. L., Gorin P. A. J., Souza L. M., Czelusniak P. A. & Iacomini M. (2005). Rapid Synthesis of Partially O-Methylated Alditol Acetate Standards for GC-MS: Some Relative Activities of Hydroxyl Groups of Methyl Glycopyranosides on Purdie Methylation. *Carbohydrate Research* 340(4): 731-739.
- Saura-Calixto F. (1988). Effect of Condensed Tannins in the Analysis of Dietary Fiber in Carob Pods. *Journal of Food Science* 53(6): 1769-1771.
- Saura-Calixto F. (1998). Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10): 4303-4306.
- Saura-Calixto F. (2011). Dietary Fiber as a Carrier of Dietary Antioxidants: An Essential Physiological Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(1): 43-49.
- Saura-Calixto F. (2012). Concept and Health-Related Properties of Nonextractable Polyphenols: The Missing Dietary Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(45): 11195-11200.
- Saura-Calixto F. & Díaz-Rubio M. E. (2007). Polyphenols Associated with Dietary Fibre in Wine. *Food Research International* 40(5): 613-619.
- Saura-Calixto F., Goñi I., Mañas E. & Abia R. (1991). Klason Lignin, Condensed Tannins and Resistant Protein as Dietary Fibre Constituents: Determination in Grape Pomaces. *Food Chemistry* 39(3): 299-309.
- Saura-Calixto F., Serrano J. & Goñi I. (2007). Intake and Bioaccessibility of Total Polyphenols in a Whole Diet. *Food Chemistry* 101(2): 492-501.
- Schäfer J., Ubat F., Rund K. & Bunzel M. (2015). A Stable-Isotope Dilution GC-MS Approach for the Analysis of DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage) Monomers from Low-Lignin Plant Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(10): 2668-2673.
- Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K. & Gleis M. (2009). Mechanisms of Primary Cancer Prevention by Butyrate and Other Products Formed During Gut Flora-Mediated Fermentation of Dietary Fibre. *Mutation Research* 682(1): 39-53.
- Scheller H. V. & Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 61(1): 263-289.

## 6. Literaturverzeichnis

- Schendel R. R., Meyer M. R. & Bunzel M. (2016). Quantitative Profiling of Feruloylated Arabinoxylan Side Chains from Gramineous Cell Walls. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-11.
- Schofield P., Mbugua D. M. & Pell A. N. (2001). Analysis of Condensed Tannins: A Review. *Animal Feed Science and Technology* 91(1): 21-40.
- Schols H. A., Bakx E. J., Schipper D. & Voragen A. G. J. (1995). A Xylogalacturonan Subunit Present in the Modified Hairy Regions of Apple Pectin. *Carbohydrate Research* 279: 265-279.
- Schultink A., Cheng K., Park Y. B., Cosgrove D. J. & Pauly M. (2013). The Identification of Two Arabinosyltransferases from Tomato Reveals Functional Equivalency of Xyloglucan Side Chain Substituents. *Plant Physiology* 163(1): 86-94.
- Schultink A., Liu L., Zhu L. & Pauly M. (2014). Structural Diversity and Function of Xyloglucan Sidechain Substituents. *Plants* 3(4): 526-542.
- Serrano J., Puupponen-Pimiä R., Dauer A., Aura A. M. & Saura-Calixto F. (2009). Tannins: Current Knowledge of Food Sources, Intake, Bioavailability and Biological Effects. *Molecular Nutrition and Food Research* 53: 310-329.
- Shay P. E., Trofymow J. A. & Constabel C. P. (2017). An Improved Butanol-HCl Assay for Quantification of Water-Soluble, Acetone:Methanol-Soluble, and Insoluble Proanthocyanidins (Condensed Tannins). *Plant Methods* 13(63): 1-11.
- Sims I. M., Carnachan S. M., Bell T. J. & Hinkley S. F. R. (2018). Methylation Analysis of Polysaccharides: Technical Advice. *Carbohydrate Polymers* 188: 1-7.
- Sims I. M., Munro S. L. A., Currie G., Craik D. & Bacic A. (1996). Structural Characterisation of Xyloglucan Secreted by Suspension-Cultured Cells of *Nicotiana Plumbaginifolia*. *Carbohydrate Research* 293(2): 147-172.
- Sójka M., Kołodziejczyk K. & Milala J. (2013). Polyphenolic and Basic Chemical Composition of Black Chokeberry Industrial by-Products. *Industrial Crops and Products* 51: 77-86.
- Stewart D., Iannetta P. P. & Davies H. V. (2001). Ripening-Related Changes in Raspberry Cell Wall Composition and Structure. *Phytochemistry* 56(5): 423-428.
- Struck S., Plaza M., Turner C. & Rohm H. (2016). Berry Pomace – a Review of Processing and Chemical Analysis of its Polyphenols. *International Journal of Food Science & Technology* 51(6): 1305-1318.
- Sun J., Marais J. P. J., Khoo C., LaPlante K., Vejborg R. M., Givskou M., Tolker-Nielsen T., Seeram N. P. & Rowley D. C. (2015). Cranberry (*Vaccinium Macrocarpon*) Oligosaccharides Decrease Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia Coli*. *Journal of Functional Foods* 17: 235-242.
- Sundberg A., Sundberg K., Lillandt C. & Holmbom B. (1996). Determination of Hemicelluloses and Pectins in Wood and Pulp Fibres by Acid Methanolysis and Gas Chromatography. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 11(4): 216-219.
- Swain T. & Hillis W. E. (1959). The Phenolic Constituents of *Prunus Domestica*. I. The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10(1): 63-68.
- 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. *Carbohydrate Research* 40(2): 217-225.
- Szajdek A. & Borowska E. J. (2008). Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. *Plant Foods for Human Nutrition* 63(4): 147-156.
- THL, National Institute for Health and Welfare (2016a). Fineli Resultset - Cranberry. *National Food Composition Database*, Helsinki, Finland, Release 17.
- THL, National Institute for Health and Welfare (2016b). Fineli Resultset - Raspberry. *National Food Composition Database*, Helsinki, Finland, Release 17.
- THL, National Institute for Health and Welfare (2016c). Fineli Resultset - Redcurrant. *National Food Composition Database*, Helsinki, Finland, Release 17.

- THL, National Institute for Health and Welfare (2017). Fineli Resultset - Chokeberry. *National Food Composition Database*, Helsinki, Finland, Release 17.
- Tobimatsu Y., Chen F., Nakashima J., Escamilla-Trevino L. L., Jackson L., Dixon R. A. & Ralph J. (2013). Coexistence but Independent Biosynthesis of Catechyl and Guaiacyl/Syringyl Lignin Polymers in Seed Coats. *The Plant Cell* 25(7): 2587-2600.
- Tuomivaara S. T., Yaoi K., O'Neill M. A. & York W. S. (2015). Generation and Structural Validation of a Library of Diverse Xyloglucan-Derived Oligosaccharides, Including an Update on Xyloglucan Nomenclature. *Carbohydrate Research* 402: 56-66.
- USDA, United States Department of Agriculture (2016a). USDA Food Composition Databases - Cranberries, Raw. Release 28.
- USDA, United States Department of Agriculture (2016b). USDA Food Composition Databases - Currants, Red and White, Raw. Release 28.
- USDA, United States Department of Agriculture (2016c). USDA Food Composition Databases - Microdried Aronia Berries. Release 28.
- USDA, United States Department of Agriculture (2016d). USDA Food Composition Databases - Raspberries, Raw. Release 28.
- Varo P., Laine R., Veijalainen K., Espo A., Wetterhoff A. & Koivistoinen P. (1984a). Dietary Fibre and Available Carbohydrates in Finnish Vegetables and Fruits. *Journal of Agricultural Science in Finland* 56(1): 49-59.
- Varo P., Laine R., Veijalainen K., Pero K. & Koivistoinen P. (1984b). Dietary Fibre and Available Carbohydrates in Finnish Cereal Products. *Journal of Agricultural Science in Finland* 56(1): 39-48.
- Vicente A. R., Ortugno C., Powell A. L. T., Greve L. C. & Labavitch J. M. (2007). Temporal Sequence of Cell Wall Disassembly Events in Developing Fruits. 1. Analysis of Raspberry (*Rubus Idaeus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(10): 4119-4124.
- Vierhuis E., York W. S., Kolli V. S., Vincken J., Schols H. A., Van Alebeek G. W. & Voragen A. G. (2001). Structural Analyses of Two Arabinose Containing Oligosaccharides Derived from Olive Fruit Xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydrate Research* 332(3): 285-297.
- Vincken J. P., York W. S., Beldman G. & Voragen A. (1997). Two General Branching Patterns of Xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiology* 114(1): 9-13.
- Vogel J. (2008). Unique Aspects of the Grass Cell Wall. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3): 301-307.
- Voragen A. G. J., Coenen G.-J., Verhoef R. P. & Schols H. A. (2009). Pectin, a Versatile Polysaccharide Present in Plant Cell Walls. *Structural Chemistry* 20(2): 263-275.
- Wan J.-X., Zhu X.-F., Wang Y.-Q., Liu L.-Y., Zhang B.-C., Li G.-X., Zhou Y.-H. & Zheng S.-J. (2018). Xyloglucan Fucosylation Modulates *Arabidopsis* Cell Wall Hemicellulose Aluminium Binding Capacity. *Scientific Reports* 8(428): 1-11.
- Watt D. K., Brasch D. J., Larsen D. S. & Melton L. D. (1999). Isolation, Characterisation, and NMR Study of Xyloglucan from Enzymatically Depectinised and Non-Depectinised Apple Pomace. *Carbohydrate Polymers* 39(2): 165-180.
- Wawer I., Wolniak M. & Paradowska K. (2006). Solid State NMR Study of Dietary Fiber Powders from Aronia, Bilberry, Black Currant and Apple. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 30(2): 106-113.
- Wefers D. & Bunzel M. (2016). Arabinan and Galactan Oligosaccharide Profiling by High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(22): 4656-4664.
- 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.

## 6. Literaturverzeichnis

- Westphal Y., Schols H. A., Voragen A. G. J. & Gruppen H. (2010). Introducing Porous Graphitized Carbon Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering and Mass Spectrometry Detection into Cell Wall Oligosaccharide Analysis. *Journal of Chromatography A* 1217(5): 689-695.
- White B. L., Howard L. R. & Prior R. L. (2010). Proximate and Polyphenolic Characterization of Cranberry Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(7): 4030-4036.
- Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnäkki 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. *Industrial Crops and Products* 29(2-3): 571-580.
- Wu X., Gu L., Prior R. L. & McKay S. (2004). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26): 7846-7856.
- Yamamura M., Hattori T., Suzuki S., Shibata D. & Umezawa T. (2012). Microscale Thioacidolysis Method for the Rapid Analysis of  $\beta$ -O-4-Substructures in Lignin. *Plant Biotechnology* 29(4): 419-423.
- Yaoi K., Nakai T., Kameda Y., Hiyoshi A. & Mitsuishi Y. (2005). Cloning and Characterization of Two Xyloglucanases from *Paenibacillus* sp. Strain KM21. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 7670-7678.
- York W. S., Harvey L. K., Guillen R., Albersheim P. & Darvill A. G. (1993). Structural Analysis of Tamarind Seed Xyloglucan Oligosaccharides Using Beta-Galactosidase Digestion and Spectroscopic Methods. *Carbohydrate Research* 248: 285-301.
- York W. S., Impallomeni G., Hisamatsu M., Albersheim P. & Darvill A. G. (1995). Eleven Newly Characterized Xyloglucan Oligoglycosyl Alditols: The Specific Effects of Sidechain Structure and Location on  $^1\text{H}$  NMR Chemical Shifts. *Carbohydrate Research* 267(1): 79-104.
- York W. S., Kumar Kolli V. S., Orlando R., Albersheim P. & Darvill A. G. (1996). The Structures of Arabinoxylglucans Produced by Solanaceous Plants. *Carbohydrate Research* 285: 99-128.
- York W. S., van Halbeek H., Darvill A. G. & Albersheim P. (1990). Structural-Analysis of Xyloglucan Oligosaccharides by  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy and Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry. *Carbohydrate Research* 200: 9-31.
- Zeller W. E., Ramsay A., Ropiak H. M., Fryganas C., Mueller-Harvey I., Brown R. H., Drake C. & Grabber J. H. (2015).  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR Spectroscopy for Estimating Procyanidin/Prodelphinidin and *cis/trans*-Flavan-3-ol Ratios of Condensed Tannin Samples: Correlation with Thiolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(7): 1967-1973.
- Zhao Y., Daeschel M., Wilhelmsen E., Ramaswamy H., Howard L., Mitcham E., Meng Y., Hager T., Figuerola F., Strik B., Giusti M., Wang S., Talcott S., Bower C. & Liu R. (2007). BERRY FRUIT - VALUE-ADDED PRODUCTS FOR HEALTH PROMOTION. Boca Raton, FL, USA, CRC Press.



## 7. Chemikalien und Instrumente







### a. Chemikalienliste

CHEMIKALIE	HERSTELLER, REINHEIT	GHS-PIKTOGRAMME	H-SÄTZE	P-SÄTZE
(-)-Epicatechin	abcr, 97 %	07	315, 319, 335	261, 305+351+338
1,4-Dioxan	Sigma-Aldrich, ≥ 99,8 %	02, 08, 07	225, 319, 335, 351, EUH019, EUH066	210, 280, 305+351+338, 308+313
1-Butanol	Sigma-Aldrich, > 99,5 %	02, 05, 07	226, 302, 318, 315, 335, 336	210, 280, 302+352, 305+351+338, 313
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	06, 05	302, 311, 314	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 308+310
2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure	Duchefa Biochemie, > 96 %	05, 07	302, 317, 318, 335, 412	262, 273, 280, 301+310, 305+351+338
Acetanilid	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	07	302	301+312, 330
Aceton	VWR, HPLC-Grade	02, 07	225, 319, 336, EUH066	210, 240, 305+351+338, 403+233
Aceton- <i>d</i> <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 % D	02, 07	225, 319, 336	210, 261, 305+351+338
Acetonitril	VWR, HPLC-Grade	02, 07	225, 302+312+332	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Acetylbromid	Sigma-Aldrich, 99 %	05	290, 314	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 308+310
Ammoniak, NH <sub>3</sub>	Merck, 25 %	05, 07, 09	290, 314, 335, 400	260, 273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
Ammoniumeisen-(III)-sulfat Dodecahydrat, FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	Merck, ≥ 98 %	-	-	-
Ascorbinsäure	Fluka, ≥ 99,0 %	-	-	-
Bortrifluorid-diethyletherat	Agros Organic, 48 % BF <sub>3</sub>	02, 05, 08, 07	226, 314, 332, 372	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Calciumchlorid Dihydrat, CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth, ≥ 99 % p.a.	07	319	305+351+338
Cellulose, GG	Carl Roth, ≥ 98 %	-	-	-
Cellotetraose, GGGG	Megazyme, > 90 %	-	-	-
Cellotriose, GGG	Megazyme, > 95 %	-	-	-
Chloroform	VWR, p.a.	06, 08	302, 331, 315, 319, 351, 361d, 336, 372	261, 281, 305+351+338, 311
Chlorwasserstofflösung, HCl-Lösung	Sigma-Aldrich, ≥ 37 %	05, 07	290, 314, 335	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
D-Apiose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	-	-	-
Deuteriumoxid (D <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 % D	-	-	-
D-Galactose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-



<b>D-Galacturonsäure Monohydrat</b>	Fluka, ≥ 97 %	-	-	-
<b>D-Glucose</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %	-	-	-
<b>D-Glucuronsäure</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %	-	-	-
<b>Dichlormethan</b>	VWR, ≥ 99,5 %	08, 07	315, 319, 335, 336, 351, 373	261, 281, 305+351+338
<b>Diethylether</b>	VWR p.a.	02, 07	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 403+235
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Carl Roth, ≥ 99,8 %	-	-	-
<b>Dimethylsulfoxid-d<sub>6</sub></b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 % D	-	-	-
<b>Dinatriumhydrogenphosphat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Riedel de-Haën, ≥ 99 %	-	-	-
<b>D-Mannit</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
<b>D-Mannose</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
<b>D-Xylose</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	-	-	-
<b>Essigsäure</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
<b>Essigsäureanhydrid</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	02, 06, 05	226, 302, 331, 314, 335	210, 260, 303+361+353, 305+351+338, 312
<b>Ethanol, EtOH</b>	VWR, ≥ 99,5 %	02, 07,	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
<b>Ethanthiol</b>	Agros Organic, > 99 %	02, 07, 09	224, 302, 332, 410	210, 261, 301+312+330, 370+378, 403+235
<b>Ethylacetat</b>	Carl Roth, ≥ 99,5 %	02, 07	225, 319, 336, EUH066	210, 233, 240, 305+351+338, 403+235
<b>Hydroxylaminhydrochlorid</b>	Alfa Aesar, 99 %	08, 05, 07, 09	290, 302+312, 315, 317, 319, 351, 373, 400	260, 280, 301+312+330, 305+351+338
<b>Isomaltotriose</b>	Megazyme, ≥ 95 %	-	-	-
<b>Isoprimeverose, X</b>	Megazyme, > 95 %	-	-	-
<b>Kaliumdihydrogenphosphat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Carl Roth, ≥ 99 % p.a.	-	-	-
<b>Kaliumhydroxid, KOH</b>	Merck, p.a.	05, 07	290, 302, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
<b>L-Arabinose</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
<b>L-Fucose</b>	Alfa Aesar, ≥ 99 %	-	-	-
<b>Lithiumchlorid, LiCl</b>	Fluka, ≥ 99,0 %	07	302, 315, 319	302+352, 305+351+338
<b>L-Rhamnose</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
<b>Magnesiumsulfat, MgSO<sub>4</sub></b>	VWR p.a.	-	-	-
<b>Maleinsäure</b>	Carl Roth, ≥ 99 %	07	302, 315, 319, 335, 317	261, 280, 305+351+338
<b>Methanol</b>	VWR, HPLC-Grade	02, 06, 08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 304+340, 308+310, 403+235
<b>Methanolische Salzsäure</b>	Sigma-Aldrich, 1,25M	02, 05, 06, 08	225, 290, 331, 311, 301, 370	210, 260, 280, 301+310, 308+330, 311, 403+233

## 7. Chemikalien und Instrumente

<b>Methyliodid</b>	VWR, ≥ 99 %	06, 08, 09	301+331, 312, 315, 319, 335, 351, 410	273, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	
<b>Murashige &amp; Skoog Medium, MS-Salze</b>	Duchefa Biochemie	-	-	-	
<b>myo-Inositol</b>	Duchefa Biochemie, > 97 %	-	-	-	
<b>N,O-Bis(trimethylsilyl)- trifluoroacetamid, BSTFA</b>	Sigma-Aldrich, GC-MS-Grade	02, 05	226, 314	280, 305+351+338, 310	
<b>Natriumacetat</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-	
<b>Natriumbordeuterid, NaBD<sub>4</sub></b>	Carl Roth, ≥ 98 % D	02, 05, 06	260, 301, 311, 314	223, 231+232, 280, 301+310, 370+378, 422	
<b>Natriumborhydrid, NaBH<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %	02, 06, 08, 05	260, 301, 314, 360F, EUH014	201, 231+232, 280, 308+313, 370+378, 402+404	
<b>Natriumdihydrogen- phosphat Dihydrat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O</b>	VWR p.a.	-	-	-	
<b>Natriumhydrogen- carbonat, NaHCO<sub>3</sub></b>	Merck, ≥ 99,5 %	-	-	-	
<b>Natriumhydroxid, NaOH</b>	Carl Roth, ≥ 99 %	05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	
<b>Natriumthiosulfat</b>	Carl Roth, ≥ 99 %	-	-	-	
<b>n-Hexan</b>	VWR, ≥ 97 %	02, 08, 07, 09	225, 304, 361f, 373, 315, 336, 411	210, 240, 273, 301+310, 331, 302+352, 403+235	
<b>Phloroglucin</b>	Alfa Aesar, ≥ 98 %	07	315, 319, 335	302+352, 305+351+338	
<b>Procyanidin A2</b>	Extrasynthese, ≥ 99 %	-	-	-	
<b>Pyridin-d<sub>5</sub></b>	Deutero, ≥ 99 %	02, 07	225, 302+312+332, 315, 319	210, 280, 305+351+338	
<b>Saccharose</b>	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-	
<b>Schwefelsäure, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich, ≥ 95 - 97 %	05	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310	
<b>Selenreaktionsgemisch</b>	Fluka	-	-	-	
<b>Thiamin Hydrochlorid</b>	Duchefa Biochemie, > 98,5 %	-	-	-	
<b>Trifluoressigsäure, TFA</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	05, 06	290, 331, 314, 412, EUH071	260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 312	
<b>Trizma-Base, Trometamol</b>	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	07	315, 319, 335	261, 305+351+338	
<b>GHS02</b>	<b>GHS05</b>	<b>GHS06</b>	<b>GHS07</b>	<b>GHS08</b>	<b>GHS09</b>
					
<b>Entzündlich</b>	<b>Ätzend</b>	<b>Giftig</b>	<b>Gesundheits- schädlich</b>	<b>Systemische Gesundheits- gefährdung</b>	<b>Umweltgefährlich</b>

## b. Puffer, Reagenzien und Medien

### I. Aceton-Lösung (0,05 % TFA in 60 % wässrigem Aceton)

- 60 mL Aceton mit 40 mL Reinstwasser mischen
- 50 µL TFA hinzufügen

### II. Butanol-Reagenz (51,5 % Aceton, 43 % BuOH, 5 % HCl, 0,5 % Reinstwasser)

- 4,12 mL Aceton
- 3,44 mL 1-Butanol
- 400 µL konzentrierte HCl
- 40 µL Reinstwasser
- jeweils frisch ansetzen, lichtgeschützt lagern

### III. Ethanthiol-Reagenz (2,5 % BF<sub>3</sub>, 10 % Ethanthiol in Dioxan)

- 27 mL 1,4-Dioxan
- 3 mL Ethanthiol
- 0,75 mL BF<sub>3</sub> in Diethylether

### IV. Eisen-Reagenz (2 % FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in 2 M HCl)

- 0,5 g FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12 H<sub>2</sub>O in 25 mL 2 M HCl lösen
- jeweils frisch ansetzen, lichtgeschützt lagern

### V. Methanolische HCl (0,1 M in Methanol)

- 2,08 mL 12 M HCl in 250 mL Messkolben vorlegen
- mit Methanol auffüllen

### VI. Methanol-Lösung (0,05 % TFA in Methanol)

- 50 mL Methanol mit 25 µL TFA versetzen

### VII. Murashige-Skoog-Medium (pH 5,7, 1 L)

- 4,3021 g MS-Salze
- 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1 mg Thiamin Hydrochlorid
- 0,1 g *myo*-Inositol
- 0,20 µL einer 10 mg/mL ethanolischen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Lösung
- 30 g Saccharose
- in 1 L Messkolben in ausreichend Reinstwasser lösen
- mit 1 M KOH pH 5,7 einstellen und auf 1 L mit Reinstwasser auffüllen
- unter sterilen Bedingungen durch steriles Miracloth filtrieren

**VIII. Natriumacetatpuffer (200 mM, pH 7,5)**

- 1,641 g Natriumacetat in 100 mL Messkolben vorlegen und in 50 mL Reinstwasser lösen
- mit 2 M Essigsäure pH 7,5 einstellen und mit Reinstwasser auf 100 mL auffüllen

**IX. Natriummaleatpuffer (100 mM, pH 6,0, 2 mM CaCl<sub>2</sub>)**

- 5,8 g Maleinsäure in 500 mL Messkolben vorlegen und in 400 mL Reinstwasser lösen
- mit 4 M NaOH pH 6,0 einstellen und 0,15 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O hinzufügen
- mit Reinstwasser auf 500 mL auffüllen

**X. Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0)**

- 6,248 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O in 500 mL Reinstwasser lösen
- 5,678 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 500 mL Reinstwasser lösen
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung zu NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung geben bis pH 6,0 entspricht

**XI. Pankreas- $\alpha$ -Amylase/Amyloglucosidase-Lösung (18000 bzw. 5100 U/20 mL)**

- 1,2 g Pankreas- $\alpha$ -Amylase (15 U/mg, Sigma-Aldrich)
- 141,6 mg Amyloglucosidase (36 kU/g, Megazyme)
- in 20 mL Natriummaleatpuffer lösen
- jeweils direkt vor der Verwendung ansetzen

**XII. Phloroglucinpuffer (10 g/L Ascorbinsäure und 50 g/L Phloroglucin in 0,1 M methanolischer HCl)**

- 100 mg Ascorbinsäure
- 500 mg Phloroglucin
- in 10 mL methanolischer HCl lösen
- jeweils frisch ansetzen, lichtgeschützt lagern

**XIII. Protease-Lösung (105 U/0,3 mL)**

- 11,7 mg Protease (9 U/mg, Megazyme)
- in 0,3 mL Reinstwasser lösen
- jeweils direkt vor der Verwendung ansetzen

## c. Enzyme

Enzym	Organismus/Herkunft	Aktivität	Hersteller
<b><math>\alpha</math>-Amylase</b> (thermostabil, Termamyl 120 L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	Novozymes
<b><math>\alpha</math>-Amylase</b> (Pankreas, Typ VI-B, EC-Nummer 3.2.1.1)	Schweinepankreas	15 U/mg	Sigma-Aldrich (A3176)
<b>Amyloglucosidase</b> (AMG 300 L)	<i>Aspergillus niger</i>	-	Novozymes
<b>Amyloglucosidase</b> (EC-Nummer 3.2.1.3)	<i>Aspergillus niger</i>	36 kU/g	Megazyme (E-AMGDFPD)
<b>Driselase</b>	<i>Basidiomycetes</i> sp.	-	Sigma-Aldrich (D9515)
<b>Protease</b> (Alcalase, 2.5 MG Type FG)	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	Novozymes
<b>Protease</b> (Subtilisin A, EC-Nummer 3.4.21.62)	<i>Bacillus licheniformis</i>	9 U/mg	Megazyme (E-BSPRPD)
<b>Xyloglucanase</b> (EC-Nummer 3.2.1.151)	<i>Paenibacillus</i> sp.	1000 U/mL	Megazyme (E-XEGP)

## d. Instrumente

### I. Liste der verwendeten LC- bzw. GC-Säulen

Säule	Partikelgröße/Filmdicke	Maße (Länge x Innendurchmesser)	Hersteller
<b>Bio-Gel P-2</b>	< 45 $\mu$ m	85 cm x 2,6 cm	Bio-Rad
<b>CarboPac PA20</b>	6 $\mu$ m	150 mm x 3,0 mm	Thermo Scientific
<b>CarboPac PA200</b>	6 $\mu$ m	250 mm x 3,0 mm	Thermo Scientific
<b>DB-225/DB-225(MS)</b>	0,25 $\mu$ m	30 m x 0,25 mm	Agilent
<b>DB-5MS</b>	0,25 $\mu$ m	30 m x 0,25 mm	Agilent
<b>Hypercarb (PGC)</b>	5 $\mu$ m	100 mm x 4,6 mm	Thermo Scientific
<b>Luna C18(2)</b>	5 $\mu$ m	250 mm x 4,6 mm	Phenomenex
<b>Luna HILIC</b>	5 $\mu$ m	250 mm x 4,6 mm	Phenomenex

### II. Systeme und Anlagen

- **GC-FID**

Hersteller: Shimadzu  
 Bezeichnung: GC-2010 Plus  
 Autosampler: AOC-20i Auto Injector  
 Detektor: FID-2010 Plus

- **GC-MS**

Hersteller: Shimadzu  
 Bezeichnung: GC-2010 Plus  
 Autosampler: AOC-20i Auto Injector  
 Detektor: GC-MS QP 2010 SE bzw. Ultra

## 7. Chemikalien und Instrumente

- **GPC-RI**

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

- **HPAEC-PAD**

Hersteller: Thermo Scientific  
Pumpe: Dionex ICS-5000 DP  
Autosampler: Dionex AS-AP  
Detektoren (PAD): ICS-6000 DC, 2 x Electrochemical Detector

- **HPAEC-PAD/MS**

Hersteller: Thermo Scientific  
Pumpe (Eluent): Dionex ICS-5000 SP  
Pumpe (Regenerent): Dionex AXP  
Pumpe (LiCl): Dionex AXP-MS  
Autosampler: Dionex AS-AP  
Detektor (PAD, CD): ICS-5000 DC, Electrochemical & Conductivity Detector  
Detektor (MS): ISQ EC Mass Spectrometer  
Suppressor: Dionex AERS 500 (4mm)

- **LC-MS<sup>n</sup>**

Hersteller: Thermo Scientific  
Pumpe: Finnigan Surveyor MS Pump Plus  
Autosampler: Finnigan Surveyor Autosampler Plus  
Detektor (DAD): Finnigan Surveyor PDA Plus Detector  
Detektor (MS): LXQ Linear Ion Trap MS mit ESI-Ionenquelle

- **NMR-Spektrometer**

Hersteller: Bruker  
Bezeichnung: Ascend 500 mit CryoProbe Prodigy Probenkopf

- **Präparative HPLC-ELSD**

Hersteller: Knauer  
Pumpe (Doppelt): AZURA P2.1L  
Autosampler: Smartline Autosampler Optimas  
Detektor (ELSD): Sedex 85 (ERC)  
Fraktionsventil: AZURA V2.1S

- **UV/Vis-Spektrometer**

Hersteller: Jasco  
Bezeichnung: V-550 UV/Vis Spectrophotometer

### III. Sonstige Gerätschaften

- Passiermühle, Edelstahl mit 1,3 mm Passierscheibe, Küchenprofi
- Tube-Mill control, IKA
- Planeten-Kugelmühle PM 100 mit 50 mL ZrO<sub>2</sub>-Mahlbecher und zehn ZrO<sub>2</sub>-Kugeln, Retsch
- Mikrofeinmühlen-Antrieb MF 10 mit MF 10.1 Schneidmahlkopf & MF 0.5 Siebeinlage, IKA
- Hochleistungsdispersierer, Ultra-Turrax T 25, IKA



## 8. Arbeitsvorschriften

### a. Quantitative Ballaststoffgewinnung

#### I. Unlösliche Ballaststoffe

- ca. 1,5 g Probe in 50 mL Zentrifugenröhrchen einwiegen
- mit 15 mL Natriummaleatpuffer versetzen und für 10 min bei 37 °C inkubieren
- 10 mL Pankreas- $\alpha$ -Amylase/Amyloglucosidase-Lösung zugeben und für 4 h bei 37 °C inkubieren
- mit 1,25 M Trizma®-Base pH 8,2 einstellen und 20 min bei 95 °C im Wasserbad inkubieren
- proben auf ca. 60 °C abkühlen lassen, 0,15 mL Protease-Lösung zugeben und 30 min bei 60 °C inkubieren
- mit 3,5 M Essigsäure pH 4,3 einstellen
- warme Lösung für 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren (LBS-haltigen Überstand aufbewahren)
- Rückstand vierfach mit 30 mL 60 °C warmem Reinstwasser waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und LBS-haltige Überstände vereinigen)
- Rückstand zweifach mit 40 mL 99,5 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstand zweifach mit 40 mL Aceton waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstand (UBS) bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank trocknen und auswiegen

#### II. Lösliche Ballaststoffe

- Präzipitation der LBS: Zugabe des vierfachen Volumens EtOH (99,5 %) zu den vereinigten Überständen der Waschungen mit Reinstwasser (s.o.), über Nacht ruhen lassen
- Überstand abgießen/abpipettieren, den Rest der Lösung in ausgewogene Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführen und 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Rückstand zweifach mit 40 mL 78 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstand zweifach mit 40 mL 99,5 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstand zweifach mit 40 mL Aceton waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstand (LBS) bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank trocknen und auswiegen

#### III. Driselase-Verdau

- 500 mg UBS in 50 mL Reinstwasser lösen, 30 mg Driselase hinzugeben und bei 37 °C für 48 h inkubieren.
- Inaktivierung der Enzyme durch 10 min Inkubation bei 100 °C
- zentrifugieren für 6 min bei 5000 rpm (Überstand verwerfen)



- Rückstand zweifach mit 10 mL Reinstwasser waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstände verwerfen)
- Rückstand zweifach mit 10 mL EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstände verwerfen)
- Rückstand zweifach mit 10 mL Aceton waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstände verwerfen)
- Rückstand (Driselase-verdaute UBS) über Nacht im Vakuumtrockenschrank trocknen und auswiegen

## b. Hydrolysen zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

### I. Schwefelsäurehydrolyse

- 10 mg Probenmaterial in ein 3,5 mL Vial einwiegen und mit Glasperlen versetzen
- 150  $\mu$ L 12 M Schwefelsäure zugeben und mischen
- 30 min im Eisbad stehen lassen und alle 10 min mischen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen und alle 30 min mischen
- 975  $\mu$ L Reinstwasser hinzugeben und 3 h bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- abkühlen lassen und durch Spritzenfilter (0,45  $\mu$ m, Teflon) filtrieren
- 100  $\mu$ L Filtrat mit 75  $\mu$ L 4 M NaOH und 825  $\mu$ L Reinstwasser versetzen
- 20  $\mu$ L mit 20  $\mu$ L 1 mM D-Mannit-Lösung versetzen und 160  $\mu$ L Reinstwasser hinzufügen
- Probe mit Reinstwasser 1:2 verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren

### II. Kombinierte Methanolyse und Trifluoressigsäure-Hydrolyse

- je nach Homogenität der Probe 10 - 25 mg Probenmaterial in ein 3,5 mL Vial einwiegen
- 2 mL 1,25 M methanolische HCl hinzufügen und 16 h bei 80 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- abkühlen und grobe Teilchen absetzen lassen und 40  $\mu$ L in ein neues 1,5 mL Vial pipettieren
- Im Rotationsverdampfer vollständig eindampfen
- 500  $\mu$ L 2 M TFA hinzufügen und 1 h bei 121 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- im Rotationsverdampfer vollständig eindampfen
- 200  $\mu$ L EtOH hinzufügen und im Rotationsverdampfer vollständig eindampfen (Zweifach)
- in 180  $\mu$ L Reinstwasser aufnehmen und 20  $\mu$ L 1 mM D-Mannit-Lösung hinzufügen
- Probe mit Reinstwasser 1:5 verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren

### III. Trifluoressigsäure-Hydrolyse der Xyloglucanligosaccharid-Standardsubstanzen

- 1  $\mu$ L der XGO-Probe der NMR-Messung in ein 1,5 mL Vial pipettieren und im Rotationsverdampfer vollständig eindampfen
- 500  $\mu$ L 2 M TFA hinzugeben und 1 h bei 121 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- im Rotationsverdampfer vollständig eindampfen
- 200  $\mu$ L EtOH hinzufügen und im Rotationsverdampfer vollständig eindampfen (Zweifach)

## 8. Arbeitsvorschriften

- in 180 µL Reinstwasser aufnehmen und 20 µL 1 mM D-Mannit-Lösung hinzufügen
- Probe mit Reinstwasser 1:5 verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren

### IV. Analyse mittels HPAEC-PAD

<b>Säule:</b>	CarboPac PA20
<b>Fluss:</b>	0,4 mL/min (Gradienten siehe Tab. D1 und D2)
<b>Injektionsvolumen:</b>	25 µL
<b>Säulentemperatur:</b>	25 °C
<b>Detektion:</b>	gepulst amperometrisch (PAD) mittels AgCl-Elektrode
<b>Kalibrierung:</b>	10 Monosaccharide (Fuc, Rha, Ara, Gal, Glc, Xyl, Man, Api, GalA, GlcA) 2 Fünf-Punkt Kalibrierungreihen (1 - 25 µM und 25 - 125 µM) mit quadratischer Anpassung

**Tabelle D1** Gradientenprogramm der HPAEC-PAD zur Analyse der Monosaccharide. Eluent A: Reinstwasser; Eluent B: 0,1 M NaOH; Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,2 M NaOAc

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]	ELUENT C [%]
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	90	10	0
0	90	10	0
1,5	96	4	0
22,0	96	4	0
32,0	0	100	0
32,1	0	0	100
42,0	0	0	100

**Tabelle D2** Alternatives Gradientenprogramm der HPAEC-PAD zur Trennung von Xylose und Mannose. Eluent A: Reinstwasser; Eluent B: 0,1 M NaOH; Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,2 M NaOAc

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]	ELUENT C [%]
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	96	4	0
0	96	4	0
25,0	96	4	0
25,1	96	4	0
40,0	0	0	0

## c. Methylierungsanalyse

### I. Methylierung (zweifach durchgeführt)

- 5 mg möglichst homogenes Probenmaterial in ein Pyrexglas einwiegen (ggf. zuvor erneut trocknen)
- 2 mL DMSO hinzufügen, 15 min im Ultraschallbad behandeln, über Nacht quellen lassen und erneut 15 min im Ultraschallbad behandeln
- 100 mg frisch unter Stickstoff gemörserte NaOH zugeben
- 90 min im Ultraschallbad und 90 min bei Raumtemperatur reagieren lassen
- 1 mL Methyljodid zugeben, 30 min im Ultraschallbad und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3 mL Dichlormethan und 5 mL 0,1 M Natriumthiosulfat-Lösung zugeben, gut mischen
- wässrige Phase abnehmen und organische Phase zweifach mit Reinstwasser waschen
- Lösungsmittel abrotieren (Lösungsmittelreste ggf. unterm Stickstoffstrom trocknen)
- bei 40 °C über Nacht im Vakuumtrockenschrank trocknen

### II. Hydrolyse, Reduktion und Derivatisierung

- 2 mL 2 M TFA zugeben und 90 min bei 121 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- Lösungsmittel abrotieren (Lösungsmittelreste ggf. unterm Stickstoffstrom trocknen)
- 20 mg NaBD<sub>4</sub> in 0,3 mL 2 M Ammoniak hinzugeben, 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
- Abbruch der Reaktion durch die Zugabe von 100 µL Eisessig
- unter Eiskühlung 450 µL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- unter Eiskühlung 3 mL Reinstwasser zugeben
- abkühlen lassen und mit 5 mL Dichlormethan extrahieren
- organische Phase dreifach mit Reinstwasser waschen
- Restwasser im Gefrierschrank (-18 °C) über Nacht ausfrieren
- organische Phase in 3,5 mL Vial überführen (etwaige Partikel durch Faltenfilter entfernen)
- Proben mittels GC-MS/GC-FID analysieren

### III. Analyse mittels GC-MS und GC-FID

<b>Säule:</b>	DB-225MS bzw. DB-225
<b>Injektionsvolumen:</b>	5 µL
<b>Injektionstemperatur:</b>	220 °C
<b>Injektionsart:</b>	Split im Verhältnis 30 : 1 bzw 10 : 1
<b>Trägergas:</b>	Helium bei 40 cm/s
<b>Detektion (MS):</b>	Elektronenstoß (EI) mit 70 eV, Transferline-Temperatur 220 °C
<b>Detektion (FID):</b>	Temperatur 240 °C
<b>Temperaturprogramm:</b>	Anfangstemperatur 140 °C für 1 min Aufheizphase mit 20 °C/min bis 220 °C (4 min), halten für 25 min

### d. Aufarbeitung der Ausgangsmaterialien zur Gewinnung von Xyloglucanoligosacchariden

#### I. Tabakzellen-Pflanzenzellsuspensionskultur

<b>Zellen:</b>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow-2
<b>Medium:</b>	MS-Medium, jeweils 150 mL pro 500 mL Kolben
<b>Inkubation:</b>	Rotationsinkubation im Dunkeln bei konstant 140 rpm und 25 °C
<b>Subkultivierung:</b>	nach einer Woche unter sterilen Bedingungen je 150 mL Medium wurden 7,5 mL Suspensionskultur inokuliert

#### II. Gewinnung des alkoholunlöslichen Rückstands

- Tabakzellen abfiltrieren und gefriertrocknen und mörsern
- Mangofruchtfleisch und Cranberries zerkleinern, gefriertrocknen und mahlen
- Mehle in ausreichend Reinstwasser mittels Hochleistungsdispergierer homogenisieren
- Präzipitation durch Zugabe des vierfachen Volumens an EtOH (99,5 %), über Nacht stehen lassen
- im Zentrifugenbecher (7 min bei 5000 rpm) Präzipitate vom Überstand trennen (Überstand verwerfen)
- Rückstände zweifach mit 78 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstände zweifach mit 99,5 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstände zweifach mit Aceton waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstände bei 60 °C im Trockenschrank trocknen

#### III. Stärke- und Proteinverdau

- ca. 20 g Probe einwiegen und 400 mL Natriumphosphatpuffer zugeben
- 1,8 mL thermostabiler  $\alpha$ -Amylase (Termamyl 120 L, Novozymes) zugeben und 20 min bei 92 °C inkubieren (alle 5 min schwenken)
- abkühlen lassen, pH-Wert mit 0,275 M NaOH auf 7,5 einstellen
- 840  $\mu$ L Protease (Alcalase 2.5 MG Type FG, Novozymes) zugeben und 30 min bei 60 °C im Schüttelbad inkubieren
- abkühlen lassen, pH-Wert mit 0,325 M HCl auf 4,5 einstellen
- 840  $\mu$ L Amyloglucosidase (AMG 300 L, Novozymes) zugeben und 30 min bei 60 °C im Schüttelbad inkubieren
- im Zentrifugenbecher (7 min bei 5000 rpm) unlösliche Ballaststoff-Polysaccharide vom Überstand trennen (Überstand verwerfen)
- Rückstände zweifach mit 150 mL 60 °C warmem Reinstwasser waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und LBS-haltige Überstände vereinigen)
- Rückstände zweifach mit 100 mL 99,5 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)

- Rückstände zweifach mit 100 mL Aceton waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Rückstände bei 60 °C im Trockenschrank trocknen

#### IV. Alkalische Extraktion der Hemicellulosen

- 15 - 20 g Probe einwiegen, 500 mL 4 M NaOH (+ 20 mM NaBH<sub>4</sub>) zugeben und über Nacht konstant schwenken
- mit konzentrierter HCl neutralisieren, Überstände abzentrifugieren (7 min bei 5000 rpm) und aufbewahren
- beide Schritte wiederholen und neutralisierte Überstände vereinigen
- Präzipitation der extrahierten Hemicellulosen durch Zugabe des vierfachen Volumens an EtOH, über Nacht stehen lassen
- Überstand abgießen/abpipettieren, den Rest der Lösung in ausgewogene Zentrifugenbecher überführen und 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Präzipitat zweifach mit 100 mL 99,5 %igem EtOH waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Präzipitat zweifach mit 100 mL Aceton waschen (nach jedem Waschschrift erneut zentrifugieren und Überstand verwerfen)
- Präzipitat (Hemicelluloseextrakt) im Trockenschrank bei 60 °C trocknen

#### V. Dialyse

- Hemicelluloseextrakte in einer möglichst geringen Menge an Reinstwasser vollständig lösen
- Lösung in einen Dialyseschlauch (Molekulargewicht *Cut-off* von 3500 Dalton) einfüllen und 24 h gegen vollentsalztes Wasser dialysieren (Wasser regelmäßig erneuern)
- entsalzte Hemicelluloseextrakte gefriertrocknen

#### e. Inkubationsansätze zur Gewinnung von Xyloglucanoligosacchariden

- Probenmaterial im Verhältnis von 5 mL/mg in Reinstwasser lösen.
- Zugabe von XEG (1000 U/mL) im Verhältnis von ca. 0,05 U/mg Einwaage zugeben und 6 h bei 40 °C unter Rühren inkubieren.
- Kontrollprobe: Am Ende der Inkubation 400 µL Probe entnehmen und mit 1,6 mL EtOH versetzen, Präzipitation abwarten, zentrifugieren (10 min bei 13600 rpm), Überstand durch Spritzenfilter (0,45 µm, Teflon) filtrieren, eindampfen und anschließend in Reinstwasser aufnehmen und mittels HPAEC-PAD analysieren (siehe 8III)
- Blindprobe: 1 mg Probenmaterial im 2 mL Reaktionsgefäß einwiegen, 400 µL Reinstwasser zugeben und analog zur Probe inkubieren (ohne XEG-Zugabe), ab hier verfahren wie bei Kontrollprobe
- Abbruch der Inkubation und Präzipitation polymeren Materials durch Zugabe des vierfachen Volumens an EtOH (99,5 %), über Nacht stehen lassen
- Überstand (XGO-Gemisch) abzentrifugieren, auf ≤ 50 mL einrotieren und gefriertrocknen

### f. Fraktionierung und Reinigung der Xyloglucanoligosaccharid-Gemische

#### I. Fraktionierung mittels GPC-RID

- XGO-Gemisch in 5 mL Reinstwasser lösen
- mittels GPC-RID fraktionieren, je nach Peakmuster vereinigen
- Fraktionen mittels HPAEC-PAD überprüfen
- Gefriertrocknen

<b>Säule:</b>	Bio-Gel P-2
<b>Injektionsvolumen:</b>	5 – 10 mL
<b>Eluent:</b>	Reinstwasser, isokratisch
<b>Fluss:</b>	1 mL/min
<b>Säulentemperatur:</b>	45 °C
<b>Detektion:</b>	Brechungsindex-Detektion (RID)
<b>Fraktionierung:</b>	Fraktionensammler im Anschluss zur Detektion, Beginn frei wählbar in Intervallen von 2,5 min

#### II. Semipräparative HPLC

- trockene XGO-Fraktionen in möglichst wenig Reinstwasser vollständig lösen
- im Fall von HILIC-Trennungen mindestens 20 % organisches Lösungsmittel beachten
- mittels HPLC-ELSD fraktionieren
- Fraktionen mittels HPAEC-PAD überprüfen (siehe 8III), je nach Reinheit bzw. Peakmuster vereinigen, gefriertrocknen und erneut fraktionieren

<b>Säule:</b>	Hypercarb (PGC) bzw. Luna HILIC
<b>Injektionsvolumen:</b>	50 – 105 µL
<b>Injektionsart:</b>	Autosampler im Modus „µL-Pickup“
<b>Eluent:</b>	A: Reinstwasser, B: Acetonitril
<b>Fluss:</b>	1 - 3 mL/min
<b>Gradientenprogramm:</b>	je nach Probe angepasst
<b>Säulentemperatur:</b>	70 °C (PGC), 35 °C (HILIC)
<b>Detektion:</b>	Lichtstreuungdetektion (ELSD)
<b>Fraktionierung:</b>	einstellbares Splitventil nach Säule, Verhältnis 1 : 20 programmierbares 16-Wege-Fraktionierventil parallel zur Detektion

## g. Strukturcharakterisierung der Xyloglucanoligosaccharid-Standards

- XGO-Proben mit ausreichender Reinheit laut HPAEC-PAD wurden gefriergetrocknet und für die NMR-Messung in 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  gelöst
- 2,5  $\mu\text{L}$  davon wurden mit 247,5  $\mu\text{L}$  75  $\mu\text{M}$  LiCl-Lösung versetzt, mit einer 250  $\mu\text{L}$  Autosampler-Spritze aufgenommen und direkt zur LC-MS-Messung injiziert
- die übrigen 497,5  $\mu\text{L}$  der NMR-Probe wurden mit 0,5  $\mu\text{L}$  Aceton versetzt und in ein NMR-Röhrchen überführt

### I. LC-MS/MS

- von jeder XGO-Probe wurde ein Full-Scan-Spektrum aufgenommen
- ausgewählte Ionen wurden in der linearen Ionenfalle stufenweise fragmentiert ( $\text{MS}^n$ )

<b>Ionisierung:</b>	ESI, Positiv-Modus
<b>Tuning:</b>	automatischer Tune auf Cellobiose in 75 mM LiCl-Lösung
<b>Injektion:</b>	Spritzenpumpe mit 20 $\mu\text{L}/\text{min}$

### II. NMR-Spektroskopie

<b>Referenzierung:</b>	Aceton ( $\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm; $\delta_{\text{C}} = 30,89$ ppm)
<b>Pulssequenzen:</b>	alle Experimente wurden mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt, im Modus „Non-Uniform Sampling“ (NUS) wurde stets ein NUS-Anteil von 70 % eingestellt
$^1\text{H}$	zg30 (Scanzahl: 16 - 64)
HSQC	hsqcedetgp (Scanzahl: 4 - 64; NUS)
HSQC/TOCSY	hsqcetgpml (Scanzahl: 8 - 128; NUS)
HMBC	hmbcgplpndqf (Scanzahl: 64 - 128; NUS)
H2BC	h2bcetgpl3 (Scanzahl: 8 - 64)

## h. Quantifizierung mittels $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

- gefriergetrocknete Proben in 500  $\mu\text{L}$  0,5 mg/mL Acetanilid in  $\text{D}_2\text{O}$  lösen
- in NMR-Röhrchen überführen und gemessen
- Quantifizierung anhand des Flächenverhältnisses der Methylgruppe (drei Protonen) des Acetanilids und eines Analytsignals mit bekannter Anzahl an Protonen

<b>Referenzierung:</b>	Methylgruppe von Acetanilid ( $\delta_{\text{H}} = 2,17$ ppm)
<b>Aufnahmeparameter:</b>	$^1\text{H}$ (zg30), Scanzahl: 16 - 64, D1: 15 s

### i. Xyloglucan-Profilung

#### I. Bedingungen

- Probenmaterial: isoliertes Zellwandmaterial dikotyler Pflanzen, bestenfalls UBS, im Fall von LBS muss auf die Anwesenheit/Störeffekte durch vorhandene freie Oligosaccharide getestet werden
- bestenfalls im Vorfeld die mutmaßliche Xyl-Struktur (Seitenketten und Substitutionsmuster) anhand der phylogenetischen Gruppe abschätzen

#### II. Durchführung

- 10 mg Probenmaterial in ein 2 mL Reaktionsgefäß einwiegen, 400 µL Reinstwasser zufügen und vortexen
- 2,5 µL XEG (1000 U/mL) zugeben und 24 h bei 40 °C im Schüttelinkubator inkubieren
- zum Abbruch der Reaktion 1,6 mL EtOH zugeben, 1 h präzipitieren lassen und zentrifugieren (13600 rpm, 10 min)
- Überstand abnehmen und durch Spritzenfilter (0,45 µm, Teflon) filtrieren
- 500 µL Filtrat bis zur Trockene eindampfen, in 150 µL 10 µM Isomaltotrioselösung aufnehmen und mittels HPAEC-PAD/MS analysieren
- Kontrollprobe: 10 mg Probenmaterial ohne Enzymzugabe mitführen und analysieren

#### III. Analyse mittels HPAEC-PAD

<b>Säule:</b>	CarboPac PA200
<b>Fluss:</b>	0,4 mL/min (Gradient siehe Tab. D4) Split nach Säule: 0,1 mL/min (PAD), 0,3 mL/min (MS)
<b>Injektionsvolumen:</b>	25 µL
<b>Säulentemperatur:</b>	25 °C
<b>PAD-Detektion:</b>	AgCl-Elektrode, angepasste Wellenform für Kohlenhydrate („Quad-Potential“)
<b>MS-Detektion:</b>	elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Wasser und anschließender Leitfähigkeitsdetektion zur Kontrolle der Entsalzung (temperiert auf 18 °C) Zuführung von 500 µM LiCl-Lösung mit 0,05 mL/min ESI, Positiv-Modus: Full- (300 - 1000) & Komponenten-Scan (Tab. D3)



**Tabelle D3** Komponentenliste der MS-Detektion zur Analyse der Xyloglucan-oligosaccharide (XGO) mittels HPAEC-PAD/MS

XGO	START [MIN]	ENDE [MIN]	MASSE [ $\mu$ g]
X	5	10	319,2
GG	5	15	349,2
XG	10	25	481,4
GGG, IMT	8	25	511,4
XX	12	25	613,5
GGGG	20	35	673,5
XXG	20	35	391,3
XXX	20	35	457,3
XFG	25	40	545,4
XLG	25	40	472,3
XXXG	30	42	538,4
XXFG	35	50	692,5
GLLG	35	50	634,5
XXLG	40	55	619,5
XLFG	40	55	773,6
XLLG	42	57	700,5
XSXG	55	75	604,5
XSLG	60	80	685,5
GSG	40	55	775,6
XSG	45	60	457,3
XSGG	55	75	538,4
GLSG	55	75	619,5
GSSG	65	89	604,5

**Tabelle D4** Gradientenprogramm der HPAEC-PAD/MS zur Analyse der Xyloglucan-oligosaccharide (XGO). Eluent A: Reinstwasser; Eluent B: 0,1 M NaOH; Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]	ELUENT C [%]
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	40	60	0
0	40	60	0
0,1	40	60	0
10,0	5	95	0
20,0	5	91,5	3,5
60,0	5	87,5	7,5
60,1	5	82,5	12,5
75,0	5	82,5	12,5
75,1	5	82,5	12,5
90,0	0	50	50
95,0	0	0	100
105	0	0	100

## j. Entfettung des Samenmehls

- isolierte Samen in flüssigem Stickstoff vorkühlen und in 15 s Intervallen bei 25000 rpm bis zur Korngröße < 0,5 mm mahlen
- ca. 12 g Samenmehl in Soxhlethülse einwiegen und in Soxhletextraktor geben
- stufenweise Extraktion mit 250 mL EtOH, Ethylacetat und *n*-Hexan (jeweils ~ 20 Durchläufe)
- Soxhletrückstand bei 60 °C im Trockenschrank trocknen und auswiegen

### k. Bestimmung der Ligningehalte nach Klason

#### I. Durchführung

- 7,5 mL 12 M Schwefelsäure in eine 100 mL Schottflasche mit Rührfisch vorlegen
- unter Eiskühlung 150 - 200 mg fein gemahlene UBS zugeben
- 30 min im Eisbad inkubieren, alle 5 min rühren (auf vollständige Benetzung achten)
- 2 h bei Raumtemperatur rühren
- 48,75 mL Reinstwasser zugeben und 3 h bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- Hydrolysat abkühlen lassen, quantitativ über getrockneten und gewogenen Glasfaserfilter (Grade GF/A, stickstofffrei, Whatman) filtrieren (Filtrat aufbewahren)
- Rückstand mit ca. 600 mL Reinstwasser säurefrei waschen
- Filter bei 60 °C im Trockenschrank trocknen und auswiegen

#### II. Aschegehalt

- Klason-Lignin-Rückstand mit Filter 5 h bei 500 °C veraschen
- Aschegehalt auswiegen

#### III. Restproteingehalt

- Klason-Lignin-Rückstand mit Filter und Glasperlen in Kjeldahl-Aufschlusskolben geben
- 500 mg Selenreaktionsgemisch und 5 mL konzentrierte Schwefelsäure hinzufügen
- Proben für 1 - 1,5 h auf Heizblock aufschließen
- Proben abkühlen lassen, 10 mL Reinstwasser dazugeben und quantitativ in einen 50 mL Messkolben überführen
- 1 mL der verdünnten Aufschlusslösung in ein Becherglas mit 49 mL Reinstwasser geben
- 3 mL 2 M NaOH zugeben und mit einem Uhrglas abdecken
- zeitnahe Messung mit Ammoniaksensitiver Elektrode
- Kalibrierung: Drei-Punkt-Kalibrierung (0,1 mg/L; 1 mg/L; 10 mg/L)

#### IV. Monosaccharidanalyse aus dem Klason-Hydrolysat

- 2 mL Klason-Lignin-Filtrat durch Spritzenfilter (0,45 µm, Teflon) filtrieren
- 100 µL Filtrat mit 75 µL 4 M NaOH und 825 µL Reinstwasser versetzen
- 20 µL mit 20 µL 1 mM D-Mannit-Lösung versetzen und 160 µL Reinstwasser hinzufügen
- mit Reinstwasser 1:2 verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren (siehe 8bIV)

## l. Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignins

- 10 - 25 mg fein gemahlene Driselase verdaute UBS in ein Pyrexglas einwiegen
- 4 mL Acetylbromid (25 %) in Essigsäure und einen Rührfisch zugeben
- 2 h bei 50 °C im Wasserbad rühren
- auf Eis abkühlen, 12 mL Essigsäure hinzufügen und 5 min bei 2500 rpm zentrifugieren
- 0,5 - 2,0 mL der Lösung (bzw. für den Blindwert: 0,5 - 2,0 mL Reinstwasser) in 10 mL Kolben pipettieren, 2,5 mL Essigsäure und 1,5 mL 0,3 M NaOH zugeben, mischen
- 0,5 mL 0,5 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung zugeben und mit Essigsäure auffüllen
- Messung der Absorption bei 280 nm in Quarzglasküvetten
- UV-Spektrum der Probe (200 - 400 nm), zur Überprüfung des Absorptionmaximums bei 280 nm, aufnehmen

## m. Aufarbeitung der Vanillesamen

- Vanilleschoten halbieren und Samen isolieren
- Samen über Nacht in Chloroform/Methanol-Lösung (2 : 1, v/v) stehen lassen
- anschließend mit Methanol und Aceton waschen und im Vakuumtrockenschrank über Nacht trocknen
- Samen dreifach für 30 s bei 25000 rpm mahlen
- Samenmehl mittels Chloroform/Methanol-Lösung (2 : 1, v/v), MeOH und Reinstwasser extrahieren und gefriertrocknen

## n. Thioacidolyse

### I. Durchführung

- 10 - 20 mg Driselase verdaute UBS (Vanillesamenmehl) in ein Pyrexglas einwiegen
- 3 mL Ethanthiol-Reagenz zugeben, mit Stickstoff überschichten und für 4 h bei 100 °C rühren
- auf Eis abkühlen und mit 0,4 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 3 - 4 einstellen
- 2 mL Reinstwasser hinzugeben und dreifach mit 4 mL Dichlormethan extrahieren
- organische Phase mit MgSO<sub>4</sub> (wasserfrei) trocknen, über Faltenfilter filtrieren und vollständig einrotieren
- Rückstand in 1 mL Dichlormethan aufnehmen
- 10 µL Probe in 1,5 mL Vial mit Insert pipettieren, 50 µL *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) und 40 µL Pyridin hinzufügen
- nach 30 min bei 60 °C im Trockenschrank mittels GC-MS analysieren

## II. Analyse mittels GC-MS

<b>Säule:</b>	DB-5MS
<b>Injektionsvolumen:</b>	1 µL
<b>Injektionstemperatur:</b>	220 °C
<b>Injektionsart:</b>	Split im Verhältnis 30 : 1
<b>Trägergas:</b>	Helium bei 1 mL/min
<b>Detektion:</b>	EI mit 70 eV, Transferline-Temperatur 275 °C, Je Probe wurde ein Lauf im Full-Scan- und im SIM-Modus durchgeführt SIM-Spuren des H-Lignin-Derivats: $m/z$ 388 ( $[M+H]^+$ ), 327 und <u>239</u> SIM-Spuren des G-Lignin-Derivats: $m/z$ 418 ( $[M+H]^+$ ), 403 und <u>269</u> SIM-Spuren des Catechyl-Lignin-Derivats: $m/z$ 476 ( $[M+H]^+$ ) und <u>327</u> SIM-Spuren des S-Lignin-Derivats: $m/z$ 448 ( $[M+H]^+$ ), 433 und <u>299</u>
<b>Temperaturprogramm:</b>	Anfangstemperatur 130 °C Aufheizphase mit 5 °C/min bis 300 °C (34 min), halten für 10 min

### o. 2D-Zellwandgel-NMR

- ausreichend Probenmaterial für 1 h 25 min bei 400 rpm in 5 min Intervallen in der Kugelmühle fein mahlen
- ca. 50 mg in NMR-Röhrchen einwiegen und 500 µL DMSO- $d_6$ /Pyridin- $d_5$  (4 : 1, v/v) hinzufügen (darauf achten, dass möglichst viel Probenmaterial benetzt wird)
- durch mehrmaliges Resuspendieren mit der Pipette und ausgiebige Ultraschallbadbehandlung zu einem homogenen Gel aufquellen
- bei Aufnahme bzw. Prozessierung der Spektren vorgegebene Parameter berücksichtigen

<b>Referenzierung:</b>	DMSO ( $\delta_H = 2,50$ ppm; $\delta_C = 39,52$ ppm)
<b>Aufnahmeparameter:</b>	HSQC (hsqcetgpsisp2.2), Scanzahl: 64, D1: 0,5 s Aufnahmezeit in F2-Dimension ( $^1H$ ) sollte ca. 85 ms betragen Aufnahmezeit in F1-Dimension ( $^{13}C$ ) sollte ca. 9 ms betragen
<b>Prozessierungsparameter:</b>	F2-Dimension: <i>Gaussian Multiplication</i> (GM) <i>Gaussian Broadening Factor</i> (GB) = 0,001, <i>Exponential Broadening Factor</i> (LB) = -0,3 F1-Dimension: <i>Quadratic Sine Window Function</i> (QSINE) <i>Sine Bell Shift</i> (SSB) = 2

## p. Butanol-HCl-Assay

### I. Extrahierbare Proanthocyanidine

- 5 – 10 mg Probenmaterial in lichtgeschütztes 2 mL Reaktionsgefäß einwiegen
- 1,7 mL Aceton-Lösung und 300 µL Methanol-Lösung zugeben, vortexen und 10 min im Ultraschallbad behandeln
- 57 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei alle 19 min vortexen
- 4 min bei 10000 rpm zentrifugieren, Überstand in neues lichtgeschütztes 2 mL Reaktionsgefäß überführen (Rückstand aus NEPA aufbewahren)
- 400 µL Überstand mit 1,6 mL BuOH-Reagenz und 53,5 µL Eisen-Reagenz versetzen und vortexen
- 1 mL abnehmen und Absorption bei 550 nm messen (Blindwert)
- übrige Lösung 2,5 h bei 70 °C im Schüttelinkubator behandeln
- 30 min abkühlen lassen und Absorption bei 550 nm messen (Probenwert)

**Kalibrierung:** 5 mg PA-Standard einwiegen und mitführen (2.500 µg/mL), vor Zugabe des BuOH-Reagenzes in entsprechenden Lösungen verdünnen und analog weiter aufarbeiten und bei 550 nm messen

Fünf-Punkt-Kalibrierung: 50 µg/mL, 137,5 µg/mL, 225 µg/mL, 312,5 µg/mL, 400 µg/mL

### II. Nicht-Extrahierbare Proanthocyanidine

- Extraktionsrückstand mit 340 µL Aceton-Lösung und 60 µL Methanol-Lösung versetzen und vortexen
- 1,6 mL BuOH-Reagenz und 53,5 µL Eisen-Reagenz hinzufügen und vortexen
- 4 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- 1 mL abnehmen, ggf. analog zur Probe verdünnen und Absorption bei 550 nm messen (Blindwert)
- Rückstand in restlicher Lösung resuspendieren und vortexen
- Suspension 2,5 h bei 70 °C im Schüttelinkubator behandeln
- 30 min abkühlen lassen und anschließend 4 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- Absorption bei 550 nm messen und ggf. verdünnen (Probenwert)

## q. Phloroglucinolyse

## I. Durchführung

- 10 – 20 mg Probe in ein lichtgeschütztes 2 mL Reaktionsgefäß einwiegen
- 500 µL Phloroglucinpuffer zugeben und 20 min bei 50 °C im Schüttelinkubator inkubieren
- Reaktion mit 500 µL Natriumacetatpuffer stoppen
- Blindwert: 10 – 20 mg Probe in ein lichtgeschütztes 2 mL Reaktionsgefäß einwiegen, Reaktion durch Zugabe von 500 µL Natriumacetatpuffer unterbinden, anschließend 500 µL Phloroglucinpuffer zugeben, 20 min auf Eis „inkubieren“
- alle Proben 10 min bei 12000 rpm zentrifugieren, Überstand durch Spritzenfilter (0,45 µm, Teflon) filtrieren
- Filtrate 1 : 4 mit Reinstwasser verdünnen und mittels LC-MS analysieren

## II. Analyse mittels LC-MS

**Säule:** Luna C18(2)

**Fluss:** 0,5 mL/min (Gradient siehe Tab. D6)

**Injektionsvolumen:** 20 µL

**Säulentemperatur:** 30 °C

**Detektion:** DAD und MS

MS: ESI im Positiv-Modus für PA-Monomere, im Negativ-Modus für PA-Dimere. Jeweils mit Full-Scan (80 - 1000) und SIM-Scans (Tab. D5)

**Tabelle D5** Ausgewählte Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ) der MS-Detektion zur Analyse der Proanthocyanidine (PA) nach Phloroglucinolyse. Mit \* markierte Analyten wurden im Negativ-Modus detektiert. P, Phloroglucinaddukt.

PA-MONOMER	MASSE [ $m/z$ ]
(Epi)Afzelechin	275
(Epi)Catechin	291
(Epi)Gallocatechin	307
(Epi)Afzelechin-P	399
(Epi)Catechin-P	415
(Epi)Gallocatechin-P	431
(Epi)Catechingallat	443
(Epi)Catechingallat-P	567
(Epi)Catechin-Dimer (A-Typ) *	575
(Epi)Catechin-Dimer-P (A-Typ) *	699

**Tabelle D6** Gradientenprogramm in der LC-MS zur Analyse der Proanthocyanidine (PA) nach Phloroglucinolyse. Eluent A: Reinstwasser mit 1 % Essigsäure; Eluent B: Acetonitril mit 1 % Essigsäure.

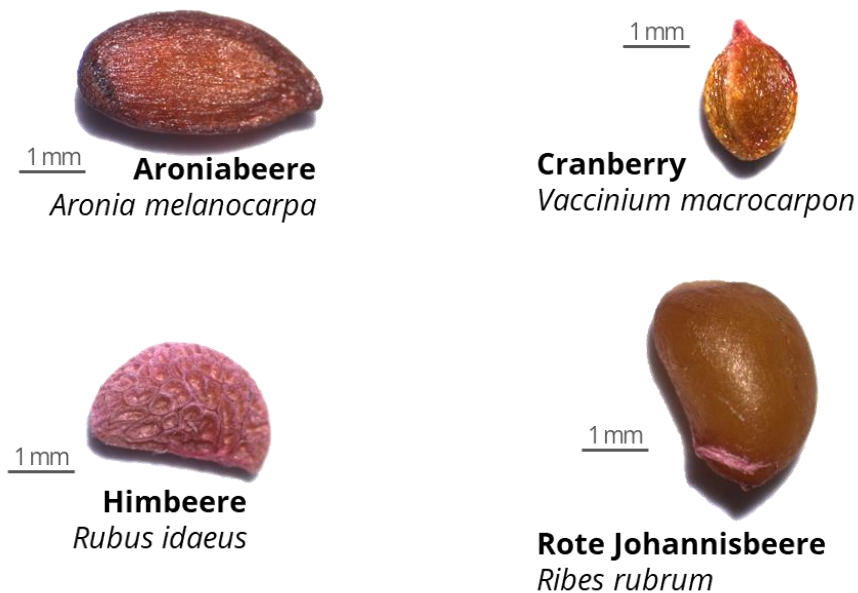
ZEIT [MIN]	ELUENT A [%]	ELUENT B [%]
0,0	93	7
10,0	93	7
10,1	98	2
25,0	98	2
25,5	88	12
40,0	88	12
60,0	70	30
61,0	10	90
71,0	10	90
72,0	93	7
82,0	93	7



## 9. Anhang

**Tabelle A1** Zusammensetzung (mol%  $\pm$  Range/2, n = 2) der freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (XGO) aus unlöslichen Ballaststoffen (UBS) verschiedener Lebensmittelpflanzen. Darunter sind die daraus errechnete Monosaccharidverteilung der XGO und der Substitutionsgrad (DS) angegeben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose

XGO	MANGO	ORANGE	AVOCADO	KÜRBIS	RHABARBER
	UBS	UBS	UBS	UBS	UBS
GGG	0,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
XG	10,7 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,1	9,7 $\pm$ 0,5	16,8 $\pm$ 0,1	18,7 $\pm$ 0,1
XX	9,7 $\pm$ 0,4	11,5 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,7	15,9 $\pm$ 0,1	17,5 $\pm$ 0,1
XXG	1,8 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,1
XXX	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
XXXG	9,9 $\pm$ 0,3	10,7 $\pm$ 0,1	9,6 $\pm$ 0,7	10,2 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,3
XLG	0,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,1
XXLG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XLLG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
XFG	3,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1
XXFG	39,5 $\pm$ 0,1	25,8 $\pm$ 0,3	22,4 $\pm$ 0,1	24,8 $\pm$ 0,4	25,5 $\pm$ 0,1
XLFG	24,1 $\pm$ 0,6	32,8 $\pm$ 0,2	42,9 $\pm$ 0,1	20,0 $\pm$ 0,3	25,5 $\pm$ 0,1
Glc	48,0	48,8	46,8	51,1	49,9
Xyl	35,0	34,9	34,2	36,0	35,7
Gal	9,7	9,9	11,7	7,7	8,6
Fuc	7,2	6,4	7,3	5,2	5,8
DS [%]	73,0	71,6	73,1	70,5	71,7



**Abbildung A2** Aufnahmen der Samen der Beerenobstsorten unter einem Stereomikroskop. Die vier Samen sind im korrekten Größenverhältnis zueinander abgebildet.



**Tabelle A3** Daten der Monosaccharidanalyse (mol% ± Standardabweichung, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse aus ganzen Aroniabeeren und den angereicherten Fruchtgeweben. Ara, Arabinose; AUR, Alkoholunlöslicher Rückstand; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

ARONIABEERE	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA	GlcA	
Ganze Frucht	1,7 ± 0,1	9,1 ± 0,4	13,2 ± 0,8	42,8 ± 0,5	25,1 ± 1,1	5,0 ± 0,3	3,6 ± 0,3		
UBS	Fruchtrückstand	1,2 ± 0,2	6,9 ± 0,2	11,5 ± 0,2	44,0 ± 1,3	28,8 ± 0,5	4,9 ± 0,6	2,6 ± 0,3	
	Fruchtfleisch (AUR)		6,1 ± 0,5	14,8 ± 0,4	48,8 ± 1,5	15,1 ± 0,8	12,0 ± 1,2	3,2 ± 0,5	
	Samen		21,4 ± 0,7	6,3 ± 0,1	54,8 ± 0,1	7,1 ± 0,1	6,2 ± 0,5	4,3 ± 0,4	
Ganze Frucht	5,1 ± 0,1	13,8 ± 0,9	16,7 ± 0,2	3,0 ± 0,3	4,1 ± 0,1	24,5 ± 0,8	31,9 ± 1,1	1,1 ± 0,1	
LBS	Fruchtrückstand	6,3 ± 0,1	19,2 ± 0,5	21,5 ± 0,5	2,9 ± 0,2	3,7 ± 0,6	11,4 ± 0,6	34,6 ± 0,3	
	Fruchtfleisch (AUR)	4,5 ± 0,8	14,2 ± 0,2	19,3 ± 1,3	4,0 ± 0,6	9,7 ± 0,8	13,3 ± 0,5	32,9 ± 3,0	2,1 ± 0,4
	Samen	0,4 ± 0,7	12,2 ± 1,0	10,7 ± 0,3	4,1 ± 0,1	21,8 ± 0,7	19,6 ± 0,8	27,2 ± 1,7	4,1 ± 0,4

**Tabelle A4** Daten der Monosaccharidanalyse (mol% ± Standardabweichung, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse aus ganzen Cranberries und den angereicherten Fruchtgeweben. Ara, Arabinose; AUR, Alkoholunlöslicher Rückstand; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

CRANBERRY	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA	GlcA
Ganze Frucht	1,1 ± 0,1	15,4 ± 0,2	9,3 ± 0,2	51,4 ± 0,3	15,5 ± 0,4	6,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1	
UBS	Fruchtrückstand	0,7 ± 0,1	14,6 ± 0,3	8,6 ± 0,3	53,9 ± 0,8	15,1 ± 0,8	6,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1
	Fruchtfleisch (AUR)	0,9 ± 0,1	15,4 ± 0,1	9,0 ± 0,2	51,5 ± 1,0	15,7 ± 0,3	6,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1
	Samen		16,4 ± 0,1	7,7 ± 0,2	51,5 ± 0,4	17,8 ± 0,5	3,1 ± 0,3	3,5 ± 0,1
Ganze Frucht	3,7 ± 0,5	20,5 ± 1,3	12,6 ± 0,3	4,8 ± 0,6	3,8 ± 0,3	13,3 ± 0,6	41,1 ± 1,4	
LBS	Fruchtrückstand	3,4 ± 0,6	21,4 ± 1,5	12,1 ± 0,6	2,3 ± 0,4	3,3 ± 0,2	7,9 ± 0,3	49,6 ± 2,5
	Fruchtfleisch (AUR)	3,4 ± 0,5	26,3 ± 1,3	16,2 ± 1,4	5,2 ± 0,9	12,2 ± 1,3	5,1 ± 0,4	31,5 ± 2,2
	Samen	7,1 ± 0,5	24,7 ± 0,1	16,5 ± 1,1	3,9 ± 1,8	5,3 ± 1,0	9,5 ± 0,7	32,8 ± 2,6

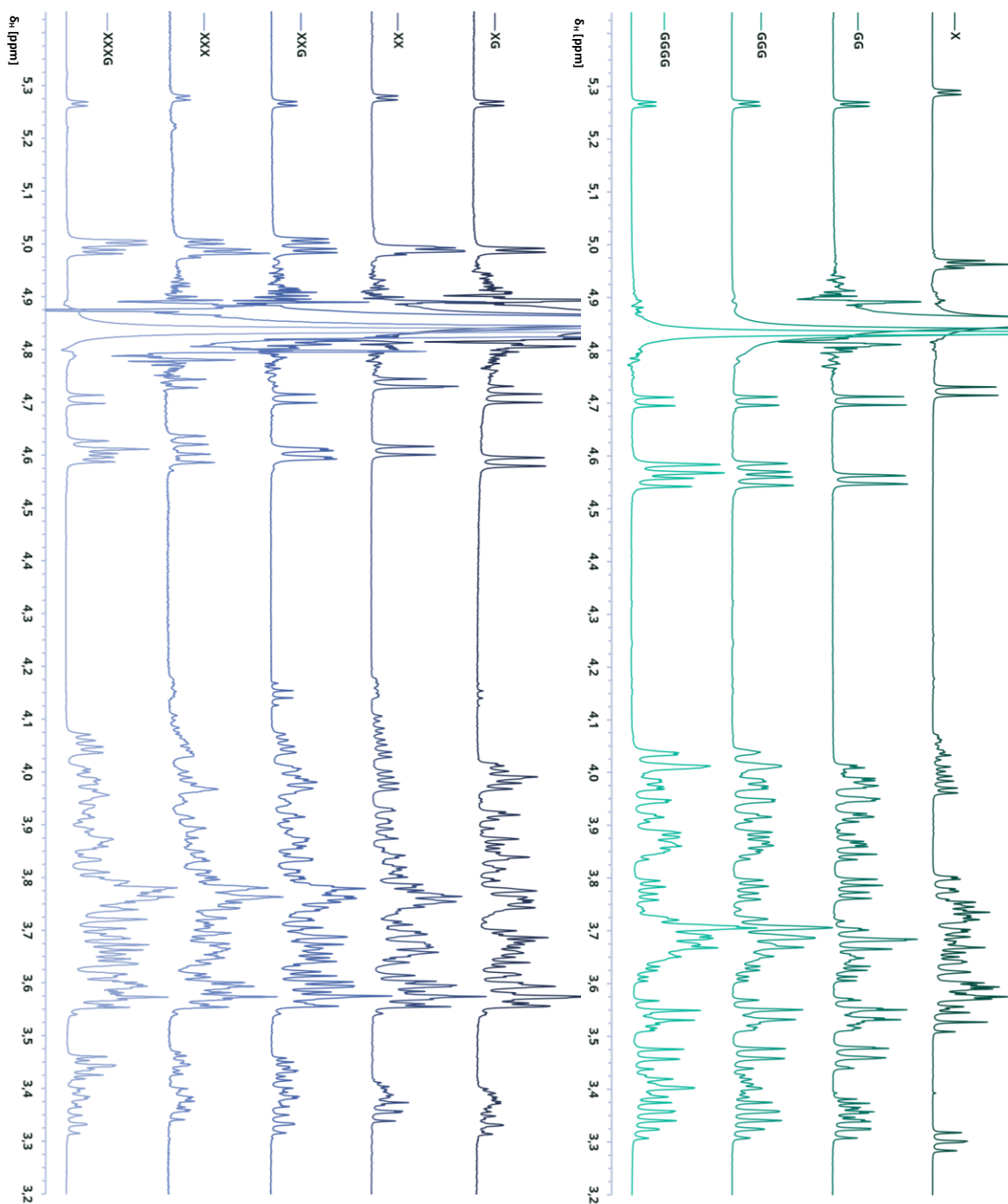
## 9. Anhang

**Tabelle A5** Daten der Monosaccharidanalyse (mol% ± Standardabweichung, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse aus ganzen Himbeeren und den angereicherten Fruchtgeweben. Ara, Arabinose; AUR, Alkoholunlöslicher Rückstand; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

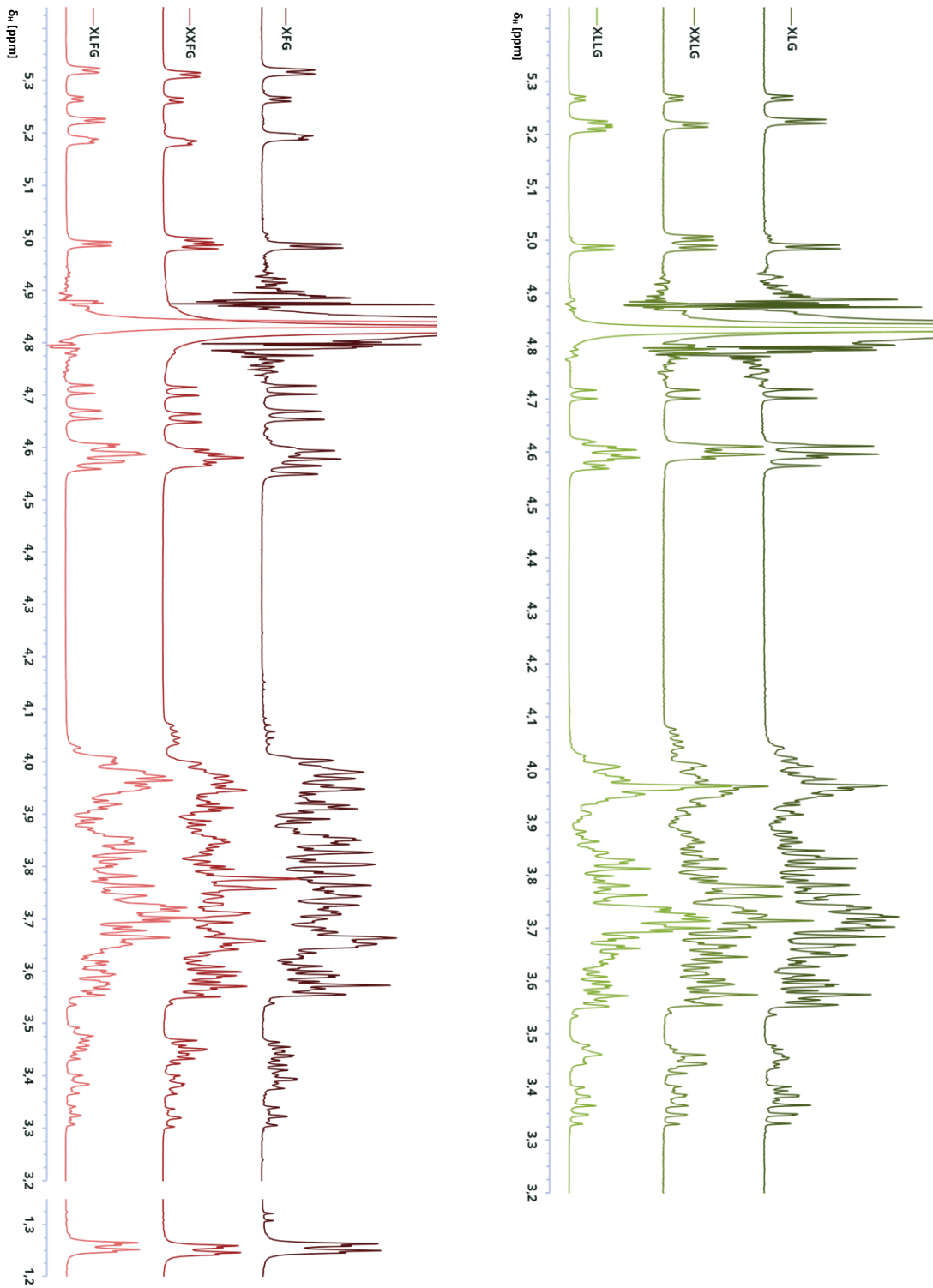
HIMBEERE		Fuc	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	GalA	GlcA
UBS	Ganze Frucht			3,1 ± 0,2	3,9 ± 0,2	47,8 ± 0,8	36,1 ± 1,6	3,8 ± 0,5	5,0 ± 0,6	
	Fruchtrückstand	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,2	46,7 ± 1,4	17,7 ± 0,7	6,4 ± 0,5	11,5 ± 0,2	
	Fruchtfleisch (AUR)	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,2	3,5 ± 0,3	9,4 ± 0,3	51,9 ± 1,1	21,3 ± 0,2	9,0 ± 0,3	1,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
	Samen			2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1	50,7 ± 0,5	44,4 ± 0,6			
LBS	Ganze Frucht		7,5 ± 1,4	26,1 ± 0,8	14,8 ± 0,4	4,3 ± 1,2	3,8 ± 0,6	16,4 ± 0,8	27,1 ± 1	
	Fruchtrückstand		7,4 ± 0,8	23,9 ± 1,4	14,7 ± 0,3	5,9 ± 1,2	3,1 ± 0,4	15,6 ± 0,6	29,2 ± 2,3	
	Fruchtfleisch (AUR)		6,1 ± 0,4	35,1 ± 2,1	13,2 ± 1,0	2,6 ± 0,6	4,0 ± 0,2	3,0 ± 0,6	35,9 ± 3	
	Samen		5,6 ± 0,2	15,3 ± 0,4	13,0 ± 0,3	6,4 ± 0,1	8,8 ± 0,3	25,4 ± 0,1	24,4 ± 1	1,2 ± 0,2

**Tabelle A6** Daten der Monosaccharidanalyse (mol% ± Standardabweichung, n = 3) der unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffe (UBS bzw. LBS) nach Schwefelsäurehydrolyse bzw. Methanolyse aus ganzen Roten Johannisbeeren und den angereicherten Fruchtgeweben. Ara, Arabinose; AUR, Alkoholunlöslicher Rückstand; Gal, Galactose; GalA, Galacturonsäure; Glc, Glucose; GlcA, Glucuronsäure; Man, Mannose; Rha, Rhamnose; Xyl, Xylose

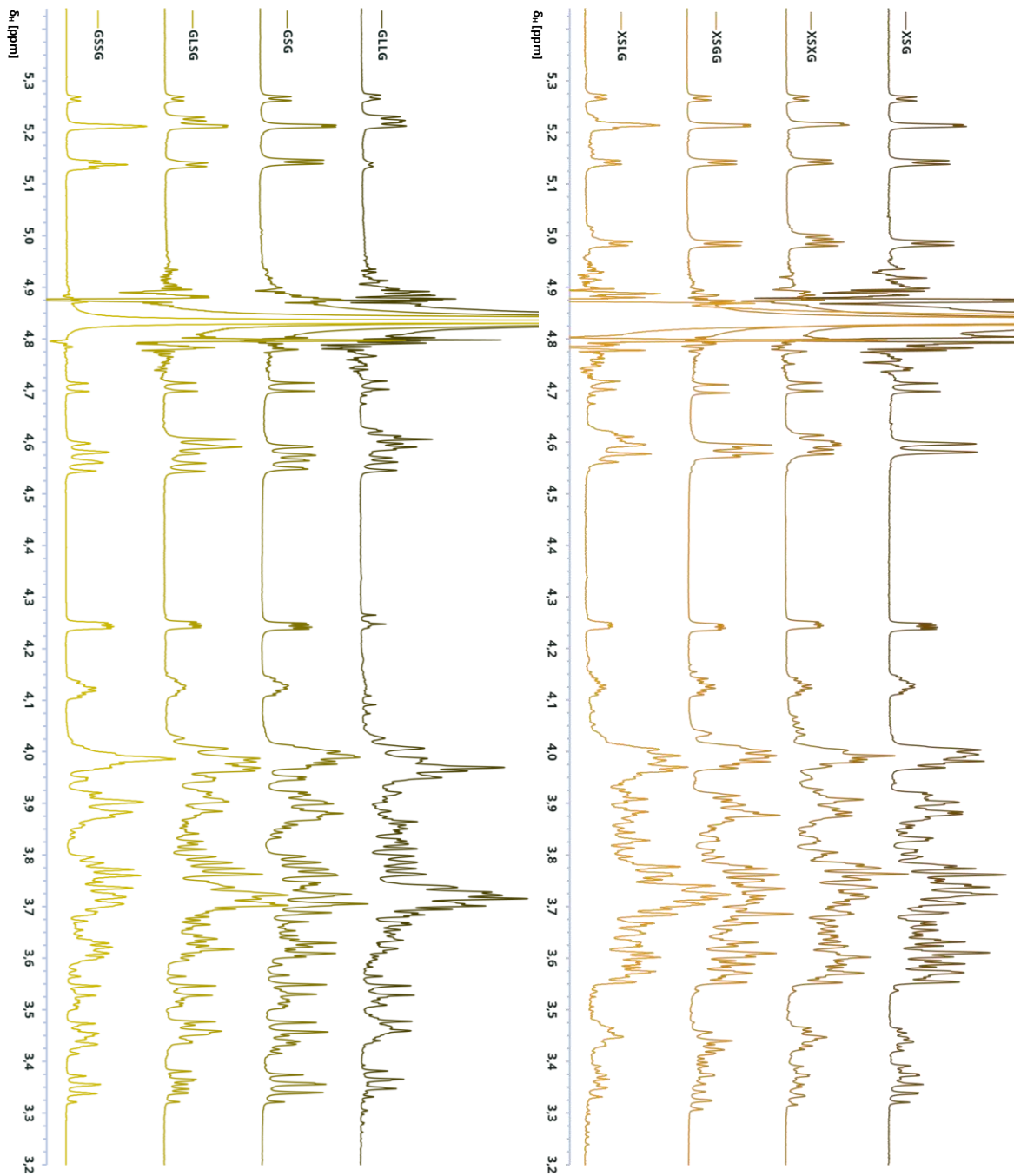
ROTE JOHANNISBEERE		Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Api	GalA	GlcA
UBS	Ganze Frucht	0,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	4,4 ± 0,1	26,2 ± 1,5	6,8 ± 0,2	54,3 ± 0,1		3,6 ± 0,1	
	Fruchtrückstand	1,3 ± 0,1	5,1 ± 0,1	6,3 ± 0,1	52,5 ± 0,5	17,4 ± 1,1	9,6 ± 0,4		8,2 ± 0,4	
	Fruchtfleisch (AUR)	1,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1	8,9 ± 0,5	53,7 ± 1,5	22,5 ± 2,5	6,4 ± 0,3		4,0 ± 0,3	
	Samen		3,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	15,5 ± 0,1		78,3 ± 0,1			
LBS	Ganze Frucht	6,1 ± 0,1	17,9 ± 0,6	9,2 ± 0,6	4,8 ± 0,1	2,6 ± 0,5	19,4 ± 0,2		40,1 ± 1,8	
	Fruchtrückstand	6,6 ± 0,1	21,1 ± 1,1	10,0 ± 0,1	4,5 ± 0,5	1,8 ± 0,3	8,6 ± 0,1		47,4 ± 1,9	
	Fruchtfleisch (AUR)	8,2 ± 0,5	22,5 ± 0,9	9,3 ± 0,5	2,8 ± 0,6	3,3 ± 0,5	7,4 ± 0,1		46,5 ± 1,9	
	Samen	0,2 ± 0,4	11,4 ± 0,7	14,7 ± 0,5	4,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1	58,1 ± 0,6	1,1 ± 0,8	4,5 ± 0,3	1,0 ± 0,2



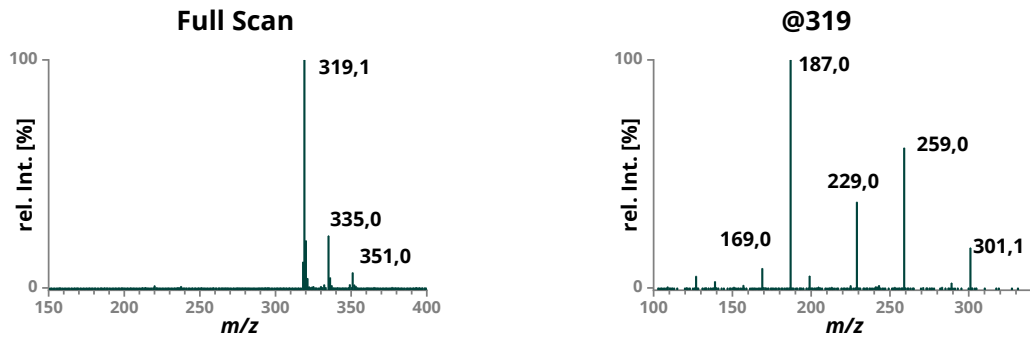
**Abbildung A7** Erweiterte Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Xyloglucanligosaccharid-Standards. Die Gruppe rechts beinhaltet die kommerziell erworbenen Xyloglucanligosaccharide (XGO) X, GG, GGG und GGGG. Die Gruppe links umfasst die Xyloglucanligosaccharide ohne verlängerte Xylose-Seitenketten XG, XX, XXG, XXX und XXXG. Die Ausschnitte zeigen den gesamten Signalbereich der XGO. Das intensive Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 4,8 - 4,9$  ppm entspringt dem Lösungsmittel. Die Spektren wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ( $\delta_{\text{H}} = 2,22$  ppm). Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).



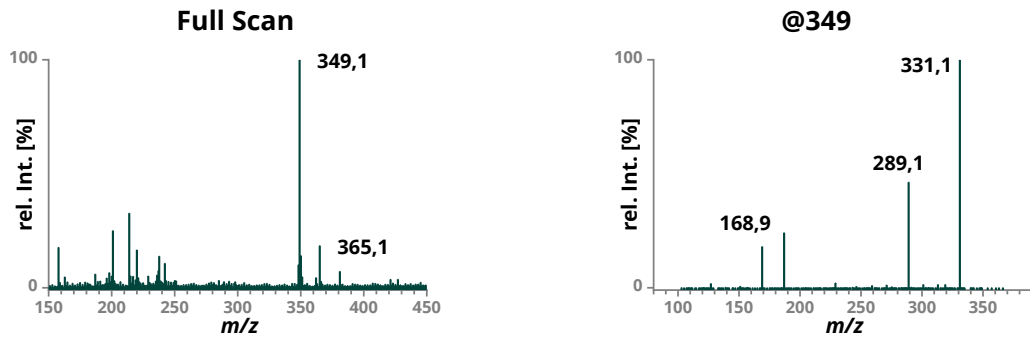
**Abbildung A8** Erweiterte Ausschnitte der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Xyloglucanoligosaccharid-Standards. Die Gruppe rechts beinhaltet die Xyloglucanoligosaccharide (XGO) mit dem L-Baustein XLG, XXLG und XLLG. Die Gruppe links umfasst fucosylierte XGO XFG, XXFG und XLFG. Die Ausschnitte zeigen den gesamten Signalbereich der XGO. Links wurde zusätzlich der Signalbereich der Methylgruppe von Position C-6 der Fucose angefügt. Das intensive Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 4,8 - 4,9$  ppm entspringt dem Lösungsmittel. Die Spektren wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ( $\delta_{\text{H}} = 2,22$  ppm). Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).



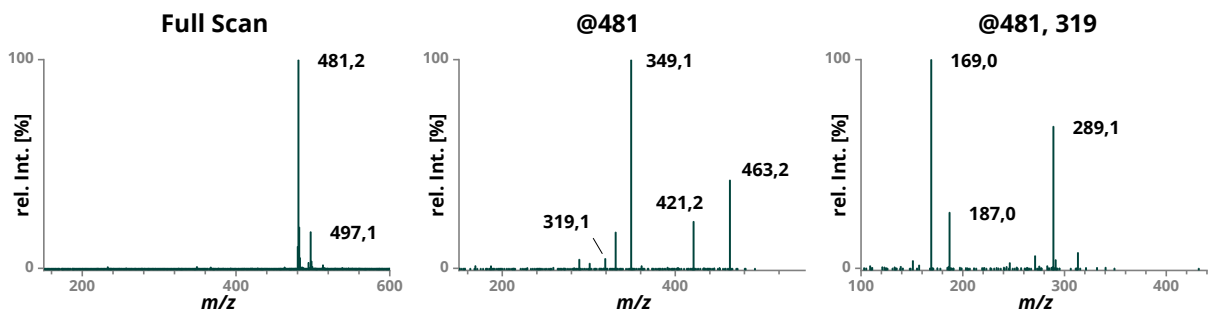
**Abbildung A9** Erweiterte Ausschnitte der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Xylogluco-oligosaccharid-Standards. Die Gruppe rechts beinhaltet die Xylogluco-oligosaccharide (XGO) mit dem S-Baustein XSG, XSXG, XSGG und XSLG. Die Gruppe links umfasst XGO mit einer unsubstituierten Glucoseeinheit am terminalen Ende GLLG, GSG, GLSG, GSSG. Die Ausschnitte zeigen den gesamten Signalbereich der XGO. Das intensive Signal bei  $\delta_{\text{H}} = 4,8 - 4,9$  ppm entspringt dem Lösungsmittel. Die Spektren wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ( $\delta_{\text{H}} = 2,22$  ppm). Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015).



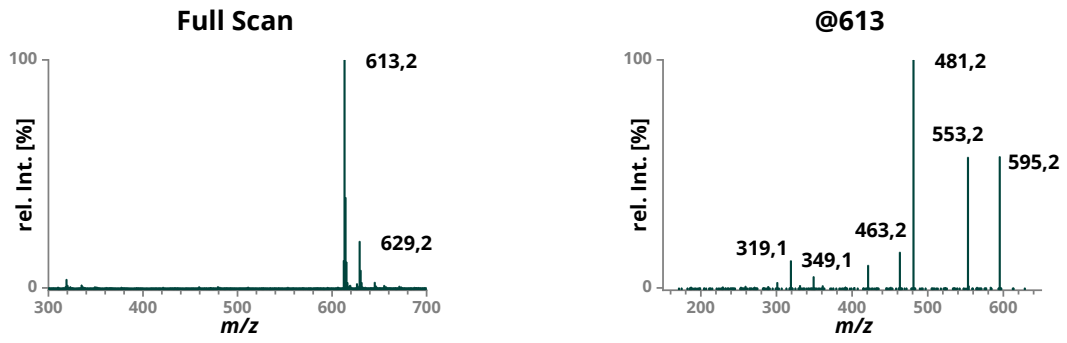
**Abbildung A10** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards X. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



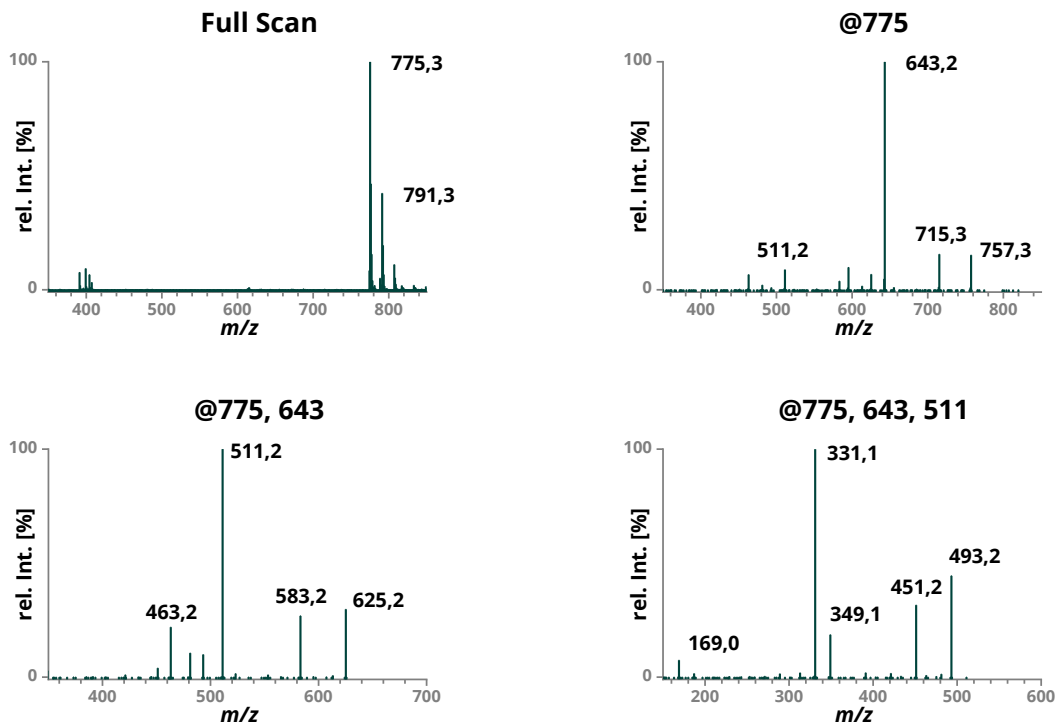
**Abbildung A11** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards GG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



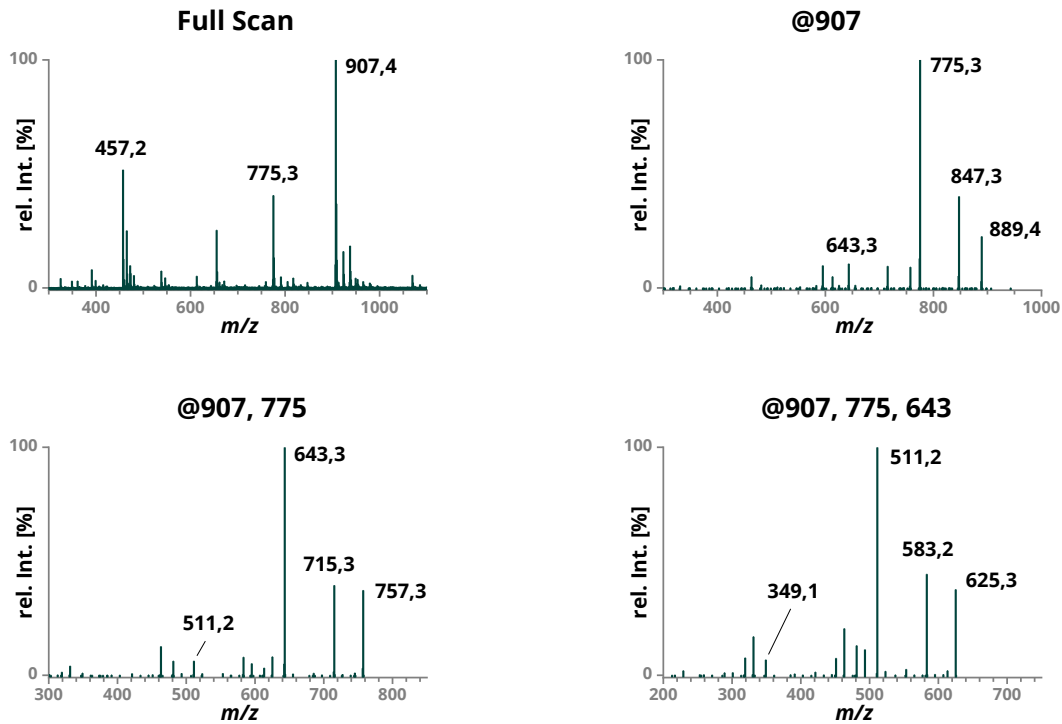
**Abbildung A12** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



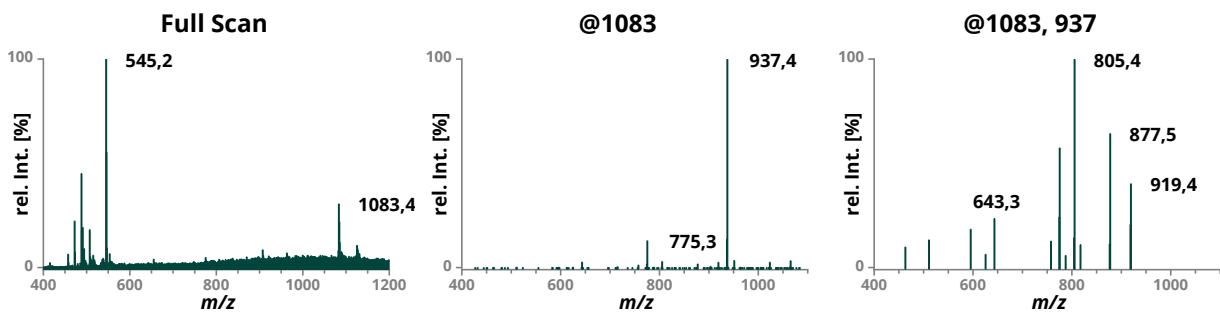
**Abbildung A13** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XX. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



**Abbildung A14** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XXG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

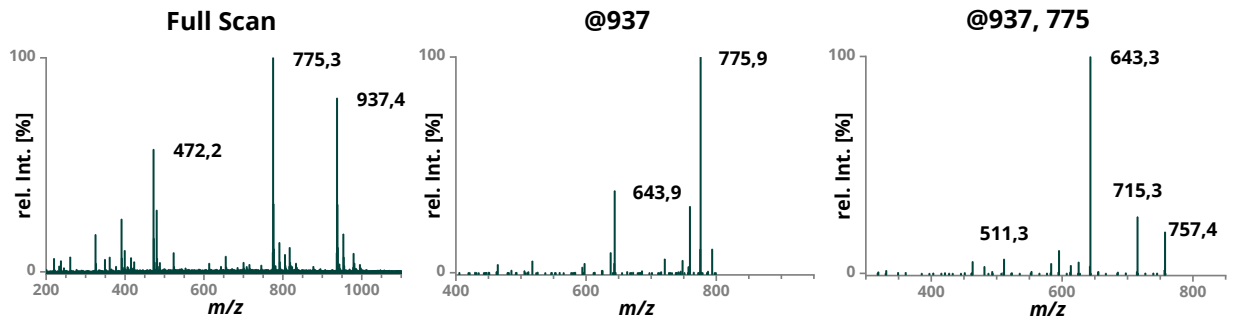


**Abbildung A15** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XXX. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

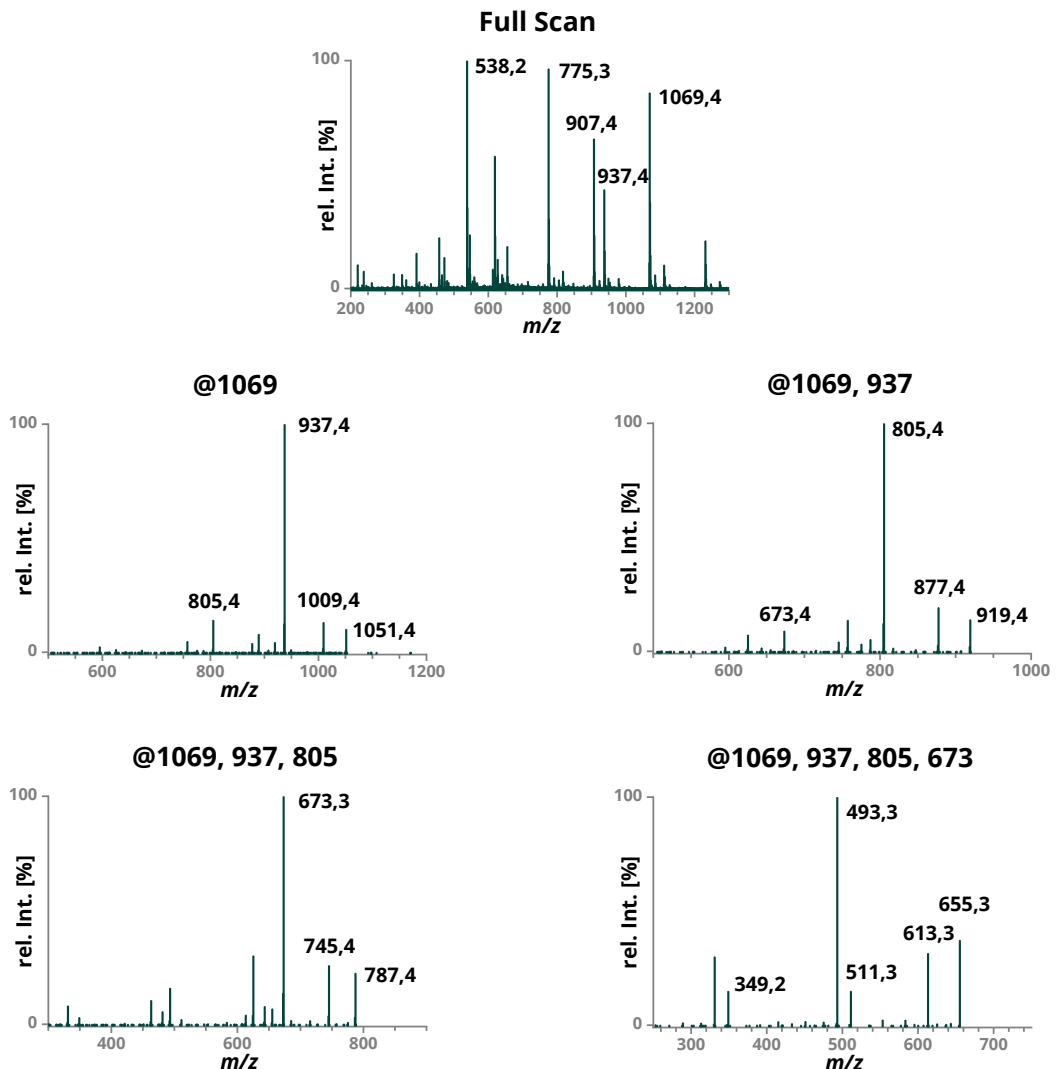


**Abbildung A16** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XFG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

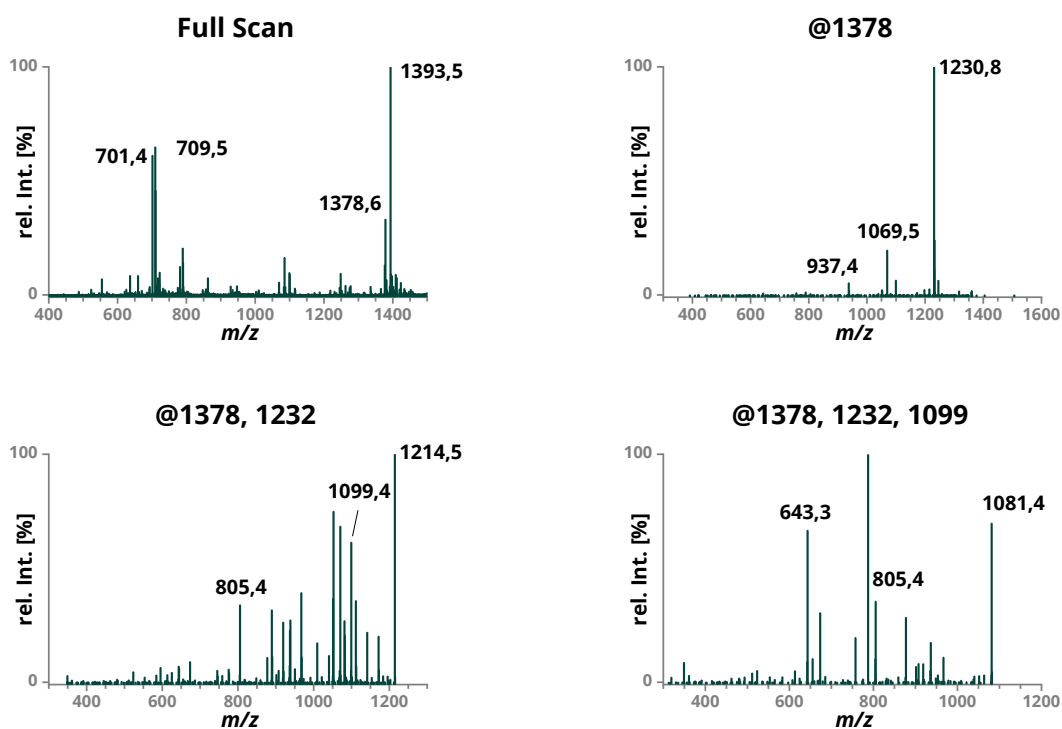




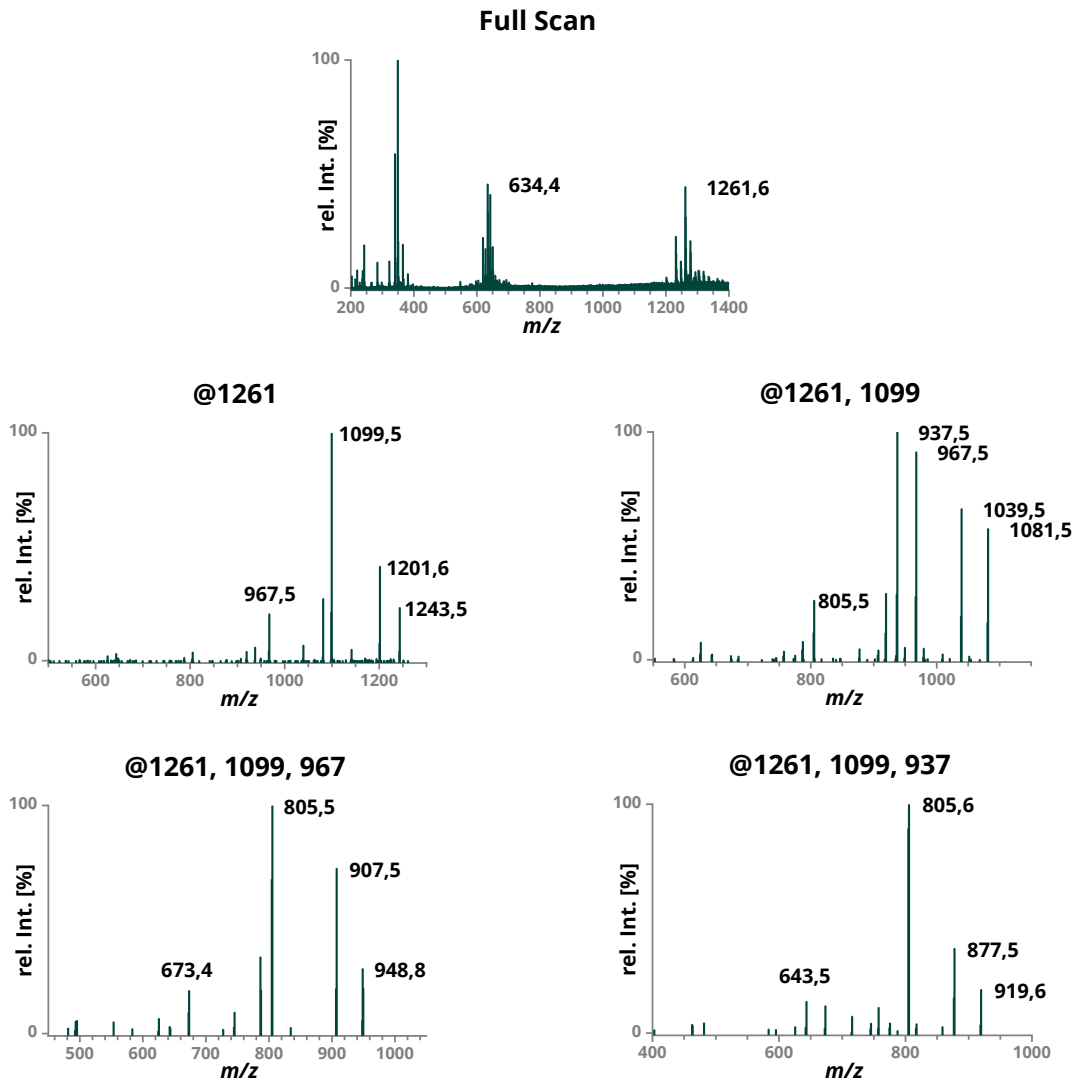
**Abbildung A17** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XLG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



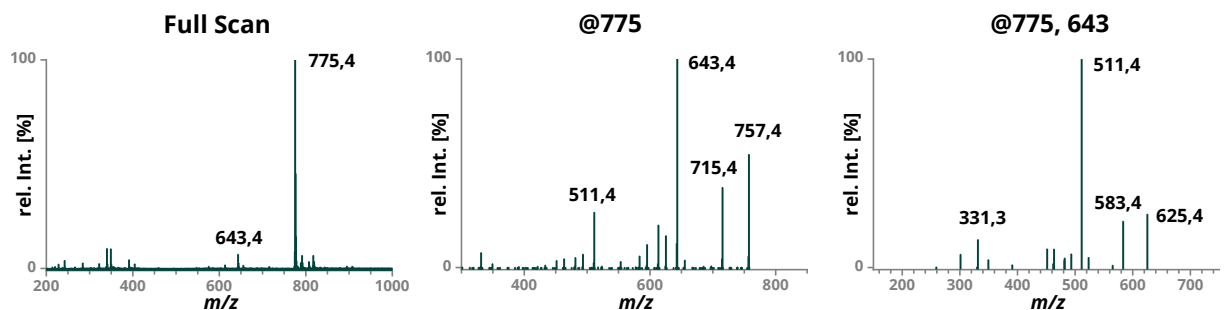
**Abbildung A18** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XXXG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



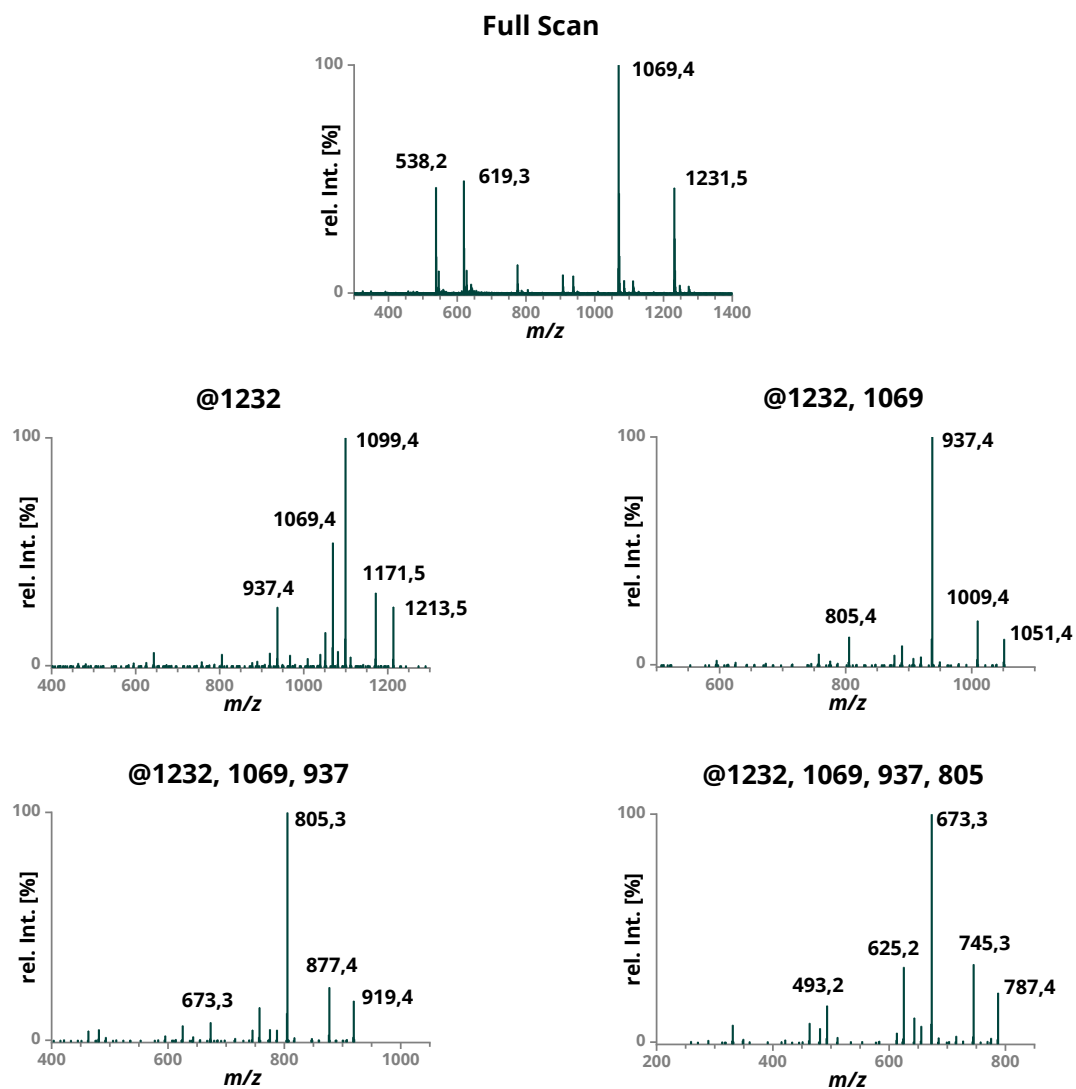
**Abbildung A19** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanligosaccharid-Standards XXFG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimoleküle des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



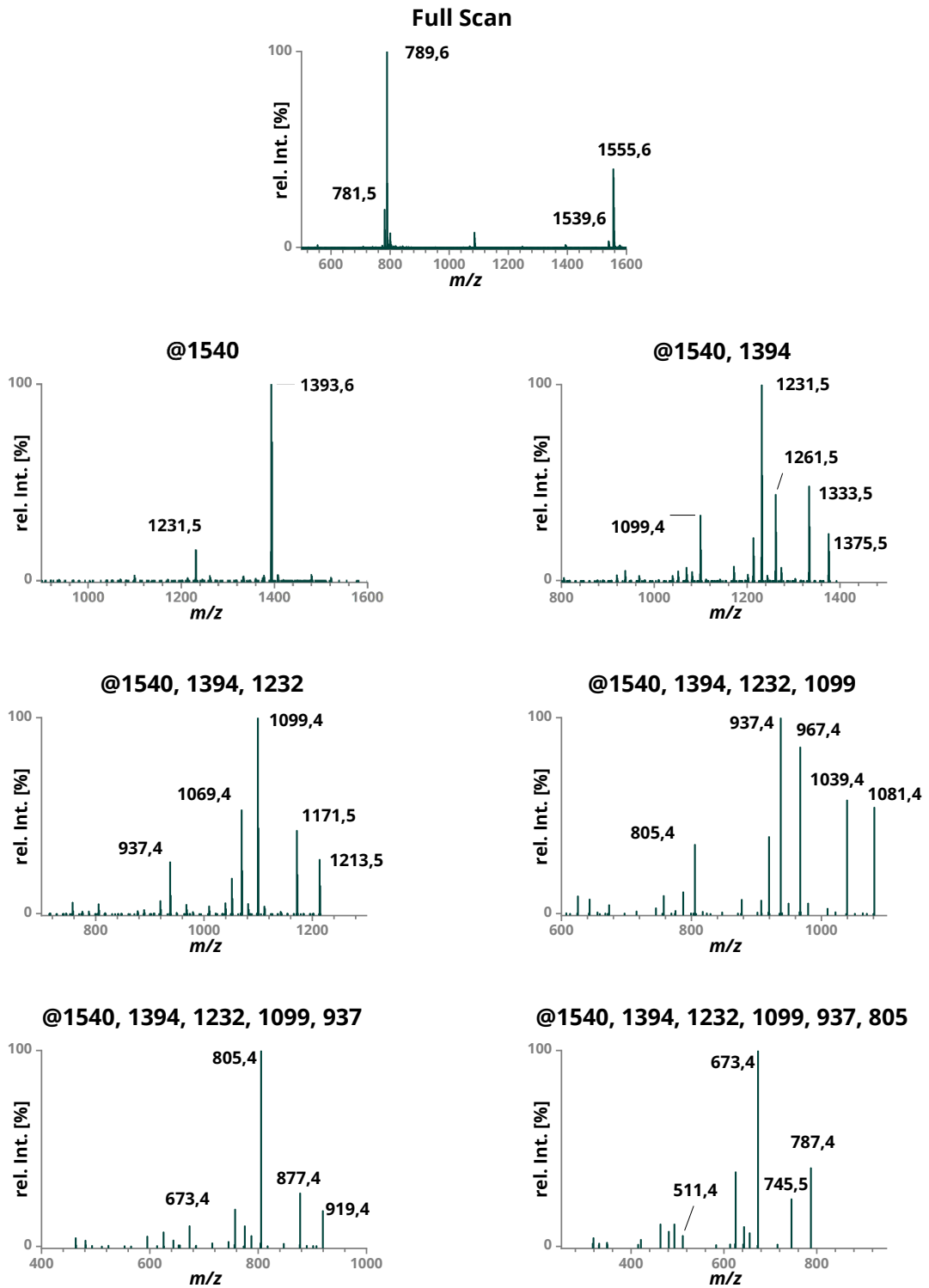
**Abbildung A20** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards GLLG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



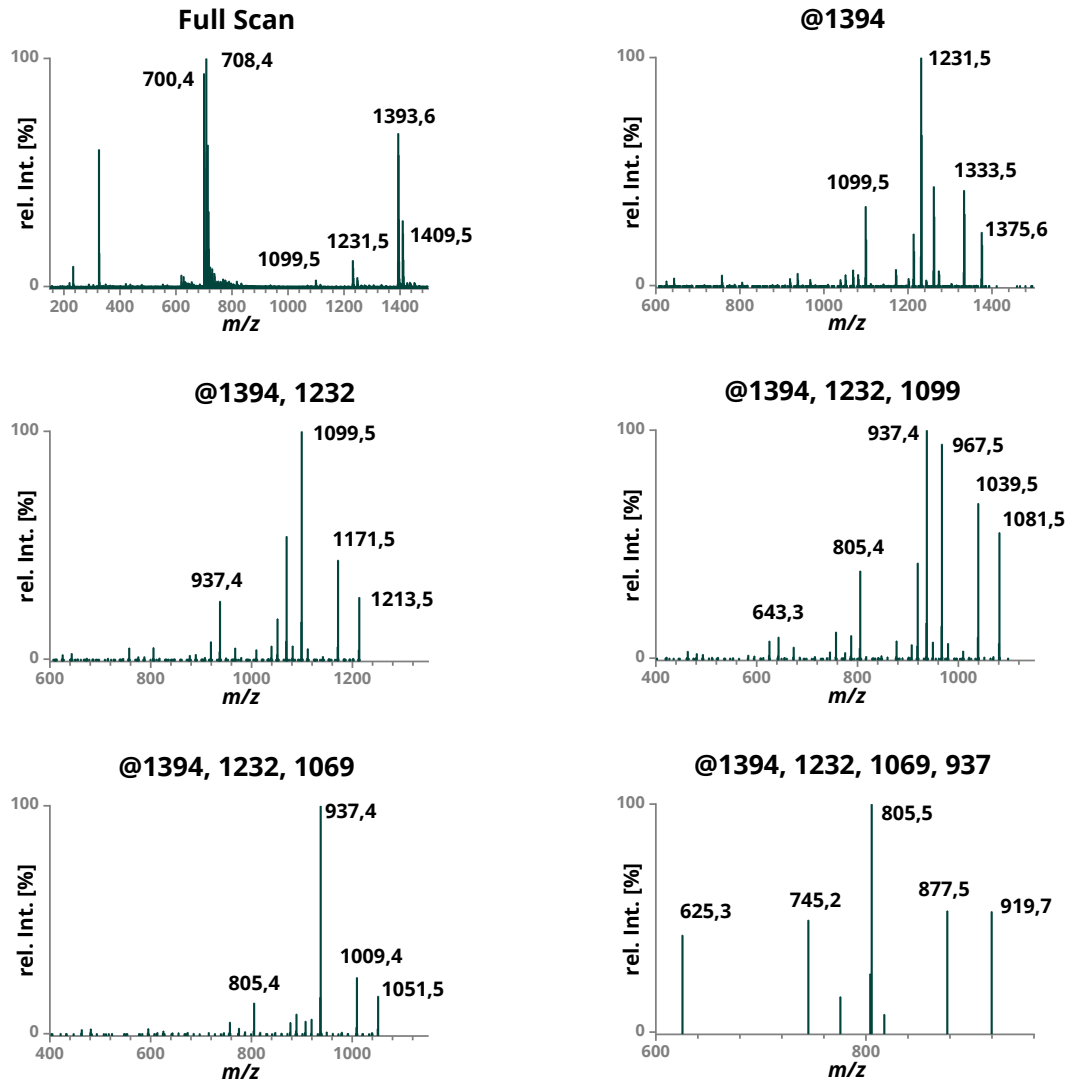
**Abbildung A21** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards GSG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



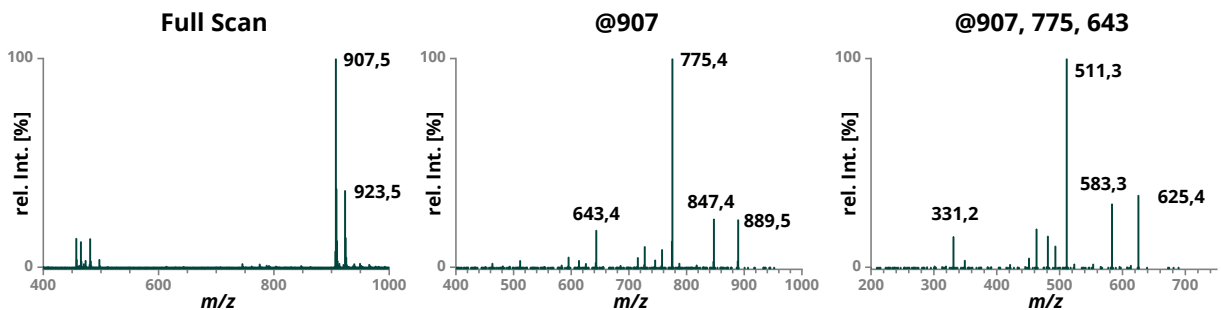
**Abbildung A22** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards XXLG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimoleküle des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



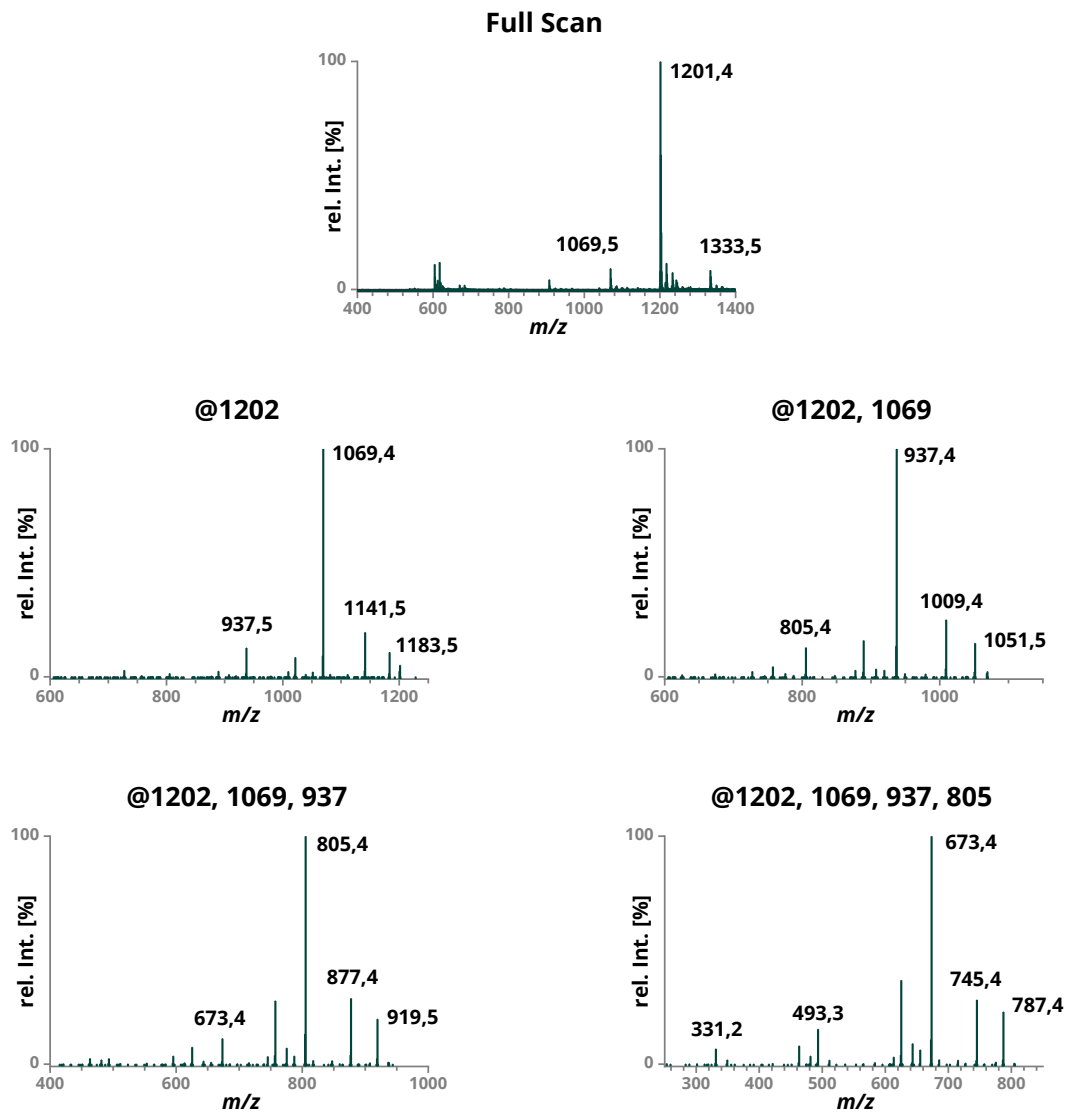
**Abbildung A23** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards XLFG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



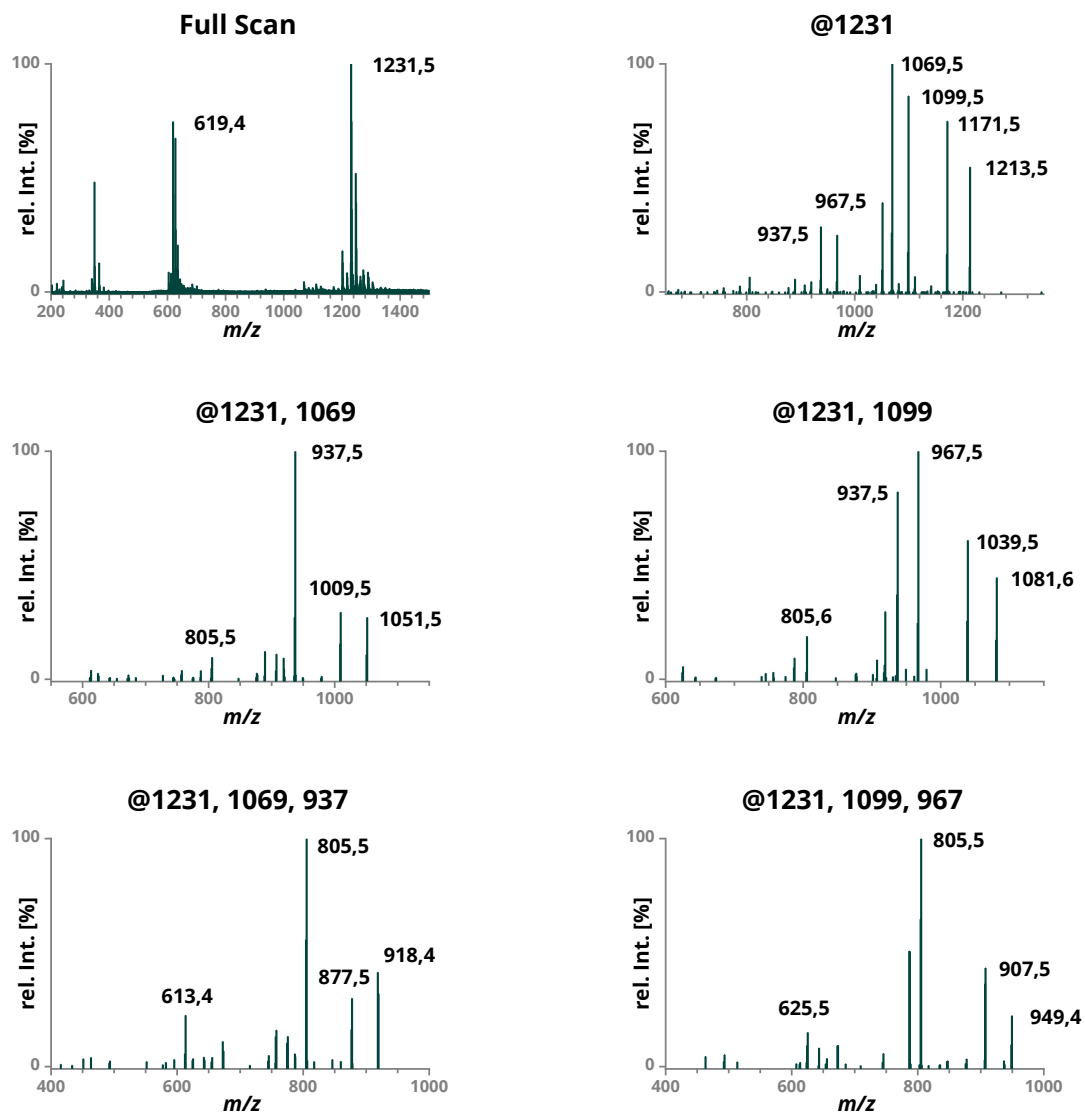
**Abbildung A24** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards XLLG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimoleküle des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



**Abbildung A25** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards XSG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimoleküle des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

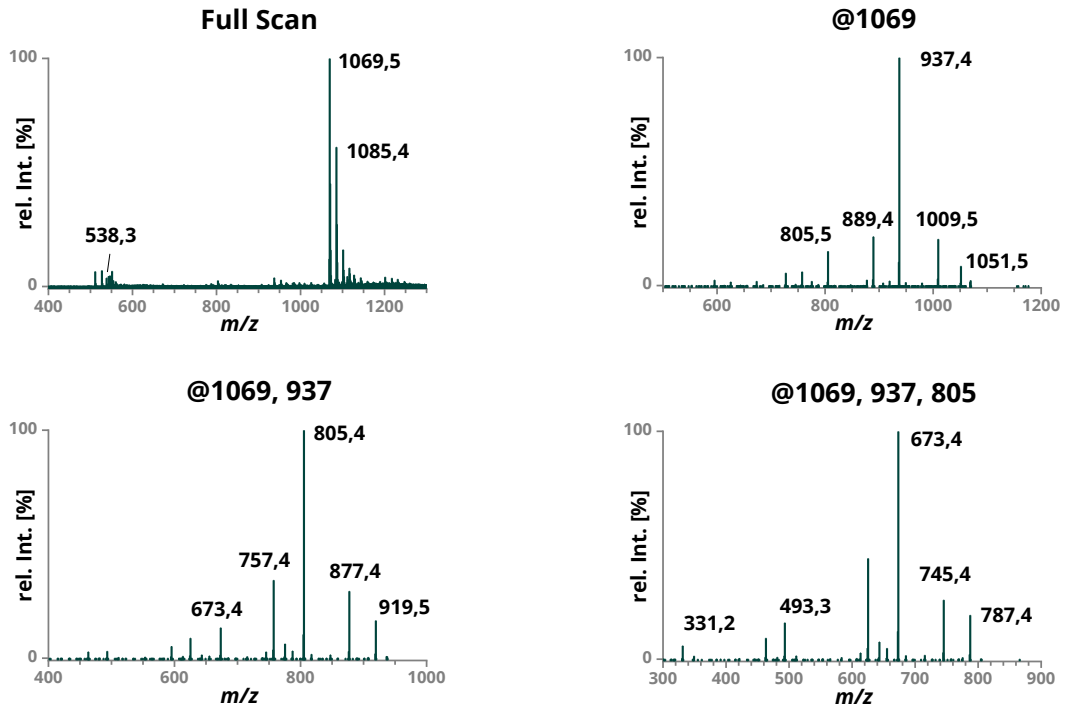


**Abbildung A26** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucan oligosaccharid-Standards XSXG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

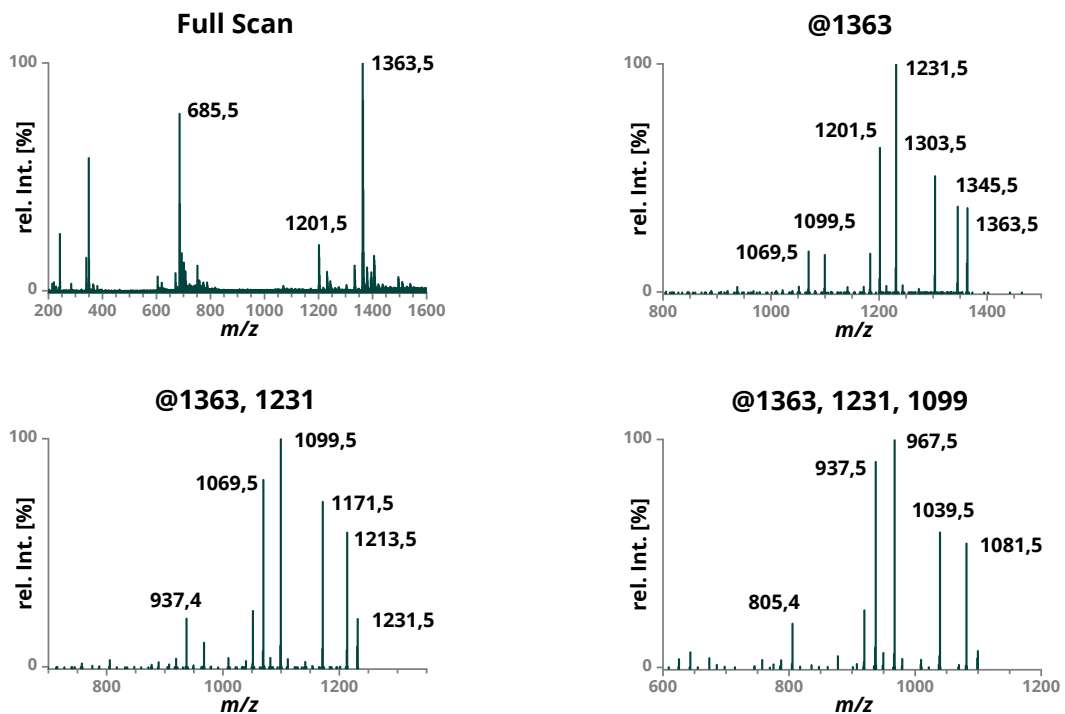


**Abbildung A27** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards GLSG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

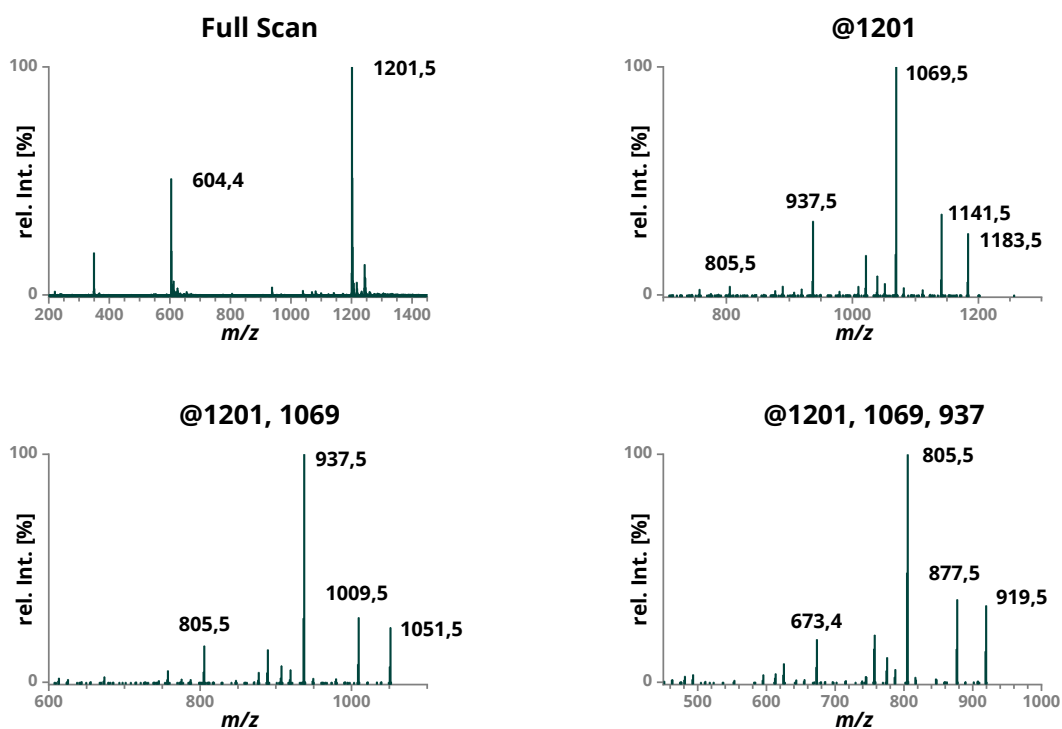




**Abbildung A28** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards XSGG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



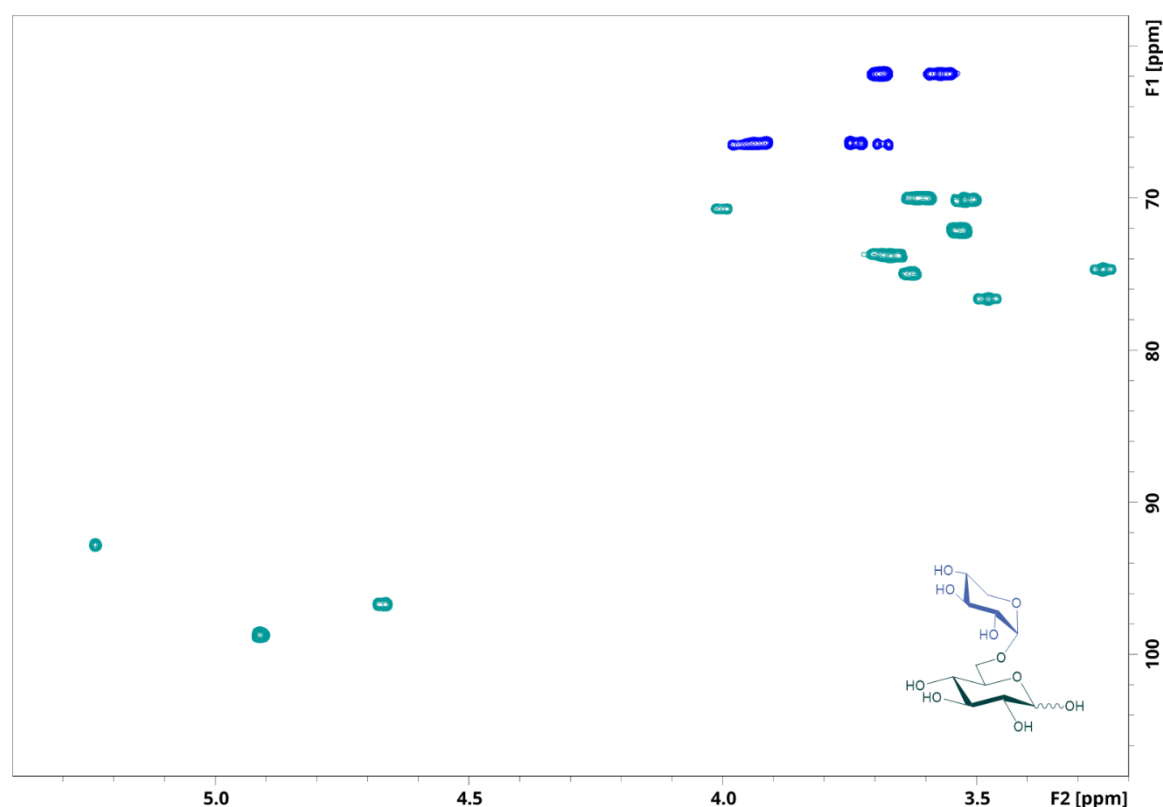
**Abbildung A29** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards XSLG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimolekülonen des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülonen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis



**Abbildung A30** Daten der massenspektrometrischen Analyse des Xyloglucanoligosaccharid-Standards GSSG. Das erste Spektrum entspricht dem Full-Scan und weist die Quasimoleküle des Analyten als einfaches oder zweifaches Li- bzw. Na-Addukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Quasimolekülen.  $m/z$ , Masse-zu-Ladung-Verhältnis

**Tabelle A31** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucan oligosaccharids X, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc	$\alpha$	5.238 (3.8) 92.80	3.58 72.00	3.71 73.74	3.52 70.13	4.00 70.72	3.68/3.97 66.47/66.50
	$\beta$	4.673 (7.9) 96.72	3.25 74.68	3.48 76.65	3.52 70.13	3.62 74.96	3.74/3.93 66.40/66.42
Xyl	4.913 98.72	3.53 72.15	3.67 73.80	3.61 69.97	3.57/3.69 61.89/61.81		

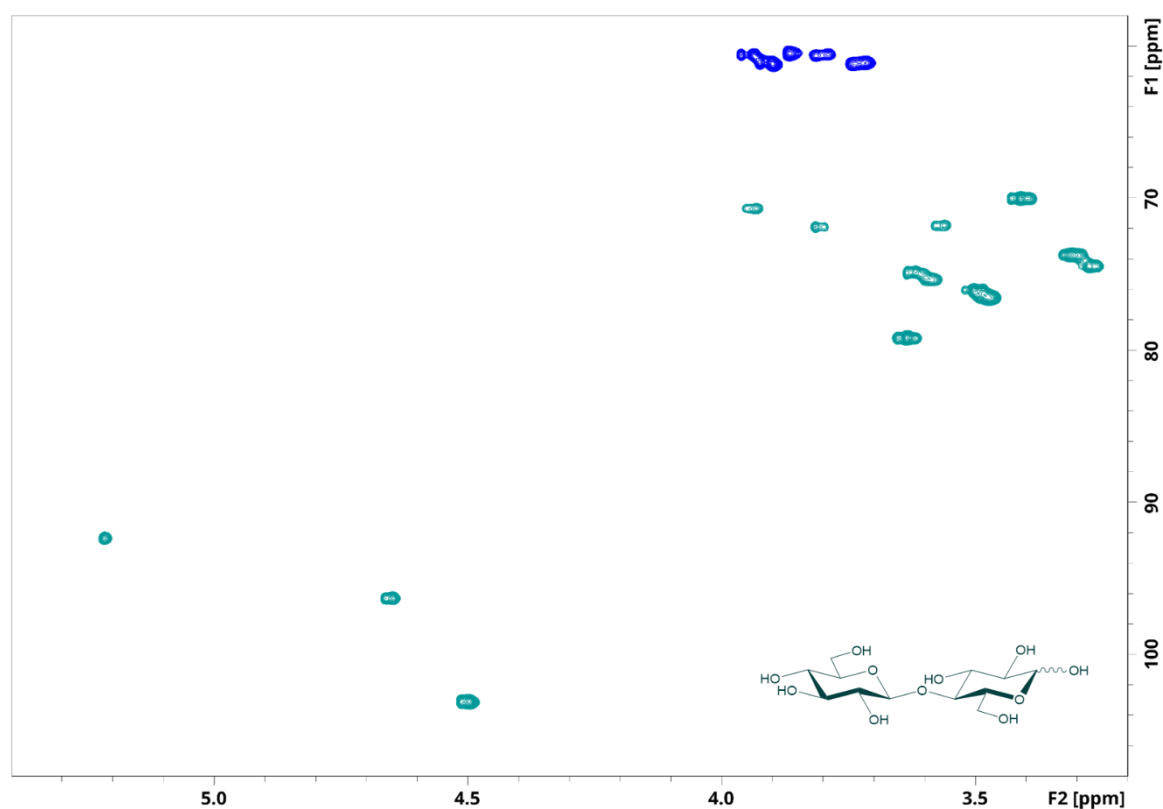


**Abbildung A32** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucan oligosaccharids X. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A33** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) GG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

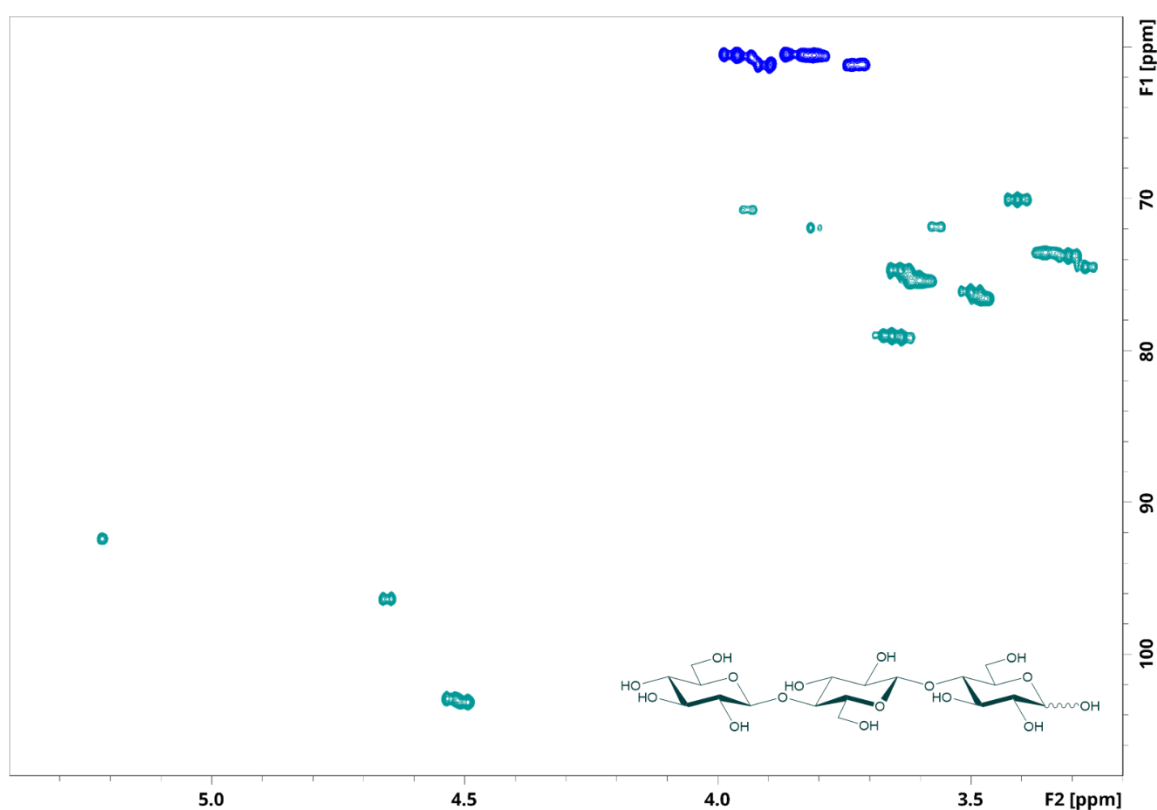
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	α	5.216 (3.8) 92.37	3.57 71.83	3.82 71.94	3.63 79.17	3.93 70.72	3.87 60.49
	β	4.654 (7.9) 96.32	3.28 74.48	3.63 74.88	3.63 79.17	3.59 75.31	3.80/3.95 60.63/60.59
Glc <sub>t</sub>	4.505 (7.9) 103.11	3.31 73.74	3.50 76.13	3.41 70.04	3.47 76.51	3.73/3.91 61.14/61.22	



**Abbildung A34** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) GG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A35** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) GGG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.217 (3.6) 92.39	3.57 71.84	3.82 71.91	3.65 79.04	3.94 70.73	3.86 60.49
	$\beta$	4.654 (7.9) 96.37	3.27 74.50	3.64 74.73	3.65 79.04	3.59 75.50	3.81/3.96 60.55/60.55
Glc <sub>a</sub>	4.528 (7.9) 102.94	3.35 73.55	3.64 74.73	3.65 79.04	3.59 75.50	3.81/3.96 60.55/60.55	
Glc <sub>t</sub>	4.502 (7.9) 103.14	3.31 73.75	3.50 76.18	3.41 70.05	3.48 76.43	3.72/3.91 61.19/61.18	

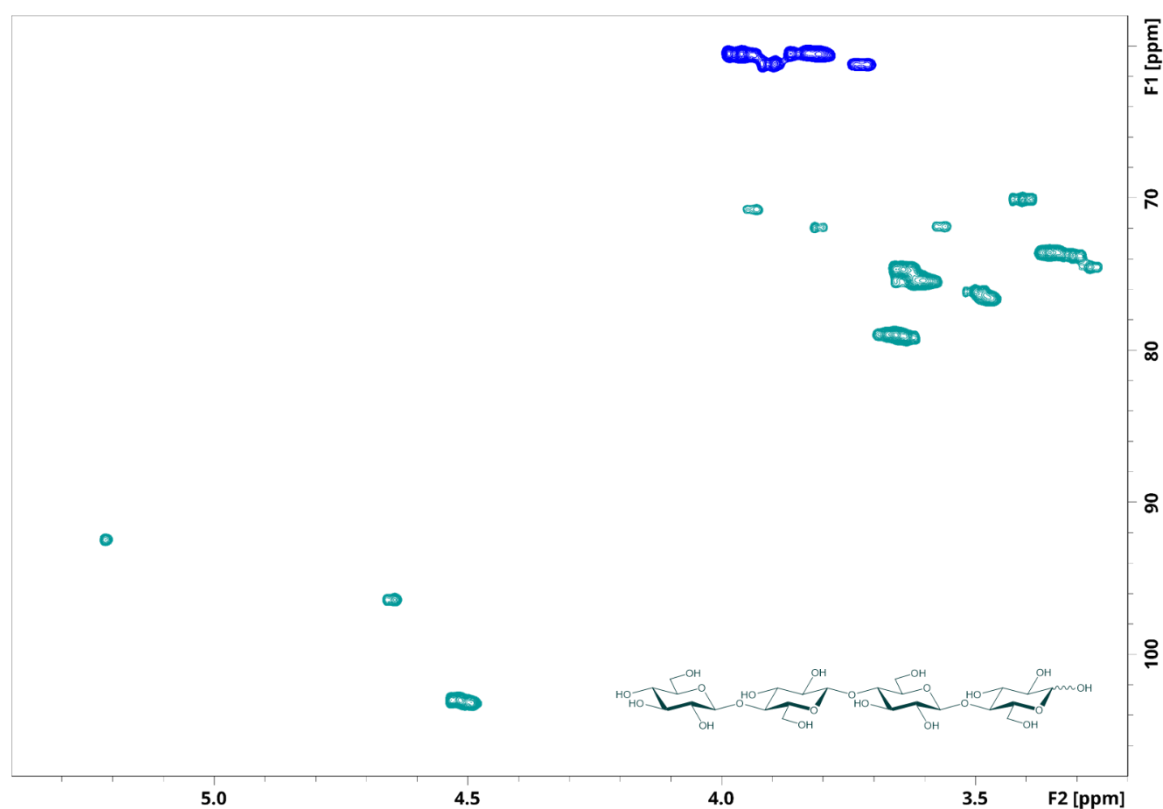


**Abbildung A36** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) GGG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A37** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GGGG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

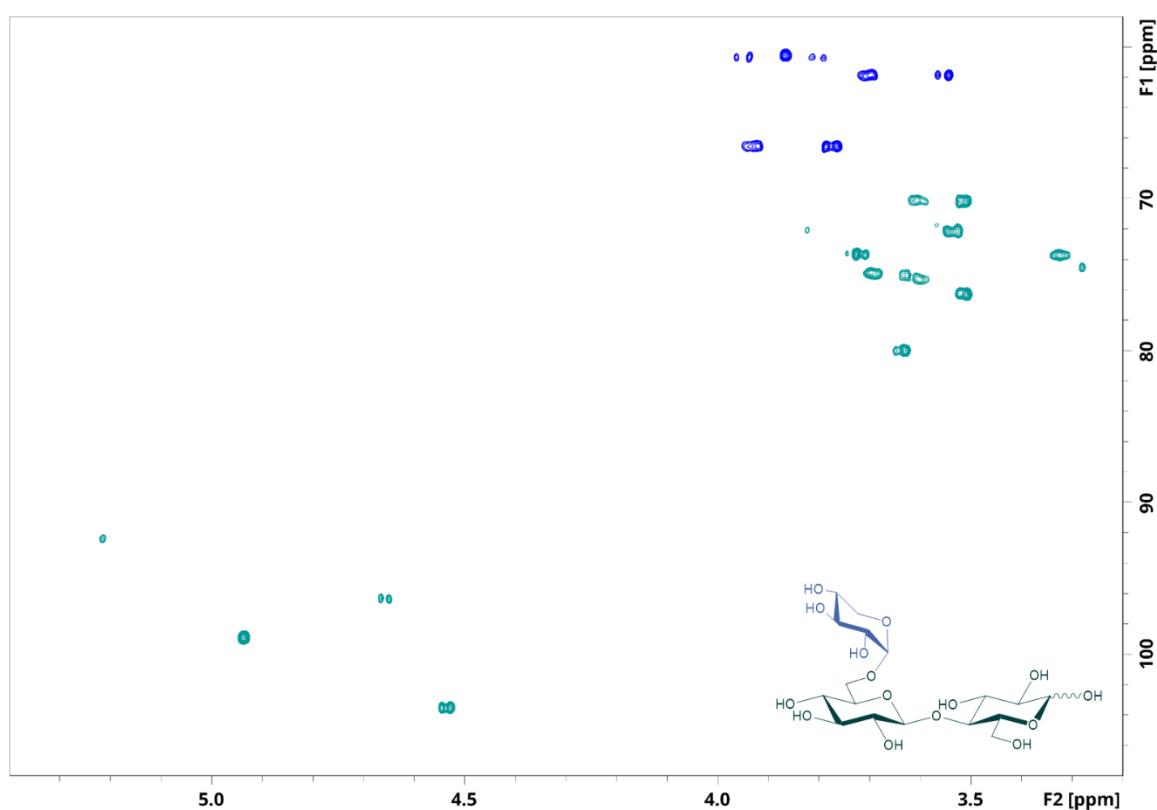
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	α 5.217 (3.6) 92.46	3.57 71.87	3.82 71.94	3.66 79.01	3.94 70.75	3.86 60.52
	β 4.653 (8.1) 96.40	3.27 74.52	3.64 74.72	3.66 79.01	3.61 75.39	3.82/3.98 60.52/60.52
Glc <sub>a</sub>	4.526 (7.9) 103.01	3.35 73.57	3.64 74.72	3.66 79.01	3.61 75.39	3.82/3.98 60.52/60.52
Glc <sub>b</sub>	4.526 (7.9) 103.01	3.35 73.57	3.64 74.72	3.66 79.01	3.61 75.39	3.82/3.98 60.52/60.52
Glc <sub>t</sub>	4.499 (7.9) 103.12	3.31 73.78	3.50 76.14	3.41 70.08	3.47 76.56	3.73/3.91 61.18/61.22



**Abbildung A38** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GGGG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A39** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids XG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	α 5.216 (3.8) 92.36	3.58 71.74	3.82 72.05	3.63 80.00	3.95 70.67	3.87 60.58
	β 4.658 (7.9) 96.32	3.28 74.53	3.63 75.02	3.63 80.00	3.60 75.29	3.80/3.95 60.70/60.69
Glc(X) <sub>t</sub>	4.537 (7.9) 103.54	3.32 73.72	3.52 76.31	3.51 70.21	3.69 74.89	3.78/3.93 66.56/66.54
Xyl <sub>t</sub>	4.938 (3.6) 98.94	3.54 72.16	3.73 73.63	3.61 70.10	3.54/3.71 61.86/61.85	

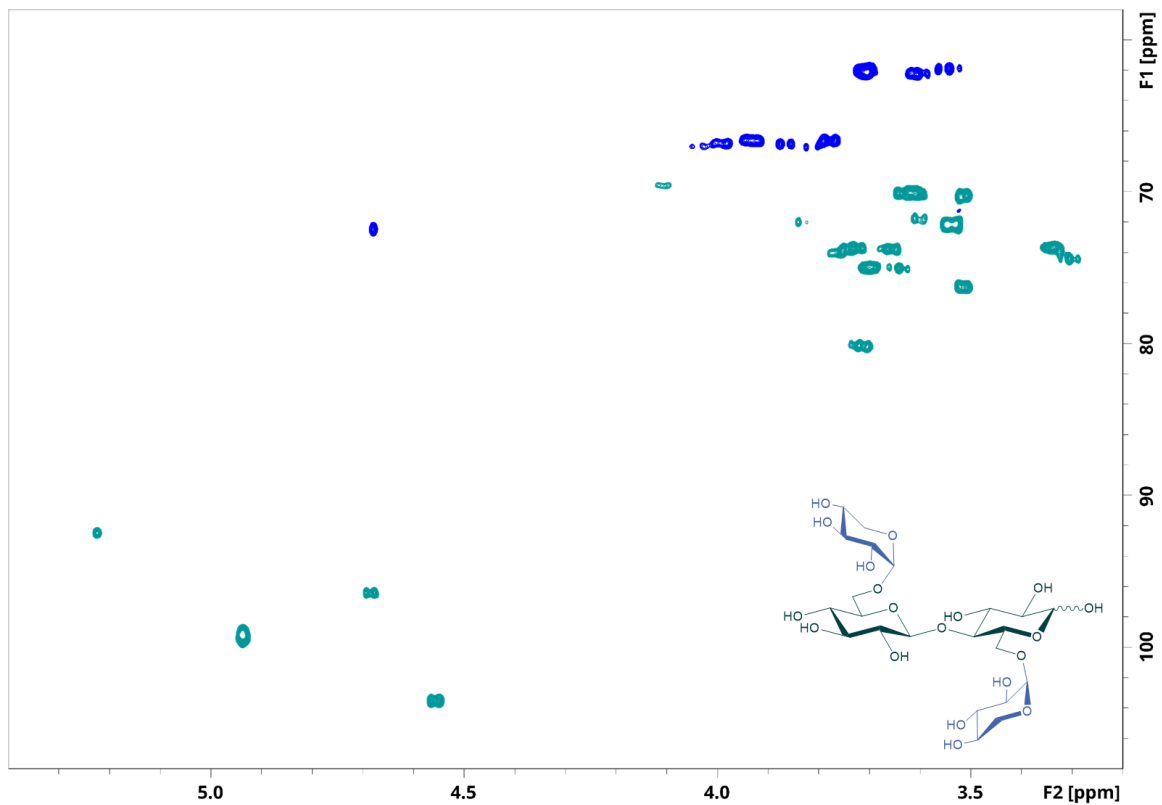


**Abbildung A40** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A41** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XX, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc(X) <sub>r</sub>	5.227 (3.7) 92.47	3.60 71.81	3.84 72.00	3.72 80.14	4.11 69.63	3.81/4.04 67.00/66.98
	4.687 (7.0) 96.42	3.31 74.40	3.64 75.03	3.72 80.14	3.66 73.78	3.86/3.99 66.85/66.83
Glc(X) <sub>t</sub>	4.559 (8.0) 103.50	3.34 73.68	3.51 76.26	3.51 70.32	3.70 74.98	3.78/3.93 66.63/66.63
Xyl <sub>r</sub>	4.936 99.19	3.54 72.16	3.73 73.73	3.62 70.07	3.54/3.71 61.90/62.11	
Xyl <sub>t</sub>	4.936 99.19	3.54 72.16	3.73 73.73	3.62 70.07	3.54/3.71 61.90/62.11	

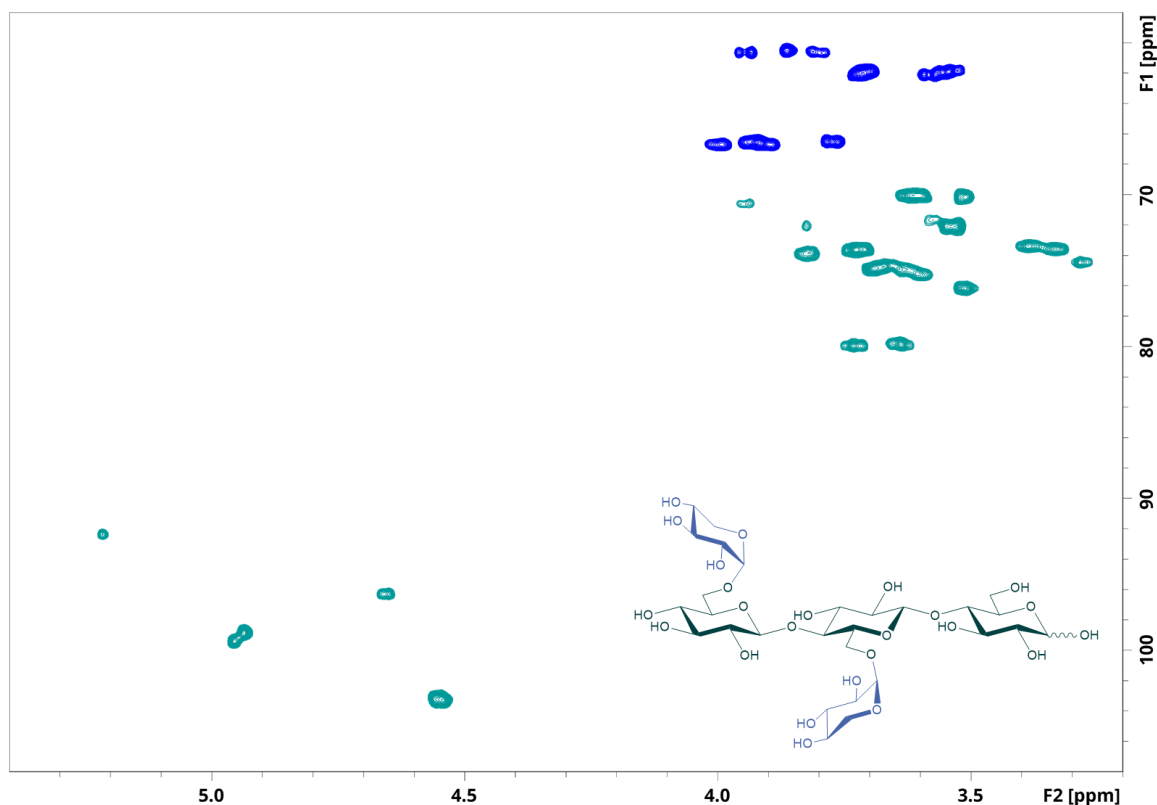


**Abbildung A42** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XX. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.



**Tabelle A43** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	α	5.216 (3.7) 92.43	3.58 71.80	3.82 72.03	3.64 79.85	3.95 70.52	3.86 60.42
	β	4.657 (7.9) 96.27	3.28 74.46	3.64 74.99	3.64 79.85	3.61 75.29	3.80/3.95 60.59/60.60
Glc(X) <sub>a</sub>	4.554 (7.9) 103.30	3.39 73.39	3.67 76.67	3.73 79.94	3.82 73.83	3.90/4.00 66.68/66.68	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.551 (7.9) 103.29	3.33 73.60	3.52 76.16	3.52 70.17	3.77 74.82	3.77/3.94 66.52/66.53	
Xyl <sub>a</sub>	α	4.956 (3.7) 99.45	3.54 72.11	3.73 73.61	3.62 70.05	3.57/3.72 62.01/61.95	
	β	4.937 (3.5) 98.86	3.54 72.11	3.73 73.61	3.62 70.05	3.57/3.72 62.01/61.95	

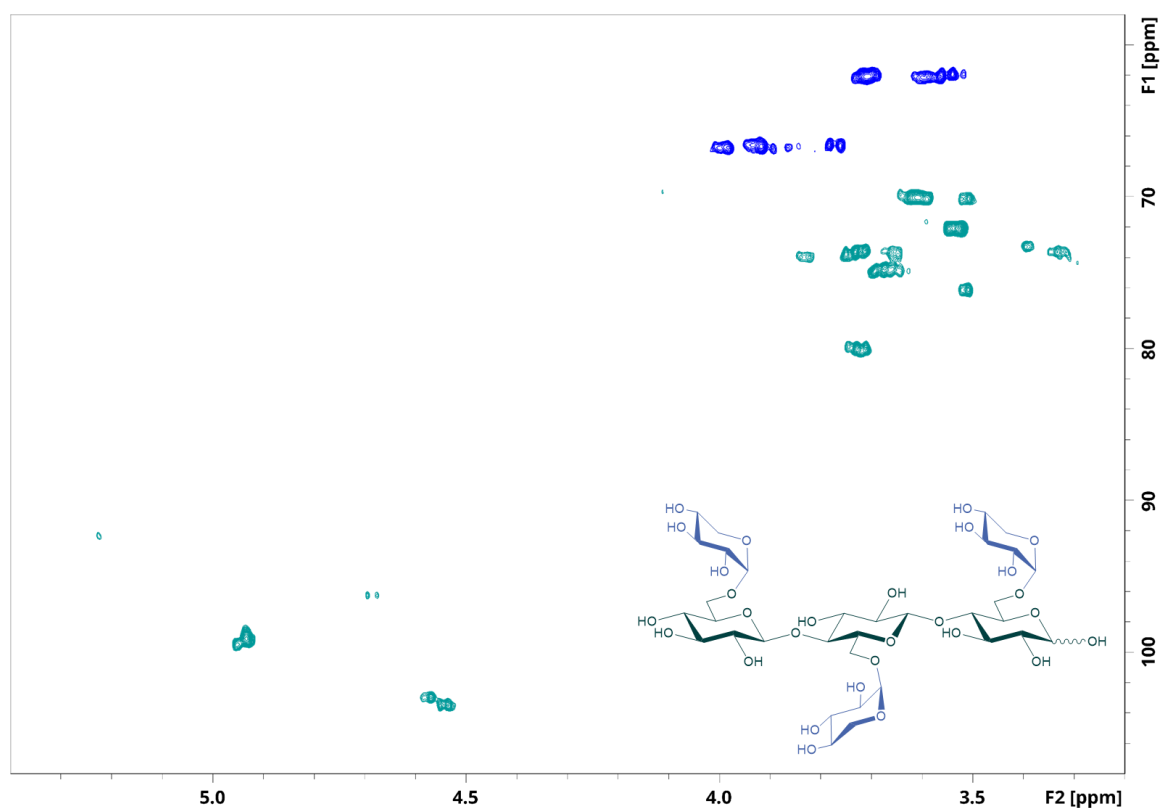


**Abbildung A44** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A45** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXX, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

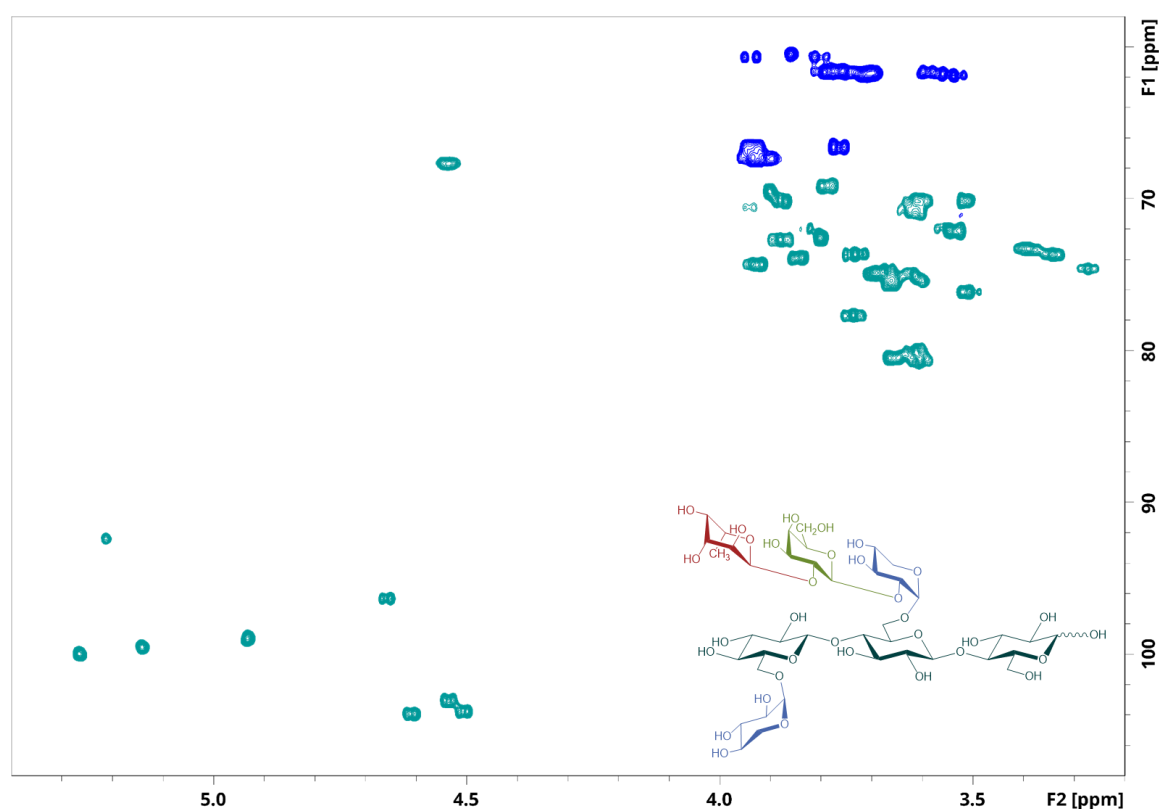
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc(X) <sub>r</sub>	α	5.226 (3.8) 92.34	3.61 71.67	3.83 72.05	3.72 80.06	4.11 69.68	3.81/4.02 67.01/70.00
	β	4.685 (7.9) 96.22	3.29 74.27	3.64 74.91	3.72 80.06	3.65 73.73	3.86/4.00 66.77/66.78
Glc(X) <sub>a</sub>	4.578 (7.9) 103.01	3.39 73.30	3.64 74.91	3.72 80.06	3.83 73.98	3.86/4.00 66.77/66.78	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.544 (7.9) 103.46	3.32 73.69	3.51 76.18	3.51 70.16	3.69 74.91	3.77/3.93 66.60/66.64	
Xyl <sub>r</sub>	4.936 (3.7) 99.09	3.53 72.04	3.73 73.69	3.61 69.98	3.54/3.71 61.99/62.06		
Xyl <sub>a</sub>	4.954 (3.6) 99.50	3.53 72.04	3.73 73.69	3.61 69.98	3.54/3.71 61.99/62.06		
Xyl <sub>t</sub>	4.936 (3.7) 99.09	3.53 72.04	3.73 73.69	3.61 69.98	3.54/3.71 61.99/62.06		



**Abbildung A46** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXX. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A47** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XFG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.215 (3.8) 92.39	3.57 71.96	3.83 71.99	3.61 80.43	3.94 70.57	3.86 60.48
	$\beta$	4.659 (7.9) 96.33	3.27 74.61	3.63 74.97	3.61 80.43	3.61 75.08	3.80/3.94 60.67/60.68
Glc(F) <sub>a</sub>	4.536 (8.1) 103.03	3.39 73.29	3.63 74.97	3.61 80.43	3.93 74.34	3.93 67.36	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.507 (7.8) 103.75	3.34 73.68	3.51 76.18	3.51 70.17	3.69 74.87	3.76/3.93 66.63/66.63	
Xyl(F) <sub>a</sub>	5.141 (3.4) 99.53	3.66 80.49	3.88 72.73	3.61 70.80	3.59/3.77 61.63/61.63		
Xyl <sub>t</sub>	4.935 (3.7) 98.95	3.54 72.10	3.73 73.65	3.61 70.15	3.55/3.70 61.84/61.74		
Gal(F) <sub>a</sub>	4.611 (7.8) 103.91	3.74 77.69	3.85 73.91	3.90 69.53	3.66 75.42	3.80 61.65	
Fuc <sub>a</sub>	5.267 (3.8) 99.97	3.79 69.15	3.87 70.18	3.80 72.55	4.54 67.67	1.25 16.59	

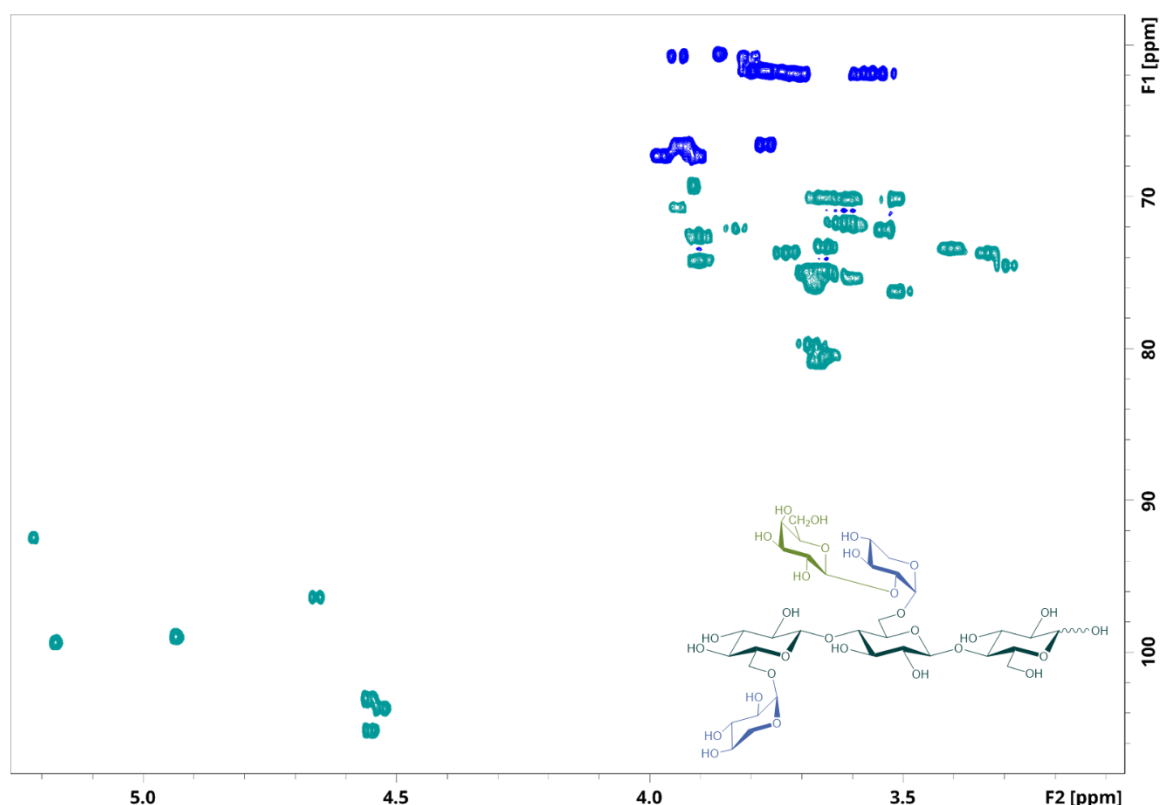


**Abbildung A48** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XFG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{HC}} = 2,22/30,89 \text{ ppm}$ ). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A49** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XLG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

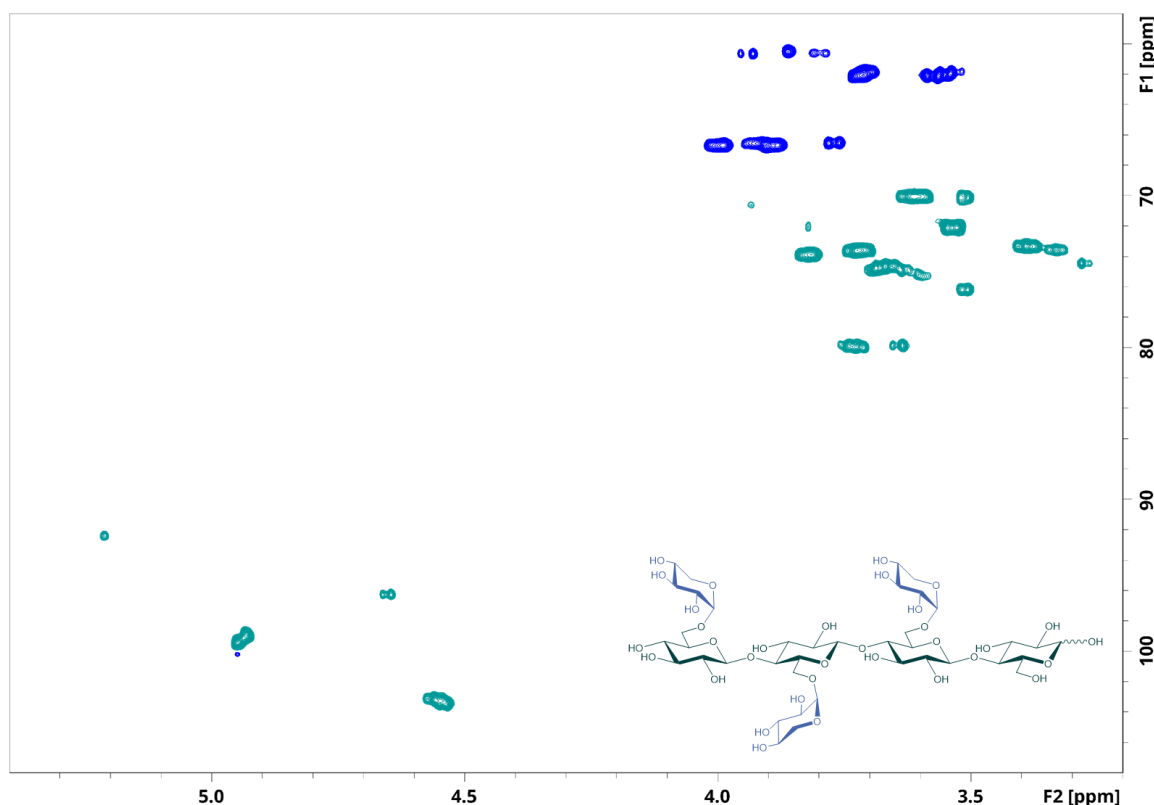
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	α	5.219 (3.8) 92.43	3.59 71.81	3.83 72.09	3.69 79.64	3.95 70.69	3.86 60.58
	β	4.660 (7.9) 96.39	3.29 74.54	3.64 74.94	3.69 79.64	3.60 75.36	3.81/3.95 60.76/60.63
Glc(L) <sub>a</sub>	4.553 (7.6) 103.02	3.41 73.41	3.67 74.87	3.66 80.31	3.90 74.16	3.91/3.98 67.35/67.33	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.532 (8.1) 103.67	3.33 73.68	3.51 76.24	3.52 70.18	3.69 74.91	3.77/3.94 66.58/66.57	
Xyl(L) <sub>a</sub>	5.175 (3.7) 99.35	3.67 80.91	3.91 72.67	3.65 70.14	3.57/3.71 61.89/61.86		
Xyl <sub>t</sub>	4.938 (3.7) 98.96	3.54 72.17	3.73 73.70	3.61 70.23	3.57/3.71 61.86/61.89		
Gal <sub>a</sub>	4.553 (7.6) 105.17	3.62 71.75	3.65 73.35	3.91 69.26	3.68 75.70	3.79 61.69	



**Abbildung A50** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XLG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A51** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXXG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.216 (3.7) 92.37	3.58 71.80	3.82 72.04	3.64 79.86	3.95 70.63 3.86 60.48
	$\beta$	4.656 (7.9) 96.26	3.28 74.47	3.63 74.90	3.64 79.86	3.60 75.20 3.80/3.95 60.62/60.63
Glc(X) <sub>a</sub>	4.561 (7.8) 103.09	3.39 73.34	3.65 76.64	3.73 79.96	3.82 73.88	3.89/3.99 66.71/66.68
Glc(X) <sub>b</sub>	4.561 (7.8) 103.09	3.39 73.34	3.65 76.64	3.73 79.96	3.82 73.88	3.89/3.99 66.71/66.68
Glc(X) <sub>t</sub>	4.545 (7.9) 103.30	3.33 73.57	3.51 76.20	3.51 70.15	3.69 74.76	3.77/3.92 66.53/66.53
Xyl <sub>a</sub>	4.953 (3.7) 99.44	3.54 72.10	3.72 73.60	3.61 70.06	3.56/3.71 62.05/62.05	
Xyl <sub>b</sub>	4.953 (3.7) 99.44	3.54 72.10	3.72 73.60	3.61 70.06	3.56/3.71 62.05/62.05	
Xyl <sub>t</sub>	4.935 (3.7) 98.96	3.54 72.10	3.72 73.60	3.61 70.06	3.56/3.71 62.05/62.05	

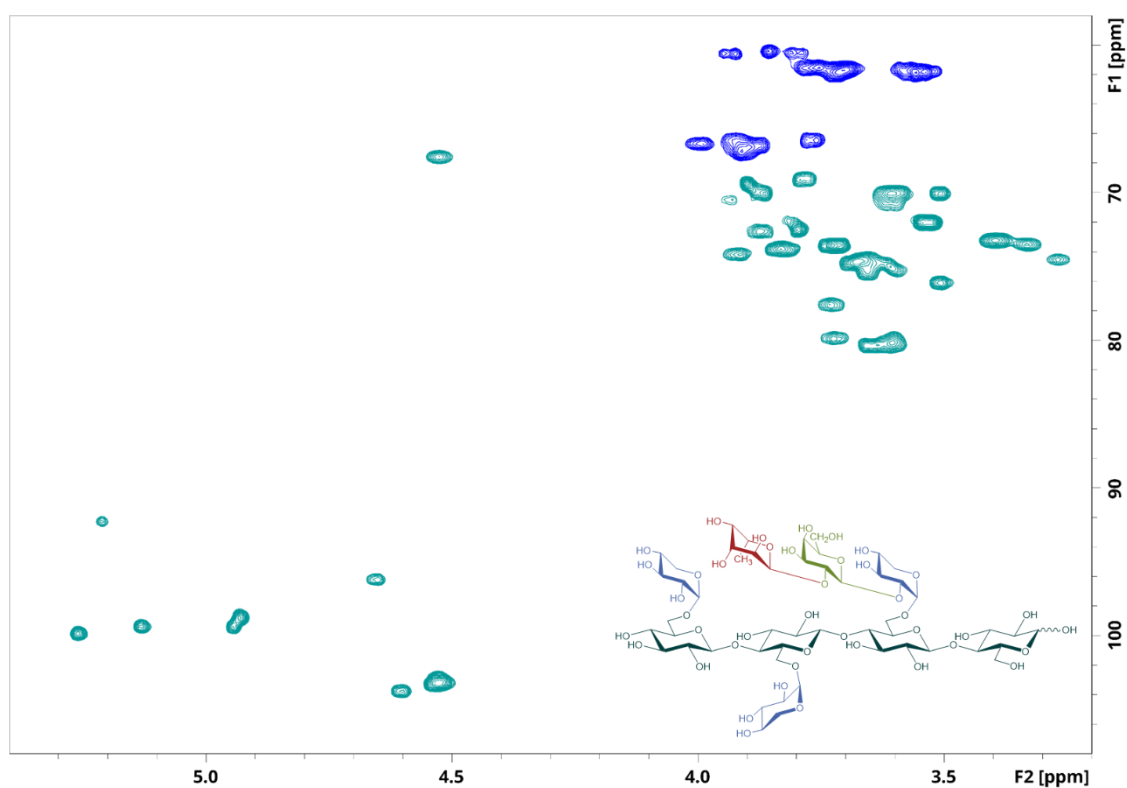


**Abbildung A52** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXXG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89 \text{ ppm}$ ). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A53** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXFG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

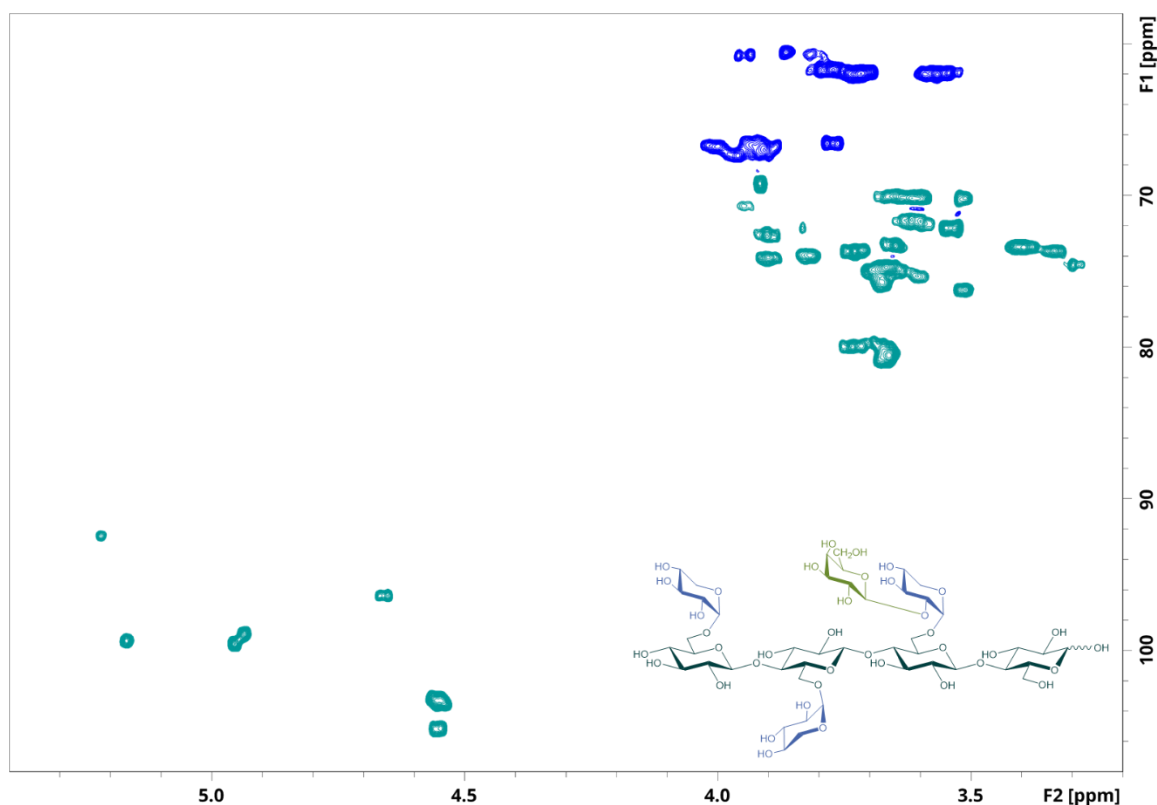
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.213 (3.7) 92.27	3.57 71.81	3.82 71.87	3.60 80.14	3.93 70.46	3.86 60.42
	$\beta$	4.657 (7.9) 96.18	3.27 74.52	3.65 74.52	3.60 80.14	3.61 75.01	3.80/3.94 60.60/60.60
Glc(F) <sub>a</sub>	4.531 103.21	3.40 73.22	3.65 74.52	3.60 80.14	3.92 74.21	3.91 67.22	
Glc(X) <sub>b</sub>	4.531 103.21	3.40 73.22	3.65 74.52	3.72 79.86	3.83 73.84	3.87/3.99 66.72/66.70	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.531 103.21	3.33 73.50	3.51 76.08	3.51 70.04	3.68 74.72	3.77/3.92 66.48/66.51	
Xyl(F) <sub>a</sub>		5.132 (3.4) 99.36	3.65 80.38	3.87 72.62	3.61 70.76	3.58/3.75 61.70/61.55	
	Xyl <sub>b</sub>	4.945 (3.7) 99.39	3.54 71.98	3.73 73.55	3.61 70.00	3.55/3.73 61.85/61.85	
Xyl <sub>t</sub>	4.933 (3.7) 98.75	3.54 71.98	3.73 73.55	3.61 70.00	3.55/3.73 61.85/61.85		
Gal(F) <sub>a</sub>	4.606 (7.6) 103.76	3.73 77.60	3.83 73.84	3.90 69.44	3.66 75.41	3.78 61.53	
Fuc <sub>a</sub>	5.261 (3.8) 99.87	3.79 69.07	3.87 70.04	3.80 72.53	4.53 67.58	1.25 16.61	



**Abbildung A54** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXFG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Table A55** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXLG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.219 (3.8) 92.44	3.59 71.89	3.83 72.11	3.69 79.76	3.95 70.73 3.86 60.54
	$\beta$	4.659 (7.9) 96.39	3.30 74.52	3.64 74.56	3.69 79.76	3.61 75.30 3.81/3.95 60.70/60.72
Glc(L) <sub>a</sub>	4.553 (7.5) 103.32	3.40 73.41	3.67 74.73	3.67 80.22	3.90 74.13	3.91/3.96 67.36/67.36
Glc(X) <sub>b</sub>	4.553 (7.5) 103.32	3.40 73.41	3.67 74.73	3.73 79.95	3.82 73.93	3.89/4.01 66.80/66.73
Glc(X) <sub>t</sub>	4.546 (7.8) 103.32	3.33 73.65	3.51 76.25	3.51 70.19	3.70 74.92	3.77/3.93 66.54/66.58
Xyl(L) <sub>a</sub>	5.168 (3.7) 99.35	3.67 80.72	3.90 72.59	3.66 70.06	3.57/3.72 61.92/61.96	
Xyl <sub>b</sub>	4.954 (3.7) 99.55	3.54 72.11	3.73 73.71	3.61 70.18	3.57/3.72 61.92/61.96	
Xyl <sub>t</sub>	4.936 (3.7) 98.92	3.54 72.11	3.73 73.71	3.61 70.18	3.57/3.72 61.92/61.96	
Gal <sub>a</sub>	4.553 (7.5) 105.15	3.62 71.61	3.65 73.39	3.92 69.19	3.68 75.74	3.80 61.74

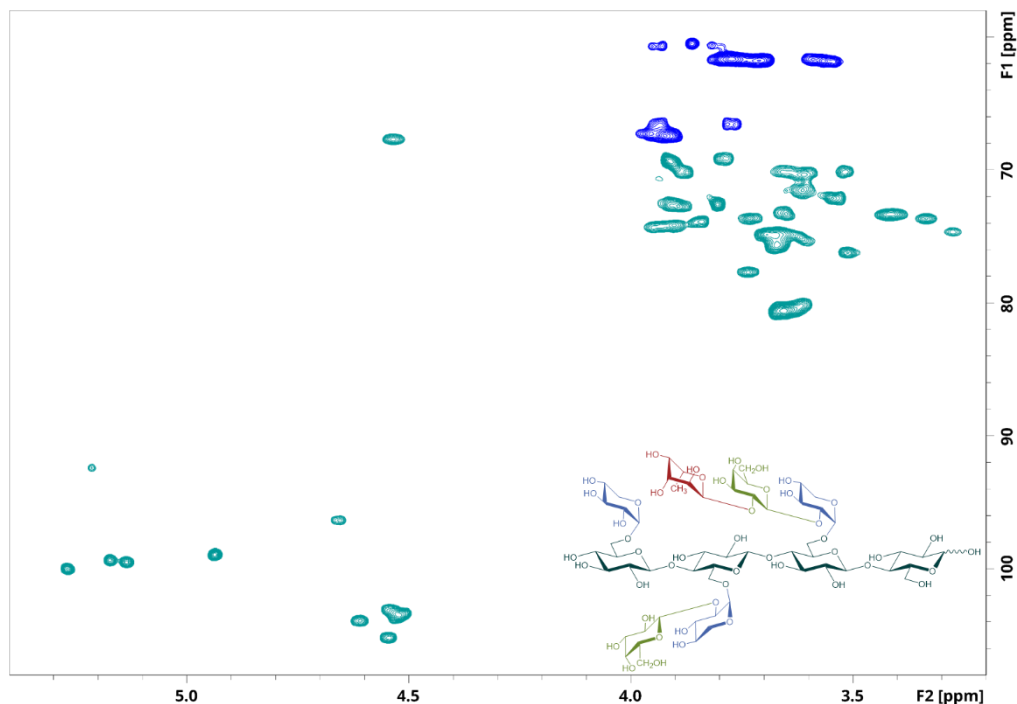


**Abbildung A56** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XXLG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{HC}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A57** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und dem HSQC-Spektrum des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) XLFG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	α 5.215 (3.6) 92.44	3.58 71.88	3.83 71.95	3.65 80.19	3.93 70.67	3.86 60.50
	β 4.661 (7.9) 96.35	3.27 74.63	3.68 74.88	3.65 80.19	3.61 75.32	3.61/3.80 60.69
Glc(F) <sub>a</sub>	4.53 103.89	3.41 73.35	3.68 74.88	3.65 80.19	3.93 74.24	3.94 67.42
Glc(L) <sub>b</sub>	4.53 103.89	3.41 73.35	3.68 74.88	3.65 80.19	3.93 74.24	3.94 67.42
Glc(X) <sub>t</sub>	4.53 103.89	3.34 73.64	3.51 76.24	3.52 70.13	3.68 74.88	3.77/3.94 66.52
Xyl(F) <sub>a</sub>	5.135 (3.4) 99.52	3.66 80.68	3.90 72.61	3.63 70.10	3.56/3.74 61.65	
Xyl(L) <sub>b</sub>	5.174 (3.7) 99.33	3.66 80.68	3.90 72.61	3.63 70.10	3.56/3.74 61.65	
Xyl <sub>t</sub>	4.939 (3.6) 98.93	3.54 72.07	3.73 73.69	3.63 70.10	3.56/3.74 61.65	
Gal(F) <sub>a</sub>	4.613 (7.6) 103.89	3.74 77.70	3.85 73.90	3.92 69.28	3.67 75.61	3.77 61.64
Gal <sub>b</sub>	4.54 105.19	3.62 71.52	3.65 73.29	3.92 69.28	3.67 75.61	3.79 61.72
Fuc <sub>a</sub>	5.270 (3.8) 99.98	3.79 69.18	3.88 70.13	3.80 72.58	4.53 67.68	1.26 16.51

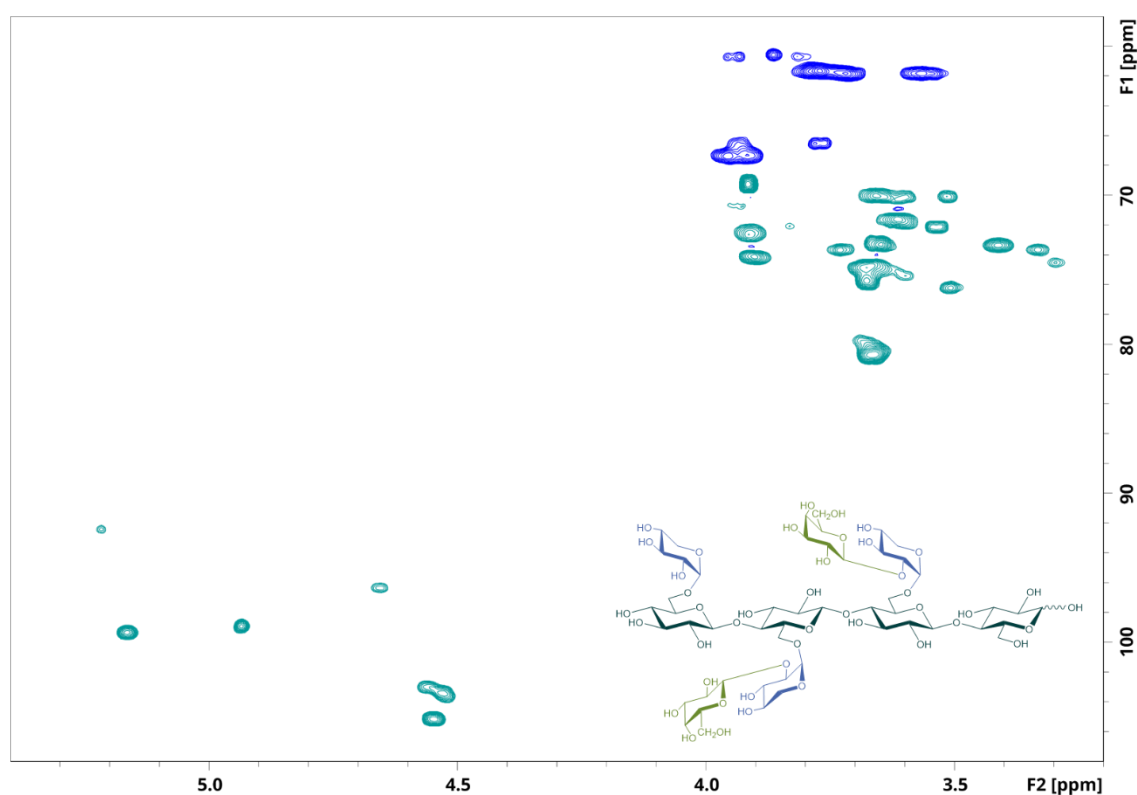


**Abbildung A58** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) XLFG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.



**Tabelle A59** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XLLG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.218 (3.8) 92.43	-	3.83 72.06	3.69 79.69	3.94 70.72	3.86 60.54
	$\beta$	4.659 (7.9) 96.30	3.30 74.51	3.68 74.93	3.69 79.69	3.60 75.36	3.81/3.95 60.74/60.74
Glc(L) <sub>a</sub>	4.56 102.97	3.41 73.34	3.68 74.93	3.66 80.35	3.90 74.11	3.91/3.96 67.34/67.37	
Glc(L) <sub>b</sub>	4.56 102.97	3.41 73.34	3.68 74.93	3.66 80.35	3.90 74.11	3.91/3.96 67.34/67.37	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.53 103.44	3.33 73.67	3.51 76.19	3.51 70.05	3.60 75.36	3.77/3.94 66.48/66.48	
Xyl(L) <sub>a</sub>	$\alpha$	5.161 (3.7) 99.34	3.66 80.86	3.91 72.61	3.66 70.01	3.56/3.72 61.80/61.82	
	$\beta$	5.172 (3.7) 99.34	3.66 80.86	3.91 72.61	3.66 70.01	3.56/3.72 61.80/61.82	
Xyl <sub>t</sub>	4.936 (3.7) 98.92	3.54 72.15	3.73 73.67	3.60 70.13	3.56/3.72 61.80/61.82		
Gal <sub>a</sub>	$\alpha$	4.55 105.14	3.61 71.60	3.65 73.32	3.91 69.24	3.68 75.71	3.79 61.68
	$\beta$	4.55 105.14	3.61 71.60	3.65 73.32	3.91 69.24	3.68 75.71	3.79 61.68

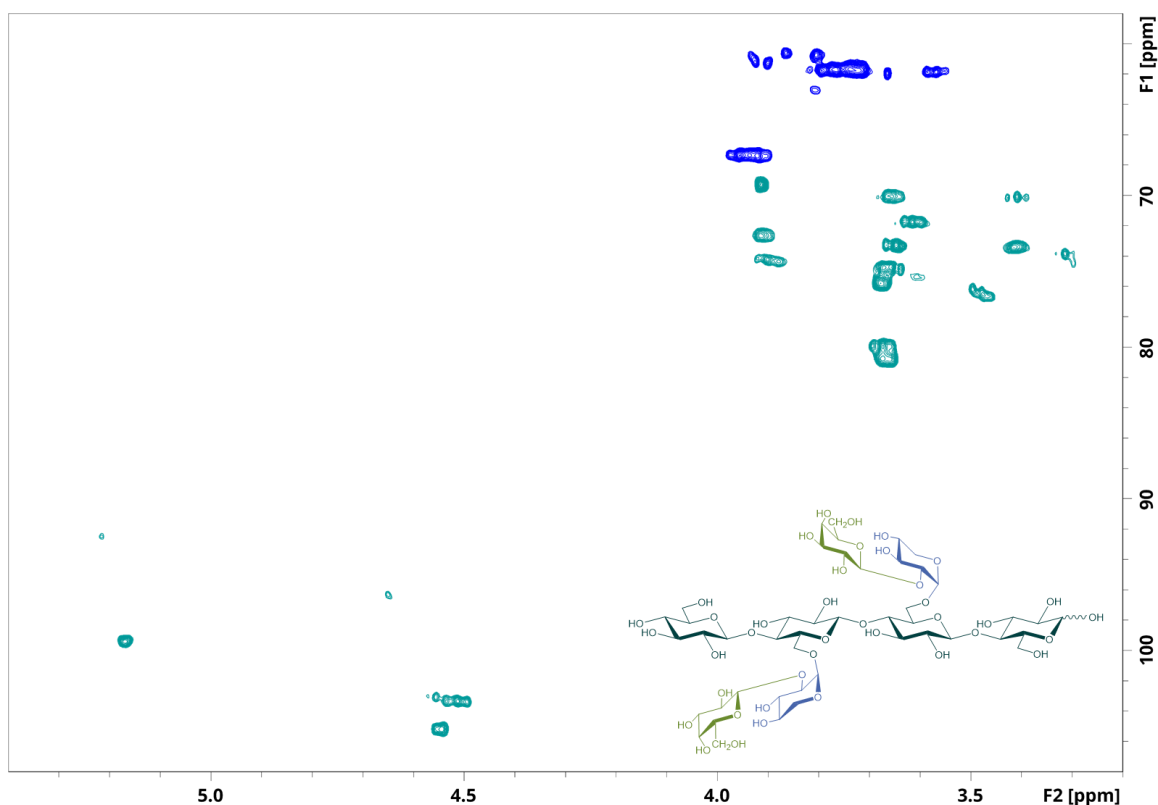


**Abbildung A60** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XLLG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A61** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GLLG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

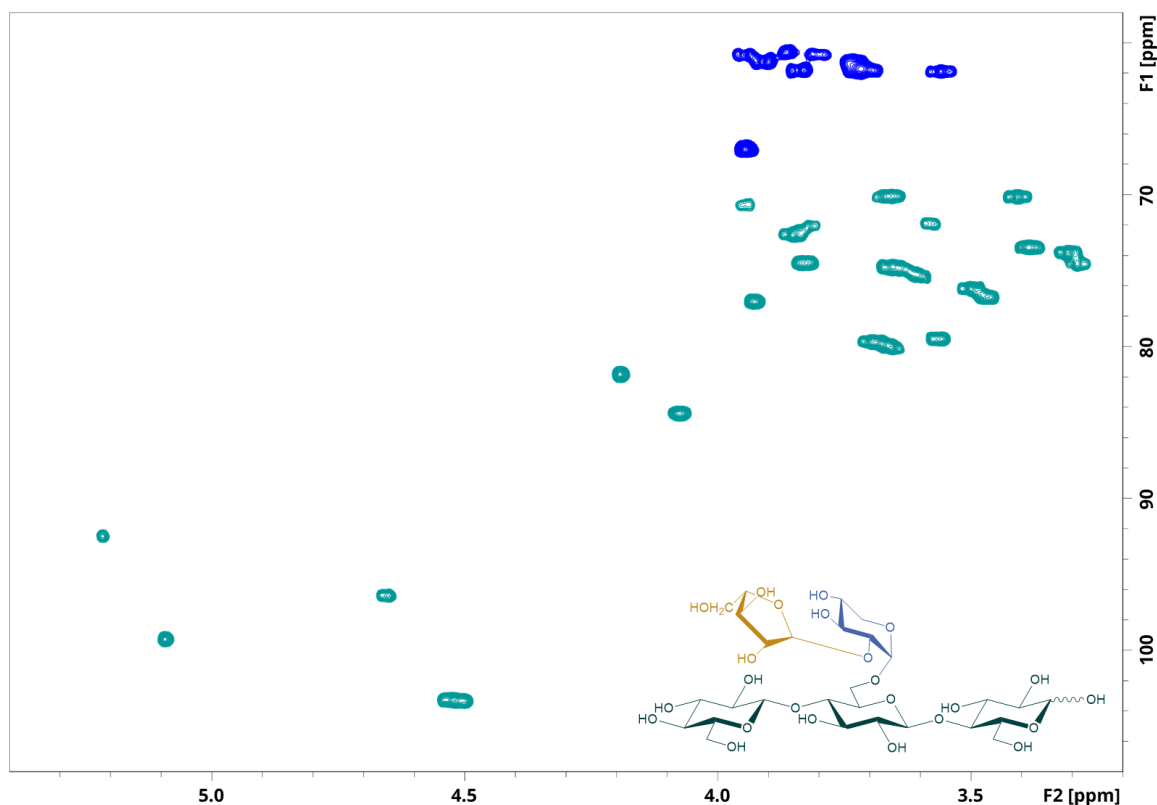
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	α 5.219 (3.7) 92.48	-	3.83 72.17	3.67 80.00	3.95 70.74	3.86 60.62
	β 4.660 (7.9) 96.30	3.30 74.42	3.65 74.82	3.67 80.00	3.61 75.38	3.81/3.95 60.74/60.76
Glc(L) <sub>a</sub>	4.51 103.32	3.41 73.40	3.67 74.76	3.67 80.00	3.90 74.27	3.91/3.96 67.37/67.36
Glc(L) <sub>b</sub>	4.51 103.32	3.41 73.40	3.67 74.76	3.67 80.00	3.90 74.27	3.91/3.96 67.37/67.36
Glc <sub>t</sub>	4.506 (7.9) 103.32	3.31 73.84	3.50 76.11	3.41 70.10	3.47 76.60	3.73/3.91 61.30/61.25
Xyl(L) <sub>a</sub>	5.166 (3.7) 99.40	3.67 80.76	3.91 72.63	3.66 70.02	3.58/3.73 61.86/61.76	
Xyl(L) <sub>b</sub>	5.177 (3.7) 99.40	3.67 80.76	3.91 72.63	3.66 70.02	3.58/3.73 61.86/61.76	
Gal <sub>a</sub>	4.55 105.19	3.61 71.69	3.65 73.30	3.91 69.26	3.68 75.79	3.79 61.71
Gal <sub>b</sub>	4.55 105.19	3.61 71.69	3.65 73.30	3.91 69.26	3.68 75.79	3.79 61.71



**Abbildung A62** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GLLG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A63** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanligosaccharids (XGO) GSG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	α	5.216 (3.7) 92.49	3.58 71.91	3.82 72.01	3.67 79.95	3.95 70.72	3.87 60.63
	β	4.657 (7.9) 96.40	3.29 74.51	3.67 74.71	3.67 79.95	3.61 75.23	3.80/3.95 60.76/60.75
Glc(S) <sub>a</sub>	4.533 (7.9) 103.29	3.39 73.46	3.67 74.71	3.69 79.71	3.83 74.49	3.95 67.01	
Glc <sub>t</sub>	4.506 (7.9) 103.29	3.31 73.82	3.50 76.19	3.41 70.11	3.47 76.67	3.73/3.91 61.24/61.24	
Xyl(S) <sub>a</sub>	5.093 (3.5) 99.26	3.57 79.50	3.85 72.63	3.66 70.07	3.56/3.71 61.88/61.83		
Ara <sub>a</sub>	5.163 (1.7) 109.88	4.19 81.82	3.93 77.04	4.08 84.40	3.71/3.85 61.83/61.83		

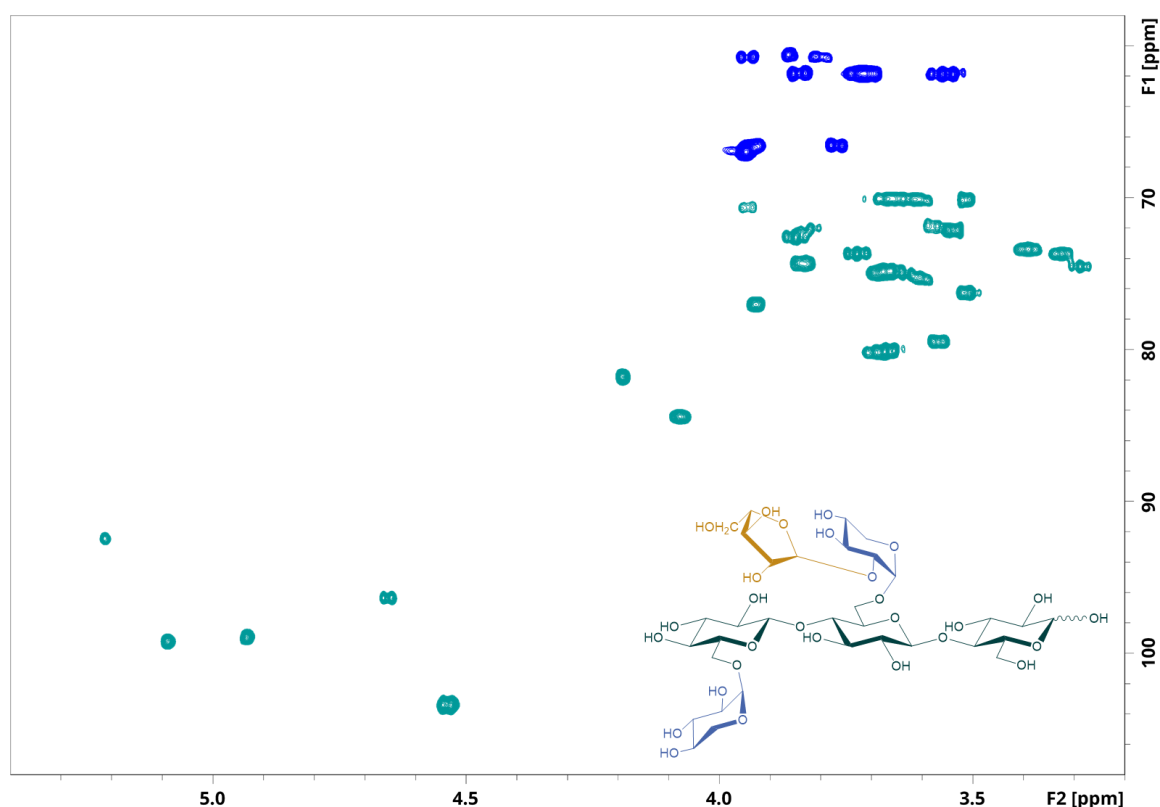


**Abbildung A64** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanligosaccharids (XGO) GSG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A65** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XSG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

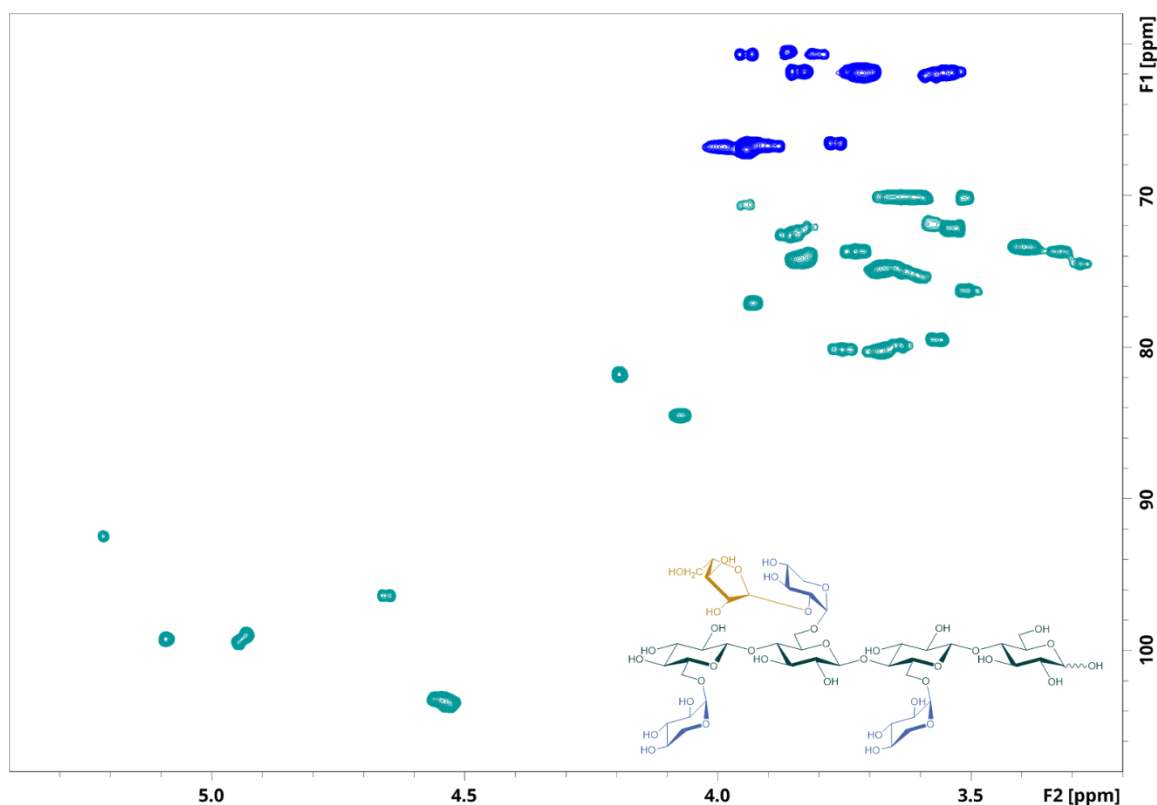
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	α	5.215 (3.7) 92.42	3.58 71.82	3.81 71.97	3.67 80.13	3.94 70.63	3.86 60.58
	β	4.656 (7.9) 96.34	3.29 74.48	3.64 74.86	3.67 80.13	3.94 70.63	3.80/3.95 60.64/60.64
Glc(S) <sub>a</sub>	4.539 (7.9) 103.35	3.39 73.36	3.67 74.88	3.67 80.13	3.83 74.28	3.95 67.14	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.539 (7.9) 103.35	3.32 73.67	3.51 76.25	3.51 70.17	3.67 75.88	3.77/3.93 66.60/66.58	
Xyl(S) <sub>a</sub>	5.092 (3.5) 99.20	3.57 79.46	3.85 72.60	3.66 70.06	3.55/3.71 61.78/61.80		
Xyl <sub>t</sub>	4.935 (3.5) 98.93	3.54 72.14	3.73 73.65	3.61 70.08	3.55/3.71 61.78/61.80		
Ara <sub>a</sub>	5.163 (1.5) 109.78	4.19 81.79	3.93 77.04	4.08 84.37	3.71/3.85 61.80/61.78		



**Abbildung A66** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XSG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A67** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) XSXG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.216 (3.7) 92.46	3.58 71.90	3.82 72.11	3.64 79.90	3.95 70.60 3.86 60.53
	$\beta$	4.657 (8.1) 96.38	3.28 74.51	3.63 75.00	3.64 79.90	3.60 75.26 3.80/3.94 60.69/60.69
Glc(X) <sub>a</sub>	4.545 (3.6) 103.30	3.39 73.39	3.67 74.81	3.75 80.15	3.83 74.20	3.89/3.99 66.73/66.78
Glc(S) <sub>b</sub>	4.545 (3.6) 103.30	3.39 73.39	3.67 74.81	3.68 80.25	3.83 74.20	3.94 66.97
Glc(X) <sub>t</sub>	4.545 (3.6) 103.30	3.32 73.69	3.51 76.28	3.51 70.19	3.67 74.81	3.77/3.94 66.56/66.55
Xyl <sub>a</sub>	4.947 (3.7) 99.41	3.54 72.16	3.73 73.69	3.61 70.11	3.54/3.72 61.91/61.91	
Xyl(S) <sub>b</sub>	5.093 (3.7) 99.25	3.57 79.51	3.86 72.62	3.66 70.10	3.54/3.72 61.91/61.91	
Xyl <sub>t</sub>	4.934 (3.7) 99.01	3.54 72.16	3.73 73.69	3.61 70.11	3.54/3.72 61.91/61.91	
Ara <sub>b</sub>	5.166 (1.5) 109.90	4.19 81.79	3.93 77.10	4.07 84.50	3.72/3.84 61.91/61.82	

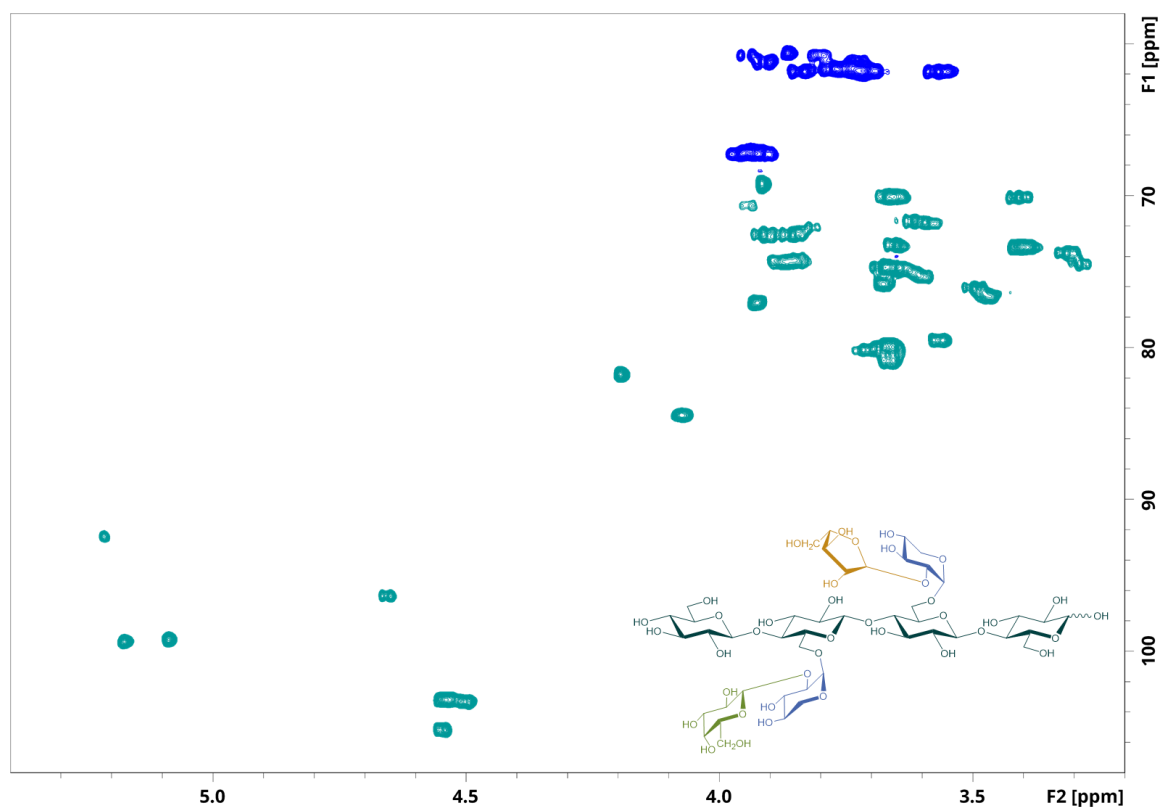


**Abbildung A68** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucan-oligosaccharids (XGO) XSXG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89 \text{ ppm}$ ). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A69** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GLSG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

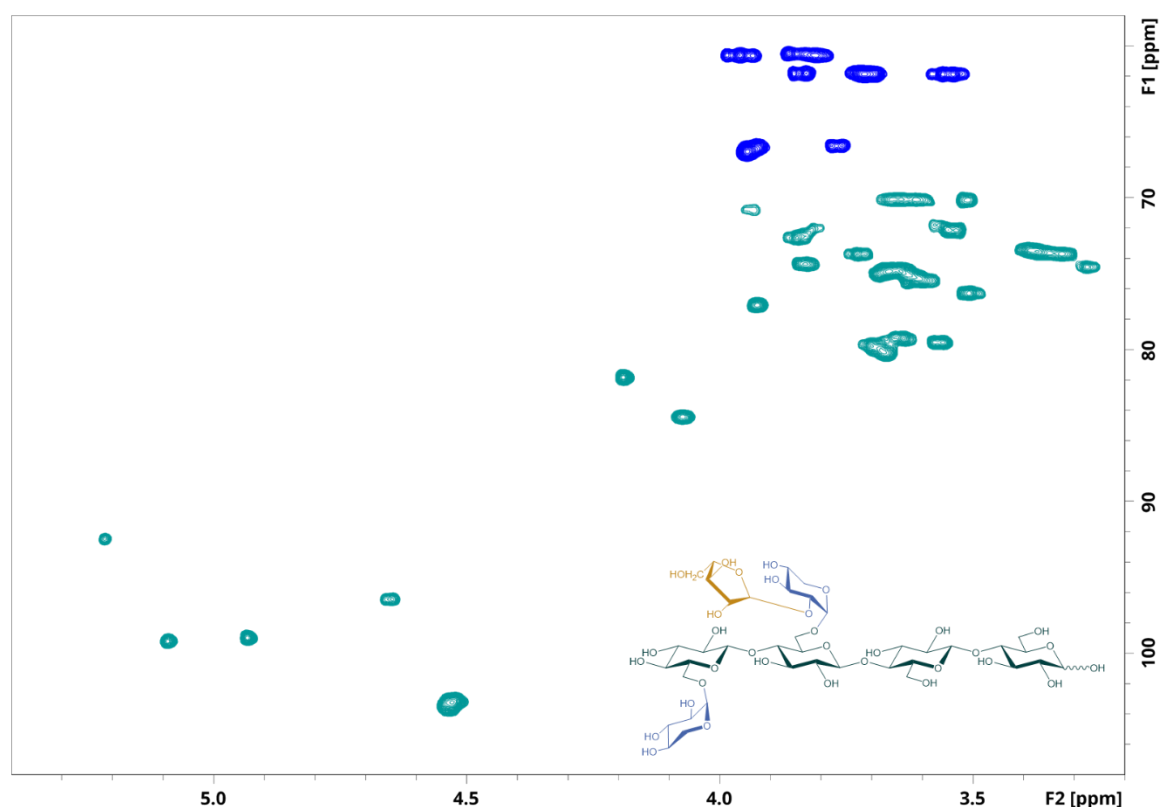
Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	α 5.215 (3.8) 92.44	-	3.82 72.08	3.71 80.13	3.94 70.67	3.87 60.59
	β 4.657 (7.9) 96.34	3.28 74.50	3.62 74.89	3.71 80.13	3.60 75.28	3.80/3.95 60.75/60.73
Glc(S) <sub>a</sub>	4.542 103.30	3.40 73.36	3.67 74.71	3.67 79.94	3.86 74.30	3.94 67.04
Glc(L) <sub>b</sub>	4.542 103.19	3.40 73.36	3.67 74.71	3.67 79.94	3.86 74.30	3.91/3.97 67.30/67.34
Glc <sub>t</sub>	4.501 (7.9) 103.30	3.31 73.77	3.50 76.11	3.41 70.11	3.47 76.61	3.73/3.91 61.24/61.25
Xyl(S) <sub>a</sub>	5.087 (3.5) 99.24	3.57 79.52	3.85 72.57	3.66 70.11	3.56/3.72 61.82/61.76	
Xyl(L) <sub>b</sub>	5.176 (3.5) 99.36	3.67 80.83	3.91 72.62	3.66 70.11	3.56/3.72 61.82/61.76	
Gal <sub>b</sub>	4.542 105.16	3.61 71.70	3.66 73.28	3.92 69.23	3.68 75.80	3.78 61.66
Ara <sub>a</sub>	5.162 (1.4) 109.86	4.19 81.76	3.92 77.04	4.07 84.43	3.72/3.84 61.76/61.81	



**Abbildung A70** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GLSG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

**Tabelle A71** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XSGG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.216 (3.8) 92.46	3.57 71.90	3.81 71.98	3.64 79.27	3.94 70.79	3.86 60.50
	$\beta$	4.653 (7.9) 96.45	3.27 74.54	3.62 75.09	3.64 79.27	3.59 75.45	3.81/3.96 60.61/60.61
Glc <sub>a</sub>	4.530 (7.8) 103.22	3.37 73.50	3.62 74.08	3.70 79.73	3.59 75.45	3.81/3.96 60.61/60.61	
Glc(S) <sub>b</sub>	4.536 (7.9) 103.22	3.37 73.50	3.67 74.79	3.68 80.18	3.83 74.38	3.95 66.99	
Glc(X) <sub>t</sub>	4.536 (7.9) 103.22	3.32 73.69	3.51 76.27	3.51 70.17	3.67 74.79	3.77/3.93 66.61/66.65	
Xyl(S) <sub>b</sub>	5.092 (3.5) 99.23	3.57 79.52	3.85 72.65	3.66 70.10	3.55/3.71 61.85/61.83		
Xyl <sub>t</sub>	4.934 (3.5) 98.96	3.54 72.16	3.73 73.69	3.61 70.11	3.55/3.71 61.85/61.83		
Ara <sub>a</sub>	5.163 (1.5) 109.87	4.19 81.81	3.93 77.10	4.07 84.43	3.71/3.84 61.83/61.82		

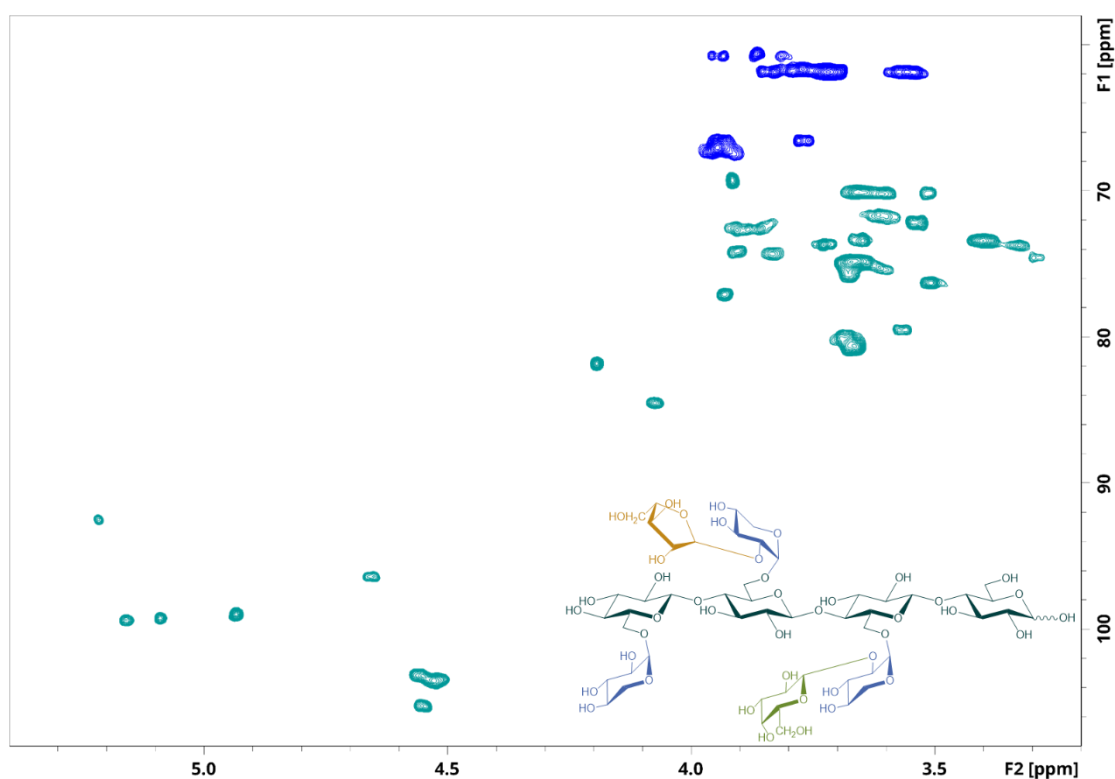


**Abbildung A72** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XSGG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang

**Tabelle A73** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XSLG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
Glc <sub>r</sub>	α 5.219 (3.8) 92.50	-	3.84 72.30	3.68 80.12	3.95 70.63	3.87 60.60
	β 4.660 (7.9) 96.40	3.30 74.57	3.64 74.93	3.68 80.12	3.61 75.34	3.81/3.95 60.76/60.75
Glc(L) <sub>a</sub>	4.55 103.14	3.40 73.40	3.67 74.85	3.68 80.12	3.91 74.13	3.91/3.97 67.45/67.32
Glc(S) <sub>b</sub>	4.55 103.14	3.40 73.40	3.67 74.85	3.68 80.12	3.83 74.31	3.94 67.05
Glc(X) <sub>t</sub>	4.53 103.52	3.33 73.73	3.51 76.33	3.51 70.18	3.67 74.85	3.77/3.94 66.59/66.62
Xyl(L) <sub>a</sub>	5.159 (3.7) 99.38	3.67 80.63	3.88 72.63	3.66 70.11	3.56/3.72 61.87/61.86	
Xyl(S) <sub>b</sub>	5.092 (3.7) 99.24	3.57 79.51	3.88 72.63	3.66 70.11	3.56/3.72 61.87/61.86	
Xyl <sub>t</sub>	4.935 (3.5) 98.97	3.54 72.16	3.73 73.70	3.61 70.20	3.56/3.72 61.87/61.86	
Gal <sub>a</sub>	4.55 105.25	3.60 71.74	3.65 73.40	3.92 69.28	3.68 75.83	3.77 61.68
Ara <sub>b</sub>	5.164 109.91	4.19 81.82	3.93 77.09	4.07 84.52	3.72/3.84 61.86/61.84	

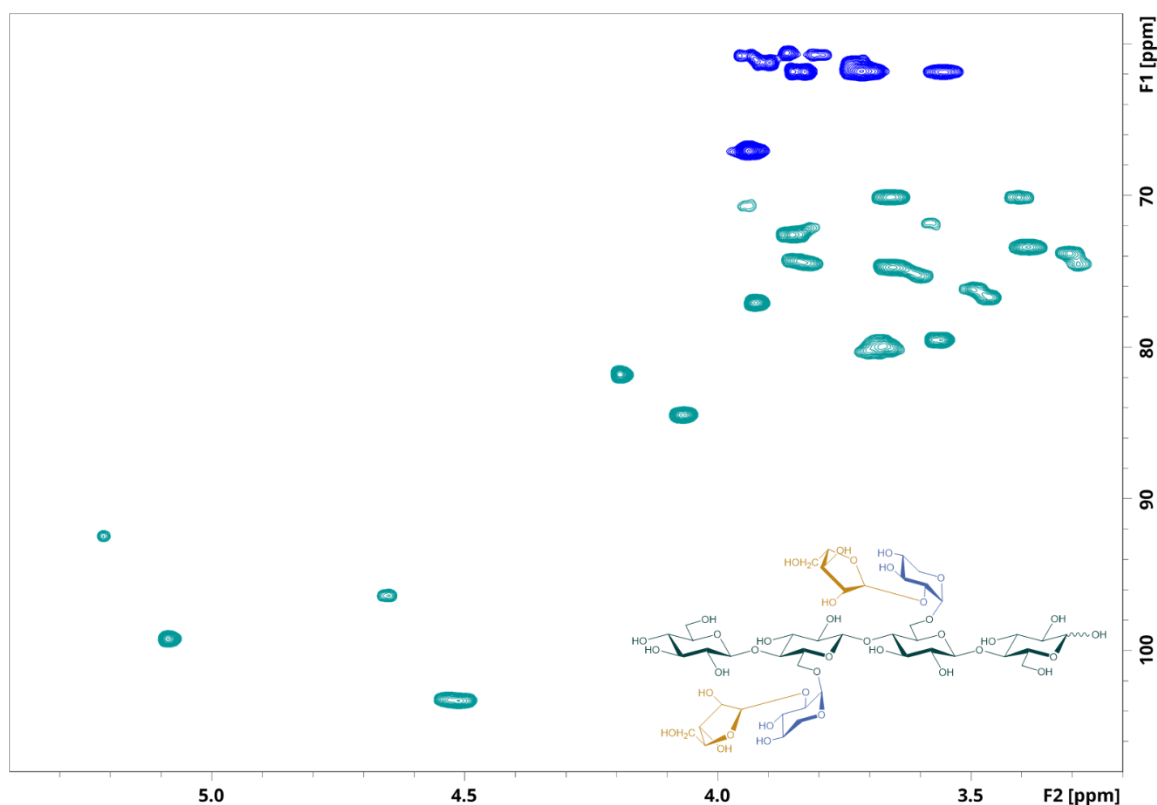


**Abbildung A74** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) XSLG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$  ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.



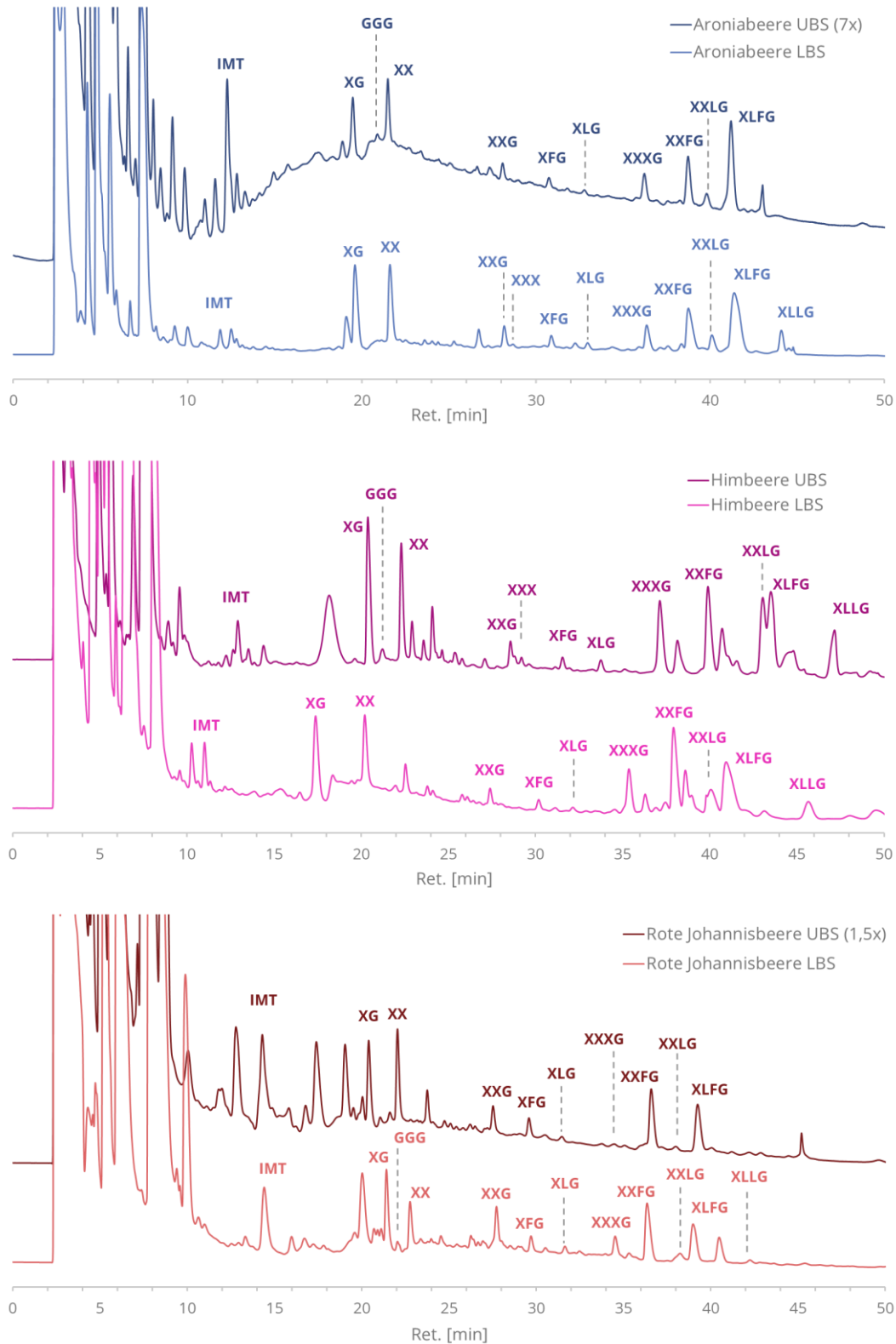
**Tabelle A75** Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen (oben) und Kohlenstoffe (unten) aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (ausgewählte anomere Signale) und HSQC-Spektrum des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GSSG, gemessen in  $\text{D}_2\text{O}$ . In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) zum benachbarten Proton angegeben. Die Kürzel der Bausteine und die Bezeichnung der Positionen entsprechen den Abb. 24 & 25.

Einheit	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	
Glc <sub>r</sub>	$\alpha$	5.215 (3.7) 92.35	3.56 71.90	3.82 71.98	3.70 80.04	3.95 70.57	3.86 60.55
	$\beta$	4.656 (7.9) 96.28	3.28 74.48	3.63 74.87	3.70 80.04	3.60 75.27	3.80/3.95 60.66/60.71
Glc(S) <sub>a</sub>	4.521 103.08	3.38 73.28	3.67 74.67	3.67 79.85	3.84 74.19	3.94 66.97	
Glc(S) <sub>b</sub>	4.521 103.08	3.38 73.28	3.67 74.67	3.67 79.85	3.84 74.19	3.94 66.97	
Glc <sub>t</sub>	4.521 103.22	3.31 73.72	3.50 76.05	3.41 70.09	3.47 76.52	3.72/3.91 61.16/61.21	
Xyl(S) <sub>a</sub>	5.088 (3.4) 99.10	3.57 79.44	3.85 72.56	3.65 70.02	3.56/3.71 61.73/61.73		
Xyl(S) <sub>a</sub>	5.088 (3.4) 99.10	3.57 79.44	3.85 72.56	3.65 70.02	3.56/3.71 61.73/61.73		
Ara <sub>a</sub>	5.162 109.75	4.20 81.70	3.93 76.96	4.07 84.37	3.71/3.84 61.73/61.78		
Ara <sub>b</sub>	5.162 109.75	4.20 81.70	3.93 76.96	4.07 84.37	3.71/3.84 61.73/61.78		

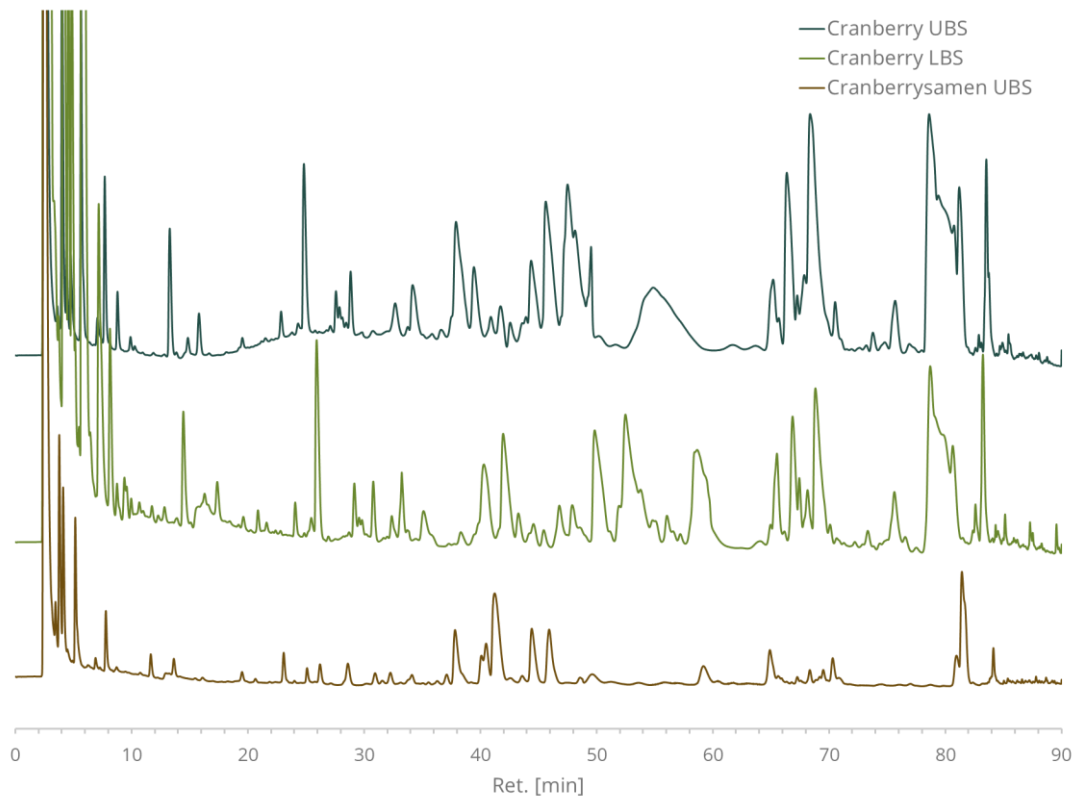
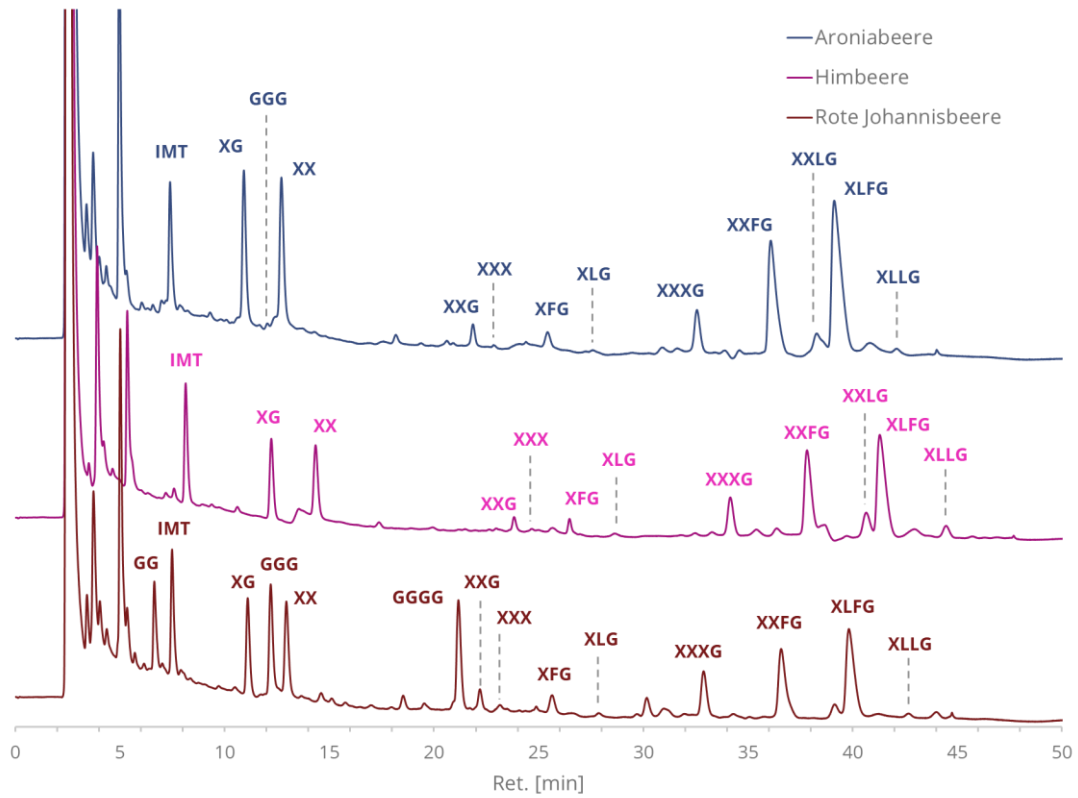


**Abbildung A76** HSQC-Spektrum und Struktur des Xyloglucanoligosaccharids (XGO) GSSG. Die Aufnahme erfolgte in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton ( $\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89 \text{ ppm}$ ). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der Abb. 24.

## 9. Anhang



**Abbildung A76** Chromatogramme (HPAEC) des Xyloglucan-Profilings der Ballaststofffraktionen der Beerenobstsorten. In Klammern ist angegeben, um welchen Faktor die Intensität des Signalwerts vergrößert wurde, wobei keine Angabe  $\times 1$  entspricht. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). IMT, Isomaltotriose; LBS, lösliche Ballaststoffe; UBS, unlösliche Ballaststoffe



**Abbildung A77** Chromatogramme (HPAEC) des Xyloglucan-Profilings der unlöslichen Ballaststoffe (UBS) der Samen (oben) sowie der Ballaststofffraktionen der Cranberryproben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). (1993). IMT, Isomaltotriose; LBS, lösliche Ballaststoffe

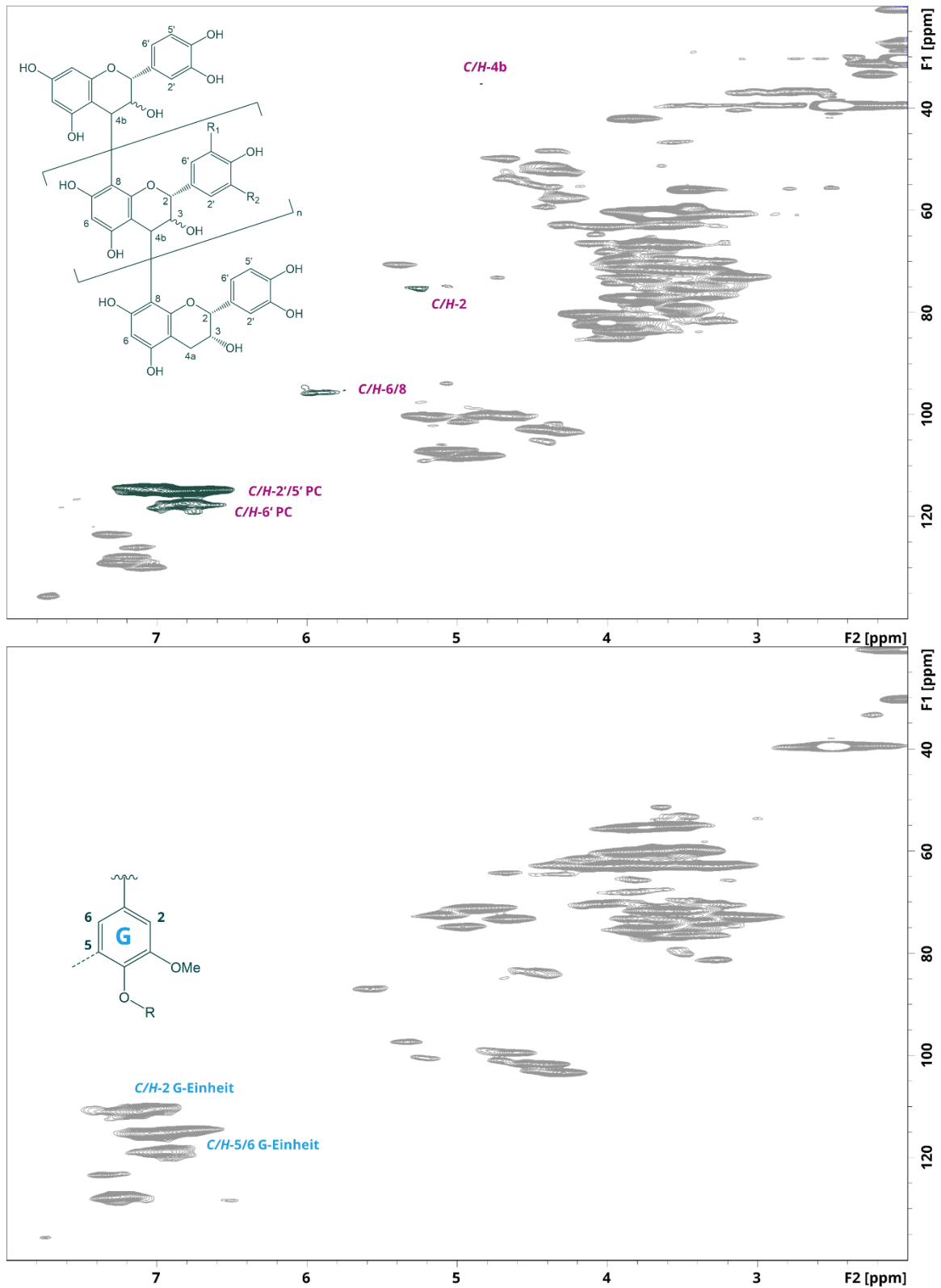
## 9. Anhang

**Tabelle A78** Zusammensetzung (mol% ± Range/2, n = 2) der freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (XGO) aus den unlöslichen bzw. löslichen Ballaststoffen (UBS & LBS) der Beerenobstsorten. Darunter sind die daraus errechnete Monosaccharidverteilung der XGO und der Substitutionsgrad (DS) angegeben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose

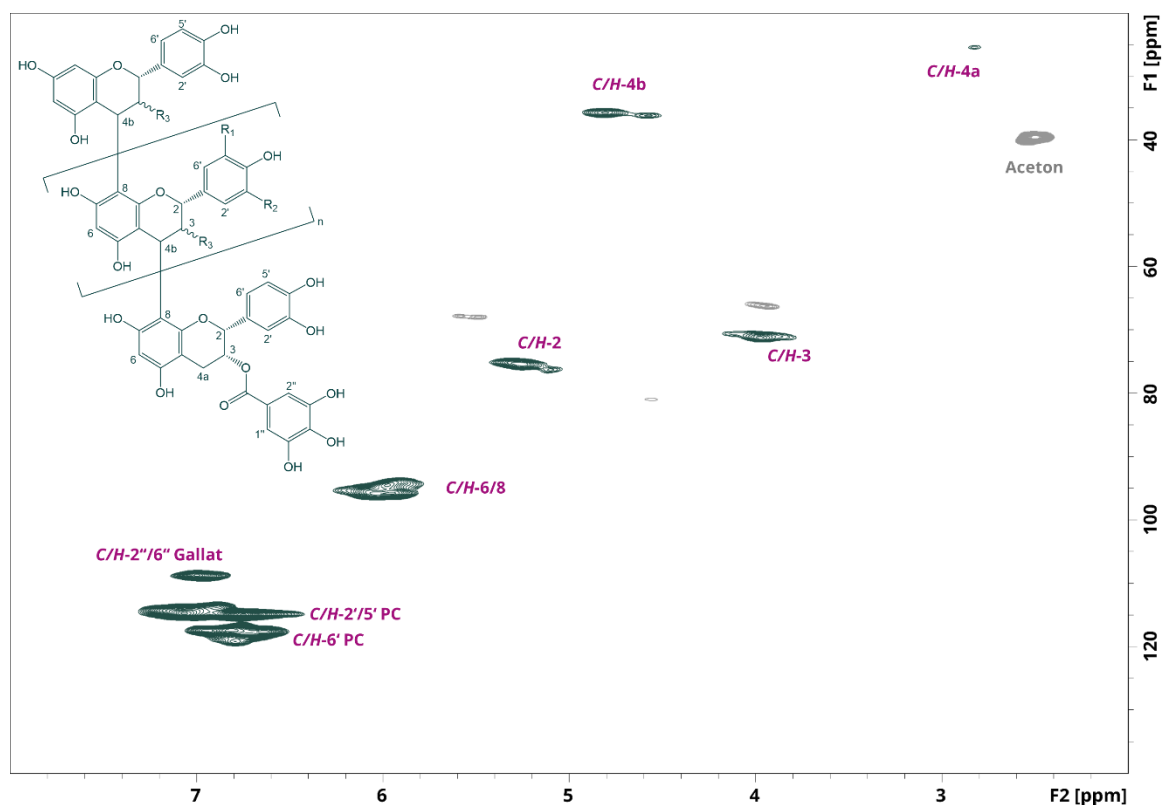
XGO	ARONIABEERE		HIMBEERE		ROTE JOHANNISBEERE	
	UBS	LBS	UBS	LBS	UBS	LBS
GGG	1,9 ± 0,2	n.d.	1,3 ± 0,3	n.d.	n.d.	3,0 ± 0,3
XG	17,6 ± 1,3	19,1 ± 0,4	15,9 ± 0,1	16,6 ± 0,8	20,9 ± 0,6	19,0 ± 0,5
XX	11,4 ± 0,2	12,4 ± 0,4	9,1 ± 0,1	9,8 ± 0,4	18,2 ± 0,9	9,3 ± 0,1
XXG	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,3	1,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1
XXX	n.b.	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	n.b.	n.b.	n.d.
XXXG	9,0 ± 0,6	7,8 ± 1,1	11,4 ± 0,5	9,1 ± 0,6	1,8 ± 0,7	7,9 ± 0,5
XLG	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
XXLG	5,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1	13,9 ± 0,1	8,5 ± 0,7	2,0 ± 0,3	3,7 ± 0,4
XLLG	n.d.	8,8 ± 0,3	16,1 ± 0,2	11,5 ± 0,8	n.d.	1,9 ± 0,5
XFG	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	5,0 ± 1,5	3,2 ± 0,2
XXFG	17,4 ± 0,2	14,9 ± 0,3	14,7 ± 0,5	19,8 ± 0,5	25,5 ± 1,0	26,0 ± 0,1
XLFG	31,6 ± 1,4	27,2 ± 0,8	13 ± 0,2	21,3 ± 2,5	19,9 ± 0,1	16,8 ± 1,0
Glc	50,5	49,9	51,3	49,6	50,4	52,5
Xyl	34,7	35,6	35,8	35,5	36,1	34,6
Gal	9,4	10,0	9,8	10,4	8,0	7,9
Fuc	5,3	4,6	3,0	4,5	5,5	5,0
DS [%]	68,7	71,4	69,9	71,6	71,6	65,9

**Tabelle A79** Zusammensetzung (mol% ± Range/2, n = 2) der freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide (XGO) aus den unlöslichen Ballaststoffen (UBS) der Beerenobstsorten. Darunter sind die daraus errechnete Monosaccharidverteilung der XGO und der Substitutionsgrad (DS) angegeben. Die Codierung der XGO entspricht der gängigen Nomenklatur (Fry et al., 1993; Tuomivaara et al., 2015). Fuc, Fucose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose

XGO	ARONIABEERSAMEN	HIMBEERSAMEN	ROTE JOHANNISBEERSAMEN
	UBS	UBS	UBS
GG	n.d.	n.d.	13,0 ± 0,1
GGG	0,4 ± 0,1	n.d.	12,5 ± 1
GGGG	n.d.	n.d.	12,9 ± 1,7
XG	12,9 ± 0,4	10,4 ± 0,1	8,0 ± 0,2
XX	12,0 ± 0,5	9,1 ± 0,1	7,2 ± 0,2
XXG	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
XXX	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1
XXXG	6,0 ± 0,3	8,3 ± 0,2	7,5 ± 1,0
XLG	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
XXLG	5,9 ± 0,1	7,7 ± 0,1	n.d.
XLLG	1,4 ± 0,1	5,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1
XFG	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1
XXFG	24,3 ± 0,1	25,7 ± 0,4	15,1 ± 0,7
XLFG	33,6 ± 0,4	30,1 ± 0,3	18,6 ± 1,0
Glc	48,0	47,6	68,3
Xyl	35,0	35,0	21,9
Gal	10,8	11,3	6,0
Fuc	6,2	6,1	3,8
DS [%]	72,8	73,5	32,1



**Abbildung A80** Das HSQC-Spektrum der Zellwandgele von den unlöslichen Ballaststoffen aus Aroniabeersamen (oben) und Himbeersamen (unten), aufgenommen in D<sub>2</sub>O mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Signals von Dimethylsulfoxid ( $\delta_{H/C} = 2,50/39,52$  ppm). Das obere Spektrum wurde übernommen und modifiziert aus Junker (2018). Zudem ist oben ein Strukturausschnitt eines Proanthocyanidinpolymers mit dem B-Bindungstyp über Position C-4 und C-8 dargestellt. Die Abkürzungen der Reste entsprechen der Abb. 7 und 8. Im unteren Spektrum ist ein Strukturausschnitt aus G-Lignin dargestellt. G, Guaiacyleinheit; PC, Procyanidin



**Abbildung A81** Das HSQC-Spektrum des isolierten Proanthocyanidinstandards aus Weinbeersamen aufgenommen in  $D_2O$  mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals ( $\delta_{H/C} = 2,22/30,89$  ppm). Das Spektrum wurde übernommen und modifiziert aus Junker (2018). Zudem ist ein Strukturausschnitt eines Proanthocyanidinpolymers mit terminalem Epicatechingallat und dem B-Bindungstyp über Position C-4 und C-8 dargestellt. Die Abkürzungen der Reste entsprechen der Abb. 7 und 8. PC, Procyanidin



## 10. Publikationsliste

### a. Publikationen in Fachzeitschriften

Beer F., Urvat F., Steck J., Huch M., Bunzel D., Bunzel M. & Kulling S. E. (2017). Metabolism of Foodborne Heterocyclic Aromatic Amines by *Lactobacillus Reuteri* DSM 20016. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(32): 6797-6811.

Schmid V., Steck J., Mayer-Miebach E., Behnlian D., Briviba K., Bunzel M., Karbstein H.P., Emin M. A. (2020). Impact of Defined Thermomechanical Treatment on the Structure and Content of Dietary Fiber and the Stability and Bioaccessibility of Polyphenols of Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Pomace. *Food Research International*. 134(109232): 1-11.

### b. Präsentationsvorträge auf Fachtagungen

Steck J. (2019). Zellwandpolysaccharide, Lignin und Proanthocyanidine in Samen aus Beerenobst. *Arbeitstagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Hohenheim

Steck J. (2019). Entwicklung und Anwendung einer chromatographischen Profilingmethode für Xyloglucane aus pflanzlichen Lebensmitteln. 48. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Dresden

### c. Posterbeiträge auf Fachtagungen

Junker F., Steck J., Eichhöfer H., Bunzel M. (2019). Differenzierung von ballaststoff-assoziiertem Lignin und Proanthocyanidinen am Beispiel von Samen aus Beerenobst. 48. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Dresden

Beer F., Urvat F., Steck J., Krüger J., Franz C. M. A. P., Huch M., Kulling S. E., Bunzel M., Bunzel D. (2019). Metabolisierung von heterozyklischen aromatischen Aminen durch die humane Darmmikrobiota. 48. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Dresden