

Molekulare Charakterisierung ferulasäurehaltiger Polysaccharidgele

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

M. Sc. Florian Raphael Junker

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
 2. Referentin: Prof. Dr. Gisela Guthausen
- Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2023

„Wir seien gleichsam Zwerge, die auf den Schultern von Riesen sitzen, um mehr und Entfernteres als diese sehen zu können - freilich nicht dank eigener scharfer Sehkraft oder Körpergröße, sondern weil die Größe der Riesen uns emporhebt.“

- Bernhard von Chartres

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die pflanzliche Zellwand	2
1.1.1	Zellwandaufbau	2
1.1.2	Strukturen der Zellwandpolysaccharide	3
1.1.2.1	Cellulose	3
1.1.2.2	Hemicellulosen	3
1.2	Ferulasäurehaltige Polysaccharide	4
1.2.1	Pektine	5
1.2.1.1	Die strukturelle Komplexität von Pektin	5
1.2.1.2	Ausbildung von Ferulasäure- <i>cross-links</i>	9
1.2.1.3	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	10
1.2.2	Arabinoxylane	11
1.2.2.1	Die Beschaffenheit der Arabinoxylanseitenketten	12
1.2.2.2	Ausbildung von Ferulasäure- <i>cross-links</i>	15
1.2.2.3	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	16
1.3	Hydrogele	16
1.3.1	Klassifizierung	17
1.3.1.1	Quelle	17
1.3.1.2	Netzwerkstruktur	18
1.3.1.3	Quervernetzung	18
1.3.2	Ferulasäurehaltige Polysaccharidgele	21
1.3.2.1	Enzymatische Kopplung über Ferulasäure- <i>cross-links</i>	21
1.3.2.2	Funktionelle Eigenschaften	22
1.3.2.3	Ernährungsphysiologische Eigenschaften	23
1.4	Charakterisierung von Hydrogelen	23
1.4.1	Makroskopische Charakterisierung	24
1.4.2	Mikroskopische Charakterisierung	25
1.4.2.1	Elektronenmikroskopie	25
1.4.2.2	Diffusion	26
2	Zielsetzung	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Gewinnung des Probenmaterials	30
3.1.1	Ausgangsmaterialien	30

3.1.2	Gewinnung von Pektin	30
3.1.2.1	Isolierung von Pektin	31
3.1.2.2	Enzymatische Modifikation von Pektin	32
3.1.3	Präparative Gewinnung von Ballaststoffen	33
3.1.4	Isolierung von Arabinoxylanen	34
3.2	Charakterisierung der extrahierten Polysaccharide	36
3.2.1	Grundcharakterisierung	36
3.2.1.1	Bestimmung der Asche- und Proteingehalte	36
3.2.1.2	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	36
3.2.1.3	Bestimmung des Molekulargewichts	37
3.2.2	Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen	38
3.2.2.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung	38
3.2.2.2	Bestimmung der Bindungsverhältnisse	39
3.2.2.3	Quantifizierung der phenolischen Komponenten	40
3.2.2.4	Analyse der Seitenkettenstrukturen	42
3.2.2.4.1	Freisetzung von Oligosacchariden	43
3.2.2.4.2	Auftrennung der freigesetzten Oligosaccharide	45
3.2.2.4.3	Screening von Arabinanen und Galactanen	46
3.2.2.4.4	Screening der Seitenkettenstrukturen von Arabinoxylanen	47
3.2.2.4.5	Strukturelle Charakterisierung der Oligosaccharide	47
3.2.2.5	Bestimmung des Veresterungsgrads	49
3.3	Bildung von kovalenten Hydrogelen	50
3.4	Rheologische Messungen	52
3.5	Diffusionsmessungen mittels NMR	54
4	Ergebnisse und Diskussion	58
4.1	Gewinnung des Probenmaterials	58
4.1.1	Pektinextraktion und -modifikation	58
4.1.2	Extraktion von Arabinoxylanen	59
4.2	Charakterisierung der extrahierten Polysaccharide	59
4.2.1	Entwicklung einer Profilingmethode für ferulasäurehaltige Arabinane und Galactane	61
4.2.1.1	Chromatographische Vortrennung und Analyse von ferulasäurehaltigen und und ferulasäurefreien Oligosacchariden	62
4.2.1.2	Anwendung auf ausgewählte Proben	65
4.2.1.3	Evaluation der Methode	69

4.2.2	Charakterisierung von (säure)extrahierten Pektinen aus Zuckerrüben	70
4.2.2.1	Grundcharakterisierung	70
4.2.2.2	Strukturcharakterisierung der Polysaccharide	71
4.2.2.3	Charakterisierung von ferulasäurehaltigen Galactanoligosacchariden	79
4.2.3	Charakterisierung von enzymatisch modifizierten Pektinen	81
4.2.4	Charakterisierung von Arabinoxylanen aus Popcornmais	84
4.2.4.1	Grundcharakterisierung	84
4.2.4.2	Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen	85
4.3	Charakterisierung der kovalenten Polysaccharidgele	91
4.3.1	Pektingele	92
4.3.1.1	Rheologische Eigenschaften	92
4.3.1.2	Diffusionseigenschaften	98
4.3.1.3	Veränderungen der phenolischen Komponenten	106
4.3.2	Arabinoxylangele	109
4.3.2.1	Rheologische Eigenschaften	109
4.3.2.2	Diffusionseigenschaften	111
4.3.2.3	Veränderungen der phenolischen Komponenten	114
4.3.3	Heterogene Pektin- und Arabinoxylangele	117
4.4	Zusammenfassende Diskussion	119
5	Zusammenfassung	128
6	Literaturverzeichnis	131
7	Chemikalien und Instrumente	153
7.1	Chemikalien	153
7.2	Hergestellte Lösungen und Reagenzien	155
7.3	Enzyme	156
7.4	Instrumente	156
8	Arbeitsvorschriften	159
8.1	Gewinnung des Probenmaterials	159
8.2	Grundcharakterisierung	164
8.3	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung	166
8.4	Bestimmung der Bindungsverhältnisse	167
8.5	Analyse der phenolischen Säuren	170
8.6	Screening von Arabinanen und Galactanen	172

8.7	Screening der Seitenketten von Arabinoxylanen	178
8.8	Bestimmung des Veresterungsgrads	180
8.9	Rheologische Messungen	181
8.10	Diffusionsmessungen	183
9	Abbildungen und Tabellen	185
9.1	Tabellen	185
9.2	Abbildungen	188
10	Publikationsliste	200

Abkürzungsverzeichnis

AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
AGN	Arabinogalactan
AN	Arabinan
AOAC	<i>Association of Analytical Chemists</i>
AQC	6-Aminochinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidylcarbamat
Ara	L-Arabinose
A/x	Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis
AX	Arabinoxylan
AXOS	Arabinoxyloligosaccharide
BS	Ballaststoff
c	zyklisch, engl. <i>cyclic</i>
<i>o</i> -CS	<i>trans-ortho</i> -Cumarsäure
<i>p</i> -CS	<i>trans-para</i> -Cumarsäure
D1	Relaxationszeit, engl. <i>Relaxation Delay</i>
DA	Acetylierungsgrad, <i>Degree of Acetylation</i>
DAD	Diodenarraydetektor
dc	Decarboxyliert
DM	Methylierungsgrad, engl. <i>Degree of Methylation</i>
DFS	Dehydrodiferulasäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrosprayionisation
<i>f</i>	Furanose
FA	5- <i>O-trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FAX	β -D-Xylopyranosyl-5- <i>O-trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FAXG	α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow \rightarrow 2)-5- <i>O-trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor
Fuc	D-Fucose
FS	<i>trans</i> -Ferulasäure

Gal	D-Galactose
GalA	D-Galacturonsäure, engl. <i>galacturonic acid</i>
GC	Gaschromatographie
Glc	D-Glucose
GlcA	D-Glucuronsäure, engl. <i>glucuronic acid</i>
GN	Galactan
HG	Homogalacturonan
HMBC	engl. <i>Hetero Multiple Bond Correlation</i>
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie engl. <i>High Performance Anion Exchange Chromatography</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPSEC	Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie engl. <i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i>
HSQC	engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Lac	Laccase
LBS	Lösliche Ballaststoffe
LC	Flüssigchromatographie, engl. <i>Liquid Chromatography</i>
MALLS	Mehrwinkellichtstreuendetektor, engl. <i>Multi-Angle Laser Light Scattering</i>
MS	Massenspektrometer
MWD	Molekulargewichtsverteilung, engl. <i>Molecular Weight Distribution</i>
nc	nicht-zyklisch, engl. <i>non-cyclic</i>
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie, engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OFS	Oligoferulasäuren
p	Pyranose
PAD	Gepulst amperometrischer Detektor, engl. <i>Pulsed Amperometric Detector</i>
PFGE-STE	engl. <i>Pulsed Field Gradient-Stimulated Echo</i>
PGC	engl. <i>Porous Graphitized Carbon</i>
Pkt	Pektin
PMMA	Partiell methylierte Alditolacetate

POD	Peroxidase
RG	Rhamnogalacturonan
Rha	L-Rhamnose
RI	Brechungsindex, engl. <i>Refractive Index</i>
RP	Umkehrphase, engl. <i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
SA	<i>trans</i> -Sinapinsäure
SPE	engl. <i>Solid Phase Extraction</i>
TFA	Trifluoressigsäure, engl. <i>Trifluoroacetic acid</i>
THF	Tetrahydrofuran
TriFS	Dehydrotriferulasäure
UBS	Unlösliche Ballaststoffe
UV	Ultraviolett
UVD	UV-Detektor
WEAX	Wasserlösliche Arabinoxylane
WUAX	Wasserunlösliche Arabinoxylane
XOS	Xylooligosaccharide
Xyl	D-Xylose
ZRS	Zuckerrübenschnitzel

Symbolverzeichnis

a	Fitparameter der Latour-Pade-Gleichung
b	Fitparameter der Latour-Pade-Gleichung
c	Konzentration
D	Diffusionskoeffizient
D_0	Diffusionskoeffizient bei unendlicher Verdünnung
D_{eff}	Effektiver Diffusionskoeffizient
$\frac{dn}{dc}$	spezifisches Brechungsindexinkrement
g	Gradientenstärke
g_s	Spoilerpuls
G'	Speichermodul

G''	Verlustmodul
k_B	Boltzmann-Konstante
M_w	Gewichtsgemittelttes Molekulargewicht
r	Stokes-Radius
$R(\theta)$	Intensität des Streulichts am Winkel θ
$R/2$	Range/2
s_{x0}	Standardabweichung
S	Signalintensität
S_0	Signalintensität ohne Gradient
t	Zeit
T	Temperatur
T_1	Longitudinale Relaxationszeit
T_2	Transversale Relaxationszeit
γ	gyromagnetisches Verhältnis
γ_s	Deformation
$\gamma_{s,0}$	Amplitude der Deformation
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit
$\dot{\gamma}_{s,0}$	Amplitude der Schergeschwindigkeit
δ	Phasenwinkel
δ_c	Chemische Verschiebung
δ_p	Gradientenpulsdauer
$\tan \delta$	Verlustfaktor
Δ	Diffusionszeit
η	Viskosität
λ	Wellenlänge
π	Kreiszahl
τ	Schubspannung
τ_0	Amplitude der Schubspannung
τ_{Tort}	Tortuosität
ω	Kreisfrequenz

1 Einleitung

Pflanzliche Lebensmittel stellen einen bedeutenden Teil der menschlichen Ernährung dar, da sie Quelle wichtiger Nährstoffe wie u.a. Kohlenhydrate, Vitamine und Mineralstoffe sind. Darunter fallen Ballaststoffe als nicht verdauliche Bestandteile, die sowohl für die menschliche als auch tierische Ernährung eine große Rolle spielen. Sie stammen zu großen Teilen aus der pflanzlichen Zellwand und werden nach der *American Association of Cereal Chemists* (AACC) als „essbare Bestandteile von Pflanzen oder analoge Kohlenhydrate definiert, die gegenüber Verdau und Resorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und vollständig oder teilweise im Dickdarm fermentiert werden.“ Weiter weisen Ballaststoffe positive ernährungsphysiologische Effekte wie die Verminderung des Blutcholesterin- und -glucosespiegels auf (AACC, 2001). Im Zuge der Gewinnung von Nahrungsmitteln aus Pflanzen wie beispielsweise bei der Saftherstellung oder Stärke- und Haushaltszuckergewinnung bilden Ballaststoffe einen mengenmäßig bedeutenden Teil der verbleibenden Rückstände. Dabei weisen manche Ballaststoffkomponenten durch ihre vielfältigen Strukturen auch unterschiedliche funktionelle Eigenschaften auf, womit sie zur Herstellung von Papier, Textilien aber auch als Lebensmittelzusatzstoffen eingesetzt werden können. So finden Ballaststoffpolysaccharide, abhängig von ihrer strukturellen Zusammensetzung, beispielsweise Anwendung als Stabilisatoren, Dickungsmittel oder Gelbildner in verarbeiteten Lebensmitteln.

Der Einsatz als Gelbildner in Lebensmitteln beruht dabei meist auf physikalischen Gelbildungsprozessen, die jedoch stark sensitiv gegenüber pH- und Temperaturänderungen sind. Eine Alternative ist der Einsatz ferulasäurehaltiger Polysaccharide wie Pektine (Pkt) aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae oder Arabinoxylane (AX) aus Pflanzen der Familien Poaceae und Bromeliaceae. Durch die Substitution mit *trans*-Ferulasäure (FS) können sie durch den Einsatz geeigneter Enzyme oxidativ gekoppelt werden, wodurch sich kovalent-vernetzte Hydrogele ausbilden. Auf Grund ihrer präbiotischen Eigenschaften sowie der pH- und Elektrolytstabilität können sie beispielsweise als *Carrier* für dickdarmgerichtete Wirkstoffe oder zur Einstellung der Lebensmitteltextur eingesetzt werden (Carvajal-Millán *et al.*, 2005b; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009). Hierbei gibt es zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen den viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele und einzelnen Strukturparametern der Polysaccharide belegen (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c; Zaidel *et al.*, 2012). Jedoch sind Daten zu mikroskopischen Eigenschaften der ferulasäurebasierten Hydrogele kaum vorhanden, die für eine umfassende Beschreibung der Gele essentiell sind.

1.1 Die pflanzliche Zellwand

Pflanzliche Zellen sind von einer Zellwand umgeben, die ihnen Stabilität verleiht und dabei hilft, dem Turgordruck standzuhalten. Zudem stellt sie einen Schutzmechanismus der Pflanze gegen Austrocknung und Pflanzenpathogene dar und spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation.

1.1.1 Zellwandaufbau

Die Zellwand stellt in ihrer Grundstruktur ein komplexes Netzwerk aus überwiegend Polysacchariden, Proteinen und Lignin dar. Sie lässt sich in die drei Kompartimente Mittellamelle, Primärzellwand und Sekundärzellwand unterteilen, die abhängig von Art, Wachstumsstadium sowie Gewebe der Pflanze unterschiedlich stark ausgeprägt sind (McDougall *et al.*, 1996). Die Mittellamelle ist im Interzellularraum lokalisiert und bildet dadurch die äußerste Schicht der Zellwand. Sie ist hauptsächlich aus Pkt aufgebaut und für die Zell-Zell-Adhäsion entscheidend (Zamil & Geitmann, 2017). Ihr aufgelagert ist die Primärzellwand, die sich während des Zellwachstums ausbildet. Grundsätzlich sind Primärzellwände aus Cellulosemikrofibrillen aufgebaut, die in ein Netzwerk aus Pkt, Hemicellulosen und Proteinen eingelagert sind. Die Zusammensetzung der verschiedenen Polysaccharide variiert dabei je nach Pflanzenart. So enthalten Primärzellwände von monokotylen Pflanzen große Anteile an (Glucurono-)Arabinoxylanen als Hemicellulosen, während Pkt in geringfügigen Anteilen enthalten sind. Zusätzlich können in Pflanzen der Familie Poaceae *mixed-linked* β -Glucane vorkommen. Dagegen sind Primärzellwände in dikotylen sowie nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen zu erheblichen Anteilen aus Pkt sowie Xyloglucanen als Hemicellulosen zusammengesetzt (Vogel, 2008). Strukturproteine sind ebenfalls wesentlicher Bestandteil von Primärzellwänden. Diese werden in hydroxyprolinreiche (Extensine), glycinreiche und prolinreiche Strukturproteine unterteilt (Showalter, 1993). Die sekundäre Zellwand wird nach Beendigung des Zellwachstums ausgebildet und der Primärzellwand aufgelagert. Sie besteht abhängig von der Pflanzenart aus unterschiedlichen Anteilen von Cellulose, Xylanen sowie Lignin, einem polyphenolischen Polymer. Der Einbau von Lignin verleiht der Zelle Stabilität und Festigkeit und erhöht den Schutz vor Pflanzenpathogenen. Gleichmaßen wird durch die Erhöhung der Hydrophobizität die Wasserdurchlässigkeit der Zellwand gesenkt und dadurch der Wassertransport im Leitgewebe ermöglicht (Boerjan *et al.*, 2003).

1.1.2 Strukturen der Zellwandpolysaccharide

Polysaccharide stellen Polymere von Monosacchariden dar, die sich in der Anzahl der Kohlenstoffatome (Pentosen/Hexosen), Ringform (Furanose (*f*)/Pyranose (*p*)), Konfiguration (α/β) oder Chiralität (D/L) unterscheiden, wodurch sich eine große Strukturvielfalt ergibt. In der pflanzlichen Zellwand basieren die Polysaccharide weitestgehend auf den Hexosen D-Glucopyranose (Glc*p*), D-Glucopyranuronsäure (Glc*p*A, engl. *glucuronic acid*), D-Galactopyranose (Gal*p*), D-Galactopyranuronsäure (Gal*p*A, engl. *galacturonic acid*), D-Mannopyranose, L-Rhamnopyranose (Rha*p*) und L-Fucopyranose (Fuc*p*) sowie den Pentosen L-Arabinofuranose (Ara*f*) und L-Xylose (Xyl*p*). Eine zusätzliche Vielfalt ergibt sich durch die Substitution mit Acetyl- oder Methylresten, u.a. bei Pkt und AX (Gibeaut *et al.*, 2005; McComb & McCreedy, 1957). Abhängig von der Zusammensetzung der Polymerketten werden Zellwandpolysaccharide in Cellulose, Hemicellulosen sowie Pkt unterschieden. Der Aufbau von Cellulose und Hemicellulosen (mit Ausnahme von AX) wird im folgenden Kapitel beschrieben, während auf Pkt und AX in Kap. 1.2 genauer eingegangen wird.

1.1.2.1 Cellulose

Cellulose ist das mengenmäßig bedeutendste natürlich vorkommende Biopolymer. Es stellt ein lineares, wasserunlösliches Polymer aus β -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpften Glc*p* dar, die alternierend um 180° gedreht vorliegen. Als kleinste sich wiederholende Einheit besteht Cellulose somit aus Cellobiose. In Primärzellwänden bestehen die Celluloseketten aus etwa 5.000 Einheiten, während sie in Sekundärzellwänden aus bis zu 15.000 Einheiten aufgebaut vorliegen können. Über intermolekulare Wasserstoffbrücken lagern sie sich zu Mikrofibrillen zusammen, die dem Zellwandgefüge als Gerüstsubstanz Stabilität und Struktur verleihen (McDougall *et al.*, 1996; O’Sullivan, 1997).

1.1.2.2 Hemicellulosen

Hemicellulosen stellen die zweite große Klasse der Zellwandpolysaccharide dar und bilden durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken das Füllmaterial zwischen den Cellulosemikrofibrillen. Die Extraktion von Hemicellulosen aus dem Zellwandverbund bedarf teilweise starker alkalischer Behandlung, um die Interaktion mit den Cellulosemikrofibrillen aufzulösen. Als bedeutendste Hemicellulosen in Primärzellwänden von dikotylen sowie nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen sind Xyloglucane zu nennen. Ihr Rückgrat ist analog zur Cellulosestruktur aus β -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpften Glc*p* aufgebaut. An Position O-6 der Glucoseeinheiten können Xyl*p*-Einheiten gebunden

sein, die wiederum an Position *O*-2 zusätzlich mit Galp, Araf oder Xylp substituiert sein können, wobei Galp-Einheiten fucosyliert oder acetyliert vorliegen können. Der Substitutionsgrad sowie das Substitutionsmuster sind dabei stark abhängig von der Pflanzenart und haben wesentlichen Einfluss auf die Löslichkeit (Tuomivaara *et al.*, 2015; Scheller & Ulvskov, 2010; Steck *et al.*, 2021). Xyloglucane sind ebenfalls Teil von Primärzellwänden commelinider monokotyler Pflanzen, allerdings spielen sie hier mengenmäßig nur eine untergeordnete Rolle.

Dagegen sind in Primärzellwänden commelinider monokotyler Pflanzen Xylane als weitere Hemicellulosen in hohen Anteilen enthalten. Abhängig von ihrer Struktur können sie in Glucuronoxylane und (Glucurono)Arabinoxylane unterteilt werden und damit einhergehend eine unterschiedliche Bedeutung im Zellwandgefüge einnehmen: Während Glucuronoxylane wesentlicher Bestandteil von Sekundärzellwänden dikotyler und nicht-commelinider monokotyler Pflanzen sind, beschränkt sich das Vorkommen von (Glucurono)Arabinoxylanen weitestgehend auf Primär- und Sekundärzellwände commelinider monokotyler Pflanzen (Vogel, 2008). In ihrer Grundstruktur sind Xylane aus β -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpften Xylp aufgebaut. Glucuronoxylane tragen als wesentliche Strukturmerkmale GlcA sowie 4-*O*-Methylglucopyranuronsäure als Substituenten an Position *O*-2 der Xylp (Scheller & Ulvskov, 2010). Die strukturellen und funktionellen Aspekte von (Glucurono)Arabinoxylanen werden in Kap. 1.2.2 behandelt.

Als weitere Hemicellulosen sind *mixed-linked*- β -Glucane und Mannane zu nennen, wobei das Vorkommen von *mixed-linked*- β -Glucanen wie bereits erwähnt auf Primärzellwände einiger monokotyler Pflanzen der Familie Poaceae wie z.B. Hafer und Gerste beschränkt ist (Gibeaut *et al.*, 2005). Sie sind ähnlich wie Cellulose aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Glcp aufgebaut, deren Ketten allerdings regelmäßig durch β -(1 \rightarrow 3)-Verknüpfungen unterbrochen werden. Dagegen sind Mannane hauptsächlich aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Mannopyranosen aufgebaut, die bei zusätzlicher Substitution mit Galp auch als Galactomannane bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu enthält das Rückgrat von Glucomannanen zusätzlich Glcp als Kettenglied (Scheller & Ulvskov, 2010).

1.2 Ferulasäurehaltige Polysaccharide

Die strukturellen Eigenschaften von Zellwandpolysacchariden sind von einer Reihe an Faktoren abhängig, wobei die botanische Herkunft bereits Hinweise auf grundsätzliche Strukturparameter geben kann. So tragen Zellwandpolysaccharide wie Pkt aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae sowie AX aus Pflanzen der Familien Poaceae und Bro-

meliceae *trans*-Ferulasäure als wesentliches Strukturmerkmal (Ishii & Tobita, 1993; Colquhoun *et al.*, 1994; Levigne *et al.*, 2004b).

1.2.1 Pektine

Pkt sind als Bestandteil der Mittellamelle sowie der Primär- und Sekundärzellwände ubiquitär in sämtlichen Landpflanzen enthalten. In monokotylen Pflanzen können sie dabei etwa 5 % der Primärzellwand ausmachen, während sie in der Sekundärzellwand nur zu etwa 0,1 % vorkommen. Mit Anteilen von bis zu 20-35% spielen sie eine große Rolle in Primärzellwänden dikotyler Pflanzen (Vogel, 2008). In der Lebensmittelindustrie finden Pkt Anwendung als Gelbildner, Dickungs- und Stabilisierungsmittel, wobei die Eigenschaften erheblich von der Struktur abhängen (Funami *et al.*, 2011; Bindereif *et al.*, 2021). Hierbei werden gewöhnlich Pkt aus Zitrusfrüchten, Äpfeln oder Zuckerrüben eingesetzt.

1.2.1.1 Die strukturelle Komplexität von Pektin

Pkt stellen hochkomplexe Heteropolysaccharide dar, deren strukturelle Zusammensetzung bis dato nicht gänzlich aufgeklärt sind. Es existieren mehrere Modelle, welche die räumliche Struktur von linearen und verzweigten Abschnitten unterschiedlich definieren (Vries *et al.*, 1982; Vincken *et al.*, 2003; Yapo, 2011). Nach dem Modell von Vries und Mitarbeitern (1982) kann die Struktur von Pkt in *smooth regions* und *hairy regions* unterteilt werden. Die *smooth regions* bilden weitestgehend lineare Abschnitte aus Homogalacturonan (HG), während *hairy regions* aus Xylogalacturonan und Rhamnogalacturonanen (RG) Typ II und I aufgebaut sind, wobei letztere Arabinane (AN) und (Arabino)Galactane (AGN bzw. GN) als neutrale, verzweigende Seitenketten tragen können. Die Anteile und Zusammensetzungen der einzelnen Strukturelemente variieren dabei stark abhängig von der botanischen Herkunft, der Gewebeart, des Reifegrads und der Extraktionsmethode (Voragen *et al.*, 2009; Caffall & Mohnen, 2009; Rombouts & Thibault, 1986). Die Strukturen der einzelnen Polysaccharide werden im Folgenden näher beleuchtet.

Homogalacturonan

HG stellt mit bis zu 60% einen mengenmäßig bedeutenden Teil von Pkt dar. In seiner Grundstruktur ist HG linear aus bis zu 100 α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften GalA-Einheiten aufgebaut (Thibault *et al.*, 1993). An Position O-6 können die GalA-Einheiten mit Methanol verestert vorliegen, wodurch Pkt in hoch- und niedrigverestertes Pkt unterteilt wird,

welche unterschiedliche Gelieereigenschaften aufweisen (Mort *et al.*, 1993). Beispielsweise können hochveresterte Pkt aus z.B. Zitrusfrüchten oder Äpfeln mit einem Methylierungsgrad (DM, engl. *degree of methylation*) über 50% bei Anwesenheit von hohen Gehalten an Zucker und niedrigen pH-Werten gelieren, was sich in der Herstellung von Fruchtgelées zu Nutze gemacht wird. Für die Gelierung von niedrigveresterten Pkt sind divalente Kationen wie z.B. Ca^{2+} nötig (Voragen *et al.*, 2009). Die unterschiedlichen Mechanismen der Gelierung werden in Kap. 1.3.2.1 näher beschrieben. Daneben kann das HG-Polymer an Position *O*-2 und/oder *O*-3 der GalA-Einheiten acetyliert vorliegen, was die funktionellen Eigenschaften beeinflusst (Willats *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der Acetylierungsgrad (DA, *Degree of Acetylation*) die Gelbildung negativ beeinflusst und sich daher stark acetyliertes Pkt, wie z.B. aus Zuckerrüben, nicht zur Gelierung eignet (Pippen *et al.*, 1950; Oosterveld *et al.*, 2000a).

Xylogalacturonan und Rhamnogalacturonan Typ II

α -(1→4)-verknüpfte GalA-Einheiten in Pkt z.B. in Äpfeln können zusätzlich an Position *O*-3 mit β -Xylp oder Xyl-Oligosacchariden substituiert vorliegen und **Xylogalacturonane** als Teil der *hairy regions* von Pkt bilden (Schols *et al.*, 1995). Das Vorkommen beschränkt sich allerdings auf wenige Pflanzenspezies wie u.a. Apfel oder Erbse (Caffall & Mohnen, 2009).

Dagegen ist **RG II** ubiquitär in zumeist geringen Mengen in Pflanzenzellwänden vorhanden. Es wird angenommen, dass RG II als verzweigter Abschnitt des HG von etwa neun GalA-Einheiten gilt. An diesen Abschnitt sind vier Seitenketten substituiert, die aus bis zu zwölf verschiedenen Monosacchariden zusammengesetzt und über viele verschiedene Bindungstypen miteinander verknüpft sind. Die komplexe Struktur ist hochkonserviert und kann Pkt über Borat-Diester-Brücken miteinander verknüpfen, weshalb RG II eine wichtige Rolle im Aufbau der Zellstabilität zugesprochen wird.

Rhamnogalacturonan Typ I

Die *hairy regions* von Pkt sind neben Xylogalacturonan und RG II aus RG I aufgebaut, wobei RG I quantitativ oft am bedeutsamsten ist. In Zuckerrüben bzw. Soja kann RG I Anteile am Gesamtpektin von etwa 50 bzw. 75% ausmachen (Voragen *et al.*, 2009).

RG I stellt ein verzweigtes Makromolekül dar, dessen Rückgrat alternierend aus α -1→2-verknüpfter Rhap und α -1→4-verknüpfter GalA zusammengesetzt ist. Die Carboxylgruppen der GalA können analog zu HG methyliert oder acetyliert vorliegen, wobei Methylierungen im Vergleich zu Acetylierungen eine untergeordnete Rolle spielen (Voragen *et al.*, 2009). Methylveresterte GalA-Einheiten in RG I konnten bislang lediglich

in Flachs und Tabak festgestellt werden (Sun *et al.*, 1987; Rihouey *et al.*, 1995).

An Position *O*-4 der Rhap können mit AN, GN und AGN Typ I als neutrale Seitenketten auftreten, wodurch RG I verzweigt vorliegt (Colquhoun *et al.*, 1990; Lau *et al.*, 1987). Die schematische Grundstruktur von RG I mit AN, GN und AGN Typ I-Seitenketten ist in Abb. 1.1 dargestellt.

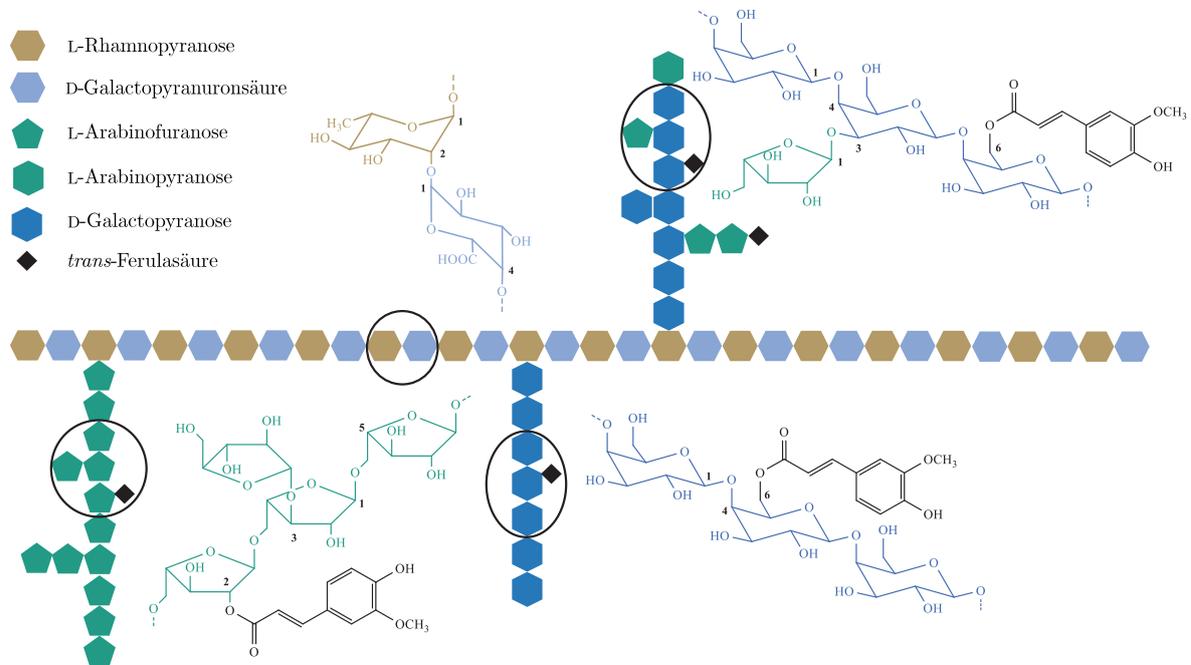


Abb. 1.1: Schematische Struktur von Rhamnogalacturonan I (Rückgrat) in Pflanzen der Familie Amaranthaceae mit Arabinan (grün)-, Galactan (blau) und Arabinogalactan Typ I-Seitenketten (grün + blau)

Arabinane sind weitestgehend Homopolymere aus α -(1 \rightarrow 5)-verknüpften Araf-Einheiten, die an Position *O*-2 und/oder *O*-3 weitere Araf oder Araf- α -(1 \rightarrow 3)-Araf-Disaccharide als Substituenten tragen können (Cardoso *et al.*, 2007; Westphal *et al.*, 2010c; Wefers *et al.*, 2014). Das Substitutionsmuster sowie der Gehalt an AN ist abhängig von der Pflanzenspezies (Wefers & Bunzel, 2016) und verändert sich u.a. während der Lagerung, wie Wefers und Mitarbeiter (2018) bei der Untersuchung von Äpfeln feststellten. Gleichmaßen sind AN thermo- und säurelabil, wodurch die AN-Zusammensetzung auch erheblich von der Extraktionsmethode beeinflusst wird (Levigne *et al.*, 2002b; Schmid *et al.*, 2021; Oosterveld *et al.*, 1996; Kaya *et al.*, 2014). Bei Studien zu technofunktionellen Eigenschaften von Zuckerrübenpektin konnte festgestellt werden, dass die Feinstruktur der Arabinane die Emulgiereigenschaften beeinflussen kann. Zuckerrübenpektin gilt als AN-reich und damit einhergehend als guter Emulsionsbildner (Bindereif *et al.*, 2021). AN aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae liegen unter natürlichen Bedingungen mit FS verestert vor, wodurch sich u.a. Zuckerrübenpektin sowohl strukturell als auch

funktionell erheblich von anderen Pkt unterscheidet. Die Esterbindung befindet sich dabei an Position *O*-2 der *Araf* oder an *O*-5 der terminalen Einheit, was durch Isolierung von FS-haltigen Oligosacchariden nach enzymatischem Verdau gezeigt werden konnte (Ishii & Tobita, 1993; Colquhoun *et al.*, 1994; Levigne *et al.*, 2004b; Bunzel *et al.*, 2005). Die Assoziation von Pkt mit FS wird in Kap. 1.2.1.2 näher betrachtet.

Gal-basierte Polysaccharide als Teil von Pkt werden anhand der Bindungsstruktur ihres Rückgrats in **Galactane** und **Arabinogalactane Typ I** oder **Arabinogalactane Typ II** eingeordnet. Sowohl GN als auch AGN Typ I basieren auf einem Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Gal p -Einheiten und sind durch die Bindung an Rha p mit dem RG I Rückgrat verknüpft. GN stellen meist lineare, unverzweigte Polysaccharide dar, während AGN Typ I durch α -(1 \rightarrow 5)-gebundene *Araf* innerhalb des Gal-Rückgrats aber auch durch Verzweigungen des Rückgrats mit Ara oder Gal charakterisiert sind (Caffall & Mohnen, 2009; Huisman *et al.*, 2001). Die Verknüpfungen von AGN Typ I mit *Araf* oder *Araf*-Oligosacchariden treten dabei an Position *O*-3 der Gal p auf (Habibi *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnten Ara p an Position *O*-4 der Gal p als terminale oder interne Einheit des Rückgrats identifiziert werden (Huisman *et al.*, 2001; Wefers *et al.*, 2014; Wefers *et al.*, 2015b). Zusätzlich kann Gal p an Position *O*-6 oder β -(1 \rightarrow 3)-gebunden innerhalb des Rückgrats auftreten (Hinz *et al.*, 2005; Voragen *et al.*, 2009). Wie AN können auch GN und AGN Typ I z.B. in Zuckerrübenpektin mit FS verestert vorliegen. Dabei treten diese Substitutionen entweder an Position *O*-6 der Gal p oder an *O*-2 der *Araf* im AGN Typ I auf. Dies konnte u.a. durch Isolierung des Disaccharids 6-*O*-*trans*-Feruloyl-D-Galactopyranosyl- β -(1 \rightarrow 4)-D-Galactopyranose aus Spinat, Zuckerrübe und Amaranth gezeigt werden (Ishii & Tobita, 1993; Colquhoun *et al.*, 1994; Bunzel *et al.*, 2005).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden GN als Überbegriff für verzweigte und unverzweigte β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Gal-Strukturen verwendet.

Im Vergleich zu AGN Typ I ist das Rückgrat von AGN Typ II aus β -(1 \rightarrow 3)-verknüpften Gal p aufgebaut, die an *O*-6 weitere Gal p -Einheiten oder β -(1 \rightarrow 6)-verknüpfte Gal p Oligosaccharide tragen. Die Seitenketten können ihrerseits mit *Araf* verzweigt sein (Voragen *et al.*, 2009). AGN Typ II liegen meist mit zellwandgebundenen Arabinogalactanproteinen assoziiert vor, die durch ihren hohen Anteil an Hydroxyprolin charakterisiert sind (Villa-Rivera *et al.*, 2021). Bis dato ist nicht geklärt, ob AGN Typ II an RG I gebunden vorliegt oder lediglich mit Arabinogalactanproteinen assoziiert ist, die wiederum kovalent mit Pkt verknüpft sein können (Oosterveld, 2002; Kirby *et al.*, 2006). Die Assoziation mit Proteinen hat dabei einen potenziellen Einfluss auf die Emulgierereigenschaften von

Pkt (Funami *et al.*, 2007; Funami *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2015).

1.2.1.2 Ausbildung von Ferulasäure-*cross-links*

AN und GN in Pkt aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae liegen mit FS verestert vor. Dies konnte für Zuckerrübe, Spinat, Quinoa und Amaranth gezeigt werden (Ishii & Tobita, 1993; Levigne *et al.*, 2004b; Bunzel *et al.*, 2005; Wefers *et al.*, 2015a). Ralet und Mitarbeiter (1994b) stellten bei der Analyse von Zuckerrübenpektin fest, dass etwa 50% der FS an AN und 50% an GN gebunden vorliegen können. Unter Ausbildung von kovalenten Oligoferulasäure (OFS)-*cross-links* können FS-Einheiten miteinander koppeln und so verschiedene Polysaccharide miteinander verknüpfen. Dies konnte speziell für AX beobachtet werden (Kap. 1.2.2.2). In der Zellwand geschieht dies entweder photochemisch (Hartley *et al.*, 1990) oder oxidativ unter Einbeziehung zellwandgebundener Enzyme (Hatfield *et al.*, 2017; Bunzel, 2010).

Der Mechanismus der photochemischen Reaktion konnte auch für *trans-p*-Cumarsäure (*p*-CS) gezeigt werden und beruht auf einer [2+2]-Cycloaddition, wodurch Cyclobutandimere (Abb. 1.2) als Produkte entstehen (Hartley *et al.*, 1990). Dieser Mechanismus spielt in der Natur allerdings nur eine untergeordnete Rolle (Bunzel, 2010). Hier ist vielmehr die radikalische Kopplung unter oxidativen Bedingungen mittels Peroxidase (POD)/H₂O₂ bzw. Laccase (Lac)/O₂ von Bedeutung, was in der Bildung von 5-5-, 4-*O*-5-, 8-5-, 8-8- und 8-*O*-4-gekoppelten Dehydroferulasäuren (DFS) resultiert (s. Abb. 1.3). Die 4-*O*-5-DFS konnte bislang

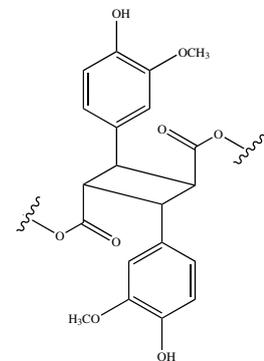


Abb. 1.2: Cyclobutandimer nach photochemischer Kopplung estergebundener *trans*-Ferulasäure

allerdings nur in Getreide nachgewiesen werden (Bunzel *et al.*, 2000; Bunzel, 2010). Einige DFS können wiederum in zyklische (*c*, engl. *cyclic*), nicht-zyklische (*nc*, engl. *non-cyclic*), decarboxylierte (*dc*) und Tetrahydrofuran (THF)-Dimere unterteilt werden. Der Mechanismus der radikalischen Kopplung wird in Kap. 1.3.2.1 näher beschrieben. Bei der Analyse von freigesetzten DFS nach alkalischer Behandlung konnten größere Mengen in Zuckerrüben, Buchweizen und Amaranth quantifiziert werden. Hier waren die 8-5-DFS dominant. Gleichmaßen konnten Trimere nachgewiesen werden, die aus der Weiterreaktion von DFS resultieren (Dobberstein & Bunzel, 2010; Jilek & Bunzel, 2013). Levigne und Mitarbeiter (2004a) und Ralet und Mitarbeiter (2005) konnten DFS-substituierte Oligosaccharide aus Zuckerrüben isolieren, was darauf hindeutet, dass sich Pkt tatsächlich intra- oder intermolekular vernetzen können. Dies hat eine Erhöhung der Viskosität und des Molekulargewichts zur Folge, wodurch sich unter

geeigneten oxidativen Bedingungen Gele ausbilden können (Thibault, 1988; Guillon & Thibault, 1990; Oosterveld *et al.*, 1997; Oosterveld *et al.*, 2000b; Kuuva *et al.*, 2003; Baydoun *et al.*, 2004).

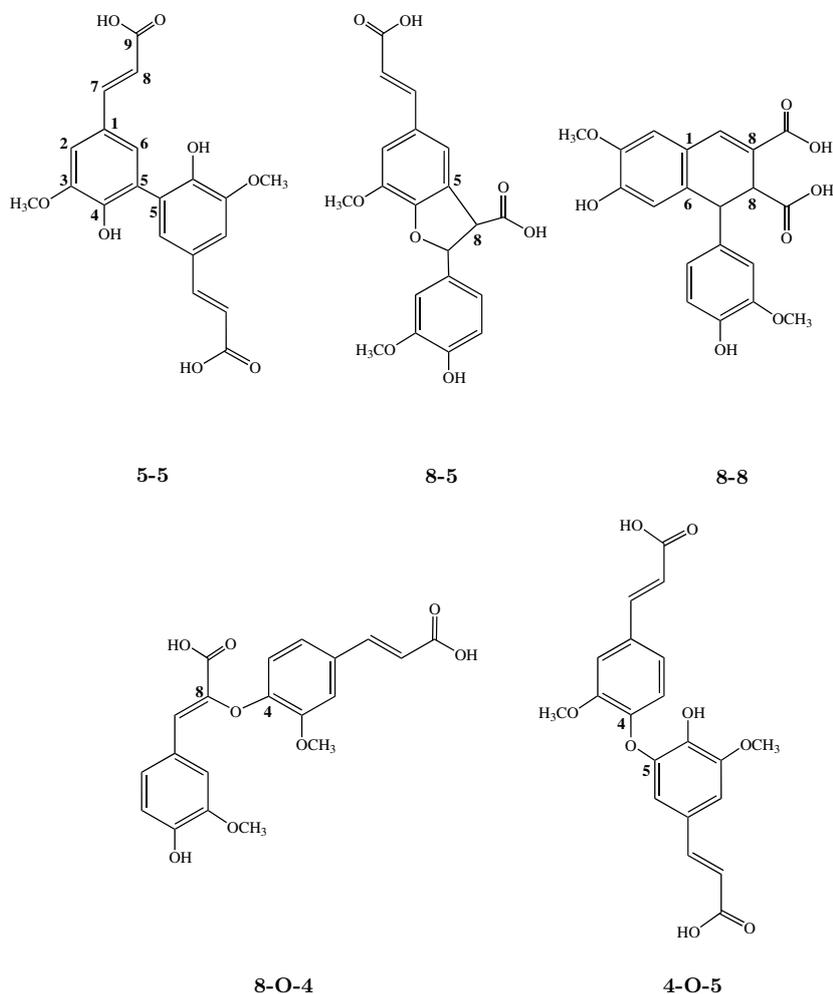


Abb. 1.3: Strukturen von 5-5-, 8-5-, 8-8-, 8-O-4- und 4-O-5-gekoppelten Dehydrodiferulasäuren, die durch radikalische Kopplung aus zwei *trans*-Ferulasäuren bzw. deren Estern entstehen können. Die 8-5- und 8-8-Dimere sind hier lediglich in ihrer zyklischen Struktur dargestellt (Bunzel, 2010).

1.2.1.3 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Als Teil der Ballaststoffe weisen Pkt unterschiedliche ernährungsphysiologische Eigenschaften auf und spielen damit einhergehend eine wesentliche Rolle in der menschlichen Ernährung. Als Dickungsmittel sorgen Pkt für eine Viskositätserhöhung des Chymus und beeinflussen dadurch die Verweildauer im Magen-Darm-Trakt sowie die Nährstoffaufnahme im Dünndarm. Hier zeigte sich u.a. durch Verringerung des Blutcholesterinspiegels ein positiver Effekt auf den Fettstoffwechsel (Cervantes-Paz *et al.*, 2017). Zusätzlich weisen Ballaststoffe präbiotische Eigenschaften auf, wodurch sie im menschlichen Dick-

darm von der Mikrobiota in u.a. kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, *n*-Propionat und *n*-Butyrat verstoffwechselt (Macfarlane & Macfarlane, 2011; Yang *et al.*, 2013). Die gebildeten kurzkettigen Fettsäuren sorgen für eine pH-Senkung des lokalen Milieus, eine verminderte Bildung pathogener Mikroorganismen sowie eine verbesserte Aufnahme von Mineralstoffen. Darüber hinaus werden ihnen protektive Wirkungen gegen Krebs und Übergewicht zugesprochen (Schwiertz *et al.*, 2010; Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021). Holck und Mitarbeiter (2011) und Yang und Mitarbeiter (2013) konnten zeigen, dass eine Aufnahme von Pkt mit einem erhöhten Wachstum von Bifidobakterien und Lactobazillen einhergeht. Der bifidogene Einfluss ist dabei unabhängig von einer potenziellen Substitution mit FS (Holck *et al.*, 2011). Für FS wurden zudem cholesterinsenkende sowie auch antioxidative und antiinflammatorische Effekte postuliert (Ou & Kwok, 2004).

1.2.2 Arabinoxylane

AX bilden die mengenmäßig bedeutendste Gruppe der Hemicellulosen in Zellwänden commelinider monokotyler Pflanzen. So sind sie wesentlicher Bestandteil der Zellwände von Getreidepflanzen wie Weizen, Mais, Hafer, Gerste oder Roggen, wo sie sich bevorzugt in den äußeren Schichten des Getreidekorns (Kleie), aber auch im Endosperm, anreichern. In Getreidekleie können sie abhängig vom Getreide Anteile von 5 bis 25 % des Gesamtgewichts einnehmen, wobei sie bis zu 30 % des Gesamtballaststoffgehalts ausmachen können (Lin *et al.*, 2021). Wie bereits in Kap. 1.1.2.2 beschrieben bildet ihr Grundgerüst eine Kette aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Xylp-Einheiten. Wie der Name suggeriert, sind Araf-Einheiten wesentlicher Bestandteil der Struktur (s. Abb. 1.4). Araf-Einheiten können an den Positionen O-2 und/oder O-3 der Xylp-Einheiten lokalisiert sein. Die Struktur von AX unterscheidet sich insofern von anderen Hemicellulosen, als dass sie phenolische Komponenten, insbesondere FS tragen. Dabei liegt FS an Position O-5 der Araf-Einheiten verestert vor. Es existieren viele Variationen der AX-Seitenketten, die in Kap. 1.2.2.1 diskutiert werden. Gleichmaßen gibt es verschiedene Variationen des AX-Rückgrats. So trägt das Rückgrat von AX in Getreidepflanzen wie Mais oder Sorghum, aber auch in Zuckerrohr GlcA, 4-O-Methylglycopyranuronsäure oder Acetylgruppen als Substituenten. Diese werden als Glucuronarabinoxylane bezeichnet (Carpita & Whittorn, 1986; Verbruggen *et al.*, 1998; Huisman *et al.*, 2000; Schendel *et al.*, 2016b; Morais de Carvalho *et al.*, 2017).

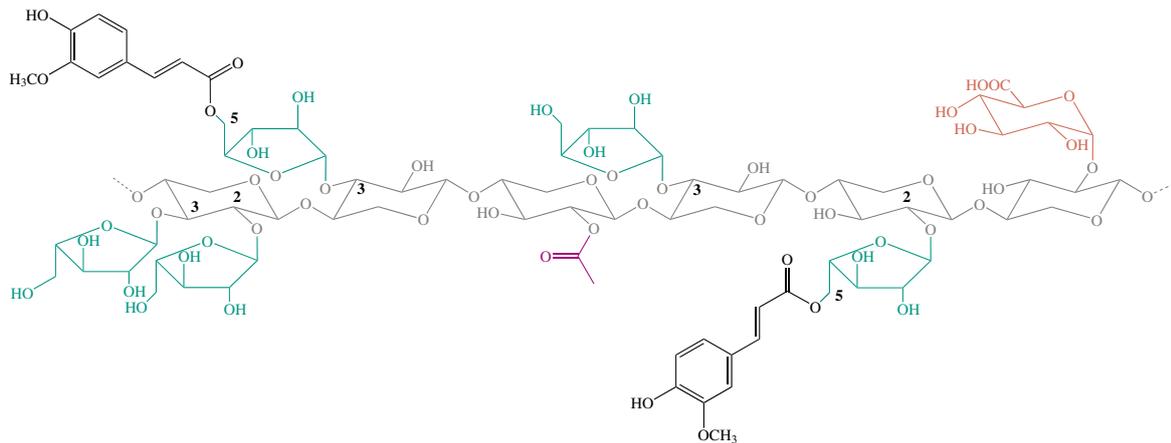


Abb. 1.4: Schematische Struktur von Arabinoxylanen aufgebaut aus D-Xylopyranose (grau), L-Arabinofuranose (grün), D-Glucopyranuronsäure (rot), Acetat (pink) und *trans*-Ferulasäure (schwarz)

AX können anhand ihrer Löslichkeit in wasserextrahierbare (WEAX) und wasserunlösliche AX (WUAX) eingeteilt werden. Während WEAX kaum Interaktion mit der Zellwand aufweisen (Mares & Stone, 1973), können WUAX u.a. durch die Ausbildung kovalenter *cross-links* über FS bzw. OFS-Strukturen an andere Zellwandkomponenten wie Lignin (Iiyama *et al.*, 1990; Grabber *et al.*, 1995), Protein (Piber & Koehler, 2005) oder andere AX (Saulnier *et al.*, 1999; Allerdings *et al.*, 2005) an das Zellwandgefüge gebunden sein. Durch alkalische Behandlung und einer damit einhergehenden Verseifung der *cross-links* können WUAX in Lösung gebracht werden (Gruppen *et al.*, 1992). Roye und Mitarbeiter (2019) untersuchten verschiedene Getreidekleien auf ihre Gehalte an WEAX und WUAX und stellten erhebliche Variationen fest, wobei WUAX stets in höheren Mengen enthalten waren. In Maiskleie machen WUAX etwa 43% der Trockenmasse aus, während WEAX nur zu knapp 0,4% enthalten sind. Dagegen enthält Roggenkleie mit 1,4% zwar mehr WEAX, aber auch deutlich weniger WUAX (29,1%). Neben der Substitution des Rückgrats unterscheiden sich AX hinsichtlich ihrer Kettenlänge sowie in der Anzahl und Beschaffenheit der Seitenketten. Dabei treten die Unterschiede nicht nur zwischen Pflanzenspezies auf, sondern auch abhängig von Gewebeat und Reifegrad.

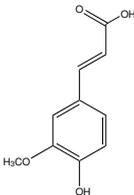
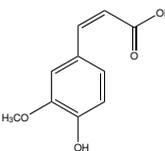
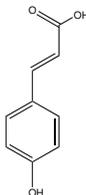
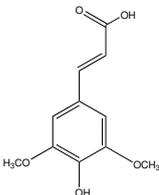
1.2.2.1 Die Beschaffenheit der Arabinoxylanseitenketten

Der Substitutionsgrad von AX wird meist durch das Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis (A/x) nach Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung ausgedrückt. Es konnte gezeigt werden, dass ein geringerer Substitutionsgrad mit einer verminderten Wasserlöslichkeit einhergeht. So weisen WUAX im Vergleich zu WEAX tendenziell einen geringeren Substitutionsgrad des Xyl-Rückgrats mit Araf auf. Dadurch zeigen WUAX

eine verbesserte Aggregationsfähigkeit durch verminderte sterische Einflüsse. Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass die Cellulose-AX-Interaktion mit steigendem A/x und Acetatgehalt abnimmt (Kabel *et al.*, 2007; Köhnke *et al.*, 2008; Köhnke *et al.*, 2011; Selig *et al.*, 2015). Das A/x ist stark von der Pflanzenart, aber auch vom Gewebe abhängig. Es sind Werte zwischen 0,4 und 0,8 für AX aus dem Endosperm und zwischen 0,6 und 1,1 für AX aus Kleie beschrieben, wobei AX aus Maiskleie und Reis im Vergleich zu anderen Getreidearten hohe A/x aufweisen (Lin *et al.*, 2021; Shibuya *et al.*, 1983; Izydorczyk & Biliaderis, 1995). Bei doppelt substituierten Xyl-Einheiten oder bei längeren Seitenketten mit zusätzlichen Xyl-Einheiten ist das A/x hinsichtlich des Substitutionsgrads wenig aussagekräftig. Dies konnte speziell bei AX aus Mais festgestellt werden, bei denen hohe Gehalte an terminaler Xylp auf komplexe Seitenketten schließen lassen (Huisman *et al.*, 2000; Saulnier *et al.*, 1995).

Neben der Substitution mit Araf stellt die Substitution mit Hydroxyzimtsäuren einen wesentlichen Unterschied zu Xylanen in dikotylen und nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen dar. Neben FS sind dabei *cis*-Ferulasäure, *p*-CS und *trans*-Sinapinsäure von Bedeutung. In Tab. 1.1 sind die Gehalte monomerer Hydroxyzimtsäuren in unlöslichen Ballaststoffen (UBS) verschiedener Getreidearten zusammengefasst.

Tab. 1.1: Gehalte [$\mu\text{g/g}$] von Hydroxyzimtsäuren in unlöslichen Ballaststoffen verschiedener Getreidearten nach alkalischer Extraktion. FS, Ferulasäure; *p*-CS, *para*-Cumarsäure; SA, Sinapinsäure

				
	<i>trans</i> -FS ^{a,b}	<i>cis</i> -FS ^a	<i>trans-p</i> -CS ^a	<i>trans</i> -SA ^a
Weizen	5.952 - 6.925	423	166	79
Dinkel	7.281 - 8.799	231	165	53
Roggen	6.240 - 6.338	611	353	89
Gerste	4.675 - 6.895	378	481	95
Hafer	2.294 - 4.249	197	309	160
Mais	24.622 - 33.109	213	2.157	89
Reis	7.512 - 8.991	444	2.169	185

^a Bunzel (2001)

^b Schendel und Mitarbeiter (2016a)

Araf-Seitenketten können unter mildsauren Bedingungen vom Rückgrat abgespalten wer-

den, was den Zugang zu FS-haltigen Seitenketten ermöglicht. Saulnier und Mitarbeiter (1995) konnten zeigen, dass die so freigesetzten Strukturen den Großteil der enthaltenen FS in unlöslichen Ballaststoffen (UBS) aufweisen. Dies verdeutlicht, dass bestimmte Getreidearten, insbesondere Mais, bedeutende Quellen FS-reicher AX darstellen.

Bei Betrachtung der Feinstrukturen der Seitenkettenelemente zeigen sich erhebliche Unterschiede zwischen FS-freien Seitenketten und solchen, die mit FS substituiert vorliegen. In Abb. 1.5 sind die Strukturen der isolierten hydroxyzimtsäurehaltigen Seitenketten aus AX dargestellt. Wie bereits erwähnt liegt FS an Position *O*-5 der *Araf*-Seitenketten verestert vor, was in der einfachsten Struktureinheit 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FA) resultiert, die in AX sämtlicher Getreidearten enthalten ist. FA ist an Position *O*-3 des *Xylp*-Rückgrats gebunden. Strukturen mit doppelt gebundener FA an Position *O*-3 und *O*-2 konnten bis dato nicht isoliert werden. Die Verknüpfung der *Araf* mit *p*-CS konnte in Mais nachgewiesen werden (Allerdings *et al.*, 2006).

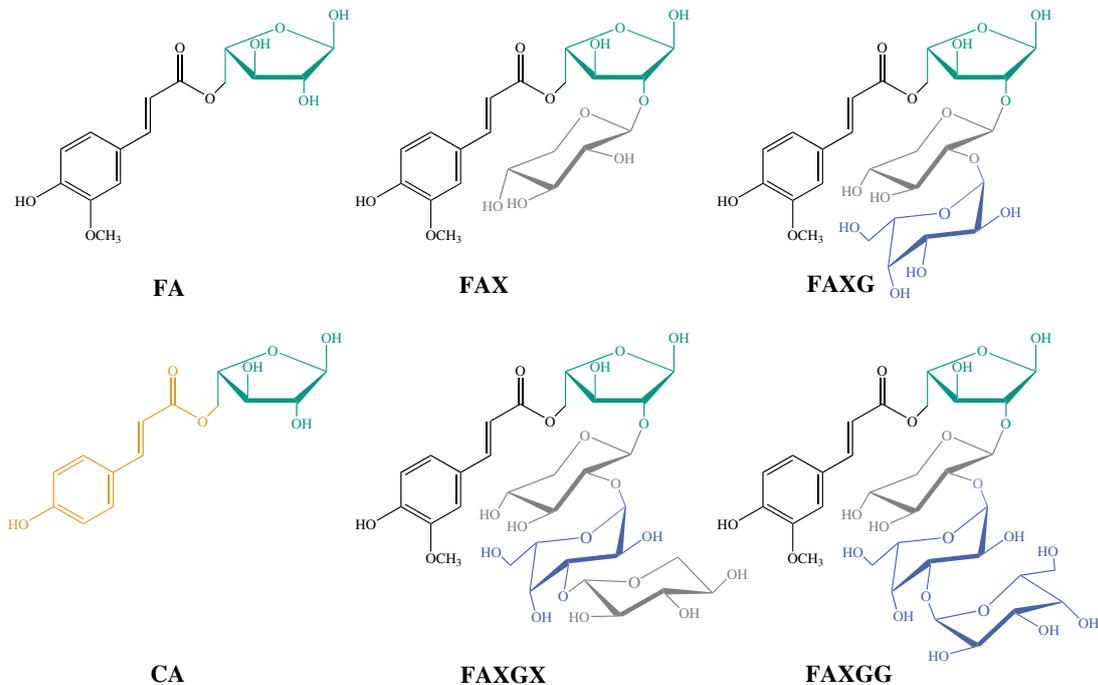


Abb. 1.5: Strukturen bekannter hydroxyzimtsäurehaltiger Seitenkettenelemente in Arabinoxylenen, zusammengesetzt aus Arabinofuranose (grün), Xylopyranose (grau), Galactopyranose (blau) sowie *trans*-Ferulasäure (schwarz) und *para*-Cumarsäure (gelb). FA, 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAX, β -D-Xylopyranosyl-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAXG, α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; CA, 5-*O*-*trans*-*p*-Cumaryl-L-Arabinofuranose; FAXGX, α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAXGG, α -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose

Ein Seitenkettenelement, das zusätzlich *Xylp* an Position *O*-2 der *Araf* trägt, β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FAX), konnte in den meis-

ten Getreidearten nachgewiesen werden (Bunzel *et al.*, 2002; Saulnier *et al.*, 1995; Schendel *et al.*, 2016a), wobei die Gehalte in Popcornmais mit ca. 20 $\mu\text{mol/g}$ UBS am höchsten waren (Schendel *et al.*, 2016a). Das konnte auch für die Seitenkette α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FAXG) gezeigt werden, die zusätzlich zu FAX mit α -L-Galactopyranose verknüpft vorliegt. Diese Strukturen stellen die mengenmäßig bedeutendsten Seitenkettenelemente in AX, v.a. in Mais, dar. Allerdings und Mitarbeiter (2006) konnten in Mais Strukturen identifizieren, die darüber hinaus eine weitere Verknüpfung mit Xylp bzw. Galp zeigen.

Die Strukturen FS-freier Seitenketten sind bis dato dagegen nur spärlich beschrieben. In Mais und Gerste konnte das Disaccharid β -D-Xylopyranose-(1 \rightarrow 2)- α -L-Arabinofuranose nach milder Säurehydrolyse als Seitenkettenelement identifiziert werden (Whistler & McGilvray, 1955; Aspinall & Ferrier, 1958). Pastell und Mitarbeiter (2009) konnten das Disaccharid später zusätzlich spektroskopisch in Reis, Weizen und Hafer nachweisen. In Mais wurde nach milder Säurehydrolyse ebenfalls α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-L-Arabinofuranose als natives, FS-freies Seitenkettenelement identifiziert (Schendel, 2016). Ein häufiges Problem bei der Strukturanalyse FS-freier Seitenketten stellt die alkalische Extraktion des AX-Probenmaterials dar und die damit einhergehende Abspaltung von FS aus dem Seitenkettenelement. Dadurch kann nicht sichergestellt werden, dass potenzielle FS-freie Seitenketten vor der Extraktion tatsächlich unverestert vorlagen.

1.2.2.2 Ausbildung von Ferulasäure-*cross-links*

Bis zu 90 % der estergebundenen FS in AX aus Getreide liegt in seiner monomeren Form vor (Schendel *et al.*, 2016a). Wie bereits beschrieben, können AX unter Ausbildung von kovalenten DFS-*cross-links* mit Zellwandkomponenten verknüpft vorliegen und so die Zellwand stabilisieren (Saulnier *et al.*, 1999; Allerdings *et al.*, 2005; Iiyama *et al.*, 1990; Piber & Koehler, 2005).

Durch Untersuchung der DFS in Getreide-UBS nach alkalischer Behandlung konnten in UBS aus Mais, Weizen, Dinkel, Roggen, Reis, Wildreis und Gerste sämtliche bekannten DFS identifiziert werden. Die höchsten Gesamtgehalte wurden in UBS aus Mais festgestellt (Bunzel *et al.*, 2001). Dabei waren 8-5-gebundene Regioisomere dominant. Den Nachweis, dass DFS auch an AX gebunden vorliegen, lieferte die Isolierung von 5-5-, 8-*O*-4- und 8-8c-DFS-Oligosacchariden aus Bambus und Mais (Allerdings *et al.*, 2005; Saulnier *et al.*, 1999; Ishii, 1991; Bunzel *et al.*, 2008).

Die Kopplung von AX-Ketten resultiert in einer Erhöhung des Molekulargewichts und der Viskosität. Dies wird genutzt, um Hydrogele zu generieren, deren Eigenschaften in

Kap. 1.3.2 evaluiert werden. Bei der *in vitro*-Kopplung von AX aus Mais und Weizen mittels POD/H₂O₂ oder Lac/O₂ zeigten sich ebenfalls die 8-5-gekoppelten Regioisomere als dominante DFS (Figuroa-Espinoza & Rouau, 1998; Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999; González-Estrada *et al.*, 2015; Martínez-López *et al.*, 2011; Martínez-López *et al.*, 2016; Martínez-López *et al.*, 2019). Die Kopplung von AX hat immer eine Abnahme des Gehalts an monomerer FS zur Folge, allerdings ist nicht immer nachweisbar, dass der Gehalt an DFS zunimmt (Grabber *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2009; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Martínez-López *et al.*, 2019). Dies wird u.a. auf die Ausbildung höher oligomerer Strukturen zurückgeführt (Bunzel, 2010; Grabber *et al.*, 1995). So konnten z.B. eine Reihe an Dehydrotri-(TriFS) bzw. tetraferulasäuren beispielsweise in Mais identifiziert werden (Bunzel *et al.*, 2006; Funk *et al.*, 2005).

1.2.2.3 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Studien zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften von AX befassen sich oftmals nicht nur mit den Polymeren, sondern auch mit den sogenannten Arabinoxyloligosacchariden (AXOS) bzw. unsubstituierten Xyloligosacchariden (XOS), die hydrolytische Abbauprodukte von AX darstellen. Im Folgenden werden lediglich ernährungsphysiologische Effekte betrachtet, die mutmaßlich auf AX zurückzuführen sind.

AX zählen ebenfalls zu den Ballaststoffen und weisen wie Pkt präbiotische Eigenschaften auf. So passieren sie den Magen-Darm-Trakt weitestgehend unverändert. Erst im Dickdarm werden sie durch die Mikrobiota abgebaut, woraus eine Erhöhung der Acetat-, Propionat- sowie Butyrat-Gehalte resultiert, denen wie bereits beschrieben protektive Wirkungen zugeschrieben werden (Tong *et al.*, 2014; Damen *et al.*, 2011; Broekaert *et al.*, 2011). Die Ausbildung natürlich vorkommender DFS-*cross-links* in Mais hat dabei keinen Einfluss auf die *in-vitro* Fermentierbarkeit durch die menschliche Mikrobiota (Funk *et al.*, 2007). Andere positive Effekte von AX stellen die Erhöhung des Stuhlvolumens und die Senkung des Blutcholesterinspiegels dar, was *in vivo* an Ratten und Hamstern gezeigt werden konnte (Lu *et al.*, 2000a; Lopez *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 2014). Zusätzlich führt die Aufnahme von AX zu einem verlangsamten Anstieg des postprandialen Blutglucosespiegels. Dies konnten Lu und Mitarbeiter (2000b) in einer Humanstudie zeigen.

1.3 Hydrogele

Hydrogele stellen polymere, dreidimensionale Netzwerke dar, die in der Lage sind, große Mengen Flüssigkeit aufzunehmen. Nach der Definition von Rogovina und Mitarbeiter

(2008) können Hydrogele präziser als ein mehrphasiges Stoffsystem beschrieben werden. Dabei wird der Porenraum eines elastischen, polymeren Netzwerkbildners vom Fluid Wasser in ausreichendem Maße ausgefüllt, wodurch die viskoelastischen Eigenschaften des Gels bedingt werden. Das Wasser liegt nicht molekular gebunden vor, sondern wird durch Kapillarkräfte im Netzwerk eingeschlossen und gespeichert (Belton, 1997). Die Hydrophilie des Netzwerks resultiert aus funktionellen Gruppen wie Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino- oder Amidgruppen der Polymerkette, wodurch Hydrogele Wasser einer bis zu tausendfachen Menge des Trockengewichts aufnehmen können (Peppas, 2000; Chirani *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016).

Abhängig vom Netzwerkbildner und von der Art der Netzwerkbildung können sich Hydrogele in hoher Variabilität ausbilden, die für unterschiedlichste Zwecke in den Bereichen der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, Medizin und Bioanalytik eingesetzt werden (Chirani *et al.*, 2015; Saha & Bhattacharya, 2010; Peppas, 2000). In der Lebensmittelindustrie finden sie beispielsweise Anwendung zur Einstellung der Textur und des Mundgefühls oder als Verpackungsmaterial (Saha & Bhattacharya, 2010). Durch ihre Porosität sind Hydrogele zudem in der Lage, als Trägersubstanz Wirkstoffe aufzunehmen und diese gezielt am Wirkort freizusetzen, was im Bereich der Pharmaindustrie von Bedeutung sein kann (Carvajal-Millán *et al.*, 2005b; Carvajal-Millán *et al.*, 2006; Peppas, 2000; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Chirani *et al.*, 2015).

1.3.1 Klassifizierung

Es existieren zahlreiche Eigenschaften, nach denen Hydrogele klassifiziert werden können. Hierzu zählen u.a. die Quelle des Polymers, die Zusammensetzung der Polymere oder die Art der Quervernetzung.

1.3.1.1 Quelle

Bei Betrachtung der Polymerketten lassen sich Hydrogele abhängig von ihrer Quelle in synthetische und natürliche Hydrogele einteilen. Beispiele für synthetische Gele stellen solche auf Basis von Polyethylenglycoldiacrylat, Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol dar. Sie sind durch eine hohe Reproduzierbarkeit ihrer Geleigenschaften gekennzeichnet und lassen sich je nach Bedarf vergleichsweise leicht modifizieren (Chirani *et al.*, 2015). Im Vergleich dazu werden natürliche Hydrogele vorrangig aus Proteinen oder Polysacchariden hergestellt, die in der Natur vorkommen und damit einhergehend der biologischen Variabilität unterliegen. So ist die chemische Struktur von Naturstoffen sehr schwer uniformierbar, was in einer geringen Reproduzierbarkeit natürlicher Hy-

drogele resultiert. Große Vorteile stellen die hohe Verfügbarkeit in der Natur sowie die hervorragende Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit dar. Einen Gelbildner tierischer Herkunft stellt beispielsweise das Protein Kollagen bzw. Gelatine dar. Im Bereich der Lebensmittelindustrie werden zusätzlich u.a. die Polysaccharide Alginat, Carrageen und Agar aus Algen sowie Stärke oder Pkt aus Pflanzen eingesetzt.

1.3.1.2 Netzwerkstruktur

Eine weitere Klassifizierung kann anhand der Struktur der Netzwerke durchgeführt werden, wenn unterschiedliche Gelbildner eingesetzt werden. Beim Einsatz von zwei Gelbildnern können sich theoretisch vier verschiedene Netzwerkstrukturen ausbilden. Beim interpenetrierenden Netzwerk gelieren beide Polymere unabhängig voneinander und bilden zwei unterschiedliche Netzwerke. Beim heterogen verknüpften Netzwerk werden beide Polymere miteinander verknüpft und bilden dadurch ein gemeinsames Netzwerk aus. Als Beispiel ist hier das heterogene Netzwerk beim Einsatz von Carrageen zusammen mit Johannisbrotkernmehl zu nennen. Daneben können phasenseparierte Netzwerke entstehen oder der Fall, dass nur ein Netzwerkbildner geliert, während der andere ohne Einfluss bleibt (de Vries, 2004). Interpenetrierende oder heterogen verknüpfte Netzwerke stellen eine Möglichkeit dar, Eigenschaften der Polymere zu kombinieren und so die Geleigenschaften gezielt anzupassen (Chirani *et al.*, 2015).

1.3.1.3 Quervernetzung

Neben der Quelle des Gelbildners und der Netzwerkstruktur stellt die Art der Quervernetzung des Gelbildners eine Möglichkeit dar, Hydrogele zu klassifizieren. So können sie in physikalische und chemische Gele unterteilt werden. Der Fokus liegt dabei auf Gelen, die in der Lebensmittelindustrie relevant sind.

Physikalische Gele

Durch die Aggregation von Polymerketten infolge physikalischer, nicht-kovalenter Wechselwirkungen wie ionische und hydrophobe Bindungen oder Wasserstoffbrücken können sich physikalische Gele ausbilden. Dabei können äußere Einflüsse wie pH-Wert oder Temperatur entscheidend für die Wechselwirkungen sein. Darüber hinaus können lokale Verknotungen der Polymere zum Netzwerk beitragen. Durch u.a. Erhitzung ist es möglich, dass netzwerkbildende Bindungen aufgebrochen werden, die sich jedoch nach Rückkehr in den Ausgangszustand neu ausbilden können. Daher gelten physikalische Hydrogele als reversible Gele (Rogovina *et al.*, 2008; Chirani *et al.*, 2015).

Im Bereich der Lebensmittelindustrie werden überwiegend physikalische Gele eingesetzt.

Als Beispiel sind hier Ca^{2+} -stabilisierte Gele aus Pkt oder Alginat zu nennen, deren Gelierung durch das *egg box* Modell beschrieben werden kann (s. Abb. 1.6) (Grant *et al.*, 1973; Braccini & Pérez, 2001). Hierbei interagieren zu Beginn zwei Polymerketten über ionische Ca^{2+} -Brücken zwischen zwei gegenüberliegenden Carboxylgruppen der enthaltenen Uronsäuren. Dadurch werden zunächst Dimere gebildet, die sich dann im zweiten Schritt analog zur Stapelung von Eierkartons mit weiteren Ketten aneinander lagern. Bei Pkt sind nur niedrig veresterte und anionisch vorliegende Abschnitte des HG an der Komplexbildung beteiligt, weswegen ein höherer pH-Wert nötig ist. Zudem bilden sich nur dann stabile Bindungsstellen aus, wenn ausreichend benachbarte Ca^{2+} -Brücken vorliegen. Methylveresterung und Substituenten wie z.B. Acetatgruppen können die Aggregation unterbinden, weswegen Zuckerrübenpektin nicht zur Herstellung physikalischer Gele geeignet ist (Thakur *et al.*, 1997; Oosterveld *et al.*, 2000a; Phippen *et al.*, 1950).

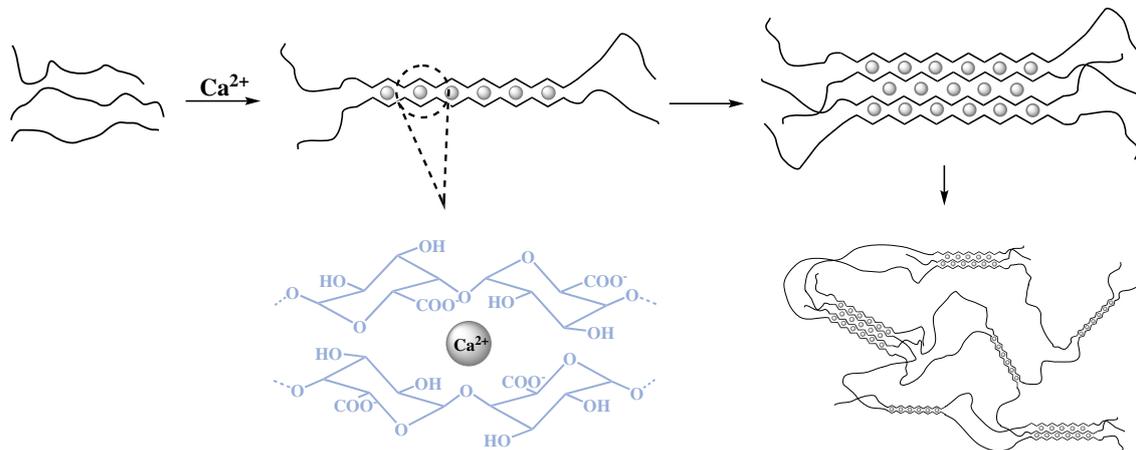


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Ca^{2+} -koordinierten Aggregation von D-Galacturonsäureabschnitten (blau) im *egg box* Modell von niedrigverestertem Pkt. Modifiziert nach Thakur und Mitarbeiter (1997)

Bei der Herstellung von Fruchtkonfitüren und -gelées wird meist hochverestertes Pkt aus Zitrusfrüchten oder Äpfeln eingesetzt. Hier beruht der Mechanismus nicht auf der Ausbildung von Ca^{2+} -Brücken, sondern auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polaren Gruppen sowie hydrophoben Wechselwirkungen methylierter Carboxylgruppen. Durch Zugabe großer Mengen an Polyalkoholen wie z.B. Saccharose und ihrer damit einhergehenden Solvatation können die hydrophoben Interaktionen der Methylgruppen in Folge einer verringerten Wechselwirkung mit Wasser erhöht werden. Zusätzlich hat die Zugabe von Zucker eine Verringerung der Hydratisierung der Pkt zur Folge, wodurch auch vermehrt Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Gleichzeitig wird durch die Einstellung eines geringen pH-Werts eine vollständige Protonierung der Carboxylgruppen

erreicht, wodurch die Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt und ionische Abstoßungskräfte reduziert werden (Oakenfull & Scott, 1984; Thakur *et al.*, 1997).

Chemische Gele

Durch die Ausbildung kovalenter *cross-links* zwischen Polymerketten können chemische, irreversible Gele entstehen. Hierbei ist das Vorhandensein von funktionellen Gruppen an den Polymerketten entscheidend, die durch verschiedene Reaktionsmechanismen miteinander gekoppelt werden, um *cross-links* zwischen den Polymerketten und dadurch ein dreidimensionales Netzwerk auszubilden (s. Abb. 1.7). Gleichzeitig können physikalische Wechselwirkungen auftreten und das Netzwerk beeinflussen. Lokale Verknotungen von Ketten können ebenfalls auftreten, haben aber anders als bei physikalischen Gelen keinen Einfluss auf die Elastizität des Netzwerks (Chirani *et al.*, 2015).

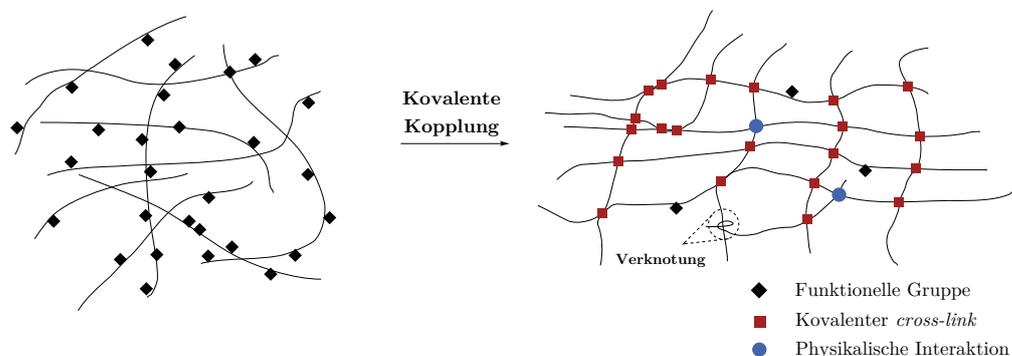


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Ausbildung des kovalent verknüpften Netzwerks bei chemischen Gelen

Um *cross-links* auszubilden, werden u.a. chemische Reaktionen wie die Michael-Addition oder Kondensationsreaktionen eingesetzt. Beim Einsatz toxischer Reagenzien können diese potenziell im Gel verbleiben, weswegen diese ggf. vor Einsatz des Hydrogels aufwändig entfernt werden müssen. Eine Alternative bietet hier der Einsatz von spezifischen Enzymen, die Kopplungsreaktion katalysieren und so die Verwendung von chemischen Reagenzien in der Regel nichtig machen (Ullah *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016). Die Anzahl der *cross-links* bestimmt die Elastizität des Gels. Je dichter das Netzwerk ist, desto immobil sind die einzelnen Polymerketten, wodurch die Quellfähigkeit abnimmt (Peppas, 2000).

Im Vergleich zu physikalischen Gelen finden chemische Gele bislang jedoch kaum Einsatz im Lebensmittelbereich. Eine Möglichkeit stellen ferulasäurehaltige Polysaccharidgele dar, die im folgenden Kapitel behandelt werden.

1.3.2 Ferulasäurehaltige Polysaccharidgele

Wie bereits erwähnt inkludieren Pkt und AX abhängig von ihrer botanischen Herkunft phenolische Säuren (vorwiegend FS) in ihrer Grundstruktur, was ihnen einzigartige Eigenschaften verleiht. Dadurch sind sie unter geeigneten oxidativen Bedingungen in der Lage, Gele auszubilden. Die Kopplung wurde in der Literatur in frühen Studien z.T. mit Ammoniumpersulfat durchgeführt, was später allerdings weitestgehend auf die Enzyme POD und Lac umgestellt wurde (Thibault, 1988; Oosterveld *et al.*, 1997; Baydoun *et al.*, 2004). Der Einsatz von POD bedarf zusätzlich H_2O_2 als Substrat, während für die Kopplung mit Lac lediglich Luftsauerstoff nötig ist.

1.3.2.1 Enzymatische Kopplung über Ferulasäure-*cross-links*

Die Verknüpfung von FS beruht auf einer radikalischen Kopplung, die durch die Enzyme POD oder Lac katalysiert wird (s. Abb. 1.8).

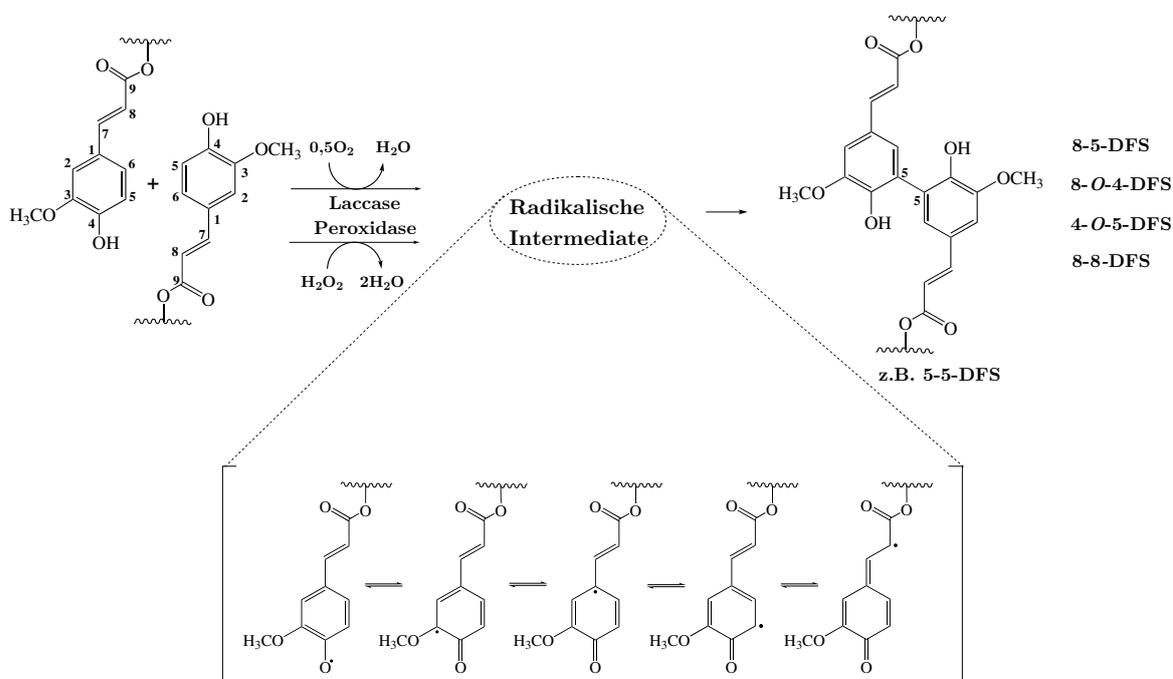


Abb. 1.8: Enzymatische Kopplung estergebundener Ferulasäuren zu Dehydrodiferulasäuren (DFS)

Die Abstraktion des phenolischen Wasserstoffs zur Bildung des Radikals unterscheidet sich mechanistisch zwischen beiden Enzymen. Das aktive Zentrum von POD enthält im Ausgangszustand porphyringebundenes Fe^{3+} . Im ersten Schritt wird Fe^{3+} durch 1 mol H_2O_2 unter Abspaltung von 1 mol Wasser oxidiert, wodurch Eisen als Oxoferryl (Fe^{4+}) sowie ein kationisches Porphyrinradikal vorliegt. Dieses kann nun in zwei Schritten unter Rückkehr in den Ausgangszustand und der Abspaltung von 1 mol Wasser 2 mol

FS zu intermediären Radikalen oxidieren (Veitch, 2004). Bei der POD-katalysierten Oxidation handelt es sich somit um eine mehrstufige Einelektronenoxidation von 2 mol FS sowie eine gleichzeitige Zweielektronenreduktion von 1 mol H_2O_2 zu 2 mol Wasser (s. Gl. (1)).



Im Gegensatz dazu stellt die Lac-katalysierte Oxidation eine Einelektronenoxidation von 4 mol FS mit einer gleichzeitigen Vierelektronenoxidation von 1 mol O_2 zu 1 mol Wasser dar. Dies geschieht im aktiven Zentrum durch einen Cu-Cluster, bestehend aus einem Cu (Typ-1) sowie zwei Cu (Typ-2) und einem Cu (Typ-3), die sich jeweils durch ihre spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden. Im ersten Schritt der Reaktion werden 4 mol FS durch Cu (Typ-1) oxidiert und die e^- auf die beiden Cu (Typ-2) und das Cu (Typ-3) übertragen, wo schließlich 1 mol O_2 zu 2 mol Wasser reduziert wird (s. Gl. (2)) (Baldrian, 2006; Kudanga *et al.*, 2011).



Dabei entstehen jeweils resonanzstabilisierte radikalische Zwischenstufen, die im nächsten Schritt zu 5-5-, 8-5-, 8-O-4-, 4-O-5- oder 8-8-DFS koppeln können und somit Polymerketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk kovalent vernetzen, worin sich Wasser einlagern kann. Durch diesen Mechanismus könnten jedoch ggf. auch benachbarte FS innerhalb einer Polymerkette miteinander verknüpft werden, die somit nicht zum Netzwerk beitragen. Bei erneuter Oxidation der DFS und Kopplung mit FS können Tri- und Tetramere und evtl. auch höher oligomere Strukturen entstehen (Bunzel, 2010). Die Vernetzung von AX bzw. Pkt über OFS-Brücken resultiert in einer Erhöhung des Molekulargewichts sowie der Viskosität und bietet die Möglichkeit, einzigartige Hydrogele herzustellen.

1.3.2.2 Funktionelle Eigenschaften

Ferulasäurehaltige Polysaccharidgele gelten gemeinhin als pH- und elektrolytstabil und weisen ein hohes Wasserbindungsvermögen auf. Dazu sind sie geschmacks- und geruchsneutral. In ihrer Zusammensetzung bestehen sie aus Ballaststoffen, wodurch sie resistent gegenüber Abbauprozessen im Magen-Darm-Trakt sind. Als hydrophile Matrices für Proteine, Probiotika oder andere Wirkstoffe können die beladenen Gele bis zum Dickdarm transportiert und die enthaltenen Wirkstoffe dort im Zuge des bakteriellen Verdauens der Gele gezielt freigesetzt werden. Studien hierzu beschränken sich bis dato nur auf AX-basierte Hydrogele. Die Aufnahme von Proteinen wie Insulin,

β -Lactoglobulin oder Rinderserumalbumin und Probiotika hatte keinen Effekt auf die Geleigenschaften von AX-basierten Hydrogelen (Izydorczyk & Biliaderis, 1995; Carvajal-Millán *et al.*, 2005b; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Vansteenkiste *et al.*, 2004; Paz-Samaniego *et al.*, 2018). Genauer zeigte sich für Rinderserumalbumin ein partieller Schutz vor Hydrolyse nach dem Einschluss in AX-Gele (Vansteenkiste *et al.*, 2004).

Studien zu kovalenten Pkt-Gelen behandeln meist die technofunktionellen Eigenschaften von Zuckerrübenpektin. So konnte gezeigt werden, dass die oxidative Kopplung von Pkt mit einer Verbesserung der Schaum- und Emulsionsstabilität einhergeht (Littoz & McClements, 2008; Zeeb *et al.*, 2012; Wemmer *et al.*, 2020). Norsker und Mitarbeiter (2000) konnten mit Hilfe von kovalenten Pkt-Gelen die Textur von Milch, Fleischprodukten und Saft beeinflussen, wobei der Einsatz von Lac jedoch auch zur Bildung von Fehleraromen oder unerwünschten Entfärbungen führte.

1.3.2.3 Ernährungsphysiologische Eigenschaften

Der Einsatz von AX-Gelen als dickdarmspezifische Transporter von Wirkstoffen hat zudem einen präbiotischen Effekt. Bei der Fermentation von AX, aber auch AX-Gelen, werden spezielle mikrobielle Enzyme wie Xylanasen benötigt, um das Polysaccharidgerüst zu kleineren Molekülen wie AXOS abzubauen. Arabinofuranosidasen und Ferulasäureesterasen sorgen für einen Verdau der Seitenketten hin zu Oligosacchariden, die eine bifidogene Wirkung aufweisen (Broekaert *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von FS-*cross-links* die Fermentation durch Bifidobakterien verlangsamt (Martínez-López *et al.*, 2016). Der *cross-link*-Prozess führt gleichzeitig zu einer verminderten Population von Enterobakterien im Dickdarm, die oft als Auslöser für Diarrhö gelten (Hopkins *et al.*, 2003). In einer Tierstudie wurde durch den Zusatz von getrockneten AX-Gelen zur Diät von Ratten gezeigt, dass der postprandiale Blutglucosespiegel im Vergleich zum Zusatz von nicht-oxidativ behandelten AX langsamer ansteigt. Der Mechanismus dahinter beruht vermutlich auf der Viskositätserhöhung des Chymus im Magen-Darm-Trakt und einer damit einhergehenden Diffusionsminderung der Glucose zu den Enterozyten (Vogel *et al.*, 2012). Zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Pkt-Gelen ist bis dato nichts bekannt. Jedoch ist davon auszugehen, dass sie ähnliche präbiotische Eigenschaften wie nicht-verknüpftes Pkt aufweisen.

1.4 Charakterisierung von Hydrogelen

Hydrogele können durch viele Parameter charakterisiert werden, wobei die Art der Applikation des Hydrogels in gewisser Weise die Relevanz des Parameters bedingt. So

können Hydrogeleigenschaften in makroskopische und mikroskopische Eigenschaften unterteilt werden. Eine makroskopische Betrachtung umfasst u.a. die Viskoelastizität und Gelhärte, die insbesondere bei medizinischen Anwendungen, z.B. bei Verkapselungen von Wirkstoffen, relevant sind. Mikroskopische Charakterisierungen beschreiben dagegen die molekulare Umgebung innerhalb des Netzwerks und sind somit für strukturelle Aspekte sowie Fragestellungen bezüglich der Diffusion von Molekülen von Relevanz, beispielsweise bei der Wirkstofffreisetzung oder dem Einfluss auf die Nährstoffaufnahme. Im Folgenden soll der Fokus auf der Charakterisierung ferulasäurebasierter Hydrogele liegen.

1.4.1 Makroskopische Charakterisierung

Hydrogele, insbesondere ferulasäurehaltige Polysaccharidgele, zeigen eine Mischung aus elastischem und viskosem Verhalten und werden daher meist hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften charakterisiert. Das Deformationsverhalten von ideal elastischen, ideal viskosen sowie viskoelastischen Materialien ist in Abb. 1.9 dargestellt. Ideal elastische Körper zeigen im Zeitintervall der Krafteinwirkung (Schubspannung) eine konstante Deformation, die nach Entfernung der Schubspannung in den Ausgangszustand zurückkehrt. Ideal viskose Fluide dagegen deformieren linear mit der Zeit der Krafteinwirkung und bleiben bei Entfernung der Schubspannung im deformierten Zustand. Hydrogele stellen viskoelastische Materialien mit elastischen und viskosen Charakteristika dar, die bei Anlegen einer Schubspannung analog zu elastischen Körpern sofort deformieren. Im Laufe der Krafteinwirkung kommt es zu einer nicht linearen Verformung mit der Zeit. Nach Entfernung der Kraft kommt es zu einer Rückdeformation mit der Zeit, wobei der Ausgangszustand nicht wieder erreicht wird. Die Messung der Viskoelastizität geschieht meist rheologisch über oszillatorische Messungen, deren Grundlagen in Kap. 3.4 beschrieben werden. Hierbei werden das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' erfasst. G' ist eine Kenngröße für den elastischen Anteil des Gels und repräsentiert die gespeicherte Energie, die nach

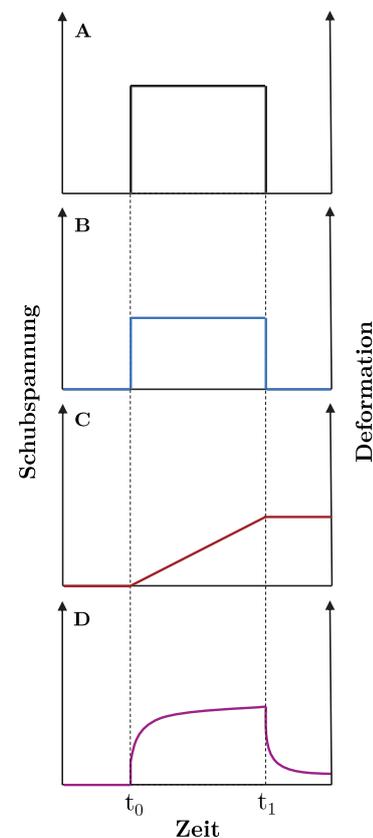


Abb. 1.9: Zeitabhängiges Deformationsverhalten bei Anlegen einer Schubspannung (A) eines ideal elastischen Körpers (B), eines ideal viskosen Fluids (C) sowie eines viskoelastischen Fluids (D)

Entlastung erhalten bleibt. Dagegen beschreibt das Verlustmodul G' den Anteil der Energie, der als Wärme verloren geht und ist somit eine Kenngröße für den viskosen Anteil (Billings *et al.*, 2015). Bei $G' > G''$ liegt rheologisch gesehen ein Gel vor, wodurch bei zeitabhängigen Messungen der Zeitpunkt der Gelierung bestimmt werden kann. Für kovalente AX-Gele als auch für kovalente Pkt-Gele konnte gezeigt werden, dass G' mit steigender Polysaccharidkonzentration zunimmt (Oosterveld *et al.*, 2000b; Carvajal-Millán *et al.*, 2005c; Zaidel *et al.*, 2012). Gleichzeitig steigt G' mit dem Gehalt an FS im Ausgangspolysaccharid (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Kale *et al.*, 2013; Ayala-Soto *et al.*, 2016) und ist abhängig von der Enzymaktivität (Kuuva *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2009; Zaidel *et al.*, 2012). Der Vergleich von Lac und POD zeigte zudem eine langsamere Gelierung für Lac-katalysierte Gele bei gleichzeitiger Ausbildung elastischerer Gele (Zaidel *et al.*, 2012; Martínez-López *et al.*, 2019). Eine weitere Möglichkeit, Gele makroskopisch zu charakterisieren, ist durch den TextureAnalyzer gegeben. Hierbei gibt die für das Eindringen eines Stempels in das Gel benötigte Kraft Rückschlüsse auf die Härte des Gels. So konnte an Pkt-Gelen gezeigt werden, dass Lac-Gele im Vergleich zu POD-Gelen weicher sind (Norsker *et al.*, 2000). Dagegen erwiesen sich Gele aus AX nach Oxidation mittels Lac stärker als nach Kopplung mittels POD (Martínez-López *et al.*, 2019).

1.4.2 Mikroskopische Charakterisierung

Elastizität und Härte geben Auskunft über die makroskopische Beschaffenheit des Gels. Aussagen zur Netzwerkstruktur sind vage, werden teilweise dennoch getroffen. Hierfür sind jedoch Methoden nötig, um die mikroskopische Umgebung zu beschreiben. Hierzu zählen ebenfalls chemische Strukturanalysen der *cross-links* nach Verseifung. Diese wurden bereits in Kap. 1.2.1.2 und Kap. 1.2.2.2 behandelt.

1.4.2.1 Elektronenmikroskopie

Eine Möglichkeit, die Morphologie näher zu untersuchen, stellt die Elektronenmikroskopie dar, bei der durch Beschuss des Gels mit Elektronen die Porenstruktur abgetastet und bildlich erfasst werden kann. Allerdings sind hier teilweise destruktive Probenvorbereitungsschritte nötig, wodurch nicht die native Netzwerkstruktur abgebildet wird (Einhorn-Stoll & Drusch, 2015). Die Elektronenmikroskopie wurde beispielsweise genutzt, um die Porenstruktur von AX-Gelen bei Einsatz von AX mit variablen A/x zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass sich die Morphologie eines Gels von einer vergleichsweise geordneten Honigwabenstruktur mit sinkendem A/x hin zu einer unregelmäßigen

flockenartigen Struktur verändert (Marquez-Escalante *et al.*, 2018).

1.4.2.2 Diffusion

Eine weitere Möglichkeit, die mikroskopische Umgebung zu charakterisieren, bietet sich über die Analyse des Diffusionsverhaltens von Molekülen, die sich innerhalb des Netzwerks befinden. In dieser Arbeit beschreibt die Selbstdiffusion die Bewegung von Teilchen, die auf die thermische Energie des Systems zurückzuführen ist. Diese wird auch als Brown'sche Molekularbewegung bezeichnet und gilt somit für Teilchen im Konzentrationsgleichgewicht (Einhorn-Stoll & Drusch, 2015). Hydrogele können als offene Systeme beschrieben werden, die im ständigen Massenaustausch mit der Umgebung stehen. Zur besseren Anschaulichkeit stellt das Gel ein Netzwerk dar, in dessen Porenräumen Teilchen diffundieren, wobei die fluide Phase das Diffusionsmedium repräsentiert. Durch Messung der translatorischen Bewegung der Teilchen können Rückschlüsse auf ihre Interaktion mit dem Netzwerk und damit einhergehend auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Netzwerks gezogen werden. Dadurch sind Aussagen zur Umgebung der Moleküle im nm- μ m-Bereich möglich. Mehrere Parameter beeinflussen das Diffusionsverhalten. Diese sind u.a. durch die kovalente Verknüpfung der Polymerketten gegeben, wodurch Maschenweiten, Porengrößenverteilung oder Vernetzungsdichte Einfluss ausüben. Zusätzlich sind Anziehungs- oder Abstoßungskräfte durch physikalische Wechselwirkungen zu nennen (Bernin *et al.*, 2011; de Kort *et al.*, 2015; Einhorn-Stoll & Drusch, 2015). Die einfachste Beschreibung der Diffusion ist durch den Selbstdiffusionskoeffizienten D gegeben. Für sphärische Teilchen wird er durch die Stokes-Einstein-Beziehung

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (3)$$

mit der Boltzmann-Konstanten k_B , der Temperatur T , der Viskosität η sowie dem Stokes-Radius r beschrieben (Billings *et al.*, 2015). Bei geometrischer Hinderung oder Wechselwirkungen des Teilchens wird die Selbstdiffusion durch den effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} beschrieben. D_{eff} ist zudem abhängig vom Beobachtungszeitraum, da die statistische Bewegung der Moleküle innerhalb des Netzwerks durch Stöße mit Hindernissen beeinflusst wird. Bei kurzen Diffusionszeiten werden lediglich Moleküle, die sich in der Nähe von Porenwänden befinden, in ihrer Bewegung eingeschränkt. Alle anderen zeigen keine Interaktion und diffundieren unter ähnlichen Bedingungen wie ohne Vorliegen eines Netzwerks. Bei höheren Diffusionszeiten dagegen nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion des Moleküls mit dem Netzwerk zu, sodass mehr Teilchen Stöße mit den Wänden erfahren. Dadurch nimmt D_{eff} mit zunehmender Diffusionszeit

ab. Bei sehr langen Diffusionszeiten werden im Mittel alle Moleküle in ihrer Bewegung eingeschränkt, sodass D_{eff} konstant ist (Latour *et al.*, 1993; de Kort *et al.*, 2015).

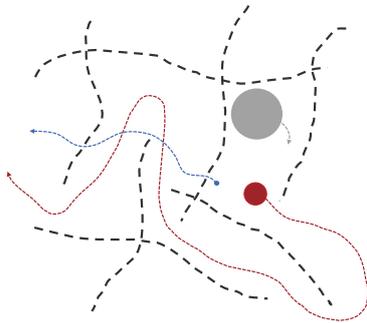


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des Obstruktionseffekts anhand des Diffusionswegs (farbig gepunktete Linien) drei unterschiedlich großer Moleküle in einem Polymernetzwerk (schwarz gestrichelte Linien). Während das kleinste Molekül (blau) kaum Hinderung erfährt, müssen größere Moleküle (rot) Umwege gehen oder werden gar eingeschlossen (grau) (de Kort *et al.*, 2015).

Verschiedene Modelle erlauben anhand des Diffusionsverhaltens Rückschlüsse auf strukturelle Parameter des Netzwerks. Obstruktive Modelle besagen, dass das Netzwerk eine starre Barriere darstellt, wodurch sich die Strecke eines Teilchens von einer Pore in eine andere Pore verlängert. Bei gleichen Maschengrößen werden größere Moleküle stärker gehindert als kleine Moleküle, die mehr oder weniger frei durch das Netzwerk diffundieren können (s. Abb. 1.10). Der Faktor, um den sich D_{eff} im Vergleich zu D (ohne Netzwerk) verringert, ist als Tortuosität oder Umwegwahrscheinlichkeit gegeben. Sie bietet die Möglichkeit, die Hinderung der Diffusionsbewegung durch die Netzwerkstruktur zu quantifizieren und nimmt für Systeme ohne Hinderung den Wert 1 an (Latour *et al.*, 1993; Amsden, 1998; Masaro & Zhu, 1999). Im hydro-

dynamischen Modell werden Reibungseffekte zwischen Teilchen, Fluid und Netzwerk berücksichtigt. Zusätzlich ist die Theorie des freien Volumens zu nennen (Amsden, 1998). D und D_{eff} können mittels *Pulsed Field Gradient-Stimulated Echo* (PFG-STE)-NMR erfasst werden. Die Messmethodik wird in Kap. 3.5 beschrieben. Sie wurde beispielsweise eingesetzt, um das Diffusionsverhalten von Natrium und Wasser in Superabsorbent oder von Dendrimeren in Alginat- und Carrageengelen zu untersuchen (Lorén *et al.*, 2009; Bernin *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2019). Zur Charakterisierung ferulasäurebasierter Hydrogele wurde die PFG-STE-NMR bis dato jedoch nicht eingesetzt.

2 Zielsetzung

Im Sinne des Nachhaltigkeitsaspekts ist die vollständige Ausschöpfung pflanzlicher Ressourcen von großer Bedeutung. Die Extraktion funktioneller Polysaccharide wie Arabinoxylane oder Pektine bietet eine Möglichkeit, industrielle Nebenströme der Lebensmittelindustrie aufzuwerten. So liegen Pektine aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae und Arabinoxylane aus Pflanzen der Familie Poaceae unter natürlichen Bedingungen mit *trans*-Ferulasäure verestert vor. Durch oxidative Kopplung dieser Polysaccharide unter Ausbildung von Oligoferulasäure-*cross-links* können stabile Hydrogele hergestellt werden, die im Bereich der Lebensmittelindustrie zur Texturierung oder im Bereich der Pharmaindustrie als Verkapselungsmaterial für dickdarmgerichtete Wirkstoffe eingesetzt werden können. Es wurde zudem gezeigt, dass die Zugabe dieser Gele zur Nahrung von Ratten durch Senkung des postprandialen Blutglucosespiegels Einfluss auf die Nährstoffresorption hat. Die Geleigenschaften werden meist auf makroskopischer Ebene betrachtet, etwa durch Untersuchung der Viskoelastizität. In der Literatur wurde gezeigt, dass die makroskopischen Geleigenschaften von strukturellen Parametern der eingesetzten Polysaccharide, insbesondere durch den Gehalt an *trans*-Ferulasäure, beeinflusst werden. Inwieweit die molekulare Komplexität der Polysaccharide die Geleigenschaften bedingt, ist nicht bekannt. So ist es denkbar, dass neben dem Gehalt auch die molekulare Umgebung der Ferulasäure durch sterische Faktoren Einfluss auf die oxidative Kopplung nimmt.

Daher sollten im Zuge dieser Arbeit durch Variation der Extraktionsbedingungen strukturell unterschiedliche ferulasäurehaltige Pektine aus Zuckerrübenschnitzeln sowie Arabinoxylane aus Popcornmais gewonnen werden, die laut Literatur im nativen Zustand komplexe Polysaccharidstrukturen aufweisen. Durch umfassende Charakterisierung ihrer Strukturen mit etablierten Methoden soll die Komplexität der Polysaccharide abgeschätzt und die molekulare Umgebung der *trans*-Ferulasäure innerhalb der Struktur abgebildet werden. Für die Beschreibung ferulasäurehaltiger Pektine müssen hierfür methodische Anpassungen getroffen werden. Darüber hinaus sollen durch enzymatische Behandlung mit strukturspezifischen Enzymen einzelne Strukturparameter der Pektine gezielt variiert werden, um dadurch diese Polysaccharide definiert zu modifizieren.

Die extrahierten Polysaccharide sollten oxidativ mittels Laccase/O₂ sowie Peroxidase/H₂O₂ vernetzt und die Veränderungen der Polysaccharidstrukturen auf molekularer Ebene untersucht werden. Das Regioisomerenprofil der gebildeten Oligoferulasäuren soll hierbei Aufschluss über eine mögliche Abhängigkeit der oxidativen Kopplung von

der mikromolekularen Umgebung der Ferulasäure liefern.

Anhand rheologischer Messungen werden die erhaltenen Hydrogele hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften charakterisiert, um die Abhängigkeit der makroskopischen Geleigenschaften von der Struktur des Gelbildners näher zu untersuchen. Speziell für diffusionsbestimmte Prozesse, wie bei der Wirkstofffreisetzung oder Nährstoffresorption, scheint die Viskoelastizität jedoch kaum aussagekräftig zur Beschreibung der Geleigenschaften. Hier ist vielmehr die mikroskopische Betrachtung durch Beschreibung der mikromolekularen Umgebung innerhalb des Gels entscheidend, die bis dato kaum Beachtung findet. Daher soll mittels NMR das Diffusionsverhalten von Wasser und Glucose als Gastmolekül in den Gelen untersucht werden, um die mikroskopische Ebene näher zu beleuchten und zu überprüfen, inwieweit diese von strukturellen Parametern der Gelbildner beeinflusst wird.

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

3.1.1 Ausgangsmaterialien

Für die Herstellung der kovalent vernetzten Hydrogele wurden Pkt aus Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) sowie AX aus Popcornmais (*Zea mays* L. var. *everta*) eingesetzt. Beide Probenmaterialien sind durch vielfältige Seitenkettenstrukturen gekennzeichnet, sodass der Einfluss komplexer Strukturcharakteristika auf Geleigenschaften untersucht werden kann (Oosterveld *et al.*, 1996; Westphal *et al.*, 2010c; Schendel *et al.*, 2016a). Als Ausgangsmaterial zur Extraktion von Pkt wurden hierfür getrocknete Zuckerrübenschnitzel verwendet, die von der Südzucker AG bereitgestellt wurden. Diese fallen nach der Zerkleinerung von Zuckerrüben und der Extraktion von Saccharose mit heißem Wasser als Rückstände der Zuckergewinnung an. Dagegen wurde getrockneter Popcornmais der Alnatura GmbH als Rohstoff für die Gewinnung von AX eingesetzt. Für die Entwicklung der Profilingmethode für FS-haltige Arabinan- und Galactanoligosaccharide wurden neben Pkt aus Zuckerrüben Samen von Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) und Quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.) eingesetzt. Diese wurden ebenfalls von der Alnatura GmbH bezogen.

Alle Rohstoffe wurden zunächst auf eine Partikelgröße $< 0,5$ mm gemahlen. Die Mehle von Popcornmais, Amaranth und Quinoa wurden anschließend 3x mit Aceton entfettet und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Lagerung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -18 °C unter Lichtausschluss.

3.1.2 Gewinnung von Pektin

In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, um Pkt aus Zellwandmaterial zu extrahieren. Dabei hat die gewählte Methode erheblichen Einfluss auf die Struktur der damit gewonnenen Polysaccharide, da die Extraktion teilweise in einer chemischen Modifikation der Pkt-Strukturen resultiert. Der Vorgang der Isolierung kann in die Vorbehandlung des Ausgangsmaterials, die Extraktion des Pkt sowie die weitere Verarbeitung des gelösten Pkt unterteilt werden, was im folgenden Kapitel näher beschrieben wird. Dazu können Pkt nach ihrer Extraktion enzymatisch modifiziert werden, um einzelne Strukturelemente gezielt anzupassen.

3.1.2.1 Isolierung von Pektin

In der Literatur werden verschiedene Verfahren beschrieben, wie Rohstoffe für die Pektinextraktion vor der Extraktion behandelt werden können. Beispielsweise können Bakterien oder Enzyme durch Blanchieren des Ausgangsmaterials inaktiviert werden, wodurch die Stabilität des Ausgangsmaterials gegenüber strukturellen Veränderungen erhöht wird. Gleichzeitig sorgt ein Trocknen der Ausgangsmaterialien für verringerte Fermentationsprozesse (Chan *et al.*, 2017).

Gewöhnlich werden Pkt anschließend im Wässrigen nach Ansäuern (pH 1-3) mittels Mineralsäuren wie Salzsäure oder Salpetersäure und bei höheren Temperaturen (50-100 °C) durch Spaltung der intermolekularen Bindungen aus dem Zellwandgefüge herausgelöst. Hiermit können die höchsten Ausbeuten erzielt werden, wobei die Pektinausbeute mit steigenden Extraktionszeiten sowie sinkendem pH-Wert steigt (Michel *et al.*, 1985; Levigne *et al.*, 2002b). Die Art der Säure zeigte keinen Einfluss (Levigne *et al.*, 2002b). Allerdings werden unter diesen Bedingungen säurelabile Strukturen wie Arabinane teilweise hydrolysiert, was in einer Veränderung der Funktionalität des Pkt resultiert. Dies äußert sich zudem in einer Reduktion des Molekulargewichts, des Verzweigungsgrads sowie verringerten Gehalten an estergebundener FS (Michel *et al.*, 1985; Oosterveld *et al.*, 1996; Bindereif *et al.*, 2021). Alternativen zur Säureextraktion stellen die Extraktionen mit heißem Wasser oder Puffern sowie unter alkalischen Bedingungen dar, die jedoch meist in geringen Ausbeuten resultieren. Bei alkalischer Extraktion wurde zudem eine Spaltung von GalA-reichen Abschnitten durch β -Eliminierung beobachtet, die mit steigendem DM stärker ins Gewicht fällt. Dadurch werden insbesondere HG-Bereiche depolymerisiert, was wiederum in verringerten Kettenlängen des Pkt-Rückgrats resultiert. Gleichzeitig kommt es unter alkalischen Bedingungen zu einer Abspaltung estergebundener Methyl- und Acetylgruppen sowie FS (Rombouts & Thibault, 1986; Kravtchenko *et al.*, 1992). Oosterveld und Mitarbeiter (1996) extrahierten Pkt mittels Autoklavenbehandlung bei höheren Drücken und neutralem pH-Wert und erhielten dadurch FS-reiche Pkt bei gleichzeitig hohen Ausbeuten. Jedoch hatte diese Behandlung auch eine Reduktion des Molekulargewichts durch Spaltung von HG-Abschnitten zur Folge (Oosterveld *et al.*, 2000b). Durch Behandlung mit Ultraschall oder Mikrowellenstrahlung kann die Extraktionszeit verringert und gleichzeitig die Ausbeute erhöht werden (Bagherian *et al.*, 2011).

Neben chemischen Extraktionsmethoden werden auch enzymatische Verfahren eingesetzt, die durch selektive Hydrolyse des Zellwandmaterials Pkt unter vergleichsweise

schonenden Bedingungen freisetzen. Beispielsweise werden *endo*-Xylanasen und *endo*-Cellulasen eingesetzt, um Pkt unter wässrigen Bedingungen aus Äpfeln zu extrahieren. So konnten Pkt mit höheren Molekulargewichten im Vergleich zu säureextrahierten Pkt erhalten werden. Jedoch ist der enzymatische Verdau mit höheren Kosten sowie längeren Inkubationszeiten verbunden (Wikiera *et al.*, 2015; Wikiera *et al.*, 2016).

Der wässrige Extrakt wird schließlich durch Filtration oder Zentrifugation vom Rückstand abgetrennt. Durch die Zugabe von Lösungsmitteln wie Ethanol oder Isopropanol zum wässrigen Extrakt können schließlich die alkohol-unlöslichen Pkt von den alkohol-löslichen Komponenten separiert und nach Trocknung als Feststoff erhalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pkt nach Autoklavenbehandlung (Pkt1) sowie nach Säurebehandlung unter unterschiedlichen Bedingungen (Pkt2-6) gewonnen, die sich im pH-Wert des Extraktionsmediums sowie in der Extraktionszeit unterscheiden, um eine Vielfalt an Struktureigenschaften zu erhalten. Die Extraktionsbedingungen sind in Tab. 3.1 zusammengefasst dargestellt. Die ausführliche Extraktion findet sich in Kap. 8.1.2 wieder.

Tab. 3.1: Verwendete Bedingungen für die Extraktion sechs verschiedener Pektine aus Zuckerrüben

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
Vorbehandlung	-	-	-	-	-	30 min Ultraschall
Extraktionsdauer	40 min	1 h	4 h	16 h	4 h	1 h
Bedingungen	2,1 bar 121°C	pH 2 80°C	pH 2 80°C	pH 2 80°C	pH 3 80°C	pH 2 80°C

3.1.2.2 Enzymatische Modifikation von Pektin

Während der chemischen Extraktion von Pkt kommt es teilweise zu einer weitgehend unspezifischen Modifikation der Pkt-Strukturen, insbesondere der AN, sodass viele Strukturelemente gleichzeitig und unregelmäßig verändert werden. Durch die Verwendung spezifischer Enzyme können einzelne Strukturmerkmale extrahierter Pkt nachträglich gezielt verändert werden, um deren Einfluss auf die Gelbildung genauer untersuchen zu können.

Beispielsweise spalten Polygalacturonasen und Pektinlyasen die glykosidischen Bindungen zwischen zwei GalA-Einheiten, was mit einem Abbau des HG-Rückgrats einhergeht. Der Spaltmechanismus unterscheidet sich dabei zwischen den Enzymen. So beruht der Mechanismus der Polygalacturonasen auf einer Hydrolyse, womit Oligogalacturonsäureeinheiten als Produkte entstehen, während Pektinlyasen durch β -Eliminierung

ungesättigte Oligogalacturonsäureeinheiten freisetzen (Jayani *et al.*, 2005). Gleichzeitig können durch den Einsatz spezifischer hydrolytischer Enzyme gezielt die neutralen Seitenketten des RG I abgebaut werden. So katalysieren *endo*- α -(1 \rightarrow 5)-Arabinanasen die Hydrolyse der α -(1 \rightarrow 5)-glykosidischen Bindungen der so verknüpften Araf-Einheiten im AN und *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactanasen die Hydrolyse β -(1 \rightarrow 4)-glykosidischer Bindungen der so gebundenen Galp im GN. Dies wurde z.B. genutzt, um den Einfluss von AN und GN auf die emulgierenden Eigenschaften von Pkt zu untersuchen (Funami *et al.*, 2011). Die *endo*-Hydrolyse von AN und GN hat die Freisetzung charakteristischer Oligosaccharide zur Folge, womit Aussagen zur Komplexität des RG I getroffen werden können (Westphal *et al.*, 2010c; Wefers *et al.*, 2014; Wefers *et al.*, 2015b; Wefers & Bunzel, 2016). Allerdings spalten *endo*- α -(1 \rightarrow 5)-Arabinanasen bevorzugt lineare Abschnitte des AN, weswegen das Ausmaß der enzymatischen Spaltung stark von der Komplexität des AN abhängt. Um quantitativ AN abzubauen, können *exo*- α -Arabinofuranosidasen eingesetzt werden, die die Freisetzung von α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3)- und α -(1 \rightarrow 5)-gebundener Araf vom nicht-reduzierenden Ende aus katalysieren.

Um hinsichtlich ihrer AN- bzw. GN-Gehalte modifizierte Pkt zu gewinnen, wurde eine *exo*- α -Arabinofuranosidase bzw. eine *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactanase eingesetzt. Dabei wurden die Inkubationszeiten (18 h und 48 h) variiert, um verschiedene Fraktionen zu erhalten (AN18+AN48 bzw. GN18+GN48). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde statt einer Präzipitation der Pkt eine Dialyse gegen destilliertes Wasser (*molecular weight cut off* von 3,5 kDa) mit anschließender Gefriertrocknung durchgeführt. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Kap. 8.1.2 zu entnehmen.

3.1.3 Präparative Gewinnung von Ballaststoffen

Die Analyse und Gewinnung von Ballaststoffen erfolgt meist mittels enzymatisch-gravimetrischen Methoden. Die *Association of Analytical Chemists* (AOAC) hat im Laufe der Zeit mehrere offizielle Methoden entwickelt, nach denen BS isoliert werden können. Dabei wurden die Methoden mehrfach angepasst, um alle Ballaststoffkomponenten zu erfassen, die durch aktualisierte Definitionen neu als Ballaststoffe eingegliedert wurden (McCleary & Cox, 2017). Alle Methoden beruhen auf dem enzymatischen Abbau von Stärke mittels α -Amylase und Amyloglucosidase sowie dem Abbau von Proteinen mittels Proteasen. Prosky und Mitarbeiter (1985) verwenden eine thermostabile α -Amylase, die Stärke sowie den Großteil resistenter Stärke unter hohen Temperaturen hydrolysiert (AOAC 985.29). Durch den Einsatz einer Pankreas- α -Amylase, die resistente Stärke nicht hydrolysiert sowie Inkubationsbedingungen, die an die physiologischen

Bedingungen angepasst wurden, wurde die Gewinnung der Ballaststoffe im Laufe der Zeit an die menschliche Verdauung angepasst, was in der aktuellen AOAC Methode 2017.16 resultierte (McCleary *et al.*, 2015). Der Rückstand nach Verdau wird als UBS ausgewogen. Aus dem Überstand nach Zentrifugation können durch Fällung mittels Ethanol (>80% (v/v) im Endvolumen) lösliche Ballaststoffe (LBS) gewonnen werden. Die Methoden können verwendet werden, um Ballaststoffe in Lebensmitteln zu quantifizieren, aber auch, um Zellwandmaterial als Grundlage für weitere Untersuchungen zu generieren. So wurden UBS und SBS aus Amaranth und Quinoa für die Applikation der Profilingmethode für FS-haltige Arabinan- und Galactanooligosaccharide gewonnen. Gleichmaßen wurden UBS aus Popcornmais isoliert, um daraus möglichst reine WUAX zu extrahieren. Für diese Zwecke ist durch die Wahl einer geeigneten AOAC Methode eine Aufreinigung des Zellwandmaterials möglich. Die Ballaststoffisolierung erfolgt somit in Anlehnung an die AOAC Methode 985.29, die durch Prosky und Mitarbeiter (1985) entwickelt wurde und resistente Stärke weitgehend abbaut. Die genaue Durchführung ist Kap. 8.1.3 zu entnehmen.

3.1.4 Isolierung von Arabinoxylanen

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Isolierung von AX aus Pflanzenmaterial beschrieben. Die Gewinnung von WEAX geschieht dabei durch Suspendierung des gemahlten und entfetteten Probenmehls in Wasser. Nach Zentrifugation wird der Überstand durch α -Amylase und Amyloglucosidase von Stärke befreit. Gleichmaßen können lösliche Proteine durch den Einsatz von Proteasen entfernt werden. Die Zugabe von Alkohol (>65% (v/v) im Endvolumen) ermöglicht schließlich die Abtrennung der alkohol-unlöslichen WEAX von der alkohol-löslichen Fraktion (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c). Alternativ können WEAX auch durch Dialyse und anschließender Gefriertrocknung aus dem Überstand isoliert werden (Maes & Delcour, 2002). Die enzymatische Behandlung kann ebenso auf das Rohmaterial angewendet werden, wodurch sich die Extraktion von WEAX leicht mit der Ballaststoffisolierung kombinieren lässt. Der Großteil der AX verbleibt jedoch durch Interaktionen mit der Zellwand als WUAX in der unlöslichen Fraktion und lässt sich erst durch alkalische Behandlung aus dem Zellwandnetzwerk lösen. Hierbei werden Wasserstoffbrücken zwischen AX und Cellulose sowie kovalente FS-*cross-links* zwischen AX und Zellwandkomponenten gebrochen, was in einer Solubilisierung der AX resultiert. Gleichzeitig werden Uronsäuren deprotoniert, was zu Abstoßungskräften führen kann (Zhang *et al.*, 2014). Es werden sowohl monovalente Basen wie Natronlauge (NaOH) und Kalilauge, als auch divalente Basen wie

Bariumhydroxid oder Calciumhydroxid eingesetzt (Mandalari *et al.*, 2005; Ayala-Soto *et al.*, 2014; Bender *et al.*, 2017; Gruppen *et al.*, 1991). Dabei steigt die Ausbeute mit zunehmender Extraktionszeit, Temperatur und Molarität der Base, wie Ayala-Soto und Mitarbeiter (2016) bei der Extraktion von AX aus Mais feststellten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass divalente Basen, insbesondere Bariumhydroxid selektiv AX aus dem Zellwandmaterial herauslösen, was in erhöhten Ausbeuten sowie Reinheiten resultierte. Dies wird auf die Interaktion von divalenten Kationen wie z.B. Ba^{2+} mit Pentosen zurückgeführt (Gruppen *et al.*, 1991). Durch Zugabe von Natriumborhydrid zur Extraktionslösung soll das *alkaline peeling* verringert werden. Dies stellt einen Abbauprozess von Polysacchariden durch Abspaltung von Monosacchariden am reduzierenden Ende unter alkalischen Bedingungen dar (Gruppen *et al.*, 1991). Ferner kann die Kombination von Basen mit H_2O_2 durch Oxidation von Ligninstrukturen und einer damit einhergehenden Spaltung von kovalenten Verknüpfungen sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit der extrahierten AX erhöhen (Yadav *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014). Eine alkalische Behandlung hat zwar die Extraktion von AX in vergleichsweise hoher Reinheit zur Folge, allerdings ist damit auch immer eine Verseifung estergebundener Komponenten verknüpft. Bei der alkalischen Extraktion muss somit immer ein Kompromiss zwischen Ausbeute und Gehalt an estergebundener FS eingegangen werden. Um möglichst FS-reiche AX zu erhalten, erfolgte die Extraktion von WUAX unter vergleichsweise milden Bedingungen mit 0,25 M NaOH bei 25 bzw. 30 °C. Die Durchführungen sind Kap. 8.1.4 zu entnehmen. Dabei wurden mehrere AX-Fractionen gewonnen, deren Gewinnung sich durch Extraktionszeit (1, 1,5 und 4 h) sowie durch Ultraschallvor- und -zwischenbehandlungen unterschied (s. Tab. 3.2). Die Extraktion schloss einen zusätzlichen enzymatischen Stärke- und Proteinverdau mit ein, um potenziell freigesetzte Stärke im Zuge der alkalischen Behandlung sowie erhöhte Proteingehalte zu reduzieren. Nach Einstellen der Extraktionslösung auf den pH-Wert 4 wurden die WUAX schließlich durch Zugabe von Ethanol zur Extraktionslösung (75% (w/v) im Endvolumen) über Nacht ausgefällt und nach Waschschrinen getrocknet.

Tab. 3.2: Verwendete Bedingungen für die Extraktion fünf verschiedener Arabinoxylanfraktionen aus unlöslichen Ballaststoffen (UBS) von Popcornmais mit 0,25 M NaOH

	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5
Vorbehandlung	-	-	-	30 min Ultraschall in Lauge	30 min Ultraschall in Wasser
Extraktionsdauer	4 h	4 h	1,5 h	1 h	1 h
Temperatur	25 °C	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C

3.2 Charakterisierung der extrahierten Polysaccharide

Polysaccharide unterliegen einer hohen biologischen Variabilität, weshalb ihre exakten Strukturen kaum vorhergesagt werden können. Hier bedarf es aufwändiger Analysemethoden, um die Strukturen umfassend zu beschreiben. Dabei wird zwischen grundsätzlichen Analysen unterschieden, die Polysaccharide hinsichtlich ihrer Begleitstoffe wie Asche und Protein, aber auch ihrer Molekülgröße untersuchen sowie Analysen, anhand derer die molekularen Feinstrukturen der Polysaccharidketten abgebildet werden können. Dies ist notwendig, um im weiteren Verlauf der Arbeit Zusammenhänge zwischen Struktureigenschaften der Polysaccharide und Eigenschaften der daraus gebildeten Gele erkennen zu können.

3.2.1 Grundcharakterisierung

3.2.1.1 Bestimmung der Asche- und Proteingehalte

Im Zuge der Präzipitation von Polysacchariden aus wässrigen Puffer- oder Extraktionslösungen werden z.T. Salze mit ausgefällt, die u.a. Auswirkungen auf Geleigenschaften haben können. Um potenzielle Unterschiede zwischen den extrahierten Fraktionen auszumachen, werden die Polysaccharide 5 h bei 520 °C verascht, und die Asche wird gravimetrisch erfasst.

Ferner können unverdauliche (Struktur)Proteine mit extrahiert werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt nach Kjeldahlaufschluss durch Quantifizierung des freigesetzten Ammoniums mittels Ammoniak-sensitiver Elektrode (Urbat *et al.*, 2019). Für die Berechnung des Proteingehalts wird der allgemeine Umrechnungsfaktor von 6,25 verwendet. Die Durchführungen sind in Kap. 8.2.1 und Kap. 8.2.2 einzusehen.

3.2.1.2 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Für besonders proteinreiche Proben bietet sich zudem eine Untersuchung des Aminosäureprofils an, um strukturelle Aussagen über die enthaltenen (Struktur)Proteine treffen zu können. Die Freisetzung der Aminosäuren geschieht häufig durch Säurehydrolyse mittels Salzsäure unter hohen Temperaturen (Barkholt & Jensen, 1989; Cohen & Antonis, 1994). Die Detektion kann spektralphotometrisch erfolgen, in dem die freigesetzten Aminosäuren durch Reaktion mit Farbreagenzien in farbige Produkte überführt werden. Jedoch sind für die separate Analyse der Aminosäuren aufwändige Probenvorbereitungsschritte nötig (Moore & Stein, 1948; Hamilton, 1963). Eine Alternative bietet die Überführung der freigesetzten Aminosäuren in fluoreszierende Derivate

und die anschließende Auftrennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) mit Fluoreszenzdetektion (FLD). Hierbei hat sich 6-Aminochinoly-N-hydroxysuccinimidylcarbammat (AQC) als Derivatisierungsreagenz etabliert. Die Methode bietet den Vorteil, in kurzer Zeit die meisten Aminosäuren getrennt zu quantifizieren. Dadurch kann ein Aminosäureprofil erstellt werden, weswegen diese Methode in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Allerdings werden durch das saure Milieu Asparagin und Glutamin in die jeweiligen Säurederivate überführt, wodurch diese Gehalte unter- bzw. überbestimmt werden. Gleichzeitig kommt es zu einer vollständigen Zerstörung von Tryptophan sowie einer partiellen Zerstörung von Cystein und Methionin, weswegen diese Aminosäuren nicht erfasst werden können (Cohen & Antonis, 1994). Die genaue Durchführung ist in Kap. 8.2.3 hinterlegt.

3.2.1.3 Bestimmung des Molekulargewichts

Neben der Feinstruktur der Polysaccharide kann auch das Molekulargewicht deren technofunktionelle Eigenschaften beeinflussen. Die Länge der Polymerketten ist natürlicherweise heterogen verteilt, sodass natürliche Polysaccharide meist eine hohe Polydispersität aufweisen. Abhängig von der Heterogenität des Molekulargewichts kann die resultierende Molekulargewichtsverteilung (MWD, engl. *Molecular Weight Distribution*) mono-, bi-, tri- oder polymodal vorliegen. Um die MWD zu analysieren, werden die Polysaccharide gewöhnlich mittels Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (HPSEC, engl. *High Performance Size Exclusion Chromatography*) nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt. Dabei werden die gelösten Polymere in einem Flüssigkeitsstrom durch poröses Material geleitet, wo sie abhängig von ihrer Größe unterschiedlich mit dem Material wechselwirken. Kleine Moleküle dringen stärker in die Poren ein als größere Moleküle und erfahren dadurch Retention auf der Säule. Mit zunehmender Größe sinkt die Fähigkeit der Partikel, in die Poren einzudringen, weshalb sie früher eluieren. Die Eluenten sind meist wässrig, damit die Polysaccharide in Lösung bleiben. Durch Zugabe von z.B. Natriumnitrat kann die Aggregation geladener Polysaccharide durch elektrostatische Wechselwirkungen unterdrückt werden. Die Kopplung mit konzentrationsabhängigen Detektoren wie Brechungsindex (RI, engl. *Refractive Index*)-Detektoren ermöglicht die Dokumentation der Auftrennung. Das Prinzip des RI-Detektors beruht auf der Veränderung des RI des Eluats von der Säule relativ zum reinen Eluenten. Die Ermittlung des Molekulargewichts mittels RI-Detektion geschieht oftmals durch Kalibrierung des Detektors mit monodispersen Standardsubstanzen bekannter Größe wie Dextranen oder Pullulanen. Der Vergleich der Retentionszeiten und die Über-

tragung des Molekulargewichts auf chemisch unterschiedliche sowie polydisperse Proben ist jedoch nur bedingt möglich. Eine Lösung stellt die Molekulargewichtsbestimmung über die Lichtstreuung dar, was beispielsweise durch die Kopplung des HPSEC-RI-Systems mit einem Mehrwinkellichtstredetektor (MALLS, engl. *Multi-Angle Laser Light Scattering*) realisiert werden kann. Die Intensität des Streulichts R am Winkel θ verhält sich dabei proportional zum gewichtsgemittelten Molekulargewicht M_w , der Konzentration c sowie dem spezifischen Brechungsindexinkrement $\frac{dn}{dc}$ (s. Gl. (4)) (Wyatt, 1997).

$$R(\theta) \propto M_w \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \cdot c \quad (4)$$

$\frac{dn}{dc}$ stellt eine stoffspezifische Größe dar und geht quadratisch in die Berechnung von M_w ein, weswegen eine genaue Kenntnis darüber wichtig ist. Für die Bestimmung des M_w der extrahierten Polysaccharide werden aus diesem Grund die $\frac{dn}{dc}$ -Werte aus der Steigung der Geraden bestimmt, die durch Auftragung der Flächenintegrale verschiedener Konzentrationen gegen die injizierte Probenmenge erhalten wird. Anschließend kann damit M_w genau bestimmt werden. Die Durchführung der HPSEC-RI/MALLS-Messungen ist unter Kap. 8.2.4 einzusehen.

3.2.2 Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen

3.2.2.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung ermöglicht erste Aussagen zum grundsätzlichen Aufbau von Polysacchariden. Sie wurde für sämtliche extrahierte Proben durchgeführt, um einerseits die Strukturen von Pkt und AX einzuordnen und andererseits zu überprüfen, ob die enzymatische Modifikation gewünschte Pkt hervorbrachte. Für lösliche Polysaccharide wie Pkt und AX, die jeweils nach alkoholischer Präzipitation gewonnen wurden, eignet sich die Methode nach Ruiter und Mitarbeiter (1992b). Hierbei werden die Polysaccharide durch die Zugabe von methanolischer Salzsäure zunächst in Methylglykoside überführt und anschließend mittels Trifluoressigsäure (TFA, engl. *Trifluoroacetic acid*) hydrolysiert. Die Spaltung kristalliner Cellulose ist nicht möglich, weswegen für UBS-Fractionen von Amaranth und Quinoa die Schwefelsäurehydrolyse nach Saeman und Mitarbeiter (1945) durchgeführt wurde. Bei Raumtemperatur quillt die Cellulose durch die Zugabe von konz. Schwefelsäure zunächst auf, bevor sie schließlich nach Wasserzugabe bei hohen Temperaturen (100 °C) hydrolysiert wird. Uronsäuren werden mittels Schwefelsäurehydrolyse tendenziell unterbestimmt, können mittels Methanolyse allerdings in akzeptablen Wiederfindungen erfasst werden (Willför *et al.*,

2009). Nach Derivatisierung in u.a. flüchtige Alditolacetate können die freigesetzten Monosaccharide mittels Gaschromatographie (GC) getrennt und mittels Massenspektrometer (MS) oder Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert werden. Die Analyse von Uronsäuren ist jedoch nur nach zusätzlicher Reduktion der Carboxylgruppe möglich (Albersheim *et al.*, 1967; Jones & Albersheim, 1972). Eine Alternative bietet die Analyse der freigesetzten Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC, engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography*) gekoppelt mit einem gepulst amperometrischen Detektor (PAD, engl. *Pulsed Amperometric Detector*). Die Trennung findet im alkalischen Milieu statt, wodurch die Monosaccharide in die anionische Form überführt werden und somit an der stationären Anionenaustauscherphase, einem quervernetzten Polystyrol mit quartären Ammoniumgruppen, aufgetrennt werden können. Durch Oxidation der Monosaccharide im PAD werden proportional zur Konzentration Elektronen erzeugt, die das gemessene Signal bilden (Rocklin & Pohl, 1983; de Ruiter *et al.*, 1992a; Willför *et al.*, 2009). Die Durchführungen der Monosaccharidanalyse nach Methanolyse und anschließender TFA-Hydrolyse für Pkt, AX und LBS-Fractionen aus Amaranth und Quinoa sowie nach Schwefelsäurehydrolyse für UBS aus Amaranth und Quinoa sind in Kap. 8.3 zu finden.

3.2.2.2 Bestimmung der Bindungsverhältnisse

Die Monosaccharidzusammensetzung alleine lässt keine repräsentativen Aussagen zu enthaltenen Polysaccharidstrukturen zu und sollte demnach unter Berücksichtigung der Bindungsverhältnisse der jeweiligen Monosaccharide evaluiert werden. Diese können standardmäßig über die Methylierungsanalyse erhalten werden, welche in dieser Arbeit in Anlehnung an Wefers und Mitarbeiter (2015a) erfolgte (s. Kap. 8.4). Grundlage der Analyse ist die Ionisierung freier Hydroxylgruppen im Polysaccharid mit starken Basen und die anschließende Methylierung durch Zugabe von Methyljodid. Hierbei hat sich der Einsatz von festem Natriumhydroxid in wasserfreiem DMSO als Base bewährt (Ciucanu & Kerek, 1984; Pettolino *et al.*, 2012). Durch eine anschließende saure Hydrolyse mittels 2 M TFA werden partiell methylierte Monosaccharide freigesetzt. Die Reduktion der partiell methylierten Monosaccharide mittels Natriumbordeuterid öffnet den Ring und ermöglicht eine Markierung des anomeren C-Atoms zur späteren massenspektrometrischen Unterscheidung von partiell methylierten Monosacchariden mit identischem Fragmentmuster. Den letzten Schritt stellt die Acetylierung der im Zuge der Hydrolyse freigesetzten Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid und 1-Methylimidazol dar, um die nötige Flüchtigkeit für die GC-Analyse zu erreichen. Gleichzeitig liefert die

Acetylierung Rückschlüsse auf die Lokalisierung der Bindungspositionen. So deutet eine 1,4,5-triacetylierte Araf auf eine (1 → 5)- verknüpfte Araf hin, wie sie in AN vorkommt. Einen Nachteil der Methode stellt der Informationsverlust über die Konfiguration am anomeren C-Atom während der Reduktion dar. Die Erfassung von Uronsäuren ist zudem nur nach vorhergehender aufwändiger Reduktion der Carboxylgruppe möglich (Pettolino *et al.*, 2012). Da der Fokus dieser Arbeit auf den neutralen Seitenketten des Pkt sowie auf AX liegt, wird auf diesen Schritt verzichtet. Die resultierenden partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) werden schließlich mittels GC getrennt und mit MS bzw. FID qualitativ bzw. semiquantitativ erfasst. Die Identifizierung der PMAA geschieht dabei durch Vergleich der mittels GC-MS erhaltenen Fragmentmuster mit Literaturdaten (Complex Carbohydrate Research Center, 2022). Die semiquantitative Analyse erfolgt unter identischen chromatographischen Bedingungen mittels GC-FID unter Verwendung der von Sweet und Mitarbeitern (1975) ermittelten molaren Responsefaktoren. Analog zur Monosaccharidanalyse können lediglich Aussagen zu relativen Anteilen der PMAA getroffen werden. Die Durchführung der Methylierungsanalyse ist in Kap. 8.4 hinterlegt.

3.2.2.3 Quantifizierung der phenolischen Komponenten

Neben den Polymerketten hat auch das Ausmaß der *cross-links* potentiellen Einfluss auf die Geleigenschaften. Diese werden im Falle kovalenter FS-haltiger Polysaccharidgelle annähernd durch den Gehalt an FS sowie OFS im Polysaccharid beschrieben. In pflanzlichen Proben können phenolische Komponenten kovalent über Esterbindungen an Polysaccharide gebunden vorliegen, gleichzeitig aber auch über Etherbindungen an Lignin, was in unterschiedlichen Stabilitäten resultiert. Da der Fokus dieser Arbeit auf den polysaccharidgebundenen phenolischen Säuren liegt, wird lediglich die Esterbindung betrachtet. In der Literatur werden verschiedene Hydrolysetechniken beschrieben, um u.a. FS, *p*-CS oder OFS freizusetzen. Enzymatische Ansätze, wie der Einsatz zellwandabbauender Enzyme wie Xylanasen oder Pektinasen sowie FS-Esterasen, sorgten für die Freisetzung gebundener FS aus dem Zellwandmaterial. Allerdings kann keine vollständige Freisetzung sichergestellt werden, was ihre Eignung zur Quantifizierung von phenolischen Komponenten in Zellwandmaterial verhindert (Andreasen *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002). Ebenso werden saure Hydrolysen mit Schwefelsäure oder Salzsäure beschrieben, die FS jedoch bei zu milden Bedingungen unvollständig freisetzen und bei zu harschen Bedingungen deren Strukturen teilweise zerstören (Barberousse *et al.*, 2008). Daher werden standardmäßig alkalische Hydrolysen mit NaOH zur Verseifung der Esterbindungen eingesetzt. Die in der Literatur beschriebenen Durchführungen unter-

scheiden sich in der Molarität der Lauge, Hydrolysezeit sowie Temperatur (Barberousse *et al.*, 2008). Die Freisetzung unter Stickstoffatmosphäre sowie unter Lichtausschluss verringert unerwünschte Oxidationsprozesse und *cis-trans*-Isomerisierungen der freigesetzten Verbindungen. Im Anschluss an die Verseifung werden die phenolischen Säuren durch Ansäuern protoniert und schließlich durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln wie Diethylether oder Ethylacetat extrahiert. Je nach Quantifizierungsmethode wird das Extraktionsmittel entfernt und die Analyten in ein geeignetes Lösemittel aufgenommen.

Die anschließende Quantifizierung kann u.a. mittels GC-MS durchgeführt werden, wobei hier ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt vonnöten ist, um die Flüchtigkeit der phenolischen Säuren zu erhöhen. Dies wird u.a. durch Silylierung erreicht (Ralph *et al.*, 1994; Bunzel *et al.*, 2001). GC-Methoden zeichnen sich durch eine erhöhte Selektivität der Trennung der monomeren phenolischen Säuren sowie DFS aus, sind jedoch für die Analyse höheroligomerer OFS ungeeignet, da diese nur unzureichend in die Gasphase überführt werden können (Bunzel *et al.*, 2001; Dobberstein & Bunzel, 2010). Dieses Problem kann durch die Analyse von phenolischen Säuren mittels HPLC-DAD (Diodenarraydetektor) an einer Phenylhexyl-Säule umgangen werden, wobei jedoch Monomere ein ähnliches Retentionsverhalten wie 8-8-DFS aufweisen können. Zusätzlich wird die Analyse durch Matrixkomponenten (insbesondere in ligninreichen Proben) sowie durch die Vielzahl an potenziellen DFS und TriFS erschwert. Durch Bestimmung von Korrekturfaktoren aus einer Matrixkalibrierung konnten Dobberstein & Bunzel (2010) u.a. Matrixeffekte berücksichtigen und gleichzeitig die Quantifizierung von DFS/TriFS ohne die zwingende Verwendung einer Kalibrierung ermöglichen. Monomere und Oligomere der FS zeigen eine unterschiedlich gute Löslichkeit bei der Resolubilisierung der extrahierten Verbindungen aus dem Rückstand des organischen Extraktionsmittels nach Trocknung. Gewöhnlich werden Gemische aus Methanol/Wasser oder Tetrahydrofuran/Wasser eingesetzt, um die Verbindungen für die weitere Analyse in Lösung zu bringen. Durch den Einsatz von Dioxan/Wasser konnte für manche DFS und TriFS eine verbesserte Wiederfindung erreicht werden (Jilek & Bunzel, 2013). Die Selektivität und Empfindlichkeit der Analyse können durch Kopplung der HPLC mit MS erhöht werden. Gleichmaßen wird dadurch die Anzahl der potenziell quantifizierbaren Verbindungen erhöht (Jilek & Bunzel, 2013; Waterstraat & Bunzel, 2019).

In dieser Arbeit erfolgt die Quantifizierung von estergebundenen FS und OFS in AX und Pkt mittels HPLC-DAD mit der von Dobberstein & Bunzel (2010) entwickelten Methode, mit der monomere phenolische Säuren sowie DFS und TriFS in kurzer Zeit

nebeneinander quantifiziert werden können. In AX wird zusätzlich der Gehalt an *p*-CS bestimmt, während in Pkt zusätzlich *cis*-Ferulasäure quantifiziert wird. Die Freisetzung der phenolischen Substanzen geschieht mit 2 M NaOH bei einer Hydrolysezeit von 18 h. Als interne Standardsubstanzen werden *ortho*-Cumarsäure (*o*-CS, für Monomere) sowie 5-5-monomethoxylierte DFS (für Oligomere) zugegeben. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wird nach Ansäuern mit Diethylether durchgeführt, die Etherphase im Stickstoffstrom getrocknet und schließlich in Methanol/Wasser (50/50, v/v) aufgenommen. Die Analyse der Monomere sowie Oligomere erfolgt mit getrennten Gradientenprogrammen. Dabei werden für die Detektion die unterschiedlichen Absorptionsmaxima von FS (321 nm), *cis*-Ferulasäure (308 nm), *p*-CS (308 nm) und *o*-CS (321 nm) verwendet. Durch eine Fünf-Punkt-Kalibrierung können die Monomere schließlich quantifiziert werden.

Die Detektion der Oligomere der FS erfolgt bei 280 nm. Die Zuordnung der Peaks geschieht durch Einordnung des Retentionsverhaltens, Vergleich der UV-Spektren sowie unter Zuhilfenahme von Standardsubstanzen. Zur Quantifizierung von DFS und TriFS werden die Korrekturfaktoren von Dobberstein & Bunzel (2010) verwendet, die für die Analyse mit internen Standardsubstanzen ermittelt wurden und somit eine Kalibrierung nicht zwingend erfordern. Da nur für ausgewählte OFS Korrekturfaktoren in der Literatur beschrieben sind, können auch nur diese quantifiziert werden. Ebendiese sind in Abb. 9.1 zusammengefasst. Dabei ist anzumerken, dass für die 8-*O*-4/8-*O*-4- und 8-5nc/8-*O*-4-TriFS Responsefaktoren verwendet wurden, die von Judith Schäfer im Rahmen ihrer Doktorarbeit ermittelt wurden (Schäfer, 2016). Diese gleichen jedoch, anders als die publizierten Korrekturfaktoren, keine Verluste durch die Probenvorbereitung aus, weswegen die so erhaltenen Gehalte lediglich als semiquantitativ anzusehen sind. Die Durchführung für die Analyse der AX und Pkt ist in Kap. 8.5.1 hinterlegt.

Die hier beschriebene Methode wurde ebenso verwendet, um die phenolischen Monomere und Oligomere in fertigen 2%igen Gelen zu bestimmen. Hierfür wurden entsprechend AX und Pkt in 2,5 ml Puffer über Nacht gelöst, anschließend durch Zugabe von Lac bzw. POD/H₂O₂ 2 h lang geliert und die Gele schließlich durch Zugabe von 2,5 ml 4 M NaOH alkalisch hydrolysiert, um vergleichbare Hydrolysebedingungen zu schaffen. Anschließend wurden die Proben analog zum Rohmaterial aufgearbeitet und analysiert (s. Kap. 8.5.2).

3.2.2.4 Analyse der Seitenkettenstrukturen

Die Strukturen der Seitenketten von Pkt und AX unterliegen einer hohen biologischen Variabilität und üben damit einhergehend einen unterschiedlichen Einfluss auf die

funktionellen Eigenschaften der Polysaccharide aus. So konnte gezeigt werden, dass die Strukturen von AN in Pkt aus Zuckerrüben die Emulgiereigenschaften bedingen können (Bindereif *et al.*, 2021). Sowohl in Pkt als auch in AX sind FS-Einheiten Teil der Seitenkettenelemente, was sich für AX auch auf die enzymatische Zugänglichkeit auswirken kann. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass FS-haltige AXOS schlechter durch die menschliche Dickdarmmikrobiota fermentiert werden können als ihre FS-freien Analoga (Snelders *et al.*, 2014). Zudem sind manche Arabinofuranosidasen nicht in der Lage, selbst einfache FS-haltige AX-Seitenketten abzuspalten (Rémond *et al.*, 2008; Schendel *et al.*, 2016c). Speziell AX aus Mais, insbesondere Popcornmais, sind durch komplexe Seitenkettenstrukturen gekennzeichnet. Dies könnte somit Einfluss auf die Fähigkeit der FS nehmen, sich an Reaktionen zu beteiligen.

Eine genaue Kenntnis über diese Seitenkettenstrukturen ist somit hilfreich, wenn Zusammenhänge zwischen der Polysaccharidstruktur und den technofunktionellen Eigenschaften untersucht werden sollen.

Mit Hilfe der Methylierungsanalyse (s. Kap. 3.2.2.2) können anhand der ermittelten Bindungstypen erste Aussagen über die Strukturen der vorhandenen Polysaccharide getroffen werden. Die genaue Lokalisierung spezieller Bindungstypen kann jedoch nicht immer bestimmt werden. Beispielsweise können *Arap* sowohl als terminale Einheiten von GN als auch intern im GN-Rückgrat gebunden vorliegen (Huisman *et al.*, 2001; Wefers *et al.*, 2014). Dabei bilden interne (1 → 4)-verknüpfte *Arap* identische PMAA wie (1 → 5)-gekoppelte *Araf*, weshalb diese mittels Methylierungsanalyse nicht unterschieden werden können. Bezüglich der Beschreibung FS-haltiger Seitenkettenstrukturen von Pkt und AX ist die Methylierungsanalyse auf Grund alkalischer Analyseschritte und der damit einhergehenden partiellen Verseifung estergebundener Verbindungen ungeeignet. Ein vielversprechender Ansatz, um Seitenkettenstrukturen zu charakterisieren stellt ihre partielle Hydrolyse bzw. Freisetzung mit anschließender Strukturcharakterisierung der freigesetzten Oligosaccharide dar. Dies wird im Folgenden sowohl für AN und GN in Pkt als auch für Seitenkettenelemente in AX gezeigt.

3.2.2.4.1 Freisetzung von Oligosacchariden

Eine saure Hydrolyse von AN und GN in Pkt hat eine unspezifische Spaltung und Modifikation der Polysaccharidstrukturen zur Folge, was den Nutzen zur Beschreibung der nativen Struktur in Frage stellt. Alternativen sind durch enzymatische Ansätze gegeben. *Exo*-Enzyme wie Arabinofuranosidasen finden aufgrund der unspezifischen Abspaltung von Ara vom Kettenende aus eher Anwendung bei der strukturellen Modi-

fikation von Pektinen und sind für die Freisetzung charakteristischer OS ungeeignet. Multienzympräparate wie Driselase mit Xylanase- und Pektinase-Aktivitäten wurden dagegen eingesetzt, um Pkt weitgehend abzubauen und das entstandene Hydrolysat auf hydroxyzimtsäurehaltige OS hin zu untersuchen (Ishii & Tobita, 1993; Ishii, 1994; Levigne *et al.*, 2004b). Der Einsatz von *endo*- α -(1 \rightarrow 5)-Arabinanasen bzw. *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactanase hat sich zur Freisetzung charakteristischer OS aus AN bzw. GN bewährt, da diese unspezifisch lineare Abschnitte innerhalb des AN- bzw. GN-Rückgrats spalten und somit die umgebenden verzweigten nativen Strukturen freisetzen (Westphal *et al.*, 2010c; Wefers *et al.*, 2015b). Durch eine vorhergehende Autoklavenbehandlung kann der Zellwandverbund gelockert werden, was in einer verbesserten enzymatischen Zugänglichkeit resultiert (Oosterveld *et al.*, 1996). Die anschließende Analyse der freigesetzten linearen und/oder verzweigten OS ermöglicht direkte Aussagen zur Komplexität der nativen Polysaccharidstrukturen, da chemische Modifikationen im Zuge saurer oder alkalischer Hydrolyseschritte vermieden werden (Westphal *et al.*, 2010c).

Für AX sind dagegen bis dato keine Enzyme bekannt, die spezifisch komplexe Seitenkettenelemente freisetzen können. Stattdessen werden Enzyme bzw. Enzympräparate mit *endo*-Xylanaseaktivität wie Driselase eingesetzt, die das Xylan-Rückgrat spalten und damit einhergehend Xylp-gebundene Seitenketten freisetzen können und so auch Informationen über die Substitution am Rückgrat liefern können (Ralet *et al.*, 1994a). Jedoch kann sich auch gezielt die erhöhte Säurelabilität von furanosidischen Strukturen im Vergleich zu pyranosidischen Strukturen bei der Freisetzung von OS aus AX zu Nutze gemacht werden. In AX sind die Seitenketten über Araf-Einheiten an das Xylp-Rückgrat gebunden (Vgl. Kap. 1.2.2.1). So können diese unter mild sauren Bedingungen abgespalten werden, während Bindungen zwischen Pyranosen weitestgehend erhalten bleiben (Saulnier *et al.*, 1995; Allerdings *et al.*, 2006). Allerdings kommt es bei zu harschen Bedingungen zu einer Hydrolyse der FS-Esterbindungen. Als geeignete Bedingungen für die maximale Abspaltung von Seitenketten aus AX bei minimaler Hydrolyse von FS etablierten Saulnier und Mitarbeiter (1995) die Verwendung von 50 mM TFA bei 100 °C für 2 h. Dies hat sich auch in weiteren Studien bewährt und wurde daher in dieser Arbeit eingesetzt (Allerdings *et al.*, 2006; Schendel *et al.*, 2015).

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Freisetzung von OS aus Pkt bzw. AX werden in Kap. 3.2.2.4.3 bzw. Kap. 3.2.2.4.4 genauer beschrieben.

3.2.2.4.2 Auftrennung der freigesetzten Oligosaccharide

Die freigesetzten OS stellen bei Hydrolyse von Pkt aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae sowie AX aus Getreiden Gemische von FS-freien sowie FS-haltigen OS dar. Je nach Ziel der Analyse kann das Gemisch mittels HPLC oder HPAEC chromatographisch aufgetrennt werden (Colquhoun *et al.*, 1990; Colquhoun *et al.*, 1994; Westphal *et al.*, 2010c; Wefers *et al.*, 2014; Wefers *et al.*, 2015b). Die Auftrennung von FS-freien OS mittels HPLC gestaltet sich auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der OS als schwierig. Gute Trennungen FS-freier OS konnten mittels *Porous graphitized carbon* (PGC)-Säulen erreicht werden, wobei die Retention vom Polymerisationsgrad sowie von der Sterik des Analyten abhängt (Pereira, 2008; Westphal *et al.*, 2010a). Die Phase ist aus sphärischen, porösen Partikeln aufgebaut, die auf molekularer Ebene aus Schichten hexagonal angeordneter Kohlenstoffatome zusammengesetzt sind. Je planarer die Struktur des Analyten, desto stärker sind die Interaktionen mit der planaren Graphitphase ausgeprägt, was in einer erhöhten Retention resultiert. Dabei interagieren die freien Elektronenpaare oder aromatischen π -Elektronen des Analyten mit der Graphitphase (Pereira, 2008). Gleichmaßen können OS mittels HPAEC aufgetrennt werden. Der Mechanismus wurde bereits in Kap. 3.2.2.1 für Monosaccharide beschrieben und gilt ebenso für OS. Die Trennung von ferulasäurehaltigen OS mittels HPAEC hat durch die alkalischen Bedingungen jedoch eine partielle Verseifung zur Folge, weswegen Informationen über die FS-Substitution verloren gehen.

Die Analyse FS-haltiger OS ist auf Grund ihrer vergleichsweise geringen Häufigkeit meist nur nach vorheriger Abtrennung von FS-freien OS möglich. Dies geschieht gewöhnlich durch langwierige Fraktionierungsschritte an Amberlite XAD 2- und Sephadex LH20-Materialien (Ishii & Tobita, 1993; Ishii, 1994; Levigne *et al.*, 2004b; Bunzel *et al.*, 2005; Allerdings *et al.*, 2006; Holck *et al.*, 2011). Hierbei werden die vergleichsweise unpolaren FS-OS am Material retardiert und können durch organische Lösemittel eluiert werden, während polarere Verbindungen zuvor mit Wasser abgetrennt werden. Zusätzliche Aufreinigungsschritte sind durch RP-Phasen wie C18- oder Phenylhexyl-Phasen möglich (Allerdings *et al.*, 2006).

Kap. 3.2.2.4.3 und Kap. 3.2.2.4.4 führen die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden zur chromatographischen Separierung der OS nochmals auf, um die Strukturen der AN und GN in Pkt sowie der FS-haltigen Seitenketten in AX zu beschreiben. Für die Analyse von FS-haltigen AN und GN wurde hierzu eine Methode weiterentwickelt, um die enzymatisch freigesetzten FS-haltigen OS von den FS-freien OS getrennt analysieren

zu können und um damit einhergehend die Umgebung der FS in den Polysacchariden näher zu beschreiben.

3.2.2.4.3 Screening von Arabinanen und Galactanen

Wefers & Bunzel (2016) entwickelten eine Methode, um freigesetzte AN- und GN-OS nach Verdau mit *endo*-Arabinanase und *endo*-Galactanase mittels HPAEC-PAD analysieren zu können. Dafür wurden für isolierte AN- und GN-OS Responsefaktoren ermittelt, anhand derer die Gehalte ebendieser durch Verwendung einer internen Standardsubstanz ohne Kalibrierung semiquantitativ bestimmt werden können. In Abb. 9.2 und Abb. 9.3 sind die in der Literatur beschriebenen Strukturen von AN- und GN-OS zusammengefasst, für die Responsefaktoren ermittelt wurden. Sie unterscheiden sich im Polymerisations- und Substitutionsgrad sowie speziell bei GN-OS durch interne *Arap*-Einheiten. Der Großteil dieser Strukturen wurde durch Arabinanase- bzw. Galactanase-Verdau aus Rotkleesprossen, Zuckerrüben, Kartoffeln und Amaranth isoliert, während u.a. die Struktur G-4b nach Verdau von GN aus Kartoffeln mit dem Enzymgemisch Driselase erhalten wurde (Wefers, 2016; Wefers & Bunzel, 2016). Einige der Strukturen (u.a. A-3a, G-3a) resultieren aus einem unvollständigem enzymatischen Verdau der Poly-/Oligosaccharide und sind demnach keine Hauptprodukte. Gleichermäßen weist die verwendete Arabinanase eine geringfügige Arabinofuranosidase-Nebenaktivität auf und katalysiert somit die Abspaltung der terminalen *Araf*-Einheiten, was in der Bildung der Verbindungen A-3b, A-5d und A-6b resultieren kann. Diese Verbindungen werden als Nebenstrukturen betitelt, da sie mutmaßlich keine nativen Strukturen repräsentieren (Wefers & Bunzel, 2016).

In dieser Arbeit wird die Methode nach Wefers & Bunzel (2016) verwendet, um AN- und GN-Strukturen in Pkt zu charakterisieren (s. Kap. 8.6.1). Dafür wurde das Rohmaterial in getrennten Ansätzen mit *endo*- α -(1 \rightarrow 5)-Arabinanase bzw. *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactanase inkubiert und der Überstand mittels HPAEC-PAD analysiert. Die Zuordnung geschieht durch Vergleich mit isolierten Standardsubstanzen sowie durch Kopplung der HPAEC mit MS.

Zusätzlich zur direkten Analyse der freigesetzten OS mittels HPAEC-PAD wurde die Methode von Wefers & Bunzel (2016) erweitert, um FS-haltige OS mitzuerfassen, die ebenso freigesetzt, jedoch wie bereits erwähnt im Zuge der chromatographischen Bedingungen der HPAEC teilweise verseift werden. Diese erweiterte Methode wurde insbesondere für Pflanzen der Familie Amaranthaceae entwickelt, deren AN und GN mit FS substituiert vorliegen. Aus diesem Grund wurden die extrahierten Pkt aus Zuckerrü-

ben sowie UBS- und LBS-Fractionen aus Amaranth und Quinoa als Probenmaterialien eingesetzt. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Enzymbedingungen hinsichtlich Enzymmenge und Inkubationsbedingungen nicht verändert. Die Entwicklung der chromatographischen Trennmethode wird in Kap. 4.2.1 ausgeführt, während die endgültige Durchführung Kap. 8.6.2 zu entnehmen ist.

3.2.2.4.4 Screening der Seitenkettenstrukturen von Arabinoxylanen

Schendel und Mitarbeiter (2016a) entwickelten eine Methode, um die freigesetzten ferulasäurehaltigen OS FA, FAX und FAXG (s. Abb. 1.5) nach milder Säurehydrolyse zu quantifizieren. Dabei wird die Probe lichtgeschützt 2 h lang mit 5 ml 50 mM TFA bei 100 °C hydrolysiert und die freigesetzten FS-OS schließlich mittels Festphasenextraktion an C18-Material aufgereinigt. Der Aufreinigungsschritt verhindert dabei eine Gelbildung, die im folgenden Reduktionsschritt auftreten kann. Nach Elution der FS-OS von der stationären SPE (engl. *Solid Phase Extraction*)-Phase mit MeOH werden diese mit Natriumborhydrid in ihre Zuckeralkohole reduziert. Als Lösungsmittel wird hierbei DMSO eingesetzt, was die Lobry de Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung der reduzierenden Ara in andere Monosaccharide verhindert. Die Reduktionsreaktion wird schließlich durch Zugabe von HCl gestoppt und die Lösung mittels HPLC-DAD/MS analysiert. Hierbei dient die MS zur Signalzuordnung, während die Quantifizierung mittels DAD bei 325 nm durchgeführt wurde. Zur Quantifizierung wird eine externe Kalibrierung mit FA/FAX/FAXG verwendet, in welcher die Standardsubstanzen analog zur Probe reduziert wurden.

Das Screening von FA, FAX und FAXG wurde in dieser Arbeit sowohl für die extrahierten AX als auch für 2%ige Gele daraus durchgeführt. Die Durchführungsvorschriften sind in Kap. 8.7 hinterlegt. Für die Analyse der Gele wurden AX zunächst in 4 ml Puffer über Nacht gelöst, anschließend durch Zugabe von Lac bzw. POD/H₂O₂ 2 h lang geliert und die Gele schließlich durch Zugabe von 1 ml 250 mM TFA hydrolysiert, um vergleichbare Hydrolysebedingungen zum Rohmaterial zu schaffen. Anschließend wurden die Proben analog zum Rohmaterial aufgearbeitet und analysiert.

3.2.2.4.5 Strukturelle Charakterisierung der Oligosaccharide

In dieser Arbeit sollen zusätzlich Analysen durchgeführt werden, um Strukturen bislang unbekannter FS-OS aufzuklären, die im Zuge der Screeningmethode für FS-haltige GN-OS identifiziert wurden. Zur strukturellen Charakterisierung von OS eignet sich die Kopplung der HPLC oder HPAEC mit MS, anhand derer das Molekulargewicht sowie die molekulare Struktur schon in geringen Konzentrationen ermittelt werden

kann. Die Zugabe von Alkaliionen zum Eluenten ermöglicht in der Elektrosprayionisations (ESI)-Quelle eine gezielte Bildung von Addukten zur Messung im positiven Modus, was bei der Massenbestimmung berücksichtigt werden muss. Neben Na^+ -Ionen, die meist ubiquitär im Messsystem enthalten sind, werden insbesondere Li^+ -Ionen eingesetzt (Westphal *et al.*, 2010b; Wefers *et al.*, 2015b). Die ESI stellt eine sanfte Ionisationstechnik dar und ermöglicht den Übergang gelöster Analyten in die Gasphase. Nach Überführung der Analyt-Ionen in den Massenanalysator können sie dort nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt werden, womit die Masse erhalten werden kann. MS^n -Experimente zeichnen sich dadurch aus, dass durch Kollision der Ionen mit Stoßgas im Massenanalysator Fragmentierungen induziert werden können, anhand derer auf die Struktur des Moleküls geschlossen werden kann bzw. Hinweise darauf erhalten werden können. In einer Ionenfalle kann diese Fragmentierung stufenweise auf Ionen und dessen Fragmentionen angewandt werden, womit das Molekül sukzessive fragmentiert werden kann. Die Anzahl der Fragmentierungsschritte wird durch den Exponenten angegeben, wobei eine Fragmentierung einem MS^2 -Experiment entspricht. Das Fragmentierungsmuster der OS in MS^n -Experimenten lässt Rückschlüsse auf Substitutionspartner und -stellen zu. Dabei liefert die Spaltung der glykosidischen Bindungen Information über die Bindungspartner, während Spaltungen innerhalb des Rings Substitutionen genauer lokalisieren (Domon & Costello, 1988; Garozzo *et al.*, 1990). Diese Technik wurde bislang u.a. zur strukturellen Aufklärung von FS-haltigen OS eingesetzt (Quéméner & Ralet, 2004; Ralet *et al.*, 2005).

Neben MS-Experimenten werden insbesondere NMR-spektroskopische Methoden eingesetzt, um die Strukturen von OS näher aufzuklären. Damit können u.a. Informationen über die Konfiguration am anomeren Zentrum sowie die Zusammensetzung des OS inklusive der Bindungsverhältnisse erhalten werden. Jedoch sind auf Grund der geringen Empfindlichkeit vergleichsweise hohe Konzentrationen der Analyten notwendig. Als Lösemittel bietet sich u.a. D_2O an, da es einerseits ein gutes Lösungsmittel für OS darstellt, andererseits aber auch die aziden Protonen der Hydroxylgruppen mit Deuterium austauscht. Dadurch werden nur Signale der kohlenstoffgebundenen Protonen sichtbar, und das Spektrum wird somit übersichtlicher. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Spektren wird eine Referenzsubstanz wie z.B. Aceton zur Probenlösung gegeben, auf die die Spektren jeweils referenziert werden können. Auf Grund der ähnlichen chemischen Umgebung der Protonen in OS bieten ^1H -NMR-Spektren oft wenig Information. Häufig grenzen sich lediglich die Protonensignale im anomeren Bereich (4,5-5,5 ppm) ab und können so als Anhaltspunkte für weitere Experimente genommen werden. Gleichmaßen liefert

die Bestimmung der Kopplungskonstanten der anomeren Protonen Information über die anomere Konfiguration des Monosaccharids. Gleichzeitig induzieren aromatische Protonen wie die der FS in FS-haltigen OS Resonanzsignale im Tieffeld zwischen 7 und 9 ppm. Durch Etablierung einer zweiten Dimension in 2D-NMR-Experimenten wird der Informationsgehalt stark erhöht. ^1H - ^{13}C -*Hetero Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experimente trennen direkt gebundene C- und H-Signale in die C- und H-Dimension auf, wodurch ihre charakteristischen chemischen Verschiebungen erhalten werden, die Rückschlüsse auf die chemische Umgebung liefern können. Durch ^1H - ^{13}C -*Hetero Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Experimente können Resonanzsignale von H-C-Paaren erzeugt werden, die über mehrere Bindungen miteinander koppeln. Dadurch kann die Nachbarschaft der Signale abgebildet und so das Molekül sukzessive aufgeschlüsselt werden. So kann einerseits die glykosidische Bindung als auch die Bindung der FS am OS lokalisiert werden.

3.2.2.5 Bestimmung des Veresterungsgrads

Wie in Kap. 1.3.1.3 beschrieben, haben der DM und DA einen erheblichen Einfluss auf die Bildung physikalischer Pkt-Gele und können somit durch Ausbildung physikalischer Interaktionen auch die Eigenschaften kovalenter Gele beeinflussen. Bei der Bewertung der kovalenten Pkt-Gele in dieser Arbeit sollten diese Charakteristika somit berücksichtigt werden. Methoden, die den DM und DA in einem Ansatz analysieren, beruhen meist auf einer alkalischen Hydrolyse sowie der anschließenden Analyse der freigesetzten estergebundenen Substituenten mit HPLC-RI (Voragen *et al.*, 1986; Levigne *et al.*, 2002a), GC-MS (Savary & Nuñez, 2003) oder ^1H -NMR-Spektroskopie (Müller-Maatsch *et al.*, 2014). Die Analyse mittels NMR-Spektroskopie bietet durch die Verwendung einer internen Standardsubstanz den Vorteil, die Analyten ohne Kalibrierung direkt quantifizieren zu können. Unter den verwendeten Bedingungen von Müller-Maatsch und Mitarbeitern (2014) induzieren Methanol ($\delta_{\text{H}}(\text{CH}_3\text{OH}) = 3,3 \text{ ppm}$) und Essigsäure ($\delta_{\text{H}}(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,8 \text{ ppm}$) gut aufgelöste Signale im Hochfeld, was gegenüber potenzieller Coelutionen in den HPLC-RI-Methoden vorteilhaft ist (Voragen *et al.*, 1986; Levigne *et al.*, 2002a; Müller-Maatsch *et al.*, 2014). Der DM bzw. DA stellt den jeweiligen Gehalt pro 100 GalA-Einheiten im Polymer dar. Somit muss zusätzlich der Gehalt an GalA bestimmt werden, dessen Analyse meist photometrisch nach Säurehydrolyse unter hohen Temperaturen durchgeführt wird. Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) verwenden *meta*-Hydroxydiphenyl als Farbreagenz für die Furane, die im Zuge der Säurehydrolyse aus den freigesetzten Uronsäuren entstehen. Die Anwesenheit von Neu-

tralzuckern kann durch die Bildung von farbigen Produkten während der thermischen und säurehydrolytischen Behandlung zu Interferenzen führen, die nur teilweise durch Blindwertmessungen berücksichtigt werden können. Somit werden Uronsäuren unselektiv quantifiziert, sodass der gemessene GalA-Gehalt tendenziell überbestimmt wird (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Kintner & Buren, 1982). Da die quantitative Erfassung von Uronsäuren aus Pkt nach Hydrolyse bis dato nicht sichergestellt werden kann, ist auch die selektive Absolutbestimmung von Uronsäuren mittels HPAEC-PAD limitiert (Garna *et al.*, 2004; Garna *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wird hier der Gehalt an GalA über die Methode nach Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) bestimmt, während Methanol- und Essigsäuregehalte nach alkalischer Freisetzung mittels NMR-Spektroskopie nach Müller-Maatsch und Mitarbeitern (2014) quantifiziert werden, um den DM sowie Acetylierungsgrad von Pkt zu ermitteln. Die Durchführungen sind in Kap. 8.8 hinterlegt.

3.3 Bildung von kovalenten Hydrogelen

Die in dieser Arbeit untersuchten FS-haltigen Polysaccharidgele resultieren aus einer enzymatisch katalysierten oxidativen Kopplung von AX bzw. Pkt mit Lac und POD/H₂O₂. Mitentscheidend für die Gelbildung ist das Lösungsmittel, da dieses die Grundlage für die enzymatischen Bedingungen bildet und damit einhergehend die Vergleichbarkeit der Gele maßgeblich beeinflussen kann. Dabei stellt das simpelste Lösungsmittel Wasser dar, was jedoch bei unterschiedlich extrahierten Polysacchariden in abweichenden pH-Werten der Probenlösungen resultieren kann. So wiesen im Rahmen dieser Arbeit Lösungen der sauer extrahierten Pkt aus Zuckerrüben (Pkt2-6) in Wasser pH-Werte von 2,8-3,4 auf, während der pH-Wert des nach Autoklavierung gewonnenen Pkt1 in Wasser bei pH 6 liegt und der pH-Wert von wässrigen AX-Lösungen bei 4,5. Aus diesem Grund werden in der Literatur meist niedrigmolare Puffer wie 0,05-0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer oder 0,05 M Natriumacetat-Puffer für einen pH-Bereich von 5-5,5 eingesetzt, was dem pH-Optimum der eingesetzten Enzyme entspricht (Carvajal-Millán *et al.*, 2005a; Castillo *et al.*, 2009; Zaidel *et al.*, 2012). Auf Grund der geringeren Ionenlast wird in dieser Arbeit ein 0,05 M Natriumacetat-Puffer (pH 5) verwendet. Neben der Art des Lösungsmittels kann die Dauer der Hydratisierung vor der enzymatischen Umsetzung die Homogenität der Gele beeinflussen. So dauert es oft mehrere Stunden, bis die Polysaccharide vollständig in Lösung vorliegen. Daher ist vor jeder Gelierung anzuraten, die Polysaccharide über Nacht vollständig zu hydratisieren, was in homogenen, klumpenfreien Probenlösungen resultiert. Im Vergleich zur Hydratisierung in Wasser weisen die entstandenen

Polysaccharidlösungen in Puffer subjektiv eine leicht höhere Viskosität auf, wobei Lösungen aus sauer extrahierten Pkt im Vergleich zu AX und Pkt nach Autoklavierung höher viskos vorliegen. Die Viskosität steigt zusätzlich proportional zur Menge des gelösten Polysaccharids. Gleichzeitig verändern sich dadurch auch die Eigenschaften der daraus resultierenden Gele. In der Literatur werden vorrangig 0,5-6 %ige Lösungen (w/v) zur Gelbildung eingesetzt (Oosterveld *et al.*, 2000b; Carvajal-Millán *et al.*, 2005b; Martínez-López *et al.*, 2013). Da die Probenlösungen ab einem Polysaccharidanteil von 4% auf Grund ihrer Viskosität schwer zu handhaben waren, beschränken sich die Untersuchungen in dieser Arbeit auf 1-4%ige Gele. Durch Zugabe von Enzymlösung kommt es schließlich zur oxidativen Kopplung der Polysaccharide und damit einhergehend zur Ausbildung der Hydrogele. Dafür werden wie bereits beschrieben die Systeme Lac/O₂ bzw. POD/H₂O₂ eingesetzt (Vgl. Kap. 1.3.2). Die eingesetzten Enzymaktivitäten in der Literatur, bezogen auf die Polysaccharidmenge, variieren dabei zwischen 0,01 und 2 U/mg, wobei meist Aktivitäten im Bereich von 0,1 U/mg verwendet werden (Vansteenkiste *et al.*, 2004; Carvajal-Millán *et al.*, 2005b; Castillo *et al.*, 2009; Munk *et al.*, 2020). In Studien zu AX-Gelen stellten Castillo und Mitarbeiter (2009) fest, dass die *cross-link*-Geschwindigkeit von Lac ab einem Wert von 0,072 U/mg nicht weiter ansteigt. Dagegen untersuchten Zaidel und Mitarbeiter (2012) die Gelierung von Pkt aus Zuckerrüben mit Lac und POD mit Enzymmengen von umgerechnet 0,005-0,08 U/mg. Bei Betrachtung von *G'* als Orientierungswert konnten ab einer Aktivität von 0,04 U/mg keine größeren Unterschiede festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde für sämtliche Gele eine Enzymmenge von 0,08 U/mg sowohl für Lac- als auch POD-katalysierte Gele eingesetzt. Die POD-katalysierte Gelierung ist neben der Enzymaktivität zusätzlich von der Konzentration an H₂O₂ abhängig. Zu niedrige Konzentrationen können die Gelierung verhindern, während zu hohe Konzentrationen ggf. in einem oxidativen Abbau der monomeren und oligomeren FS resultieren (Zaidel *et al.*, 2012). Sinnvoll ist es daher, die Menge an H₂O₂ an den Gehalt von FS in der Probe anzupassen, da pro mol FS 0,5 mol H₂O₂ verbraucht werden. Pkt2 wies den höchsten Gehalt an FS auf, woraus nach Norsker und Mitarbeiter (2000) eine theoretische Menge von 0,06 μmol H₂O₂/mg Polysaccharid ermittelt wurde. Diese Menge stellt einen 1,4fachen Überschuss bezogen auf den molaren FS-Gehalt von Pkt2 dar und wurde für sämtliche Gele der Arbeit eingesetzt. Zur chemischen Analyse der Gele wurde eine Gelierzeit von 2 h gewählt, die auf Grundlage der Ergebnisse der rheologischen Messungen als ausreichend befunden wurde. Da eine zu lange Standzeit der Gele zum partiellen Abbau der Gelstrukturen führte, wurden die Gele vor jeder Analyse im entsprechenden Probengefäß frisch hergestellt. Für die

NMR-Messungen konnte die Gelierzeit nicht strikt eingehalten werden, weswegen die Gele am Abend zuvor in den jeweiligen NMR-Tubes hergestellt wurden.

3.4 Rheologische Messungen

Die Beschreibung von Hydrogelen findet meist auf makroskopischer Ebene anhand ihrer viskoelastischen Eigenschaften statt, anhand derer Aussagen u.a. zur Elastizität getroffen werden können. Als Parameter gelten hier G' und G'' zur Beschreibung des elastischen und viskosen Verhaltens des Gels, was bereits in Kap. 1.4.1 erläutert wurde. Der Zugang zu diesen Parametern ist durch rheologische bzw. rheometrische Messungen gegeben. Die Rheologie oder auch Fließkunde ist die Wissenschaft, die sich mit dem Verformungs- und Fließverhalten von Materie befasst, während Rheometrie das Messverfahren darstellt, um die rheologischen Eigenschaften zu beschreiben.

Für viskoelastische Materialien wie Gele werden hier besonders Rotationsrheometer eingesetzt, dessen Messsystem aus zwei rotationssymmetrischen Körpern besteht, zwischen denen die Probe aufgetragen wird. In dieser Arbeit wurde ein koaxiales Zylinder-System aus einem oberen Zylinder und einem unteren, festen Hohlzylinder verwendet, das insbesondere für Flüssigkeiten wie Polysaccharidlösungen geeignet ist (s. Abb. 3.1). Dabei wird die untere Geometrie fixiert, während die obere ausgelenkt werden kann. In Rotationsmessungen wird diese kontinuierlich in eine Richtung gedreht, wodurch die Probe eine Deformation erfährt. Für Gele sind stattdessen jedoch hauptsächlich Oszillationsmessungen von Bedeutung, bei denen die Bewegungsrichtung der oberen Geometrie in einer Kreisfrequenz ω und Amplitude $\gamma_{s,0}$ sinusförmig wechselt. Aus der Bewegung erfährt die Probe eine sinusförmige Deformation $\gamma_s(t)$:

$$\gamma_s(t) = \gamma_{s,0} \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad (5)$$

Ihre Ableitung bildet die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}_s(t)$.

$$\dot{\gamma}_s(t) = \dot{\gamma}_{s,0} \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad (6)$$

Als Antwort wird die Schubspannung $\tau(t)$ (Gl. (7)) über das Drehmoment erhalten, die gegenüber der Deformation einen Phasenwinkel δ aufweist, was in Abb. 3.2 veranschaulicht wird.

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad (7)$$

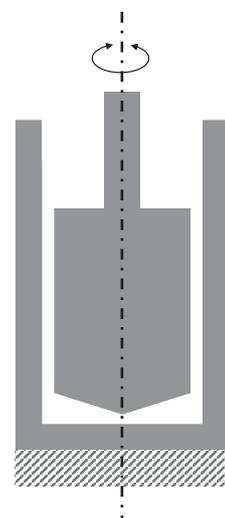


Abb. 3.1: Koaxiales Zylinder-Messsystem aus einem unteren, statischen Hohlzylinder und beweglichen, oberen Zylinder

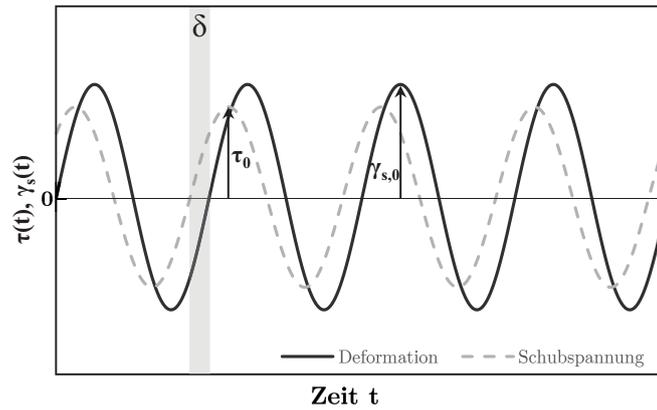


Abb. 3.2: Sinusförmige Deformation $\gamma_s(t)$ mit der Amplitude $\gamma_{s,0}$ als Funktion der Zeit t sowie die resultierende sinusförmige Schubspannung $\tau(t)$ mit der Amplitude τ_0 und Phasenverschiebung δ als Antwortsignal in oszillatorischen Messungen

Die erhaltene Schubspannung liefert über die Phasenverschiebung die Information über das Verhältnis des elastischen und viskosen Anteils der Probe. Für ideal elastische Proben gilt $\delta = 0^\circ$, da sich die Deformation proportional zur Schubspannung verhält (vgl. Kap. 1.4.1). In ideal viskosen Proben dagegen verhält sich die Schergeschwindigkeit (s. Gl. (6)) proportional zur Schubspannung, was in einer Phasenverschiebung von 90° resultiert. Viskoelastische Materialien weisen somit Phasenverschiebungen zwischen 0 und 90° auf. Über den Phasenwinkel sowie die Amplituden von Deformation und Schubspannung werden nach Gl. (8) und Gl. (9) schließlich G' und G'' berechnet, deren Herleitungen hier nicht aufgeführt werden.

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_{s,0}} \cdot \cos(\delta) \quad (8)$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_{s,0}} \cdot \sin(\delta) \quad (9)$$

Das Verhältnis von G'' und G' ist auch als Verlustfaktor $\tan \delta$ bekannt und liefert einen schnellen Überblick über die Viskoelastizität.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (10)$$

So liegt bei $\tan \delta < 1$ ein Gel vor, da der elastische Anteil überwiegt.

Bei der Messung muss gewährleistet sein, dass diese im linear viskoelastischen Bereich der Probe durchgeführt wird, in dem sich die Probe bei Entlastung reversibel zurückbilden kann und somit die Struktur der Probe während der Messung nicht zerstört wird. Dieser Bereich muss im Vorfeld durch einen Amplitudentest abgegrenzt werden. Dabei wird das Gel bei konstantem ω einem stufenweise logarithmisch steigenden $\gamma_{s,0}$ ausgesetzt (Abb. 3.3). Ab einer gewissen Belastung bricht die Gelstruktur, was an einer Abnahme von G' und G'' zu beobachten ist.

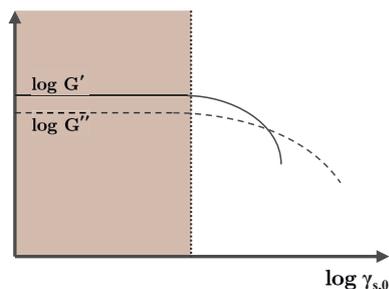


Abb. 3.3: Ergebnis des Amplitudentests als Funktion von G' und G'' eines Gels mit $G' > G''$. Der lineare Verlauf von G' und G'' mit steigender Deformation $\gamma_{s,0}$ begrenzt den linear viskoelastischen Bereich (rot).

In einem Frequenztest dagegen kann durch Variation von ω bei konstantem $\gamma_{s,0}$ das zeitabhängige Verhalten der Gele beschrieben werden. Dabei wird aus Gründen der Messzeiterparnis meist bei hohen Frequenzen gestartet, die während der Messung stufenweise gesenkt werden. Hohe Frequenzen liefern Rückschlüsse auf das Kurzzeitverhalten, während niedrige Frequenzen das Langzeitverhalten widerspiegeln. So gilt für stabile Gele $G' > G''$ über den gemessenen Frequenzbereich.

In dieser Arbeit wurden oszillatorische Messungen durchgeführt, um einerseits den Verlauf der Gelierung zu un-

tersuchen und andererseits, um die resultierenden Gele hinsichtlich ihrer Viskoelastizität einzuordnen. Zusätzlich wurden Frequenz- und Amplitudentests durchgeführt. Hierfür wurde der Hohlzylinder zunächst auf 4 °C temperiert, bevor er mit 1-4%igen Polysaccharidlösungen befüllt wurde. Nach Zugabe von Lac bzw. H_2O_2 /POD wurde die Messung gestartet. Durch rasche Temperierung des Hohlzylinders auf 25 °C wurde der Verlauf der Gelierung über einen Zeitraum von 2 h anhand von G' und G'' sowie $\tan \delta$ bei konstantem $\gamma_{s,0}$ und ω dokumentiert. Direkt im Anschluss an die Messung wurde das Gel mittels Frequenztest im Bereich von 16 Hz bis 0,016 Hz vermessen. Durch anschließende Amplitudentests (0,1 - 100 %) wurde der linear viskoelastische Bereich jeder Probe überprüft. So bestätigten sich $\gamma_{s,0} = 5\%$ sowie eine Frequenz von umgerechnet 1 Hz als geeignete Parameter der Messungen. Die Durchführung zu den rheologischen Messungen der Gele ist in Kap. 8.9 hinterlegt.

3.5 Diffusionsmessungen mittels NMR

Eine mikroskopische Herangehensweise zur Charakterisierung von Hydrogelen stellt, wie in Kap. 1.4.2.2 erwähnt, die Messung der Diffusion von Wasser oder darin gelösten Gastmolekülen im Gelnetzwerk dar (Guo *et al.*, 2019). Der Parameter D_{eff} zur Beschreibung der Diffusion kann hierbei u.a. nicht-invasiv mittels NMR bestimmt werden. Dazu werden PFG-Experimente eingesetzt, in denen durch gepulste Magnetfeldgradienten eine Ortsabhängigkeit des Magnetfelds implementiert wird, um dadurch eine Positionsänderung von Molekülen detektieren zu können. Die 1H -NMR ist hierbei auf Grund der natürlichen Häufigkeit von 1H (>99,9%) sowie des hohen gyromagnetischen Verhältnis γ deutlich empfindlicher als die NMR an anderen NMR-aktiven Kernen wie ^{13}C , womit sie insbesondere für Diffusionsmessungen von Wasser geeignet ist. Dazu können mittels

NMR-Messungen simultan mehrere Analyten in einer Messung erfasst werden, sofern Signalüberlappungen ausgeschlossen werden. Neben dem Diffusionsverhalten gelöster Analyten wurde auch das von optisch nicht-transparenten Materialien wie Nanopartikeln analysiert (de Kort *et al.*, 2015).

In Abb. 3.4 ist die Pulssequenz der in dieser Arbeit verwendeten PFG-STE-NMR dargestellt.

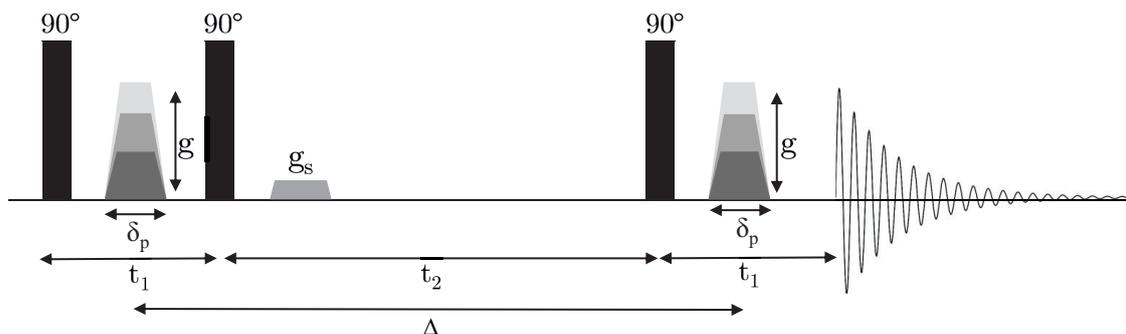


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der *Pulsed Field Gradient-Stepped Echo*-Pulssequenz. Ein 90° -Puls lenkt die Magnetisierung in die Transversalebene aus. Durch einen Gradientenpuls der Dauer δ_p und Stärke g werden die Spins örtlich codiert. Ein zweiter 90° -Puls nach der Zeit t_1 bewirkt eine $-z$ -Ausrichtung der Magnetisierung, bevor ein Spoilerpuls g_s transversale Magnetisierungsanteile entfernt. Anschließend wird die Magnetisierung nach der Zeit t_2 durch einen dritten 90° -Puls zurück in die Transversalebene gelenkt, bevor nach der Diffusionszeit Δ ein identischer Gradientenpuls die Phasen decodiert. Das stimulierte Spin-Echo wird anschließend detektiert.

Hierbei wird die makroskopische Magnetisierung durch einen 90° -Puls zunächst in die Transversalebene ausgelenkt. Dies stellt gleichzeitig den Startpunkt von Relaxationsprozessen dar, mit dem Ziel, den thermischen Gleichgewichtszustand wiederherzustellen. Die longitudinale oder auch Spin-Gitter-Relaxation bewirkt den Rückgang der Magnetisierung in $+z$ -Richtung. Sie wird durch die longitudinale Relaxationszeit T_1 beschrieben. Dagegen nimmt während der transversalen oder Spin-Spin-Relaxation die Phasenkohärenz der Magnetisierung in der Transversalebene ab. Sie wird über T_2 charakterisiert. Sowohl T_1 als auch T_2 sind molekulspezifische Größen.

In PFG-Experimenten wird nach Anregung ein Gradientenpuls der Amplitude g und Dauer δ_p überlagert. Dadurch erfahren Kernspins abhängig von ihrer Position eine linear variierende Magnetfeldstärke entlang der z -Achse, was in einer Ortsabhängigkeit der Larmorfrequenz und damit einhergehend der Magnetisierungsphase resultiert. In Folge liegen die Magnetisierungen chemisch äquivalenter Kerne wie z.B. der ^1H -Protonen von Wasser entlang der z -Achse phasenverschoben vor. Ein weiterer 90° -Puls in der PFG-STE-NMR lenkt die Magnetisierungen in $-z$ -Richtung aus, sodass die Magnetisierung lediglich nach T_1 relaxiert, wodurch die mögliche Diffusionszeit meist (wenn

$T_2 \ll T_1$) verlängert wird. Ein Spoilerpuls g_s entfernt schließlich alle verbliebenen transversalen Magnetisierungsanteile, bevor ein dritter 90° Puls die Magnetisierung zurück in die Transversalebene lenkt. Durch erneute Einstrahlung eines Gradientenpulses der identischen Amplitude und Dauer nach der Diffusionszeit Δ wird das Spinsystem refokussiert, womit schließlich ein stimuliertes Spin-Echo-Signal akquiriert wird. Kernspins, die während Δ stationär in ihrer Position verharren, weisen keine Phasenverschiebung auf und werden somit refokussiert. Dagegen befinden sich Kernspins, die während Δ entlang der z -Achse diffundieren, bei Refokussierung in einem abweichenden Magnetfeld und können dadurch nicht decodiert werden, womit sie nicht zum Spin-Echo-Signal beitragen. Demnach sinkt die Signalintensität mit steigendem Δ oder g . Durch Variation von Δ kann die Wegstrecke eines Moleküls innerhalb eines Gelnetzwerks abgebildet werden, was Rückschlüsse auf die Mikroumgebung ermöglicht (Latour *et al.*, 1993; de Kort *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2019). In der PFG-STE-NMR wird Δ durch T_1 limitiert: Nach $\approx 5T_1$ kann kein Signal mehr detektiert werden.

Gewöhnlich werden NMR-Diffusionsmessungen durch Inkrementierung von g durchgeführt. In Abb. 3.5 ist dies am Beispiel eines 4%igen AX-Gels (w/v) gezeigt.

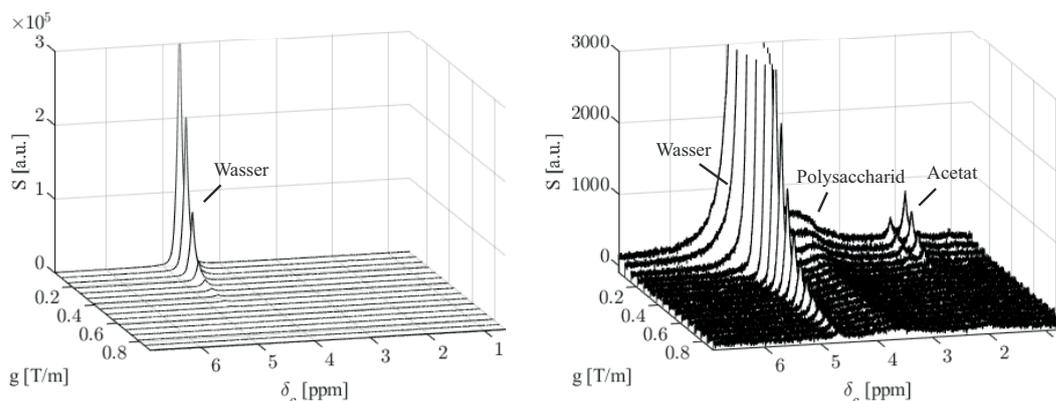


Abb. 3.5: Waterfall-Plot eines ^1H -Pulsed Field Gradient-Stimulated Echo-NMR Spektrums eines Arabinoxylan-Gels (links). Rechts ist der Waterfall-Plot nach Vergrößerung um etwa den Faktor 100 dargestellt, um Signale von Molekülen in geringerer Konzentration anzuzeigen.

Das Signal bei ca. 4,7 ppm wird Wasser zugeordnet, das zu einem Anteil von 96 % enthalten ist und demnach das Spektrum dominiert. Durch entsprechende Vergrößerung konnten Signale von Komponenten hervorgehoben werden, die in deutlich geringeren Anteilen enthalten sind, beispielsweise des Polysaccharids oder das von Acetat (ca. 2,1 ppm), das durch die Verwendung eines Natriumacetatpuffers im Gel vorliegt. Mit steigender Gradientenstärke nehmen die Signale von Wasser und Acetat ab, während sich die Polysaccharidsignale auf Grund ihrer langsameren Diffusion kaum verändern. Der Signalzerfall kann nach Stejskal-Tanner als Funktion von g , δ_p , Δ , dem gyromagne-

tischen Verhältnis γ sowie D modelliert werden (Stejskal & Tanner, 1965):

$$\frac{S}{S_0} = \exp \left\{ -D_{eff} \cdot (\gamma \cdot g \cdot \delta_p)^2 \cdot \left(\Delta - \frac{\delta_p}{3} \right) \right\} \quad (11)$$

Dabei entspricht S_0 der Signalintensität ohne Gradient. Die Inkrementierung von g bei konstantem δ_p und Δ ermöglicht die Bestimmung von D_{eff} durch Modellierung der experimentellen Daten mit Gl. (11). D_{eff} ist im Gegensatz zu D von Δ abhängig, was durch Variation von Δ überprüft wird. Hierbei nimmt D_{eff} , wie in Kap. 1.4.2.2 beschrieben, mit steigendem Δ ab und wird für hohe Δ konstant. Der Verlauf kann mittels Latour-Pade-Gleichung (Gl. (12)) modelliert werden (Latour *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2019).

$$\frac{D_{eff}}{D_0} = 1 - \left(1 - \frac{1}{\tau_{Tort}} \right) \cdot \frac{a \cdot \sqrt{\Delta} + b \cdot \left(1 - \frac{1}{\tau_{Tort}} \right) \cdot \Delta}{\left(1 - \frac{1}{\tau_{Tort}} \right) + a \cdot \sqrt{\Delta} + b \cdot \left(1 - \frac{1}{\tau_{Tort}} \right) \cdot \Delta} \quad (12)$$

D_0 entspricht dem Diffusionskoeffizient bei unendlicher Verdünnung, während a und b Hydrogel-spezifische Fitparameter darstellen. Für große Δ nähert sich D_{eff}/D_0 asymptotisch dem Wert $\frac{1}{\tau_{Tort}}$ an, womit die Tortuosität τ_{Tort} als Umwegwahrscheinlichkeit extrahiert werden kann. Sie beschreibt die geometrische Hinderung im Vergleich zu einem System mit unendlicher Verdünnung (Guo *et al.*, 2019).

In dieser Arbeit wurde die PFG-STE-NMR auf ausgewählte Pkt- und AX-Gele nach enzymatischer Kopplung mit Lac/O₂ bzw. POD/H₂O₂ angewandt. Unter Variation von Δ wird $D_{eff}(\Delta)$ von Wasser und Glc gemessen, und damit einhergehend wird die mikroskopische Umgebung der Hydrogele näher beleuchtet. Die Diffusion von Wasser wurde dabei mittels ¹H-NMR untersucht. Für die Messung von Glc wurde stattdessen das ¹³C-Isotop als Kern gewählt, um Signalüberlappungen zu vermeiden. Auf Grund der natürlichen Häufigkeit von ¹³C von 1,1 % wird durch Verwendung von ¹³C₆-angereicherter Glc die Sensitivität der Messung erhöht. Dazu wurde eine Glucosekonzentration von 50 mg/ml im Gel gewählt, die einen Kompromiss zwischen physiologischen Bedingungen im menschlichen Verdauungstrakt und Quantifizierbarkeit in der NMR-Messung darstellt. Die verwendeten Experiment- und Prozessierungsparameter sind in Kap. 8.10 zusammengefasst. Für die Bestimmung von D_{eff} aus den Diffusionsdaten wurde nach Prozessierung der Spektren in TopSpin 4.1.3 das Programm Dynamics Center (Version 2.6.2) der Firma Bruker verwendet. Die Signalintensität des Wassersignals (ca. 4,7 ppm) wurde durch Setzen eines Integrals der Breite 0,4 ppm beim Signalmaximum ermittelt, um Signalüberlappungen sowie den Einfluss von Phasenartefakten zu minimieren. Gleichermaßen wurde die Signalintensität der Glc durch Integration des gesamten ¹³C-Signalsbereichs der Glc (ca. 60-101 ppm) bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln wird zunächst die Erarbeitung grundlegender Parameter zur Gewinnung verschiedener Pkt- und AX-Fractionen dargestellt, bevor ihre umfassende Charakterisierung beschrieben wird. Zur Charakterisierung von Pkt wird auch die Entwicklung einer Methode beschrieben, mit der FS-haltige AN und GN charakterisiert werden können. Im Anschluss an die vollständige Charakterisierung der extrahierten Polysaccharide werden diese oxidativ gekoppelt, und die damit einhergehenden Veränderungen der phenolischen Komponenten werden dokumentiert. Mittels Rheologie und PFG-STE-NMR sollen die Geleigenschaften der extrahierten Polysaccharide auf unterschiedlichen Längenskalen untersucht werden.

4.1 Gewinnung des Probenmaterials

4.1.1 Pektinextraktion und -modifikation

Die Variation der Extraktionsbedingungen ermöglichte die Gewinnung strukturell unterschiedlicher Pkt aus Zuckerrüben. Die resultierenden Ausbeuten aus gemahlene Zuckerrübenschnitzeln sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Bei Betrachtung der säureextrahierten Pkt (Pkt2-6) zeigte sich, dass bei niedrigeren pH-Werten eine höhere Ausbeute erzielt werden kann. Gleichermaßen steigt die Ausbeute mit der Extraktionsdauer von 14,1 g/100 g nach 1 h auf 20,6 g/100 g ZRS nach 16 h. Dies konnte bereits in der Literatur gezeigt werden (Michel *et al.*, 1985). Eine Vorbehandlung mit Ultraschall hatte eine geringfügige Abnahme der Ausbeute zur Folge, während die Autoklavierung hinsichtlich der Ausbeute eine Alternative zur Säureextraktion bietet, um in kurzer Zeit vergleichsweise große Mengen Pkt zu erhalten (15,0 g/100 g ZRS).

Tab. 4.1: Ausbeuten der Extraktion sechs verschiedener Pektine aus Zuckerrübenschnitzeln (ZRS) in [g/100 g ZRS] \pm R/2 (n = 2)

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
Ausbeute [g/100 g ZRS]	15,0 \pm 0,2	14,1 \pm 0,4	17,3 \pm 0,0	20,6 \pm 0,7	10,1 \pm 0,9	12,2 \pm 0,2

Die Extraktion mit Säure ist in der Literatur die Methode der Wahl zur Extraktion von Pkt. Aus diesem Grund wurde für die enzymatische Modifikation Pkt2 als Ausgangsmaterial ausgewählt, da es unter vergleichsweise schonenden Bedingungen extrahiert wurde und relevante Strukturen der AN und GN somit in größerer Menge vorliegen, wie es im weiteren Verlauf dieser Arbeit gezeigt wird (Kap. 4.2.2.2). In Tab.

4.2 sind die verwendeten Bedingungen für die Modifikation sowie die Ausbeuten der Einfachbestimmung aufgeführt. Bei Vergleich der Ausbeuten zeigt sich ein unerwarteter Anstieg der jeweiligen AN- bzw. GN-verdauten Fraktionen mit der Inkubationszeit. Dies ist potenziell auf Verluste während der Probenaufarbeitung zurückzuführen.

Tab. 4.2: Verwendete Bedingungen für die Extraktion vier verschieden modifizierter Pektine mit Pkt2 als Ausgangsmaterial sowie die resultierenden Ausbeuten in Einfachbestimmung

	AN18	AN48	GN18	GN48
Enzym	Arabinofuranosidase		Galactanase	
Inkubationsdauer	18 h	48 h	18 h	48 h
Ausbeute [g/100 g Pkt2]	61,8	63,1	75,7	81,8

4.1.2 Extraktion von Arabinoxylanen

Die Extraktion von AX aus UBS aus Popcornmais wurde im Alkalischen durchgeführt. In Tab. 4.3 sind die Ausbeuten der Extraktion aufgeführt. Die dargestellten Ausbeuten stellen den erhaltenen Gehalt an Material nach Trocknung der Ethanolpräzipitate aus dem alkalischen Extrakt nach Neutralisation dar. Allerdings zeigten sich im Laufe der Arbeit unerwartet hohe Stärke- und Proteingehalte in den AX-Fraktionen, weswegen diese mit thermostabiler α -Amylase, Amyloglucosidase und Protease nachverdaut werden mussten. Durch Vereinigung gleicher AX-Fraktionen zur erneuten enzymatischen Behandlung konnten keine endgültigen Ausbeuten bestimmt werden.

Tab. 4.3: Ausbeuten der Extraktion fünf verschiedener Arabinoxylanfraktionen aus unlöslichen Ballaststoffen (UBS) von Popcornmais mit 0,25 M NaOH in [g/100 g UBS] \pm R/2 (n = 2). Extraktionsbedingungen: AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5
Ausbeute [g/100 g UBS]	14,4 \pm 0,0	15,6 \pm 0,0	11,5 \pm 0,4	13,3 \pm 0,2	10,5 \pm 0,4

4.2 Charakterisierung der extrahierten Polysaccharide

Mit Hilfe verschiedener Extraktionsbedingungen wurden strukturell unterschiedliche FS-haltige Pkt aus Zuckerrüben bzw. FS-haltige AX aus Popcornmais erhalten. Der Einfluss der gewählten Extraktionsbedingungen kann durch eine umfassende Analyse der Polysaccharidstrukturen überprüft werden. Andererseits können so spezifische Strukturcharakteristika nachgewiesen werden, die potenziell Einfluss auf die Geleigenschaften nach oxidativer Kopplung nehmen. Die Charakterisierung der Polysaccharidpräparate schließt auch grundlegende Parameter wie die Protein- und Aschegehalte sowie die Mole-

kulargewichtsverteilung mit ein, die nicht zwangsweise mit der molekularen Feinstruktur der Polysaccharide zusammenhängen.

Die Struktur der Polysaccharide kann durch verschiedene Analysemethoden näher beleuchtet werden. Anhand der Monosaccharidzusammensetzung können erste Aussagen über die Zusammensetzung der Polysaccharide getroffen werden. Da kristalline Cellulose in den alkoholisch präzipitierten Polysacchariden nicht zu erwarten ist, wurde die Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse zum Abbau der Polysaccharide in die Monosaccharide gewählt. Mit Hilfe der über die Methylierungsanalyse bestimmten Bindungsverhältnisse können die Monosaccharide Polysaccharidstrukturen zugeordnet werden. Dadurch können gleichzeitig potentiell co-extrahierte kohlenhydratbasierte Begleitstoffe festgestellt werden. Durch Analyse der FS-haltigen und FS-freien Seitenkettenstrukturen kann die Komplexität der Polysaccharide eruiert und die mikromolekulare Umgebung der FS im Polymer näher beleuchtet werden. Zu diesem Zweck wurde eine Methode entwickelt, mit der die getrennte Analyse der FS-haltigen sowie FS-freien OS in Pkt ermöglicht wird. Von großer Bedeutung ist zudem die Quantifizierung der estergebundenen phenolischen Säuren nach alkalischer Hydrolyse in den extrahierten Polysacchariden, speziell FS, ohne die eine oxidative Kopplung der Polysaccharide nicht möglich ist. Daneben ermöglicht die Bestimmung von DFS und TriFS einen Überblick über vorhandene, natürlicherweise gebildete *cross-links*. Für die Beurteilung der kovalent vernetzten Gele nach oxidativer *in vitro* Kopplung sollten zudem physikalische Wechselwirkungen berücksichtigt werden, die ebenfalls zu den Geleigenschaften beitragen können. Diese sind u.a. abhängig vom Veresterungsgrad der GalA-Einheiten, weswegen dieser ebenfalls analysiert wurde.

Anhand ausgewählter Analysen konnte zudem die Behandlung von Pkt2 mit Arabinofuranosidase bzw. Galactanase zur Gewinnung von modifizierten Pkt dokumentiert werden. Hierbei erfolgte die strukturelle Analyse lediglich hinsichtlich des Molekulargewichts, der Monosaccharidzusammensetzung sowie des Gehalts an phenolischen Säuren, die diesbezüglich variable Strukturparameter darstellen. Weitere Analysen wie das Seitenkettenscreening liefern gegenüber der Analyse des Ausgangsmaterials Pkt2 kaum Informationsgewinn und wurden demnach nicht durchgeführt.

Im Folgenden wird zunächst die Entwicklung der Methode zur getrennten Analyse von FS-haltigen und FS-freien OS aus AN und GN (Kap. 4.2.1) beschrieben. Daran anknüpfend folgt, wie oben aufgeführt, die vollständige Charakterisierung der extrahierten Pkt (Kap. 4.2.2), der enzymatisch modifizierten Pkt (Kap. 4.2.3) sowie der extrahierten AX (Kap. 4.2.4).

4.2.1 Entwicklung einer Profilingmethode für ferulasäurehaltige Arabinane und Galactane

Als Bestandteil der AN und GN von RG I in Pkt aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae kann FS die Funktionalität von Pkt durch die Befähigung zur oxidativen Kopplung erweitern. Wie bereits in Kap. 3.2.2.4 beschrieben, hat estergebundene FS einen potenziell negativen Einfluss auf die Zugänglichkeit der AX durch manche Enzyme. Somit ist es möglich, dass sich die mikromolekulare Umgebung der FS auch auf die enzymatische oxidative Kopplung mittels Lac oder POD/H₂O₂ auswirken kann, weswegen die Seitenkettenstrukturen in dieser Arbeit detailliert charakterisiert werden sollen. In der Vergangenheit wurde in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie bereits eine Profilingmethode für AN und GN entwickelt, die auf der Quantifizierung der freigesetzten OS nach enzymatischem Abbau der Seitenketten basiert (Wefers & Bunzel, 2016). Die Methode legt den Fokus jedoch lediglich auf die FS-freien AN- und GN-OS und berücksichtigt keine FS-haltigen AN- und GN-OS (FS-AN-OS bzw. FS-GN-OS). Ziel war daher, diese Methode zu erweitern, um FS-OS getrennt betrachten zu können, die durch den enzymatischen Verdau ebenso freigesetzt werden. Die entwickelte Methode lässt sich in die enzymatische Freisetzung mittels *endo*- α -1,5-Arabinanase bzw. *endo*- β -1,4-Galactanase, die chromatographische Vorseparierung von OS und FS-OS sowie deren Analyse mittels HPAEC-PAD unterteilen.

Die enzymatische Freisetzung der OS erfolgte hierbei analog zu Wefers & Bunzel (2016), die bereits eine Optimierung der enzymatischen Bedingungen vornahm. Auf Grund der vergleichsweise geringen Häufigkeit der FS-haltigen OS muss jedoch ein erhöhter Probenansatz verwendet werden. Als Testmaterialien für die Methodenentwicklung wurden hierfür das Pkt2 bzw. Pkt4 eingesetzt, die sich im Laufe der Arbeit als AN-reich bzw. GN-reich erwiesen. Die bereits etablierte Methode sieht eine direkte Analyse des Hydrolysats nach Zentrifugation vor und bedarf somit keiner weiteren Probenvorbereitung. Für die chromatographische Vorseparierung des Hydrolysats ist jedoch eine Fällung des verbliebenen polymeren Materials mit Isopropanol anzuraten, um Verunreinigungen der Trennsäule vorzubeugen. Durch Gefriertrocknung des resultierenden Überstands und anschließender Resolubilisierung in Wasser kann zudem eine definierte Konzentration des Hydrolysats eingestellt werden, was die Übertragbarkeit der Methode auf biologisch unterschiedliche Proben vereinfacht. Für den chromatographischen Trennungsschritt haben sich Konzentrationen zwischen 20 und 30 mg/mL bewährt.

4.2.1.1 Chromatographische Vortrennung und Analyse von ferulasäurehaltigen und und ferulasäurefreien Oligosacchariden

Für die Separierung der OS-Fractionen wurden verschiedene Umkehrphasen ausgetestet, die bekanntermaßen mit den unpolaren FS-Substituenten der FS-OS interagieren. Dadurch ist potenziell eine Abtrennung von den FS-freien OS möglich, da diese wenig Interaktion zeigen. Für die Dokumentation der chromatographischen Trennung wurde ein Lichtstredetektor (ELSD, engl. *Evaporative Light Scattering Detector*) als universeller Detektor für sämtliche nichtflüchtige Analyten sowie parallel ein UV-Detektor (UVD) (325 nm) für die Detektion phenolischer Komponenten eingesetzt. In Abb. 4.1 sind die mittels ELSD und UVD detektierten Chromatogramme der Hydrolysate nach enzymatischem Verdau der AN bzw. GN bei Verwendung einer semipräparativen Phenyl-Hexyl-Trennsäule dargestellt. Hier zeigte sich eine Trennung der Hydrolysate in zwei Fraktionen, wovon die erste Fraktion ($\sim 10,0 - 15,0$ min) ein intensives Signal im mittels ELSD detektierten Chromatogramm und ein schwaches Signal bei UV-Detektion aufweist. Das umgekehrte Verhalten konnte für Fraktion 2 ($\sim 29,5 - 31,0$ min) beobachtet werden. Die Chromatographiebedingungen wurden im weiteren Verlauf für Standardsubstanzen getestet. So zeigte Maltose ein identisches Elutionsverhalten zu Fraktion 1, während Fraktion 2 mit FS, 8-O-4-, 8-8-DFS sowie 8-O-4/8-8-TriFS coeluierte. Das Verhalten FS-haltiger AN-OS-bzw. GN-OS-Standardsubstanzen konnte auf Grund mangelnder Verfügbarkeit nicht direkt überprüft werden. Dennoch legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass Fraktion 1 FS-freie OS und Fraktion 2 phenolische Komponenten inklusive der FS-OS beinhaltet.

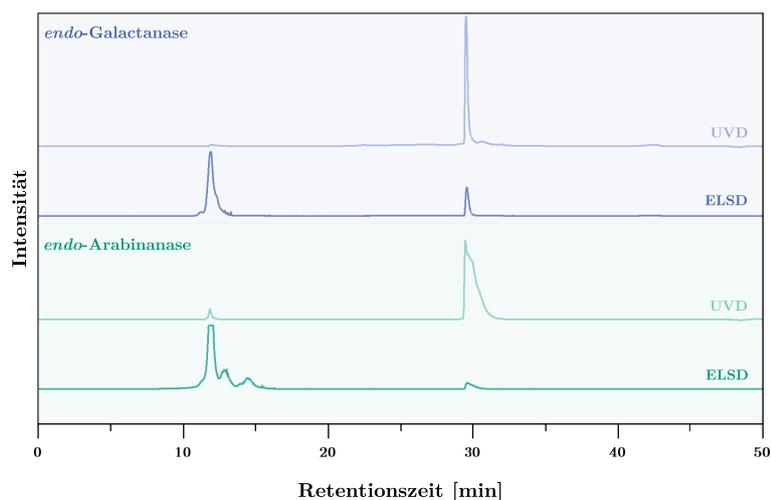


Abb. 4.1: Mittels Lichtstredetektor (ELSD) und UV-Detektor (UVD, 325 nm) registrierte Chromatogramme der Hydrolysate nach enzymatischem Verdau von Pkt2 mit *endo- α -1,5-Arabinanase* (grün) bzw. *endo- β -1,4-Galactanase* (blau) bei Trennung auf einer Phenyl-Hexyl-Trennsäule

Die Kopplung der HPLC mit einem Fraktionierventil ermöglichte das präparative Sammeln der einzelnen Fraktionen während des Elutionszeitfensters. Die so erhaltenen Fraktionen nach Injektion der enzymverdauten Pkt wurden mittels MS weiter untersucht. Eine direkte Injektion von Fraktion 1 des Arabinanase-Hydrolysats in die ESI-Quelle (positiver Modus) lieferte ein Spektrum (s. Abb. 9.4 im Anhang) mit intensiven Signalen, die einen Massenunterschied von 132 amu aufweisen. Diese m/z entsprechen den Na^+ -Addukten von Pentose-basierten OS mit DP 1-11. Der Beweis, dass es sich tatsächlich um Pentose-basierte OS handelt, war durch die chromatographische Auftrennung von Fraktion 1 mit einer PGC-Säule und anschließender MS^2 -Analyse möglich. Diese Methode wurde in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie bereits für die Analyse gering konzentrierter FS-freier OS entwickelt (Wefers *et al.*, 2014). So konnten die Li^+ -Addukte von Pentose-basierten OS bis DP 7 detektiert und durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster als AN-OS bestätigt werden. Hierbei steigt die Retention der OS auf der Trennsäule mit steigendem DP. AN-OS mit DP > 7 können auf Grund ihrer starken Retention mittels PGC-MS nicht identifiziert werden. Um auszuschließen, dass FS-OS in geringen Konzentrationen ebenfalls in Fraktion 1 enthalten sind, wurde eine weitere HPLC-DAD/MS-Methode eingesetzt, da das Retentionsverhalten von FS-OS auf einer PGC-Trennsäule unter den eingesetzten Chromatographiebedingungen nicht bekannt ist. Hierfür wurde die Methode von Schendel und Mitarbeitern (2016) verwendet, die ursprünglich für die Analyse der FS-haltigen Seitenketten von AX konzipiert wurde. Da Fraktion 1 weder UV-aktive Signale noch Signale bekannter m/z von FS-haltigen AN-OS zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass Fraktion 1 FS-freie AN-OS enthält.

Fraktion 2 liegt dagegen in niedrigen Konzentrationen vor, was durch die geringe Intensität des ELSD-Signals angedeutet wird. Die direkte Injektion der Fraktion in die ESI-Quelle (positiver Modus) zeigte erst nach Aufkonzentrierung Signale, die sich vom Rauschen abhoben. Damit war es möglich, ebenfalls Signale zu identifizieren, die sich durch einen Massenunterschied von 132 amu unterscheiden, die jedoch verglichen zu Fraktion 1 um 176 amu höhere m/z aufwiesen (s. Anhang Abb. 9.4). Diese Signale entsprechen Pentose-basierten OS mit DP 3-11, die jeweils einen FS-Substituenten tragen. Signale nicht-FS-haltiger OS konnten nicht festgestellt werden, was zusätzlich mittels HPLC-PGC-MS bestätigt werden konnte. Dagegen konnten nach Auftrennung von Fraktion 2 an einer C18-Trennsäule Signale von FS-AN-OS mit DP 2-7 nachgewiesen werden. Neben den Signalen FS-haltiger Pentose-basierter OS waren bei direkter Injektion zusätzlich zwei intensive Signale mit m/z 503 bzw. 635 zu sehen, die ebenfalls

einen Massenunterschied von 132 amu aufwiesen. Diese lassen sich jedoch auf keine bekannten FS- oder *p*-CS-haltigen OS zurückführen und wurden somit nicht weiter untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung der Phenyl-Hexyl-Trennsäule eine effektive Separierung von FS-freien und -haltigen Pentose-basierten OS erzielt werden konnte. Das gleiche Vorgehen wurde schließlich für die Fraktionen 1 und 2 des *endo*-Galactanase Hydrolysats von Pkt4 angewendet, um das Verfahren für FS-haltige Hexose-basierte OS zu adaptieren. Die direkte Injektion von Fraktion 1 (s. Abb. 9.4 im Anhang) zeigte lediglich das Signal eines Hexose-Dimers als Na⁺-Addukt (m/z 365). Weitere Signale, die sich leicht vom Rauschen unterschieden, konnten nicht zugeordnet werden. Drei intensivere Signale der Fraktion 2 konnten FS-haltigen Hexose-basierten Di-, Tri- und Tetrasacchariden zugeordnet werden, während die übrigen Signale unbekannt blieben. Mittels HPLC-C18-MSⁿ konnten schließlich FS-OS in Fraktion 1 und FS-freie OS in Fraktion 2 ausgeschlossen werden, wodurch gezeigt wurde, dass mit Hilfe der Phenyl-Hexyl-Trennsäule allgemein eine chromatographische Vortrennung von OS und FS-OS erreicht werden kann. Die OS nach *endo*-Arabinanase- und *endo*-Galactanaseverdau entsprechen den jeweiligen FS-haltigen bzw. FS-freien AN- bzw. GN-OS.

Für das Profiling von AN- und GN-OS mittels HPAEC-PAD wurden von Wefers & Bunzel (2016) relative Responsefaktoren für verzweigte und unverzweigte OS (s. Abb. 9.2 und Abb. 9.3 im Anhang) ermittelt, anhand derer die einzelnen Komponenten ohne Bedarf einer Kalibrierung semiquantitativ bestimmt werden können. Um diese Responsefaktoren gleichermaßen für die FS-haltigen Analoga verwenden zu können, muss sichergestellt sein, dass die Substituenten während oder vor der Messung abgespalten werden. Die alkalischen Bedingungen der HPAEC waren für eine quantitative Verseifung nicht ausreichend, was anhand eines ausgeprägten Tailings der Peaks zu beobachten war. Stattdessen konnte durch den Einsatz von FS-Esterasen eine effektive Entesterung erreicht werden, was sich durch schärfere und intensivere Signale andeutete (s. Abb. 9.6 im Anhang). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass enthaltene Salze in der Enzymmischung eine Retentionszeitverschiebung (ca. 2 min) der Signale im mittleren Bereich des Chromatogramms zur Folge haben, was durch die Analyse von Standardsubstanzen nach Zugabe von inaktivierter FS-Esteraselösung bestätigt wurde. Die vollständige Entesterung wurde durch fehlende Signale nach Analyse mittels HPLC-C18-DAD/MSⁿ bestätigt.

4.2.1.2 Anwendung auf ausgewählte Proben

Wie bereits erwähnt sind FS-haltige AN und GN charakteristisch für Pflanzen der Familie Amaranthaceae, sodass anhand der botanischen Herkunft eine Vorauswahl an geeigneten Proben getroffen werden konnte. Für die Eignung der entwickelten Methode für biologisch unterschiedliche Proben wurden in dieser Arbeit, zusätzlich zu Pkt aus Zuckerrüben, UBS und LBS von Amaranth- und Quinoasamen getestet. In Tab. 4.4 sind die relativen molaren Verhältnisse (auf 100 mol% normiert) der FS-freien sowie FS-haltigen AN- und GN-OS zusammengefasst. Zum Vergleich sind in Tab. 9.1 im Anhang die Verteilungen der Proben ohne Separierung in die entsprechenden FS-haltigen bzw. -freien OS aufgeführt. Eine ausführliche Diskussion der AN- und GN-Zusammensetzung der Pkt aus Zuckerrüben wird in Kap. 4.2.2.2 zusammen mit den anderen extrahierten Pkt durchgeführt. Der Fokus hier soll lediglich auf dem allgemeinen Informationsgewinn durch das entwickelte Screening liegen.

Ausgehend von der Intensität der ELSD-detektierten Signale der chromatographischen Vorseparierung (Abb. 4.1) wird deutlich, dass die FS-freien OS den mengenmäßig größeren Anteil der freigesetzten OS darstellen. Dies erklärt, dass auch die Verteilungen der FS-freien OS weitestgehend mit denen ohne vorherige Auftrennung übereinstimmen. Eine Ausnahme bildeten hier die LBS von Amaranth, deren Anteile der AN-OS-Strukturen A-2b und A-3a stark abweichen (A-2b: 40,6 zu 6,9 mol%; A-3a: 3,0 zu 17,8 mol%). Das lineare Trimer A-3a stellt einen Marker für einen unvollständigen Verdau dar und kann weiter zu A-2a abgebaut werden, wodurch die Gehalte an A-2a bei hohen Anteilen an A-3a unterbestimmt vorliegen. Dagegen ist A-2b ein Dimer aus Araf und Arap, das natürlicherweise in geringen Mengen in Amaranth vorkommt (Wefers *et al.*, 2015b). Eine Erklärung für den hohen Anteil dieses Oligosaccharids in der FS-freien Fraktion der Amaranth LBS konnte jedoch nicht gefunden werden.

Tab. 4.4: Relative molare Verhältnisse von Arabinan- und Galactanoligosacchariden der ferulasäurefreien sowie ferulasäurehaltigen Fraktionen von zwei Zuckerrübenpektinen sowie unlöslichen (UBS) und löslichen (LBS) Ballaststoffen von Amaranth- und Quinoasamen. Die Werte sind als Mittelwerte in mol% \pm R/2 (n = 2) angegeben. n.q., nicht quantifizierbar

Oligosaccharid	Zuckerrübe ferulasäurefrei						Zuckerrübe ferulasäurehaltig					
	Pkt2	Pkt4	UBS	LBS	UBS	LBS	Pkt2	Pkt4	UBS	LBS	UBS	LBS
Arabinanoligosaccharide												
A-2a	57,8 \pm 0,8	47,3 \pm 0,3	69,5 \pm 0,6	40,6 \pm 2,5	76,9 \pm 2,6	74,0 \pm 0,5	16,7 \pm 0,7	54,4 \pm 0,9	29,3 \pm 0,8	65,9 \pm 3,0	41,6 \pm 8,7	33,0 \pm 5,2
A-2b	-	-	2,3 \pm 0,1	41,2 \pm 3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
A-3a	1,7 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	-	3,0 \pm 0,5	-	0,3 \pm 0,0	27,8 \pm 0,0	16,3 \pm 0,0	28,5 \pm 1,3	-	18,3 \pm 4,1	22,5 \pm 4,9
A-3b	3,7 \pm 0,2	44,5 \pm 0,2	-	0,7 \pm 0,1	-	1,4 \pm 0,4	6,7 \pm 0,1	14,2 \pm 0,7	4,5 \pm 0,2	-	3,1 \pm 0,0	34,5 \pm 3,9
A-4a	16,6 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	15,9 \pm 1,0	11,5 \pm 0,7	13,8 \pm 1,2	13,9 \pm 0,6	14,5 \pm 0,1	9,1 \pm 0,2	15,3 \pm 0,1	34,1 \pm 3,0	14,9 \pm 0,6	10,1 \pm 3,6
A-4b	1,4 \pm 0,0	0,8 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	-	1,0 \pm 0,3	-	-	1,7 \pm 0,0	-	-	-	-
A-5a	1,7 \pm 0,0	-	1,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	0,7 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	1,4 \pm 0,0	4,3 \pm 0,0	-	-	-	-
A-5b	-	-	-	-	0,9 \pm 0,0	3,5 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
A-6a	4,1 \pm 0,1	-	2,5 \pm 0,0	-	1,9 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	-	8,8 \pm 0,8	-	6,5 \pm 0,8	-
A-6b	2,6 \pm 0,1	-	-	n.q.	-	0,5 \pm 0,1	7,7 \pm 1,0	-	2,5 \pm 0,0	-	2,9 \pm 0,1	-
A-7a	0,5 \pm 0,0	-	-	-	-	-	3,9 \pm 0,2	-	0,3 \pm 0,1	-	n.q.	-
A-7b	10,0 \pm 0,3	-	6,5 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	4,7 \pm 1,0	3,7 \pm 0,5	19,1 \pm 0,4	-	10,9 \pm 1,3	-	12,6 \pm 3,1	-
Galactanoligosaccharide												
G-2a	97,0 \pm 0,1	97,7 \pm 0,1	100,0	100,0	-	-	29,0 \pm 7,4	8,3 \pm 0,2	100,0	100,0	-	-
G-2b	3,0 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G-3a	-	-	-	-	-	-	23,7 \pm 0,2	6,6 \pm 0,6	-	-	-	-
G-4b	-	-	-	-	-	-	47,3 \pm 7,1	85,1 \pm 0,4	-	-	-	-

Beim Vergleich der FS-freien und FS-haltigen Verteilungen aus den gleichen Materialien zeigt sich dagegen eine größere Diskrepanz. FS-OS werden in deutlich geringeren Konzentrationen aus den Ausgangsmaterialien freigesetzt, was sich insbesondere bei den LBS von Amaranth und Quinoa in Signalen nahe der Bestimmungsgrenze ä-

berte. Dennoch zeichnet sich in den FS-haltigen AN-OS aller Proben ein Trend hin zu höheren Anteilen der höher oligomeren und dadurch komplexeren Strukturen ab, was am Beispiel des Heptamers A-7b in den UBS aus Quinoa einer Zunahme von ca. 8 mol% im Vergleich zum FS-freien Analogon entspricht. Auffällig sind zudem die höheren Anteile von A-3a, A-3b und A-6b (s. Abb. 4.2), die mutmaßlich keine nativen Strukturen von AN darstellen, da sie entweder weiter verdaut werden können (A-3a) oder durch eine Arabinofuranosidasenebenaktivität der *endo*-Arabinanase aus höheren Strukturen gebildet werden können. So entstammt A-3b mutmaßlich durch Abspaltung der terminalen Araf aus A-4a und A-6b gleichermaßen aus A-7a (Wefers & Bunzel, 2016).

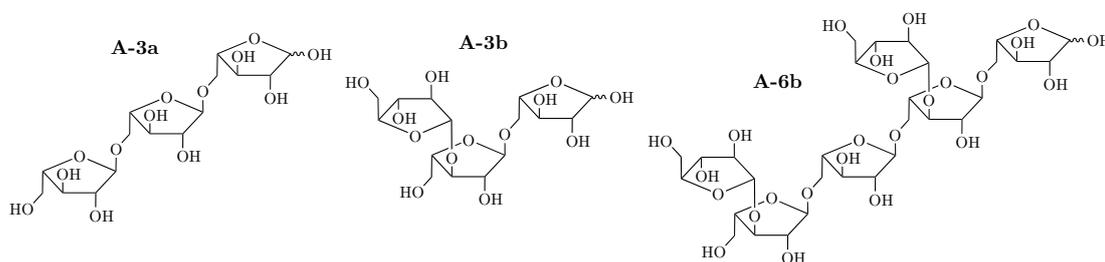


Abb. 4.2: Strukturen von Arabinanoligosacchariden, die auf einen unvollständigen Verdau (A-3a) bzw. Nebenaktivitäten des Enzyms (A-3b, A-6b) zurückgeführt werden

Bei Betrachtung der GN-OS zeigt sich ein erheblicher Unterschied zwischen FS-freien und FS-haltigen OS der Pkt aus Zuckerrüben. Während die unveresterten GN-OS hauptsächlich aus dem linearen Dimer G-2a bestehen, liegt die FS zusätzlich an die komplexeren Strukturen G-3a und G-4b gebunden vor. G-3a stellt ein lineares β -1,4-verknüpftes Galactotrisaccharid dar, das analog zu A-3a kein Endprodukt des enzymatischen Verdau darstellt. Dagegen weist G-4b eine zusätzliche Galp-Einheit an Position O6 der terminalen Galp auf und macht in Pkt4 einen Anteil von ca. 85 mol% aus.

Die hohen Gehalte von A-3a zwischen 16 und 29 mol% in den Fraktionen der FS-AN-OS sowie G-3a (6 – 24 mol%) in den FS-GN-OS deuten auf einen Einfluss der FS-Substitution auf den enzymatischen Verdau hin und damit einhergehend auf potenziell unzureichende enzymatische Hydrolysebedingungen. Um dies näher zu untersuchen, wurden die FS-haltigen AN-OS Fraktionen von Pkt2 bzw. GN-OS von Pkt4 sowohl vor als auch nach Entesterung erneut mit *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase behandelt (Tab. 4.5). Die Substitution der AN-OS mit FS hat eine Verlangsamung des enzymatischen Abbaus zur Folge, was am Beispiel der Nebenstruktur A-3a deutlich wird. Im Vergleich zur Kontrolle sinken die Anteile von 26,0 auf 15,8 mol%, wenn das FS-haltige OS erneut verdaut wird und weiter auf 4,6 mol%, wenn die FS zuvor entfernt

wird. Gleichzeitig nehmen die Anteile von A-2a zu. Auffällig ist zudem, dass durch erneute Enzymbehandlung die hoch oligomeren Strukturen A-7a und A-7b, die Endprodukte des Verdaus darstellen, ebenfalls abnehmen. Da nur relative Anteile zueinander betrachtet werden, ist es möglich, dass zuvor nicht-messbare höher oligomere Strukturen ($DP > 7$) weiter verdaut werden, was in einer relativen Zunahme niedrig oligomerer AN-OS resultieren könnte. Das Vorhandensein solcher nicht-quantifizierbarer, jedoch potenziell verdaubarer OS mit $DP > 7$ deutet auf zu kurz gewählte Inkubationszeiten des *endo*-Arabinanaseverdaus hin. Eine Verdopplung der Inkubationszeit auf 48 h hatte in den FS-freien AN-OS eine Zunahme von A-3b und A-6b als Strukturen, die auf Grund der enzymatischen Nebenaktivität entstehen, zur Folge (Tab. 9.2 im Anhang). In der FS-haltigen Fraktion dagegen sanken zusätzlich die Anteile von A-3a, A-4a, A-7a und A-7b bei gleichzeitiger Zunahme von A-2a leicht. Da auch in den PAD-detektierten HPAEC-Chromatogrammen der länger verdauten Proben keine deutliche Abnahme der mutmaßlich hocholigomeren Strukturen ($DP > 7$, Elution > 70 min) zu beobachten war, ist ein Endpunkt der enzymatischen Spaltung von AN aus Zuckerrüben auf Grund ihrer sterischen Komplexität vermutlich nicht zu erreichen. Damit ist die tendenziell bevorzugte Lokalisation der FS in höher oligomeren AN-OS vermeintlich eher Resultat der verminderten enzymatischen Zugänglichkeit von FS-haltigen AN, womit eine ungerichtete Verteilung der FS in AN denkbar ist.

Tab. 4.5: Relative molare Verhältnisse von Arabinan oligosacchariden (aus Pkt2) und Galactan oligosacchariden (aus Pkt4) der FS-haltigen Fraktionen nach jeweils drei unterschiedlichen Enzymnachbehandlungen. Die Werte sind als Mittelwerte in mol% $\pm R/2$ ($n = 2$) angegeben. FS, *trans*-Ferulasäure

	Arabinan oligosaccharide									
	A-2a	A-3a	A-3b	A-4a	A-4b	A-5a	A-6a	A-6b	A-7a	A-7b
Arabinanase ↳ FS-Esterase (Kontrolle)	20,3 $\pm 0,2$	26,0 $\pm 0,0$	7,0 $\pm 0,0$	14,6 $\pm 0,1$	0,6 $\pm 0,1$	1,3 $\pm 0,0$	2,7 $\pm 0,1$	7,0 $\pm 0,3$	3,7 $\pm 0,1$	16,9 $\pm 0,1$
Arabinanase ↳ Arabinanase ↳ FS-Esterase	39,8 $\pm 2,8$	15,8 $\pm 0,2$	8,0 $\pm 0,3$	11,5 $\pm 0,5$	0,8 $\pm 0,0$	1,2 $\pm 0,1$	3,3 $\pm 0,4$	7,2 $\pm 0,8$	2,4 $\pm 0,2$	10,1 $\pm 0,8$
Arabinanase ↳ FS-Esterase ↳ Arabinanase	48,8 $\pm 5,3$	4,6 $\pm 0,7$	5,3 $\pm 0,6$	20,2 $\pm 2,0$	0,8 $\pm 0,1$	1,5 $\pm 0,2$	2,9 $\pm 0,4$	4,7 $\pm 1,3$	1,4 $\pm 0,1$	10,0 $\pm 1,7$
	Galactan oligosaccharide									
	G-2a	G-3a	G-4b							
Galactanase ↳ FS-Esterase (Kontrolle)	5,0 $\pm 1,2$	7,7 $\pm 0,4$	87,4 $\pm 0,8$							
Galactanase ↳ Galactanase ↳ FS-Esterase	5,2 $\pm 1,1$	7,8 $\pm 0,1$	87,0 $\pm 1,0$							
Galactanase ↳ FS-Esterase ↳ Galactanase	10,9 $\pm 3,2$	-	89,1 $\pm 3,2$							

Da auch verlängerte Inkubationszeiten dieses Problem nicht beheben und in Anbetracht der ansteigenden Gehalte der OS in der mengenmäßig bedeutenderen FS-freien Fraktion, die auf Grund der Enzymnebenaktivität entstehen, scheint die 24 stündige Inkubation in der Summe geeigneter, um die Strukturen von AN repräsentativ abzubilden.

Die Ansätze des enzymatischen Nachverdaus der FS-haltigen GN-OS zeigten dagegen ein eindeutigeres Bild. Ein erneuter Verdau mit *endo*-Galactanase zeigte keine Veränderungen der relativen Verteilung. Eine vorhergehende Entfernung der FS-Substitution dagegen resultierte im quantitativen Abbau von G-3a bei gleichzeitiger Zunahme von G-2a. Dies bestätigt G-3a als Zwischenprodukt des *endo*-Galactanaseverdaus, wohingegen G-4b als stabiles Strukturelement von GN in Zuckerrüben bestätigt wurde, das mit FS substituiert vorliegt.

4.2.1.3 Evaluation der Methode

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die entwickelte Methode geeignet ist, in vergleichsweise kurzer Zeit FS-haltige OS nachzuweisen. Die Analyse mittels HPAEC-PAD und die Verwendung von relativen Responsefaktoren ermöglicht zudem ein semiquantitatives Profiling dieser Strukturen, um einen Überblick über vorhandene FS-haltige Strukturen in AN und GN zu erhalten. Dadurch konnten bereits in der Literatur beschriebene Strukturen wie die FS-haltigen G-2a und A-2a in Zuckerrüben und Amaranth oder zusätzlich FS-haltige Arabinosetri- bis -octamere in Zuckerrüben bestätigt werden (Ishii, 1994; Ralet *et al.*, 1994a; Colquhoun *et al.*, 1994; Bunzel *et al.*, 2005). Denkbar ist zudem die Anwendung der chromatographischen Separierung für die Analyse FS-haltiger AX, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Allerdings ist keine Unterscheidung zwischen einfach und mehrfach mit FS substituierten Strukturen möglich, da diese Information im Zuge der Entesterung verloren geht. Mehrfach substituierte AN-OS konnten bislang in Zuckerrüben nachgewiesen werden (Wefers *et al.*, 2014). Ebenso sind keine Aussagen zu Substitutionen mit DFS und TriFS möglich, die Wefers und Mitarbeiter (2015a) beispielsweise in Quinoa identifizierten.

4.2.2 Charakterisierung von (säure)extrahierten Pektinen aus Zuckerrüben

4.2.2.1 Grundcharakterisierung

Die Grundcharakterisierung der extrahierten Polysaccharide umfasste die Bestimmung der Gehalte an Restproteinen und Asche sowie die Bestimmung des M_w . Die Ergebnisse sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

Die Proteingehalte liegen zwischen 2,3 und 4,4 g/100 g und damit unterhalb von Literaturwerten (5,3 – 6,6 g/100 g) (Funami *et al.*, 2011; Bindereif *et al.*, 2021). Dabei zeigte sich, dass die Dauer der Säurebehandlung bei pH 2 (Pkt2-4) keinen Einfluss auf den Gehalt hat, während bei pH 3 (Pkt5) sowie durch Autoklavenbehandlung (Pkt1) tendenziell weniger Proteine freigesetzt wurden. Stattdessen weist Pkt1 mit 6,4 g/100 g den höchsten Aschegehalt auf. Die Gehalte in den säureextrahierten Pkt betragen zwischen 0,9 und 4,0 g/100 g, wobei der Gehalt mit zunehmender Säurebehandlung sowohl hinsichtlich pH-Wert als auch Extraktionsdauer abnimmt. Dagegen hatte eine vorhergehende Ultraschallbehandlung (Pkt6) eine leichte Erhöhung des Aschegehalts von 2,5 auf 3,8 g/100 g zur Folge. Die Aschegehalte könnten u.U. auch auf enthaltene Salze zurückgeführt werden, die aus dem Rohmaterial gelöst und während der Präzipitation mit ausgefällt werden. Zusätzlich wurden die M_w mittels HPSEC-RI/MALLS bestimmt. Da für deren Berechnungen die $\frac{dn}{dc}$ -Werte quadratisch eingehen, wurde für jedes Pkt zunächst das $\frac{dn}{dc}$ bestimmt, die ebenfalls in Tab. 4.6 aufgeführt werden. Sie liegen für die extrahierten Pkt im Bereich von 0,124 – 0,145 mL/g. Ein Zusammenhang zwischen Extraktionsbedingungen und $\frac{dn}{dc}$ -Wert konnte nicht festgestellt werden, jedoch zeigt die Variabilität der Werte die Bedeutung der $\frac{dn}{dc}$ -Bestimmung für jedes Pkt. Bei Betrachtung der M_w zeigen sich erhebliche Unterschiede in den Fraktionen. So weist das säureextrahierte Pkt (Pkt2) mit ca. 605 kDa das höchste M_w auf. Mit steigender Extraktionsdauer von 1 auf 16 h nimmt es auf ca. 246 kDa ab, was auf einen partiellen Abbau von Pkt hindeutet. Gleichermäßen hat eine Ultraschallbehandlung (605 auf 465 kDa) sowie ein erhöhter pH-Wert (423 auf 330 kDa) eine Verringerung des M_w zur Folge. Pkt1 weist mit 195 kDa die kleinsten Polymerketten auf, was entweder auf eine Spaltung hochpolymerer Strukturen unter hohen Drücken/Temperaturen oder auf eine geringfügigere Freisetzung hochmolekularer Verbindungen aus dem Zellwandgefüge bei pH 6,0 zurückzuführen ist.

Tab. 4.6: Gehalte an Protein und Asche der extrahierten Pektine als Mittelwerte in $\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \pm \frac{\text{R}}{2}$ ($n = 2$). Zusätzlich sind die spezifischen Brechungsindexinkremente ($\frac{dn}{dc}$ in $\frac{\text{mL}}{\text{g}}$, 50°C , 50 mM NaNO_3) sowie die damit bestimmten gewichtsgemittelten Molekulargewichte (M_w in kDa) als Mittelwerte $\pm s_{x0}$ ($n = 3$) angegeben.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121°C , pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80°C , pH 2; Pkt3, 4 h, 80°C , pH 2; Pkt4, 16 h, 80°C , pH 2; Pkt5, 4 h, 80°C , pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80°C , pH 2

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
Protein	$2,3 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,01$	$4,4 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,00$	$2,6 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,1$
Asche	$6,4 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,02$	$4,0 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$
$\frac{dn}{dc}$	0,125	0,132	0,137	0,124	0,142	0,145
	$\pm 0,002$	$\pm 0,000$	$\pm 0,005$	$\pm 0,004$	$\pm 0,003$	$\pm 0,002$
M_w	195 ± 18	605 ± 9	423 ± 20	246 ± 7	330 ± 7	465 ± 14

4.2.2.2 Strukturcharakterisierung der Polysaccharide

Die Monosaccharidanteile der extrahierten Pkt auf molarer Basis sind in Abb. 4.3 dargestellt. So sind Rha, Ara, Gal und GalA wesentliche Bestandteile der Pkt, während Glc und GlcA lediglich in geringen Anteilen enthalten sind. Der Vergleich von Pkt1 mit den säureextrahierten Pkt2, 5 und 6 impliziert eine Spaltung des Pkt-Rückgrats während der autoklaven Extraktion von Pkt1, da dieses trotz deutlich geringerem M_w eine ähnliche Monosaccharidzusammensetzung aufweist. So sind die Verteilungen der unter autoklaven Bedingungen sowie mild sauer extrahierten Pkt durch hohe Anteile der Neutralzucker Ara (41,6–47,9 mol%), Gal (15,1–17,7 mol%) und Rha (5,4–7,5 mol%) gekennzeichnet. Dies deutet darauf hin, dass diese Pkt hohe Anteile an AN und GN als Seitenketten des RG I aufweisen. Dagegen liegen die Anteile von GalA im Bereich zwischen 24,9 und 32,1 mol%. Mit steigender Extraktionsdauer bei pH 2 nehmen die Anteile von Ara von 42,5 mol% auf 6,8 mol% ab. Parallel steigt der Anteil an Ara, wenn bei pH 3 bei ansonsten gleichen Bedingungen extrahiert wird von 20,5 mol% (pH 2) auf 46,4 mol%. Dies deutet auf einen partiellen säurekatalysierten Abbau der AN hin, was bereits in früheren Studien gezeigt wurde (Levigne *et al.*, 2002b; Bindereif *et al.*, 2021). Gleichzeitig nehmen mit stärkerer Säurebehandlung relativ die Anteile an GalA, Gal und Rha zu. Aus den molaren Verhältnissen von GalA zu Rha kann das Verhältnis von HG zu RG I annähernd abgeschätzt werden. So weisen die extrahierten Pkt RG I-Anteile zwischen 32 und 45,6 % der Summe aus RG I und HG auf, wobei Pkt4 den höchsten Anteil an RG I aufweist. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass in Folge andauernd harscher Extraktionsbedingungen RG I reichere Pkt freigesetzt werden, die stark mit der Zellwand assoziiert vorliegen, deren AN jedoch unter den stark sauren Bedingungen depolymerisiert werden. Eine vorhergehende Ultraschallbehandlung hat

nur einen marginalen Effekt auf die Monosaccharidzusammensetzung. Die niedrigen Anteile von Glc deuten auf geringfügige Mengen coextrahierter Polysaccharide hin.

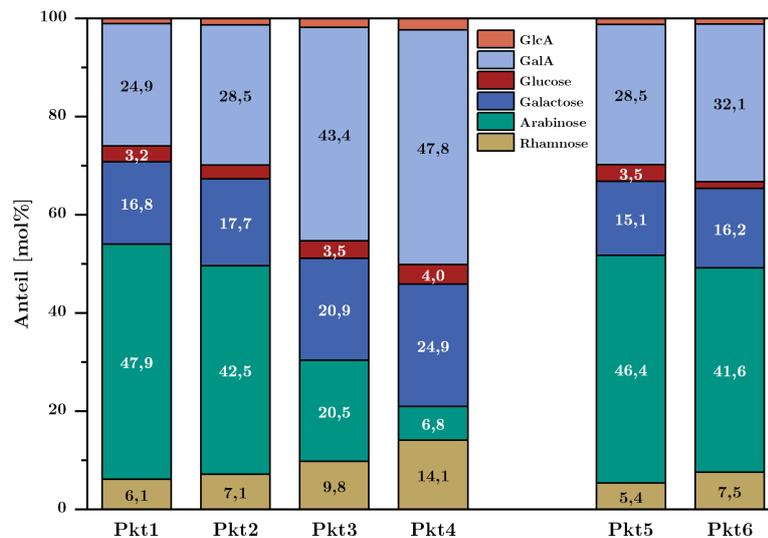


Abb. 4.3: Monosaccharidzusammensetzung (mol%, $n = 3$) der extrahierten Pektine aus Zuckerrüben nach Methanolysen mit TFA-Hydrolyse. GlcA, Glucuronsäure; GalA, Galacturonsäure. Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

Eine genauere Charakterisierung der Polysaccharide ist anhand der Bindungstypenverhältnisse möglich, die aus den analysierten PMAA der Methylierungsanalyse erhalten werden (s. Tab. 4.7). Allerdings können mittels der hier durchgeführten Methylierungsanalyse keine Uronsäuren erfasst werden, wodurch die Vergleichbarkeit der molaren Gesamtanteile der einzelnen Monosaccharide als Summe der Bindungstypen mit den molaren Anteilen der Methanolysen eingeschränkt wird. Aus den molaren Anteilen der 1,2- und 1,2,4-gebundenen Rhap kann der Substitutionsgrad des RG I-Rückgrats abgeleitet werden. Dieser lag zwischen 50,0 (Pkt4) und 63,3% (Pkt2) für die säureextrahierten Pkt und bei 53,1% für Pkt1. Bei Betrachtung der Monosaccharidzusammensetzung und der Bindung der Monosaccharide im Polysaccharid zeigte sich, dass die Pektinstrukturen von Pkt1 hinsichtlich des Aufbaus sehr ähnlich zu den säureextrahierten Pkt2, Pkt5 und Pkt6 sind. Durch Interpretation der Bindungstypen des mengenmäßig dominierenden Monosaccharids Ara kann die Komplexität des AN eingeordnet werden. So werden unsubstituierte Abschnitte des AN-Grundgerüsts durch die 1,5-gebundenen Araf mit Anteilen von 22,0 bis 25,5 mol% angezeigt. Ähnlich hohe Anteile an 1,3,5-gebundener Araf (19,0 – 20,5 mol%) weisen auf zahlreiche verzweigte und damit komplexe Abschnitte hin, die an Position O3 substituiert vorliegen. Dies konnte bereits in der Literatur gezeigt werden (Guillon *et al.*, 1989; Oosterveld *et al.*, 2000c; Schäfer *et al.*, 2020).

Tab. 4.7: Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) in den extrahierten Pektinen aus Zuckerrübe nach Methylierungsanalyse. Die Werte sind als Mittelwerte (mol%) $\pm s_{x0}$ (n = 3) angegeben. Dazu ist der Substitutionsgrad des Rhamnogalacturonan I (RG I)-Rückgrats angegeben. t, terminal; p, Pyranose; f, Furanose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose
 Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

PMAA	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
t-Glcp	1,0 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0
1,4-Glcp	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,0	4,7 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5	1,9 \pm 0,0	2,0 \pm 0,1
Σ	2,8 \pm 0,0	1,9 \pm 0,0	4,9 \pm 0,1	6,2 \pm 0,2	2,5 \pm 0,0	2,3 \pm 0,0
t-Galp	2,6 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	6,0 \pm 0,3	12,8 \pm 0,4	2,1 \pm 0,0	3,8 \pm 0,3
1,3-Galp	1,2 \pm 0,1	1,7 \pm 0,0	2,9 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	1,3 \pm 0,0	1,8 \pm 0,0
1,4-Galp	3,7 \pm 0,0	4,1 \pm 0,1	8,3 \pm 0,0	14,3 \pm 1,2	2,4 \pm 0,0	4,1 \pm 0,2
1,6-Galp	1,6 \pm 0,1	2,0 \pm 0,0	4,6 \pm 0,2	9,0 \pm 0,3	1,4 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1
1,3,6-Galp	1,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,0
Σ	10,9 \pm 0,0	13,0 \pm 0,0	25,1 \pm 0,1	41,8 \pm 0,4	9,6 \pm 0,0	14,3 \pm 0,1
t-Araf	30,7 \pm 1,4	30,5 \pm 0,4	24,2 \pm 0,2	14,4 \pm 1,0	32,4 \pm 0,3	30,6 \pm 0,3
t-Arap	0,7 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	1,6 \pm 0,3	0,8 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1
1,2-Araf	0,4 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	1,5 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0
1,3-Araf	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,0	2,4 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0
1,5-Araf	24,3 \pm 0,0	24,4 \pm 0,5	19,7 \pm 0,6	11,5 \pm 1,3	25,5 \pm 0,2	22,0 \pm 0,3
1,3,5-Araf	20,5 \pm 0,4	19,0 \pm 0,1	10,1 \pm 0,2	4,0 \pm 0,9	20,5 \pm 0,3	19,1 \pm 0,5
1,2,5-Araf	1,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	2,2 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	1,5 \pm 0,0	1,8 \pm 0,0
1,2,3,5-Araf	3,8 \pm 0,2	3,4 \pm 0,0	2,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	3,6 \pm 0,0	3,5 \pm 0,1
Σ	83,2 \pm 0,5	82,1 \pm 0,2	63,4 \pm 0,2	38,2 \pm 0,5	85,7 \pm 0,1	80,0 \pm 0,2
1,2-Rhap	1,5 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1	6,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1
1,2,4-Rhap	1,7 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	6,9 \pm 0,7	1,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
Σ	3,2 \pm 0,0	3,0 \pm 0,0	6,5 \pm 0,0	13,7 \pm 0,3	2,1 \pm 0,0	3,4 \pm 0,0
RG I- Substitutionsgrad^a	53,1 %	63,3 %	54,5 %	50,0 %	54,5 %	52,9 %

$$^a = \frac{1,2,4\text{-Rhap} [\text{mol}\%]}{1,2\text{-Rhap} [\text{mol}\%] + 1,2,4\text{-Rhap} [\text{mol}\%]} \cdot 100 \%$$

Substitutionen an Position O2 oder doppelt substituierte Ara treten in geringeren Mengen auf (1,2,5-Araf: 1,5 – 1,8 mol% bzw. 1,2,3,5-Araf: 3,4 – 3,8 mol%). Mit steigender Intensität der Säurebehandlung nehmen sowohl der Gesamtanteil der Ara als auch die Anteile der verzweigten Abschnitte stark ab, was die Säurelabilität der AN unterstreicht.

Anhand der Bindungstypen der Gal wird klar, dass 1,4-verknüpfte Strukturen dominieren. Die Anteile der 1,3- und 1,3,6-verknüpften Galp von 1,2 – 2,9 mol% bzw. 1,9 – 3,3 mol%

deuten zudem auf das Vorkommen von AGN Typ II hin, die (1→6)-verknüpfte Galp als Seitenketten tragen. Mit steigender Extraktionszeit bei pH 2 nehmen die Anteile der 1,4-Galp von 4,1 mol% auf 14,3 mol% stark zu, was die Säurestabilität der GN gegenüber den AN zeigt. Gleichzeitig steigen auch die Anteile der 1,6-Galp von 2,0 auf 9,0 mol%, während sich die Anteile der 1,3- und 1,3,6-gebundenen Galp nur geringfügig verändern. Die vergleichsweise hohen Anteile der terminalen Galp lassen auf kurze Ketten der Gal-basierten Strukturen schließen.

Eine genauere Charakterisierung der AN und GN ist durch die Analyse der freigesetzten OS nach Verdau der Polysaccharide mit *endo-α*-1,5-Arabinanase bzw. *endo-β*-1,4-Galactanase möglich. Der zuvor beschriebene chromatographische Zwischenschritt ermöglichte eine getrennte Analyse von FS-freien und FS-haltigen OS. Die so semi-quantitativ bestimmten Anteile von bekannten AN-OS und GN-OS sind in Tab. 4.8 zusammengefasst, während die Anteile ohne vorherige Auftrennung im Anhang in Tab. 9.3 aufgeführt werden. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse von Pkt2 und Pkt4 aus Kap. 4.2.1.2 erneut dargestellt. Der Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Auftrennung der FS-freien und FS-haltigen OS zeigte keinen Unterschied zwischen der FS-freien Fraktion und den Gesamt-OS. Somit wird im Folgenden die FS-freie Fraktion repräsentativ für die Beschreibung der verdaubaren Gesamtheit der AN- und GN-Strukturen herangezogen.

Bei Betrachtung der FS-freien AN-OS-Fraktion kann die durch Methylierungsanalyse bestimmte vorrangige Substitution des AN-Rückgrats an Position O3 durch die hohen Anteile an A-3b, A-4a, A-6a und A-7b bestätigt werden. Substitutionen an O-2 (A-4b) oder doppelt substituierte AN-OS (A-5a, A-7a) konnten ebenfalls, jedoch nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. OS mit dimeren Araf-Seitenketten an Position O3 (A-5b) wurden in geringeren Anteilen in Pkt1, Pkt4 und Pkt5 identifiziert. Hochverzweigte Bereiche des AN-Rückgrats werden durch die Gehalte an A-6a, A-7a und A-7b widergespiegelt, die mehrere Araf-Seitenketten in unmittelbarer Nachbarschaft aufweisen. Mit steigender Extraktionszeit bei pH 2 kommt es zu einer partiellen Abspaltung der Araf-Seitenketten, was in einer Abnahme verzweigter Strukturen wie A-4a (16,6 auf 6,5 mol%) und A-7b (10,0 auf 0,0 mol%) resultiert. Parallel nimmt der Anteil an A-3b von 3,7 auf 44,5 mol% stark zu. A-3b, das eine 1,3,5-verknüpfte Araf-Einheit beinhaltet, wird in der Literatur als Resultat einer Arabinofuranosidasenebenaktivität aufgeführt, da es im Vergleich zu A-4a keine terminale Araf aufweist (Wefers & Bunzel, 2016). Durch die hohen Gehalte dieser Struktureinheit in Pkt4 ist es jedoch zudem denkbar, dass bereits während der Extraktion eine dahingehende Modifikation des AN stattfindet.

Es ist anzumerken, dass die hier erfassten Strukturen lediglich AN-OS in unmittelbarer Umgebung linearer, unverzweigter Bereiche darstellen, die enzymatisch zugänglich sind. Die Ergebnisse nach längeren Inkubationszeiten (s. Kap. 4.2.1.2) legen nahe, dass ein bedeutender Teil der AN in Zuckerrübenpektin jedoch nicht durch *endo*-Enzyme verdaubar ist, was einerseits auf das Vorkommen längerer, hochverzweigter Bereiche zurückzuführen sein kann. Andererseits hat auch die Substitution der AN mit FS einen verlangsamenden Effekt auf die enzymatische Hydrolyse (Vgl. Kap. 4.2.1.2), wodurch bei Betrachtung der AN-OS in der FS-haltigen Fraktion eine Verschiebung in Richtung höher-oligomerer Strukturen zu beobachten ist. Dabei ist die Zusammensetzung des Pkt1 vergleichbar mit den säureextrahierten Pkt, während analog zu den FS-freien AN-OS unter sauren Bedingungen eine Simplifizierung der AN-Struktur durch Abspaltung von Seitenkettenketten zu beobachten ist. Dies ist an den abnehmenden Anteilen von A-4a und A-7b ersichtlich. Die Zunahme der Strukturen A-3b und A-6b auf molarer Basis mit der Extraktionsdauer bzw. sinkendem pH-Wert bestätigen eine partielle Modifikation des AN während der Säureextraktion.

Die Ergebnisse des GN-Screenings weisen durch die hohen Anteile von G-2a auf eine vorwiegend lineare β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Struktur der GN hin, die vereinzelt Arap als terminale Einheiten beinhalten. (1 \rightarrow 6)-verknüpfte Strukturen, wie sie in der Methylierungsanalyse identifiziert wurden, konnten in der FS-freien Fraktion nicht festgestellt werden. Die Betrachtung der FS-haltigen GN-OS zeigt dagegen ein anderes Bild. Während das lineare β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Galactotrisaccharid Resultat der enzymhemmenden Wirkung von FS ist, zeigt das mit hohen Gehalten nachgewiesene G-4b eine partielle Verknüpfung der GN an Position O6. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass (1 \rightarrow 6)-verknüpfte Gal hauptsächlich als Seitenkette des AGN Typ II bekannt ist. Als Teil des AGN Typ I kann sie als endständiges Glied des β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften GN-Rückgrats vorliegen. Demgemäß wird die Verbindung G-4b während des enzymatischen Verdaus als endständiges OS aus GN freigesetzt. Mit steigender Säurebehandlung steigen die Anteile an G-4b von 47,3 mol% in Pkt2 auf 85,1 mol% in Pkt4 an und unterstützen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse. Dies sind überraschende Ergebnisse, da sowohl FS-haltiges G-3a als auch G-4b bis dato in der Literatur nicht beschrieben wurden. Bislang konnte lediglich das FS-haltige Galactodisaccharid G-2a in Zuckerrüben, Amaranth und Spinat identifiziert werden (Ishii & Tobita, 1993; Colquhoun *et al.*, 1994; Ralet *et al.*, 1994b; Bunzel *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um diese Strukturen genau aufzuklären und damit einhergehend die Bindung der FS in den Strukturen zu lokalisieren. Dies wird in Kap. 4.2.2.3 beschrieben.

Zusätzlich kann aus den Daten gelesen werden, dass FS in AGN Typ I nicht an Arap gebunden vorliegt.

Tab. 4.8: Relative molare Verhältnisse von Arabinan- und Galactanoligosacchariden der ferulasäurefreien sowie ferulasäurehaltigen Fraktionen der extrahierten Zuckerrübenpektine. Die Werte sind als Mittelwerte in mol% \pm R/2 (n = 2) angegeben. Der besseren Übersicht wegen sind die Daten von Pkt2 und Pkt4 erneut (s. Tab. 4.4) dargestellt.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
	ferulasäurefrei						ferulasäurehaltig					
Oligosaccharid	Arabinanoligosaccharide											
A-2a	57,7 \pm 0,5	57,8 \pm 0,8	50,2 \pm 0,4	47,3 \pm 0,3	57,8 \pm 0,8	54,7 \pm 0,5	16,1 \pm 0,2	16,7 \pm 0,7	24,8 \pm 1,6	54,4 \pm 0,8	14,5 \pm 1,0	17,8 \pm 0,5
A-3a	1,2 \pm 0,1	1,7 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0	27,8 \pm 0,0	27,8 \pm 0,0	19,7 \pm 0,5	16,3 \pm 0,0	30,8 \pm 0,4	26,1 \pm 0,4
A-3b	1,8 \pm 0,3	3,7 \pm 0,1	14,5 \pm 0,2	44,5 \pm 0,2	2,6 \pm 0,0	6,4 \pm 0,2	5,1 \pm 0,0	6,7 \pm 0,1	9,5 \pm 0,1	14,2 \pm 0,7	5,3 \pm 0,1	6,8 \pm 0,2
A-4a	19,0 \pm 0,0	16,6 \pm 0,2	15,9 \pm 0,3	6,5 \pm 0,1	18,7 \pm 0,2	18,2 \pm 0,2	17,4 \pm 0,1	14,5 \pm 0,0	12,8 \pm 0,2	9,1 \pm 0,2	14,5 \pm 0,1	14,7 \pm 0,2
A-4b	-	1,4 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,8 \pm 0,2	-	-	-	-	0,8 \pm 0,0	1,7 \pm 0,0	-	-
A-5a	1,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	-	1,7 \pm 0,0	1,7 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	1,4 \pm 0,0	2,1 \pm 0,1	4,3 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0
A-5b	0,2 \pm 0,0	-	0,4 \pm 0,1	-	0,1 \pm 0,0	-	-	-	-	-	-	-
A-6a	4,6 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1	4,3 \pm 0,2	-	4,3 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	-	2,5 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1
A-6b	1,9 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	-	1,9 \pm 0,0	2,8 \pm 0,0	5,7 \pm 0,1	7,7 \pm 1,0	9,3 \pm 0,0	-	5,8 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2
A-7a	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	-	0,5 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	3,4 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	2,7 \pm 0,2	-	4,2 \pm 0,0	3,6 \pm 0,3
A-7b	11,5 \pm 0,3	10,0 \pm 0,3	7,1 \pm 0,1	-	11,3 \pm 0,5	10,3 \pm 0,5	20,8 \pm 0,2	19,1 \pm 0,4	15,9 \pm 0,3	-	21,4 \pm 0,3	20,1 \pm 0,4
	Galactanoligosaccharide											
G-2a	97,1 \pm 0,2	97,0 \pm 0,1	97,1 \pm 0,0	97,7 \pm 0,1	96,6 \pm 0,1	96,5 \pm 0,4	64,9 \pm 5,6	29,0 \pm 7,4	25,5 \pm 0,1	8,3 \pm 0,2	51,9 \pm 4,5	29,7 \pm 2,6
G-2b	2,9 \pm 0,2	3,0 \pm 0,1	2,9 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1	3,5 \pm 0,4	-	-	-	-	-	-
G-3a	-	-	-	-	-	-	22,9 \pm 2,9	23,7 \pm 0,2	15,1 \pm 0,4	6,6 \pm 0,6	24,5 \pm 0,5	20,5 \pm 0,1
G-4b	-	-	-	-	-	-	12,2 \pm 2,7	47,3 \pm 7,1	59,5 \pm 0,5	85,1 \pm 0,4	23,6 \pm 4,0	49,8 \pm 2,7

Neben der Lokalisation der FS im Polymer ist auch ihre Menge von Interesse für die Gelbildung, da dies Aufschluss über die Anzahl der verfügbaren *cross-links* gibt. So konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an FS im Polysaccharid Einfluss auf die Eigenschaften der daraus gebildeten kovalenten Gele hat (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c;

Kale *et al.*, 2013; Ayala-Soto *et al.*, 2016). Gleichermaßen deutet der Gehalt an OFS in den extrahierten Pkt auf bereits bestehende *cross-links* hin und ist demnach für die Dokumentation der Veränderungen durch die *in vitro*-Kopplung der Polysaccharide ebenfalls entscheidend. Die Analyse der phenolischen Säuren erfolgte nach alkalischer Behandlung der Polysaccharide und anschließender Analyse der freigesetzten Verbindungen mittels HPLC-DAD. Hierbei lagen der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie isolierte Standardsubstanzen vor, die eine Zuordnung der Signale und zusätzlich eine detaillierte Unterscheidung vorhandener DFS und TriFS ermöglichten, was häufig eine Limitierung publizierter Studien darstellt. In Tab. 4.9 sind die Gehalte von FS und *cis*-Ferulasäure sowie der OFS, zusätzlich aufgetrennt nach den Anteilen der DFS und TriFS aufgeführt. Neben FS konnte in den extrahierten Pkt in deutlich geringeren Mengen zusätzlich das *cis*-Isomer identifiziert werden, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Waldron *et al.*, 1997; Schäfer *et al.*, 2020). Im Hinblick auf die Extraktionsbedingungen zeigt sich eine Variation der FS-Gehalte zwischen 651,0 und 839,1 mg/100 g. So wird ihr Gehalt sowohl durch längere Extraktionszeiten bei pH 2 (Pkt2-4) als auch durch einen niedrigeren pH-Wert reduziert. Potenzielle Ursachen sind durch den partiellen Abbau der mit FS-assoziierten AN oder die säurekatalysierte Abspaltung der FS gegeben. Literaturquellen können diese Daten jedoch nur bedingt bestätigen. So konnten Michel und Mitarbeiter (1985) und Bindereif und Mitarbeiter (2021) ebenfalls eine Abnahme des FS-Gehalts bei zunehmendem Säureeinfluss feststellen, während an anderer Stelle nach längeren Extraktionszeiten geringfügig höhere Gehalte beobachtet wurden (Levigne *et al.*, 2002b; Chen *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Liu und Mitarbeiter (2019) führten dies bei ihrer fraktionierten Extraktion auf die Freisetzung von Pkt zurück, die durch eine erhöhte FS-Menge mutmaßlich stärker an den Zellwandverbund gebunden vorliegen. In Kap. 4.2.3 wird auf diese Thematik nochmals Bezug genommen. Anhand der vorliegenden Daten konnte zudem gezeigt werden, dass eine Ultraschallbehandlung in niedrigeren FS-Gehalten resultiert.

Die Gehalte der OFS unterscheiden sich ebenfalls abhängig von den Extraktionsbedingungen, wobei jeweils die Dimere dominieren. So werden durch andauernde Säurebehandlung tendenziell Pkt mit erhöhten Gehalten an OFS gewonnen, was die eben genannte These von Liu und Mitarbeitern (2019) unterstützt. Gleichermaßen hat eine Ultraschallbehandlung mutmaßlich eine erhebliche Freisetzung von stärker gebundenen Pkt zur Folge. Pkt1 unterscheidet sich hinsichtlich der OFS-Gehalte nur geringfügig von den säureextrahierten Pkt, jedoch weist es im Vergleich deutlich weniger TriFS-Strukturen auf, womit durch Autoklavierung stärker gebundene Pkt nicht zugänglich

zu sein scheinen.

Tab. 4.9: Gehalte von monomeren und oligomeren phenolischen Säuren in den extrahierten Pektinen. Die Gehalte der Oligoferulasäuren sind ebenfalls in die Anteile der Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) aufgetrennt. Die Werte sind jeweils als Mittelwerte in $\text{mg}/100\text{g} \pm s_{x0}$ ($n = 3$) angegeben.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
<i>trans</i> -Ferulasäure	769,5 ± 9,3	839,1 ± 14,8	753,4 ± 3,2	651,0 ± 8,9	790,0 ± 44,5	758,6 ± 44,8
<i>cis</i> -Ferulasäure	23,1 ± 0,3	10,5 ± 0,1	7,7 ± 0,2	10,7 ± 0,7	14,9 ± 0,9	6,4 ± 0,5
Oligoferulasäuren	58,2 ± 1,3	55,9 ± 3,6	69,8 ± 1,7	63,4 ± 2,7	48,5 ± 3,3	79,5 ± 1,9
∑ DFS	56,7	51,6	63,8	58,6	45,0	75,0
∑ TriFS	1,5	4,3	6,0	4,8	3,5	4,5

Bei Betrachtung der prozentualen Anteile der quantifizierten DFS und TriFS an der Gesamtmenge der OFS (Abb. 4.4) dominieren 8-5-DFS mit Anteilen von 48,7 – 72,1%. Dabei ist anzumerken, dass die 8-5-DFS als Summe der 8-5nc- und 8-5c-DFS angegeben wird, da die 8-5nc-DFS während der Probenvorbereitung aus der natürlich vorkommenden 8-5c-DFS hervorgeht (Bunzel, 2010). Daneben ist 8-*O*-4-DFS in höheren Anteilen enthalten. Literaturdaten zu Zuckerrübenpektin sind sehr heterogen hinsichtlich der OFS-Zusammensetzungen. So dominieren unterschiedlich 8-5-DFS oder 8-*O*-4-DFS, (Oosterveld *et al.*, 2000b; Levigne *et al.*, 2002b; Zaidel *et al.*, 2012; Schäfer *et al.*, 2020).

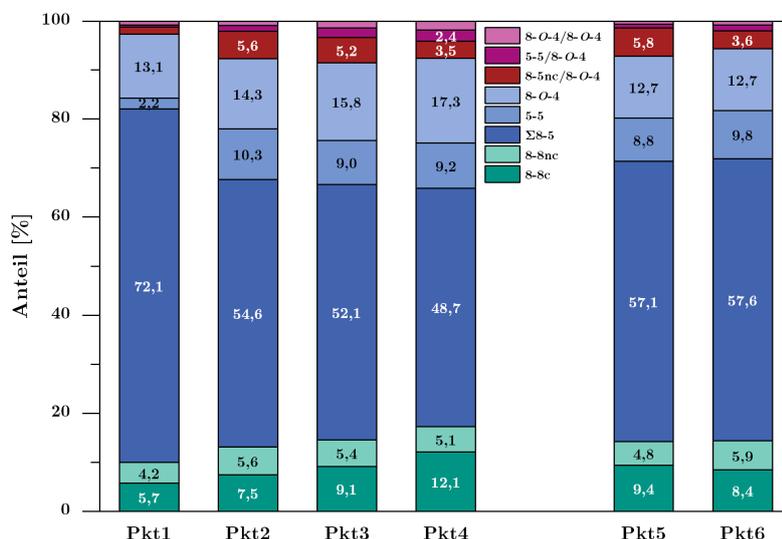


Abb. 4.4: Prozentuale Anteile der einzelnen Dehydrodiferulasäuren (blau und grün) und Dehydrotriferulasäuren (lila und rot) an der Gesamtsumme der enthaltenen Oligoferulasäuren in den extrahierten Pektinen. nc, nicht-zyklisch; c, zyklisch

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

Mit steigender Säurebehandlung reduzieren sich die Anteile der 8-5-DFS leicht, während die der 8-*O*-4- und 8-8c-DFS entsprechend zunehmen. Pkt1 weicht mit höheren Anteilen

der 8-5-DFS bei gleichzeitig geringeren Anteilen der 5-5-DFS von den säureextrahierten Pkt ab. 8-5nc/8-O-4-TriFS konnte jeweils als mengenmäßig bedeutendstes Trimer identifiziert werden.

Während die Bindung von FS entscheidend für die Ausbildung chemischer Gele ist, sind der DM und DA des Pkt relevant für physikalische Wechselwirkungen, weswegen diese ebenfalls betrachtet wurden (Tab. 4.10). So nehmen der DM und DA mit steigender Extraktionszeit bei pH 2 ab, was auf eine Entesterung unter harschen Extraktionsbedingungen hinweist. Dies entspricht Erkenntnissen von Yapo und Mitarbeitern (2007). Im Gegensatz dazu hat eine Ultraschallbehandlung keine Veränderungen zur Folge.

Tab. 4.10: Methylierungs- (DM) und Acetylierungsgrad (DA) der extrahierten Pektine. Die Werte sind jeweils als Mittelwerte in $\text{mg}/100\text{ g} \pm \text{R}/2$ ($n = 2$) angegeben. Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
DM	58,9 ± 0,0	62,0 ± 0,5	54,2 ± 0,4	51,4 ± 1,3	65,3 ± 0,2	59,2 ± 1,7
DA	41,6 ± 0,4	41,9 ± 1,6	32,9 ± 0,1	15,9 ± 0,4	42,2 ± 0,2	38,4 ± 0,6

Auf Grund des hohen DM >50 % sind bedeutende Einflüsse physikalischer Wechselwirkungen wie Ca^{2+} -Brücken als Folge potentiell enthaltenen Calciums nicht zu erwarten.

4.2.2.3 Charakterisierung von ferulasäurehaltigen Galactanligosacchariden

Aus den Ergebnissen des erweiterten GN-Screenings ging das Vorkommen eines FS-haltigen Galactotrisaccharids- und tetrasaccharids in Zuckerrübenpektin hervor (Tab. 4.8), die in der Literatur bislang nicht beschrieben wurden. In Pkt4 lag dabei ein Anteil von ca 8 % G-3a und 85 % G-4b in den FS-haltigen GN-OS vor, wodurch diese Fraktion geeignet war, diese Strukturen vor Entesterung zu charakterisieren. Dazu wurde diese Fraktion mehrfach gesammelt und mittels HPLC-C18-MSⁿ analysiert, um anhand der Fragmentierungsmuster die Bindung der FS lokalisieren zu können. Die Quasimoleküle mit m/z 865 (FS-G-4b, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) und 703 (FS-G-3a, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) wurden fragmentiert und detektierte Tochterionen ausgewählt, um diese erneut einer Fragmentierung zu unterziehen. Dies ist am Beispiel des FS-haltigen G-4b in Abb. 4.5 dargestellt. Neben der Abspaltung von Wasser (18 amu) und Anhydrohexosen (162 amu) konnten Massenübergänge (60, 90, 120 amu) beobachtet werden, die auf Cross-Ring-Fragmentierungen von Kohlenhydraten zurückzuführen sind (Garozzo *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2014). Dadurch kann das Substitutionsmuster der jeweiligen Monosaccharideinheiten aufgeklärt werden. So zeigten sich im ESI-MS²-Spektrum

Abspaltungen von 60 und 120 amu, die charakteristisch für eine (1→4)-verknüpfte Hexose sind. Die Spaltung der glykosidischen Bindungen wird durch die Massenverluste von 162 bzw. 324 amu angezeigt, was auf die Abspaltung einer Hexose bzw. eines Hexosedisaccharids zurückgeführt werden kann. Massenübergänge von 60, 90 und 120 amu im ESI-MS³-Spektrum des resultierenden Tochterions mit m/z 541 bestätigten die (1→6)-Verknüpfung der prognostizierten G-4b Struktur. Gleichzeitig war kein Verlust von FS oder Anhydro-FS zu beobachten, wodurch die Bindung der FS mutmaßlich an der terminalen Gal lokalisiert ist. Das gleiche Fragmentierungsverhalten konnte im ESI-MS⁴-Spektrum des Tochterions mit m/z 379 einer FS-haltigen Hexose beobachtet werden. Dadurch ist die FS an Position O6 der terminalen Gal-Einheit substituiert, wie es bereits für FS-haltige GN beschrieben wurde (Saulnier & Thibault, 1999).

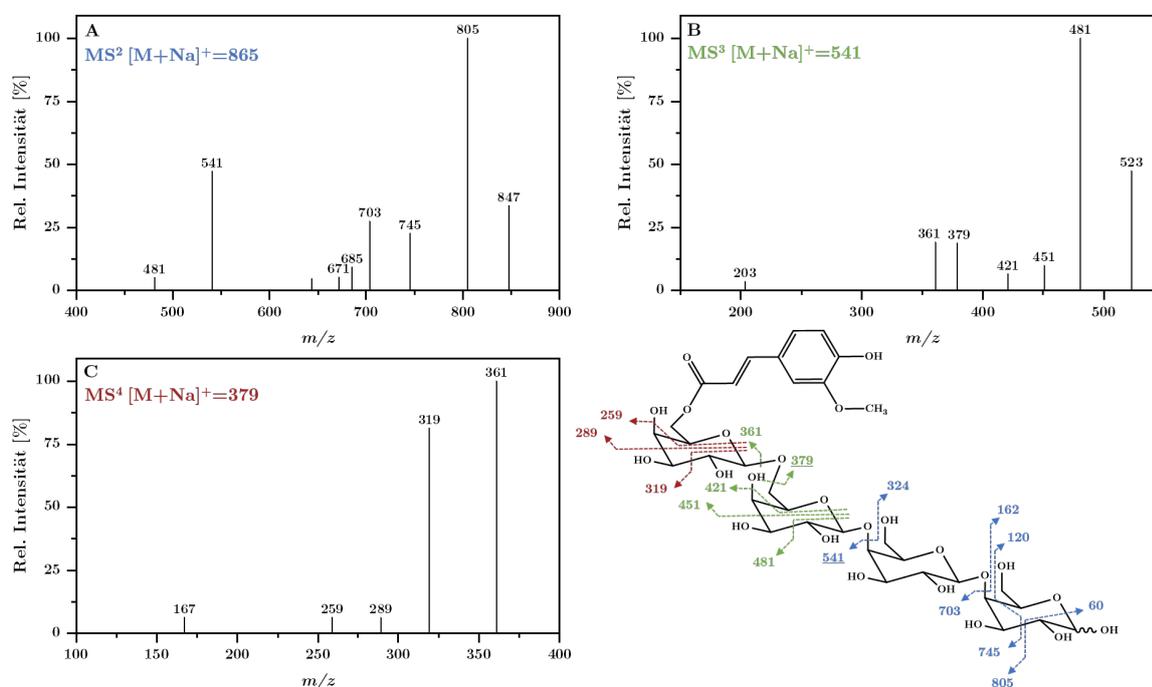


Abb. 4.5: HPLC-ESI(+)-MSⁿ-Spektren des ferulasäurehaltigen Galactotetrasaccharids G-4b mit m/z 865 ($[M+Na]^+$). Die Bindung der *trans*-Ferulasäure konnte an Position O6 der terminalen Galactose nachgewiesen werden. m/z , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

Zusätzlich wurden zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt, um die postulierte Struktur zu bestätigen. Auf Grund des hohen Anteils der zu identifizierenden Verbindung in den FS-haltigen GN-OS von Pkt4 kann diese Fraktion ohne aufwendige Aufreinigung für die NMR-Experimente verwendet werden. In Abb. 9.7 im Anhang ist das ¹H-¹³C-HSQC-NMR Spektrum der FS-haltigen GN-OS in D₂O dargestellt. Die Signalzuordnung erfolgte durch Vergleich mit Spektren chemisch ähnlicher Verbindungen wie FS-haltiges G-2a oder FS-freies G-4b (Ishii & Tobita, 1993; Ishii, 1994; Colquhoun

et al., 1994; Bunzel *et al.*, 2005; Wefers, 2016). Allerdings konnten nur Resonanzsignale der enthaltenen FS sowie der anomeren Protonen der Gal eindeutig zugeordnet werden. HMBC-Experimente zeigten auf Grund zu geringer Konzentration keine Korrelationen, um weitere Oligosaccharidsignale eindeutig zuzuordnen.

Neben FS-haltigem G-4b wurde auf Grund der Ergebnisse der HPAEC-PAD zudem das Vorkommen von FS-G-3a postuliert. Das korrespondierende Quasimolekülion mit m/z 703 ($[M+Na]^+$) zeigte in der HPLC-ESI-MSⁿ-Analyse ähnliche Fragmentierungsmuster wie FS-G-4b (s. Abb. 9.8 im Anhang). So konnte analog die Bindung der FS an Position O6 identifiziert werden. Massenübergänge von 60, 90 und 120 amu im Massenspektrum der Tochterionen (MS³ bzw. MS⁴) eines FS-haltigen Hexosedisaccharids mit m/z 541 bzw. einer FS-haltigen Hexose mit m/z 379 deuten jeweils auf eine Substitution an Position O6 hin. Da es sich bei G-3a um ein lineares β -(1 \rightarrow 4)-verknüpftes Galactotrisaccharid handelt, ist eine Coelution zweier unterschiedlich FS-haltiger Strukturen denkbar: eine mit der Substitution an der terminalen Gal und eine an der mittleren Gal-Einheit.

Bemerkenswert ist, dass im Zuge der eben beschriebenen HPLC-C18-MSⁿ-Analyse der FS-haltigen GN-OS von Pkt4 ein Signal mit einem Quasimolekülion mit m/z 673 nachgewiesen werden konnte. Dieses entspricht einem FS-haltigen Trisaccharid, das aus zwei Hexosen und einer Pentose aufgebaut ist. Dadurch würde es einer FS-haltigen G-3b oder G-3c-Struktur entsprechen, die jedoch mittels HPAEC-PAD nicht nachgewiesen werden konnten. Mittels MSⁿ-Experimenten konnte die Pentose anhand der Cross-Ring-Fragmentierungen (60 amu und 90 amu) mutmaßlich am reduzierenden Ende lokalisiert werden. Weitere Massenübergänge lassen auf eine Substitution an Position O6 der mittleren Hexose schließen. Da das Bindungsmuster des Trisaccharids jedoch unbekannt ist, kann die Position der FS nicht zweifelsfrei bestimmt werden.

4.2.3 Charakterisierung von enzymatisch modifizierten Pektinen

Neben (säure)extrahierten Pektinen wurden zusätzlich modifizierte Pkt durch Behandlung von Pkt2 mit AN- bzw. GN-spaltenden Enzymen gewonnen. Diese wurden hinsichtlich ihrer Molekulargewichtsverteilung, der Monosaccharidzusammensetzung sowie des Gehalts an phenolischen Säuren charakterisiert. In Tab. 4.11 sind die Ergebnisse der Molekulargewichtsanalyse zusammengefasst. Die Werte sollten jeweils im Vergleich zum unbehandelten Pkt2 betrachtet werden. AN und GN stellen Verzweigungen in der Pkt-Struktur dar und haben damit einhergehend großen Einfluss auf die räumliche

Struktur von Pkt. Eine enzymatische Modifikation der AN und GN-Gehalte hatte keinen Einfluss auf die $\frac{dn}{dc}$ -Werte. So stieg der Wert bei AN18 (mittlerer AN-Gehalt) im Vergleich zum AN-reichen Pkt2 zwar an, sank jedoch bei weiterem Verdau der AN wieder ab. Für die Galactanase-behandelten Pektine konnte kein signifikanter Unterschied für die $\frac{dn}{dc}$ -Werte festgestellt werden. Bei Betrachtung der daraus bestimmten M_w zeigt sich jedoch eine erhebliche Reduktion mit steigender Enzymbehandlung, sowohl für die Arabinofuranosidase- als auch die Galactanaseansätze.

Tab. 4.11: Spezifische Brechungsindexinkremente ($\frac{dn}{dc}$ in mL/g, 50 °C, 50 mM NaNO₃) sowie die damit bestimmten gewichtsgemittelten Molekulargewichte (M_w in kDa) der enzymatisch modifizierten Pektine. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm s_{x0}$ (n = 3) angegeben. Der besseren Übersicht wegen sind die Daten von Pkt2 (Tab. 4.6) wiederholt dargestellt. AN18 und AN48 sind Resultat eines 18 bzw. 48stündigen Verdau von Pkt2 mit *exo*-Arabinofuranosidase. GN18 und GN48 wurden durch 18 bzw. 48stündige Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Galactanase erhalten.

	Pkt2	AN18	AN48	GN18	GN48
$\frac{dn}{dc}$	0,132 \pm 0,000	0,146 \pm 0,004	0,142 \pm 0,004	0,135 \pm 0,008	0,128 \pm 0,004
M_w	605 \pm 9	200 \pm 11	91 \pm 12	252 \pm 19	163 \pm 8

Um den Abbau der Polysaccharide auf molekularer Ebene zu erfassen, wurden die modifizierten Pkt auf ihre Monosaccharidzusammensetzung analysiert. Die Ergebnisse der Methanolyse mit TFA-Hydrolyse sind in Abb. 4.6 zusammengefasst. Zur besseren Dokumentation des enzymatischen Verdau wurde zusätzlich die molare Verteilung des Ausgangsmaterials Pkt2 dargestellt, das zur Gewinnung der Pkt genutzt wurde. Es ist anzumerken, dass sowohl GlcA als auch Glc nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden konnten und somit nicht in der Verteilung enthalten sind.

Arabinofuranosidase eignet sich durch Spaltung von α -(1 \rightarrow 2)-, α -(1 \rightarrow 3)- und α -(1 \rightarrow 5)-verknüpften Araf zum spezifischen Abbau von komplexen AN. Durch Variation der Inkubationszeit konnte damit eine Reduktion der Ara und damit eine Reduktion der AN-Gehalte auf 17,6 bzw. 6,4 mol% erreicht werden. Anteilsmäßig stiegen dadurch die Gehalte von GalA, Gal und Rha. Im Gegensatz dazu können lineare β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte-GN durch *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactanasen abgebaut werden. Nach 18stündiger Inkubation konnte der Anteil von Gal nur geringfügig verringert werden, der auch durch längere Inkubation nicht weiter abnahm. Dies deutet daraufhin, dass GN in Pkt aus Zuckerrüben womöglich nur in geringen Anteilen linear (1 \rightarrow 4)-verknüpft vorliegen und somit enzymatisch nicht zugänglich sind. Dies geht ebenso aus den Daten der Methylierungsanalyse des unbehandelten Pkt hervor (s. Tab. 4.7). Ebenso kann die Substitution der GN mit FS den enzymatischen Verdau mit *endo*-Enzymen hemmen,

wie es in Kap. 4.2.1.2 gezeigt wurde. Durch Behandlung mit Galactanase konnte somit keine erwünschte Variation der GN-Gehalte erreicht werden. Bei Betrachtung der M_w zeigte sich, wie in Tab. 4.11 gezeigt, dennoch eine Verringerung des M_w . Laut Hersteller besitzt die eingesetzte *endo*-(1→4)-Galactanase von *Aspergillus niger* eine geringfügige Polygalacturonase-Nebenaktivität, was die Reduktion des M_w bei gleichzeitigem Erhalt der GN-Strukturen erklärt.

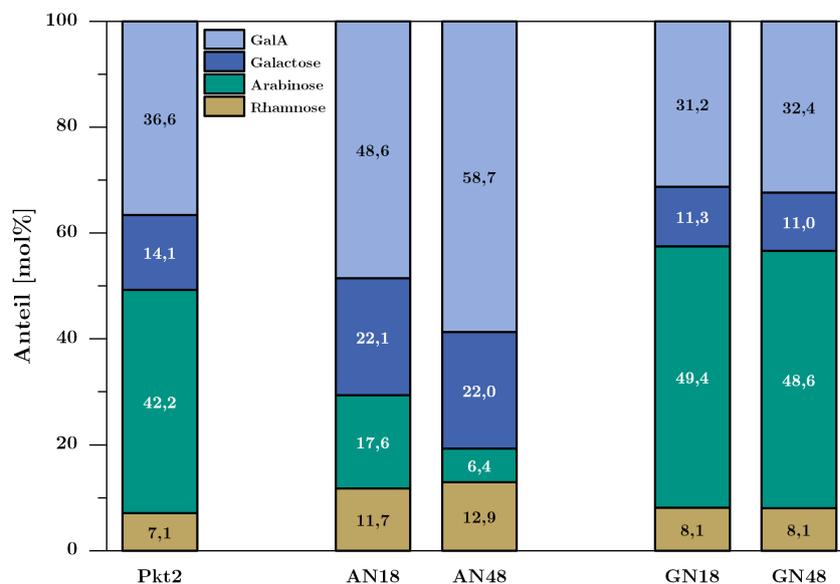


Abb. 4.6: Monosaccharidzusammensetzung (mol%, $n = 3$) der enzymatisch modifizierten Pektine aus Zuckerrüben nach Methanolyse mit TFA-Hydrolyse. AN18 und AN48 sind Resultat eines 18 bzw. 48stündigen Verdaus von Pkt2 mit *exo*-Arabinofuranosidase. GN18 und GN48 wurden durch 18 bzw. 48stündige Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Galactanase erhalten. GalA, Galacturonsäure

Zuletzt wurde der Einfluss der Modifikation auf den Gehalt der phenolischen Säuren überprüft. Bei Vergleich der enzymatisch modifizierten Pkt mit Pkt2 (s. Tab. 4.12) zeigte sich keine erhebliche Veränderung der FS-Gehalte durch Reduktion der AN-Gehalte bzw. Inkubation mit *endo*-Galactanase. Das ist hinsichtlich der AN-verdauten Pkt ein teilweise überraschendes Ergebnis, da parallel dazu eine Reduktion der AN-Gehalte durch Säurebehandlung, wie es im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, eine Abnahme der FS-Gehalte zur Folge hatte. Dies lässt darauf schließen, dass die Reduktion der FS-Gehalte unter Säurebehandlung aus einer säurekatalysierten Entesterung resultiert. Gleichzeitig ist es denkbar, dass FS-haltige AN durch die eingesetzte Arabinofuranosidase nicht hydrolysiert werden können, wie es bereits für FS-haltige AXOS gezeigt wurde (Schendel *et al.*, 2016c).

Bei Betrachtung der OFS-Gehalte zeigt sich für die AN-verdauten Pkt eine Zunahme der Gehalte mit steigender Enzymbehandlung. Dies kann auf die Hemmung des Enzyms

durch die Bindung von FS und OFS an die AN und ihrer damit einhergehenden Anreicherung im Polysaccharid zurückgeführt werden. Für die Galactanase-verdauten Pkt ist ebenfalls ein Anstieg der OFS-Gehalte im Vergleich zum Rohmaterial zu beobachten. Diese Ergebnisse sind jedoch ungewöhnlich, da die molekulare Zusammensetzung der Polysaccharide nur geringfügig verändert vorliegt.

Tab. 4.12: Gehalte von monomeren und oligomeren phenolischen Säuren in den enzymatisch modifizierten Pektinen. Die Gehalte der Oligoferulasäuren (OFS) sind zusätzlich in die Anteile der Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) aufgetrennt. Die Werte sind jeweils als Mittelwerte in $\text{mg}/100\text{ g} \pm s_{x0}$ ($n = 3$) angegeben. AN18 und AN48 sind Resultat eines 18 bzw. 48 stündigen Verdaus von Pkt2 mit *exo*-Arabinofuranosidase. GN18 und GN48 wurden durch 18 bzw. 48 stündige Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Galactanase erhalten.

	Pkt2	AN18	AN48	GN18	GN48
<i>trans</i> -Ferulasäure	$715,7 \pm 14,5$	$700,5 \pm 15,4$	$693,3 \pm 5,7$	$717,5 \pm 20,5$	$652,6 \pm 14,6$
<i>cis</i> -Ferulasäure	$22,5 \pm 0,2$	$69,7 \pm 2,4$	$50,8 \pm 1,2$	$85,8 \pm 0,6$	$64,1 \pm 1,4$
OFS	$51,9 \pm 5,1$	$63,9 \pm 7,2$	$90,5 \pm 13,2$	$89,1 \pm 2,2$	$82,3 \pm 0,5$
\sum DFS	46,2	56,4	79,9	78,3	73,1
\sum TriFS	5,7	7,5	10,7	10,8	9,2

4.2.4 Charakterisierung von Arabinoxylanen aus Popcornmais

4.2.4.1 Grundcharakterisierung

Analog zu den extrahierten Pkt aus Zuckerrüben wurden die extrahierten AX aus Popcornmais auf ihre Gehalte an Protein und Asche sowie ihr M_w analysiert (s. Tab. 4.13). Hierbei ist anzumerken, dass die AX nach gewöhnlicher Laugenextraktion hohe Proteingehalte von 20 – 32 % aufwiesen und demnach mehrfach mit Protease nachverdaut wurden. Die hier dargestellten Werte entsprechen somit den Gehalten an Restprotein nach Proteasenachbehandlung. So liegen die endgültigen Restproteingehalte nach Kjeldahl zwischen 10 und $18\text{ g}/100\text{ g}$ und damit deutlich über den Gehalten in vergleichbaren AX aus Mais mit $2 - 8\text{ g}/100\text{ g}$ (Yadav *et al.*, 2007; Carvajal-Millán *et al.*, 2007; Marquez-Escalante & Carvajal-Millán, 2019; Méndez-Encinas *et al.*, 2019). Literaturdaten zu Proteingehalten in AX aus Popcornmais sind bis dato nach bestem Wissen nicht existent. Um das AX-assoziierte bzw. co-extrahierte Protein näher zu untersuchen, wurde die Aminosäureverteilung mittels AQC-Methode analysiert (s. Tab. 9.4 im Anhang). Mit einem Anteil von ca. 21 % dominiert Prolin vor Leucin mit ca. 10 %, was in der Literatur für Popcornmaismehl bestätigt werden konnte (Matuz *et al.*, 2000). Somit handelt es sich um prolinreiches Restprotein, das durch die verwendete

Protease nicht vollständig verdaut werden kann. Dies konnte in Studien von Yust und Mitarbeiter (2003) an Sonnenblumenprotein bestätigt werden. Die unterschiedlichen Restproteingehalte der extrahierten AX korrelieren dabei mit den Extraktionsbedingungen. So weisen mild extrahierte AX höhere Proteingehalte auf, was potenziell auf einen geringeren Anteil an Polysacchariden zurückzuführen ist, welche durch andauernde Laugenbehandlung vermehrt aus dem Zellwandmaterial extrahiert werden. Dagegen sind die Aschegehalte zwischen 2,1 und 3,1 g/100 g weitestgehend unbeeinflusst von den gewählten Bedingungen.

Tab. 4.13: Gehalte an Protein und Asche der extrahierten Arabinoxylane als Mittelwerte in g/100 g \pm R/2 (n = 2). Zusätzlich sind die spezifischen Brechungsindexinkremente ($\frac{dn}{dc}$ in mL/g, 50 °C, 50 mM NaNO₃) sowie die damit bestimmten gewichtsgemittelten Molekulargewichte (M_w in kDa) als Mittelwerte \pm s_{x0} (n = 3) angegeben. Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5
Protein	14,8 \pm 0,3	10,0 \pm 0,1	13,7 \pm 0,1	12,7 \pm 0,9	18,0 \pm 0,2
Asche	2,7 \pm 0,1	2,8 \pm 0,2	3,1 \pm 0,3	2,9 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
$\frac{dn}{dc}$	0,132	0,147	0,129	0,123	0,113
	\pm 0,004	\pm 0,004	\pm 0,004	\pm 0,002	\pm 0,002
M_w	209 \pm 6	196 \pm 11	212 \pm 11	226 \pm 5	262 \pm 20

Bei Betrachtung der $\frac{dn}{dc}$ -Werte zeigt sich wiederum eine erhebliche Variabilität zwischen den Fraktionen, was die Bedeutung der individuellen Erhebung der $\frac{dn}{dc}$ -Werte hervorhebt. So werden in der Literatur meist Werte zwischen 0,136 und 0,147 mL/g eingesetzt, die für die Bestimmung des M_w von AX4 und AX5 jedoch nicht geeignet sind (Dervilly-Pinel *et al.*, 2001; Kale *et al.*, 2010; Marquez-Escalante & Carvajal-Millán, 2019). Die resultierenden M_w unterscheiden sich nur geringfügig zwischen den extrahierten AX und liegen zwischen 196 und 262 kDa. Während Daten zu M_w von AX aus Popcornmais nicht vorliegen, sind entsprechende Daten zu AX aus Mais wiederum sehr heterogen. So liegen M_w von AX aus Mais, die unter vergleichbaren Extraktionsbedingungen isoliert wurden, zwischen 250 und 500 kDa (Kale *et al.*, 2013; Marquez-Escalante & Carvajal-Millán, 2019).

4.2.4.2 Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen

Zur Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen erfolgte zunächst ebenfalls eine Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse. Es zeigen sich kaum extraktionsbedingte Unterschiede hinsichtlich der AX-Zusammensetzungen (s. Abb. 4.7). Gehalte an Glc sind mutmaßlich auf geringe Mengen an Reststärke zurückzuführen, die während der

alkalischen Extraktion aus den vermeintlich stärkefreien UBS (negativer Iod-Stärke-Test) freigesetzt wurden und trotz mehrfacher Inkubation der AX mit stärke-spaltenden Enzymen nicht hydrolysiert wurden. So weisen AX2 und AX3 mit 1,6 bzw. 2,9 mol% weniger Glc auf als die anderen Fraktionen mit ca. 6 mol%, was in einer leichten Verschiebung der relativen Monosaccharidanteile resultiert. Die AX-Strukturen werden mit Anteilen von 45 bis 49 mol% von Xyl dominiert, die hauptsächlich Teil des AX-Rückgrats ist. Anteile an Ara von 36,5 bis 39,5 mol% deuten auf ein hohes Ausmaß an Seitenkettenstrukturen hin. Gewöhnlich wird aus den Anteilen der Ara und Xyl das A/x berechnet, um Rückschlüsse auf die Substitutionsdichte des Rückgrats ziehen zu können. In Abb. 4.7 sind die A/x der extrahierten AX angegeben. Sie variieren zwischen 0,73 und 0,86 und nehmen dabei für harschere Extraktionsbedingungen wie längere Extraktionszeiten und höhere Temperaturen (AX2) oder die Behandlung mit Lauge im Ultraschallbad (AX4) geringere Werte an. Die Anteile von Gal mit ca. 5,5 mol% deuten auf komplexere Seitenkettenstrukturen und damit auf seitenkettengebundene Xyl hin, was die Aussagekraft des A/x hinsichtlich der Substitutionsdichte einschränkt. Gleichermäßen hat doppelt substituierte Xyl eine Verzerrung zur Folge, weshalb zur Einordnung des A/x ebenfalls die Daten der Methylierungsanalyse herangezogen werden sollten.

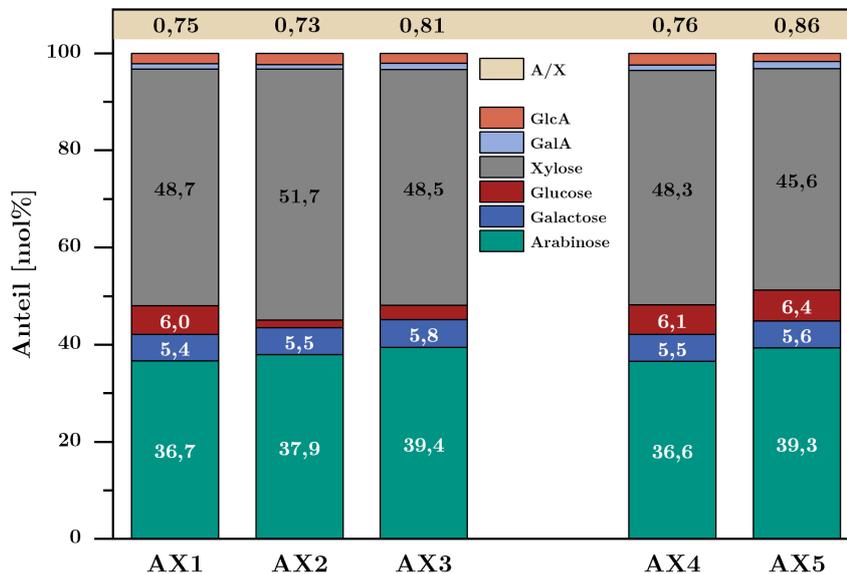


Abb. 4.7: Monosaccharidzusammensetzung (mol%) der aus Popcornmais extrahierten Arabinoxylane nach Methanolyse mit TFA-Hydrolyse. A/x , Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis; GlcA, Glucuronsäure; GalA, Galacturonsäure
Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

Die Daten der Methylierungsanalyse (s. Tab. 4.14) zeigen, dass nur ein geringer Teil der Gesamtxylose als unsubstituierte 1,4-verknüpfte Xylp vorliegt (ca. 7,5 mol%), während

monosubstituierte Xylp den mengenmäßig bedeutendsten Teil der Xylp darstellen. Hierbei zeigt sich eine Dominanz der in Position O3-substituierten Xylp mit ca. 14,9 – 17,2 mol% gegenüber Xylp, die an Position O2 verzweigt vorliegt (< 3,6 mol%). 10,4 bis 11,7 mol% der Xylp weisen zudem Substitutionen an Position O2 und O3 auf. Hier ist allerdings anzumerken, dass 1,2,3,4-Xylp ebenso das Resultat einer Untermethylierung sein kann. Gleichzeitig liegt ein bedeutender Teil der Xylp in Seitenketten vor, was durch die Anteile an t-Xylp (8 – 11 mol%) bzw. 1,2-verknüpfter Xylp (ca. 2,5 mol%) als intermediäre Einheit hochkomplexer Strukturen verdeutlicht wird. Dadurch zeigt sich das A/x als wenig geeignet für die Datierung der Seitenketten von AX aus Popcornmais. Im Gegensatz zur Xyl liegt der Großteil der enthaltenen Ara als t-Araf in simplen Ara-Seitenketten oder als mutmaßlicher Bestandteil von FA-Seitenketten vor. Die Anteile der 1,2- und 1,3-verknüpften Araf von 2,5 – 3,2 mol% bzw. 4,2 – 5,0 mol% implizieren das Vorkommen komplexer Seitenketten mit Xylp an Position O2 bzw. O3 der Araf. Ein weiteres Strukturelement ist durch die terminale Galp gekennzeichnet, die in dieser Form Bestandteil von FAXG ist. Gleichzeitig deuten die Anteile der 1,3-Galp auf das Vorkommen der hochverzweigten Seitenketten FAXGX und FAXGG hin, die bislang nur in Mais identifiziert wurden (Allerdings *et al.*, 2006). Mit Hilfe der Methylierungsanalyse kann zusätzlich zur Monosaccharidanalyse die Reinheit der extrahierten AX überprüft werden. So weisen die AX zwischen 4,0 und 16,3 mol% Glc auf, die mutmaßlich auf Stärke zurückzuführen ist. Gegebenenfalls sind auch geringe Mengen an Cellulose denkbar, die im Rahmen der alkalischen Extraktion als Feststoff aus den UBS in das alkoholische Präzipitat verschleppt wurden. Gleichzeitig wurden durch den Nachweis von GalA in der Monosaccharidzusammensetzung geringe Mengen an coextrahiertem Pkt angedeutet. In der Methylierungsanalyse wird die Anwesenheit von Pkt durch 1,5- und 1,3,5-verknüpfte Araf als Teil des AN angedeutet.

Die Ergebnisse deuten somit auf hochkomplexe Seitenketten in den AX aus Popcornmais hin. Ein Einfluss durch die Extraktionsbedingungen konnte nicht festgestellt werden. Aussagen zur Verteilung dieser Ketten entlang des Rückgrats sind anhand der Bindungstypen nicht möglich. Hierfür ist eine enzymatische Spaltung des Rückgrats und die anschließende Analyse der freigesetzten AXOS nötig. Auf Grund der geringen Mengen an unsubstituierter Xylp ist die enzymatische Zugänglichkeit mittels *endo*-Xylanase jedoch fraglich (Pollet *et al.*, 2010).

Tab. 4.14: Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) in den extrahierten Arabinoxylanen aus Popcornmais nach Methylierungsanalyse. Die Werte sind als Mittelwerte (mol%) $\pm s_{x0}$ ($n = 3$) angegeben. t, terminal; p, Pyranose; f, Furanose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; m/z , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

PMAA	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5
t-Xylp	9,0 \pm 0,6	11,1 \pm 0,3	8,2 \pm 0,7	9,5 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1
1,2-Xylp ^a	2,5 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,6 \pm 0,0	2,3 \pm 0,1
1,4-Xylp ^a	6,8 \pm 0,1	8,2 \pm 0,0	7,4 \pm 0,2	7,3 \pm 0,0	7,1 \pm 0,0
1,2,4-Xylp ^b	2,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,0	3,5 \pm 0,2	3,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0
1,3,4-Xylp ^b	14,9 \pm 0,4	17,2 \pm 0,1	14,6 \pm 0,8	15,4 \pm 0,1	15,4 \pm 0,3
1,2,3,4-Xylp	11,0 \pm 0,3	11,5 \pm 0,4	11,5 \pm 0,9	10,5 \pm 0,0	10,3 \pm 0,5
Σ	46,8 \pm 1,0	54,5 \pm 1,0	47,5 \pm 0,3	48,3 \pm 0,2	45,7 \pm 0,3
t-Glcp	0,6 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1
1,4-Glcp	15,4 \pm 0,8	3,8 \pm 0,4	10,7 \pm 1,4	10,5 \pm 0,3	14,0 \pm 0,5
Σ	16,1 \pm 0,8	4,0 \pm 0,4	11,4 \pm 1,5	11,0 \pm 0,3	14,7 \pm 0,6
t-Galp	2,6 \pm 0,1	3,3 \pm 0,0	2,4 \pm 0,1	2,9 \pm 0,0	2,4 \pm 0,1
1,3-Galp	1,6 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0	1,4 \pm 0,1
Σ	4,2 \pm 0,1	4,0 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	4,1 \pm 0,0	3,9 \pm 0,0
t-Araf	22,2 \pm 0,3	26,2 \pm 0,4	26,6 \pm 0,3	24,9 \pm 0,1	25,5 \pm 0,9
t-Arap	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
1,2-Araf	2,6 \pm 0,0	3,2 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	2,5 \pm 0,0
1,3-Araf	4,2 \pm 0,1	4,9 \pm 0,2	4,4 \pm 0,5	4,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3
1,5-Araf	1,9 \pm 0,2	2,0 \pm 0,0	2,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,0
1,3,5-Araf	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
1,2,3,5-Araf	1,1 \pm 0,5	0,4 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2
Σ	32,9 \pm 0,3	37,5 \pm 0,5	37,8 \pm 0,3	36,5 \pm 0,1	35,7 \pm 0,8

^a Auf Grund von Coelution wurden die Anteile aus den Flächenverhältnissen der charakteristischen Fragmentionen mit m/z 117 (1,2-Xylp) bzw. m/z 118 (1,4-Xylp) berechnet.

^b Auf Grund von Coelution wurden die Anteile aus dem Flächenverhältnis nach Trennung an einer DB5-Säule anteilmäßig ermittelt.

Der Zugang zu komplexen Seitenkettenstrukturen der AX ist durch die Profilingmethode von Schendel und Mitarbeitern (2016) möglich. So können die Gehalte an FA, FAX und FAXG nach milder Säurehydrolyse mittels HPLC-DAD bestimmt werden. Höheroligomere Strukturelemente, wie sie bereits in Mais identifiziert wurden (Allerdings *et al.*, 2006), können hiermit jedoch nicht analysiert werden. Die Analyseergebnisse sind in Tab. 4.15 zusammengefasst. So weisen AX3 und AX5 jeweils die höchsten Gehalte an FS-haltigen AX-Seitenketten auf, während mit steigender Extraktionszeit eine Reduktion zu beobachten ist. Dies geht mutmaßlich auf die stärker ausgeprägte

Abspaltung der FS im alkalischen Milieu zurück. Gleichermaßen resultiert eine Temperaturabsenkung während der Extraktion von 30 auf 25 °C (AX2 vs. AX1) in höheren Gehalten, was mit einer Reduktion der Verseifungsgeschwindigkeit bei niedrigeren Temperaturen einhergeht. Beim Vergleich von AX3 und AX4 kann der Einfluss der Ultraschallbehandlung überprüft werden. So hat eine Ultraschallbehandlung im Alkalischen (AX4) eine erhöhte Reduktion der FS-haltigen Strukturelemente zur Folge. Das Verhältnis von FA zu FAX liefert Rückschlüsse über die Komplexität der Seitenketten. Niedrige Quotienten indizieren eine hohe Proportion an komplexen Strukturen, während hohe Werte eine Dominanz von FA als simpelste Seitenketten andeuten. Beispielsweise weisen Dinkel und Weizen FA/FAX von ca. 40 auf und implizieren dadurch simple Seitenkettenstrukturen der AX. Im Gegensatz dazu wiesen UBS aus Popcornmais mit einem FA/FAX von ca. 3 anteilmäßig deutlich mehr FAX auf, wodurch ein bedeutender Anteil der AX-Seitenketten mutmaßlich hochverzweigt vorliegt (Schendel *et al.*, 2016a). Die hier ermittelten FA/FAX-Werte von 4,1 bis 4,7 sind im Einklang mit genannter Literatur und bestätigen die Ergebnisse der Methylierungsanalyse. Allerdings nimmt die Komplexität unter härteren Extraktionsbedingungen ab. Anhand des beschriebenen Seitenkettenprofilings sind lediglich Aussagen zu FS-haltigen Strukturen möglich. Im Zuge der alkalischen Extraktion ist allerdings eine partielle Abspaltung der FS zu erwarten, womit diese FS-freien Strukturen mit der Methode nicht erfasst werden können. Aus der Methylierungsanalyse geht zwischen den extrahierten AX keine erhebliche Variation der Polysaccharidstruktur hervor. Daher ist es wahrscheinlich, dass das Grundgerüst der komplexen Seitenketten zwischen den AX ebenfalls erhalten bleibt, wobei diese durch die variierenden alkalischen Bedingungen in unterschiedlichem Ausmaß mit FS substituiert vorliegen.

Tab. 4.15: Gehalte der ferulasäurehaltigen Seitenkettenstrukturen in den extrahierten Arabinoxylanen. Die Werte sind als Mittelwerte in $\mu\text{mol/g} \pm s_{x0}$ ($n = 3$) angegeben. FA, 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAX, β -D-Xylopyranosyl-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAXG, α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose
Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

	AX1	AX2 ^a	AX3	AX4	AX5 ^a
FA	2,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,07	4,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	6,9 \pm 0,5
FAX	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,05	1,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,01	1,6 \pm 0,2
FAXG	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,06	1,5 \pm 0,02	0,7 \pm 0,00	1,9 \pm 0,2
FA/FAX	4,7 \pm 0,9	4,7 \pm 0,3	4,1 \pm 0,2	4,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1

^a $n = 2$

Um die extrahierten AX hinsichtlich der estergebundenen Verbindungen zu analysieren, wurden diese analog zu Pkt verseift und die freigesetzten phenolischen Säuren sowohl in monomerer als auch oligomerer Form quantifiziert. So konnte neben FS auch *p*-CS identifiziert werden, während *cis*-Ferulasäure nicht nachgewiesen wurde. Die ermittelten Gehalte von FS, *p*-CS und OFS sind in Tab. 4.16 dargestellt. So zeigt sich für FS und *p*-CS eine identische relative Abnahme der Gehalte abhängig von den Extraktionsbedingungen wie sie bereits für die FS-haltigen Seitenkettenstrukturen beschrieben wurden. Dabei weist AX5 mit 296,5 mg/100 g den höchsten FS-Gehalt auf, der etwa sechsfach höher ist als der geringste Gehalt von AX2. Die ermittelten Gehalte von *p*-CS sind dagegen in allen Fraktionen etwa um den Faktor 10 niedriger als die entsprechenden FS-Gehalte. Bei Betrachtung der OFS zeigt sich dagegen kein erheblicher Einfluss durch die Extraktionsbedingungen, was eine erhöhte Alkalistabilität der OFS im Vergleich zur monomeren Form impliziert. Die Gehalte der OFS liegen hier zwischen 138 und 161 mg/100 g. Für alle AX stellen DFS die mengenmäßig bedeutendere Fraktion der OFS dar, während TriFS-Strukturen in geringen Mengen und tendenziell mehr in schonend extrahierten AX (AX3 und AX5) enthalten sind.

Tab. 4.16: Gehalte von monomeren und oligomeren phenolischen Säuren in den extrahierten Arabinoxylanen. Die Werte sind jeweils als Mittelwerte in mg/100 g \pm s_{x0} (n = 3) angegeben. Die Gehalte der Oligoferulasäuren (OFS) sind zusätzlich in die Anteile der Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) aufgetrennt. Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5
<i>trans</i> -Ferulasäure	109,2 \pm 14,0	54,2 \pm 3,2	246,5 \pm 6,4	97,6 \pm 3,5	296,5 \pm 18,6
<i>trans-p</i> -Cumarsäure	10,1 \pm 1,8	7,5 \pm 0,4	18,9 \pm 0,5	9,5 \pm 0,4	19,9 \pm 1,5
Σ OFS	161,1 \pm 11,5	137,8 \pm 18,3	149,1 \pm 1,1	138,6 \pm 0,7	141,9 \pm 2,0
Σ DFS	157,3	136,0	144,1	136,2	136,7
Σ TriFS	3,8	1,8	5,1	2,4	5,2

In Abb. 4.8 sind die prozentualen Anteile der einzelnen DFS am Gesamt-OFS-Gehalt dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass das 8-8-THF-Derivat nachgewiesen, jedoch auf Grund von Coelution nicht quantifiziert werden konnte. Die Verteilung der OFS zeigt eine klare Dominanz der 8-8c- und 8-8nc-DFS, während 8-5-DFS in geringeren Anteilen von 9 bis 15 % auftreten. Da Daten zu DFS in AX aus Popcornmais in der Literatur nicht aufgefunden werden konnten, war der Vergleich mit Popcornmaismehl sowie AX aus Mais naheliegend. In beiden Fraktionen zeigten sich 8-5- und 5-5-DFS als die mengenmäßig bedeutendsten Derivate (Lapierre *et al.*, 2001; Carvajal-Millán

et al., 2007; Jilek & Bunzel, 2013). Daher erscheint eine Dominanz der 8-8-DFS als eher ungewöhnlich. Eine Analyse der UBS aus Popcornmais (s. Abb. 9.10 im Anhang) konnte jedoch die in der Literatur beschriebenen hohen Anteile der 8-5- und 5-5-Derivate in Popcornmais bestätigen, während 8-8nc-DFS nicht quantifiziert werden konnte. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des DFS-Profiles während der alkalischen Extraktion. Es ist bekannt, dass 8-8-THF-DFS unter alkalischen Bedingungen teilweise in das 8-8c-Derivat überführt wird, was zu den gemessenen Anteilen der 8-8c-DFS vermutlich beiträgt (Bunzel, 2010). Gleichermäßen ist aus der Literatur eine erhöhte Alkalistabilität von Estern der 8-8-Disinapinsäuren bekannt (Bunzel *et al.*, 2003). Dies könnte auch für 8-8-DFS gelten, was sich in deren erhöhten Anteilen in länger extrahierten AX widerspiegelt. Aus den Daten geht zudem hervor, dass insbesondere 8-O-4-DFS unter harscheren Extraktionsbedingungen vermutlich teilweise freigesetzt wird. Im Gegensatz dazu konnte 5-5/8-O-4-TriFS als einziges Trimer nachgewiesen werden, was auch Jilek & Bunzel (2013) als bedeutendste TriFS in Popcornmaismehl identifizierten.

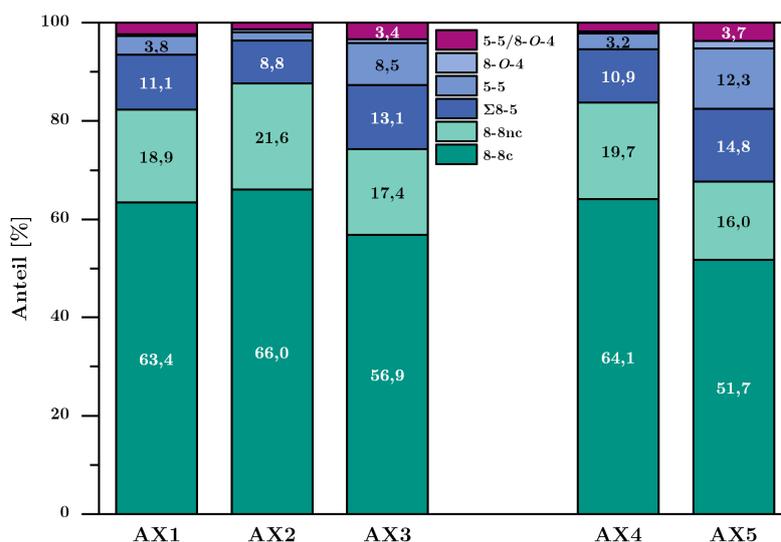


Abb. 4.8: Prozentuale Anteile der einzelnen Dehydrodiferulasäuren (blau und grün) und Dehydrotriferulasäuren (lila) an der Gesamtsumme der enthaltenen Oligoferulasäuren in den extrahierten Arabinoxylanen. nc, nicht-zyklisch; c, zyklisch
 Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

4.3 Charakterisierung der kovalenten Polysaccharidgele

Nach vollständiger Solubilisierung bzw. Hydratisierung der extrahierten Polysaccharide in Natriumacetatpuffer wurden diese schließlich durch die Zugabe von Lac bzw. H₂O₂ und POD oxidativ gekoppelt. Die so erhaltenen kovalent-vernetzten Gele wurden zunächst rheologisch charakterisiert, um die viskoelastischen Eigenschaften der Gele aus den unterschiedlich extrahierten Polysacchariden abzubilden und dadurch poten-

zielle Struktur-Eigenschaftsbeziehungen herauszufinden. Neben der Viskoelastizität der Gele ist auch die translatorische Beweglichkeit von Molekülen in der ausgebildeten Netzwerkstruktur von Interesse. Je nach Beschaffenheit des Gelbildners kann die Netzwerkstruktur auf mikroskopischer Ebene unterschiedlich ausgebildet sein, was sich potenziell in einer variablen translatorischen Beweglichkeit von Molekülen äußert. Aus diesem Grund wurde die Diffusion von Wasser und teilweise von Glc mittels PFG-STE-NMR dokumentiert, um Rückschlüsse auf die mikromolekulare Umgebung in den unterschiedlichen Gelen ziehen zu können. Hierbei konnte auf Vorarbeiten von Lena Bitenc und Karin Michalski zurückgegriffen werden, die die Anwendung der PFG-STE-NMR auf ferulasäurebasierte Hydrogele im Rahmen ihrer Masterarbeiten in Kooperation mit dem Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik erprobten (Bitenc, 2017; Michalski, 2020). In abschließenden Analysen wurden die Veränderungen der phenolischen Komponenten während der Gelbildung analysiert.

Der Gelbildungsprozess wurde dabei an die jeweils folgende Analytik angepasst. So erfolgte die Gelbildung für rheologische Messungen in der Messgeometrie, während sie für die NMR-Messungen im NMR-Probengefäß stattfand. Eine Messung desselben Gels mit beiden Messmethoden war daher nicht möglich. Gleichzeitig wurden für die Analyse der phenolischen Komponenten die Polysaccharide im für die Analytik benötigten Probengefäß geliert.

4.3.1 Pektingele

4.3.1.1 Rheologische Eigenschaften

FS-basierte Hydrogele werden klassisch mittels Rheologie hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften charakterisiert. Durch zeitliche Kopplung der Gelbildung mit der rheologischen Messmethode ist zudem eine Dokumentation der Gelierung als Funktion der Zeit möglich. Hierfür wurden jeweils die Parameter G' und G'' sowie das daraus berechnete $\tan \delta$ aufgezeichnet. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss der Polysaccharidkonzentration auf die Gelierung mit Lac/O₂ bzw. POD/H₂O₂ untersucht. Hierzu wurde Pkt2 in Konzentrationen von 1 – 4 % (w/v) gelöst und geliert. Höhere Konzentrationen konnten auf Grund der erschwerten Handhabung durch die erhöhte Viskosität der Ausgangslösung nicht analysiert werden. Der Verlauf der Gelbildung ist in Abb. 4.9 dargestellt. Aus den Daten geht für beide oxidative Systeme eine Zunahme von G' mit steigender Polysaccharidkonzentration hervor, was bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte (Oosterveld *et al.*, 2000b; Zaidel *et al.*, 2012). Dies geht vermutlich auf ein engmaschigeres Netzwerk auf Grund der höheren Menge des Netzwerkbildners

und damit einhergehend der höheren *cross-link*-Dichte zurück. Dabei erreicht G' sowohl für Lac- als auch POD-induzierte Gele Werte von ca. 1.000 Pa für 4%ige Gele, während G' -Werte der 1%igen Gele um etwa den Faktor 100 darunter liegen. Für die Lac-induzierten Gele zeigte sich das 3%ige Gel als auffällig, da es nur geringfügig vom 4%igen Gel abweicht. Eine zusätzliche Möglichkeit, die Gele zu beschreiben, ist durch $\tan \delta$ gegeben, der zusätzlich G'' als Parameter der relativen Viskosität berücksichtigt. Ein Wert von 1 stellt den Gelierzeitpunkt dar. Bereits vor Enzymzugabe liegt $\tan \delta$ der Lösungen unter 1 (0,6 – 0,8), womit rheologisch gesehen bereits ein Gel vorliegt. Dies ist potenziell dadurch zu erklären, dass die Probenlösung zu Beginn auf 4 °C gekühlt wird, wodurch die Viskosität deutlich erhöht wird. Erst im Laufe der ersten drei Minuten erfolgt eine Erwärmung auf 25 °C und eine damit einhergehende geringfügige Verringerung der Viskosität, was sich in der leichten Abnahme von G'' zu Beginn der Messung widerspiegelt. Nach Enzymzugabe kommt es schließlich durch Ausbildung des dreidimensionalen Netzwerks zu einer schnellen Erhöhung von G' , während sich G'' konstant verhält. Eine Blindwertmessung ohne Enzymzugabe zeigte keinen Anstieg von G' . Auffallend ist zudem, dass $\tan \delta$ des 3%igen Lac-generierten Gels unterhalb des Wertes des 4%igen Gels liegt, was potenziell auf den geringeren viskosen Anteil bei niedrigeren Konzentrationen zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu nimmt $\tan \delta$ für sämtliche POD-induzierten Gele den gleichen Wert (ca. 0,015) an, was derzeit nicht schlüssig erklärt werden kann.

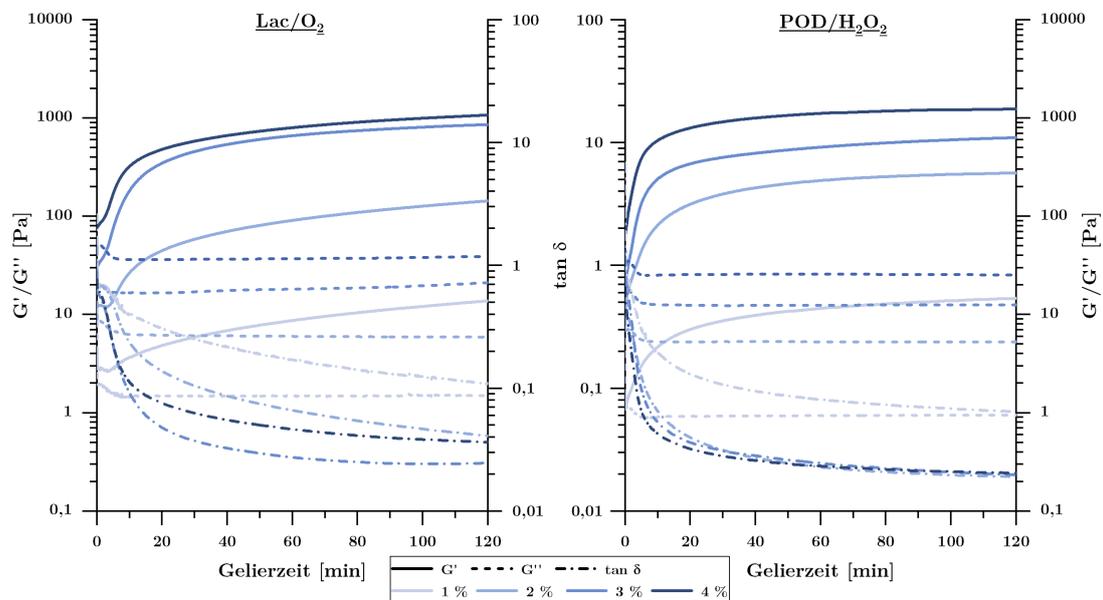


Abb. 4.9: Rheologische Untersuchung (5 % Deformation, 1 Hz) von Pektin Gelen in Abhängigkeit von der Konzentration: Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') sowie die daraus resultierenden $\tan \delta$ -Werte von 1 – 4%igen Lösungen (w/v) von Pkt2 über einen Zeitraum von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/H₂O₂

Die Messung des linear viskoelastischen Bereichs mittels Frequenz- und Amplitudentests im Anschluss an die Gelbildung ermöglichte die Überprüfung der verwendeten Messparameter, die bei erster Messung eines Gels bestimmt und auf alle folgenden Messungen übertragen wurden. In Abb. 9.11 im Anhang sind die Ergebnisse der beiden Tests für 1 – 4%ige Gele von Pkt2 zusammengefasst. Hinsichtlich des zeitabhängigen Verhaltens erwiesen sich 2 – 4%ige Gele stabil im Bereich von 0,016 bis 16 Hz mit $G' > G''$, während dies für 1%ige Gele lediglich zwischen 0,016 und ca 3 Hz der Fall war. Gleichzeitig bricht bei ca. 20% Deformation die Gelstruktur, was durch die rapide Abnahme von G' und den gleichzeitigen Anstieg von G'' detektiert wird.

Im nächsten Schritt wurden 4%ige Gele der unterschiedlich extrahierten Pkt gebildet und analysiert. Der Gelierverlauf über 2h ist in Abb. 4.10 dargestellt. Anhand des Gelierverlaufs der Lac-induzierten Gele zeigt sich, dass Pkt1 und 2 sowie Pkt6 bereits unmittelbar nach Enzymzugabe bzw. beim Start der Messung gelieren, was durch $\tan \delta < 1$ angedeutet wird. Im Vergleich dazu gelierten Pkt3-5 erst nach ca. 5 min. Im weiteren Verlauf stieg G' auf Werte zwischen 300 und 1.100 Pa an, wobei Pkt2 Gele mit der höchsten Elastizität ausbildete. Wird der Netzwerkbildner bei pH 2 durch Anwendung längerer Extraktionszeiten gewonnen (Pkt2-4), kommt es zu einer Reduktion von G' . Dies könnte auf den abnehmenden Gehalt an FS zurückgeführt werden, womit weniger intermolekulare *cross-links* eine geringere Stabilität des Netzwerks induzieren. Gele aus Autoklavenpektin (Pkt1) bzw. Pkt6 (Gewinnung nach Ultraschallbehandlung) weisen mit ca. 720 Pa ebenfalls eine hohe Elastizität auf.

Bei Betrachtung der POD-induzierten Gele fällt auf, dass sämtliche Pkt unmittelbar nach Enzymzugabe bzw. beim Start der Messung bereits gelieren und $\tan \delta$ somit unterhalb einem Wert von 1 liegen. Pkt2 zeigt hier einen fast identischen Verlauf von G' zur Lac-Katalyse. Allerdings ist im Vergleich zu den Lac-induzierten Gelen eine geringere ausgeprägte Abhängigkeit der Gelierung von der Extraktionszeit des Gelbildners bei pH 2 erkennbar. So weisen Pkt3-Gele ein ähnliches G' auf wie Pkt2-Gele (1.050 – 1.200 Pa), während das lang extrahierte Pkt4 in deutlich inelastischeren Gelen resultiert. Das bei pH 3 extrahierte Pkt5 bildete mit G' von ca. 1.500 Pa Gele mit der höchsten Elastizität aus. Im Gegensatz zu den säureextrahierten Pkt ist der Verlauf der Gelierung von Pkt1 ungleichmäßig, was sich durch den initialen Anstieg von G' zeigt, der jedoch im weiteren Verlauf in eine schrittweise Abnahme übergeht bis ein Plateau erreicht wird. Dies deutet auf Inhomogenitäten während der Gelierung hin, wie es beispielsweise durch einen Wasseraustritt als Folge der Synärese möglich ist. Für Lac-induzierte Gele konnte gegen Ende der Gelierung von Pkt1 eine ähnliche Abnahme von G' beobachtet werden.

Die Messung der Amplitudentests lieferte Aussagen zu den Stabilitäten der Gele (Abb. 9.12). So waren sämtliche Gele im Bereich von 0,1 bis 12 % Deformation stabil, wobei die Deformationsstabilität sowohl für Lac- als auch POD-induzierte Gele mit steigender Säurebehandlung abnahm. So war ein Bruch der Gelstruktur für Pkt2 bereits bei 12 % Deformation (Lac-generiertes Gel) zu beobachten, während Gele von Pkt4 erst nach ca. 65 % Deformation brachen. Somit scheint die Gelstabilität mit dem AN-Gehalt (und damit dem M_w) und/oder dem FS-Gehalt zu korrelieren, die zwischen Pkt2-4 abnehmen.

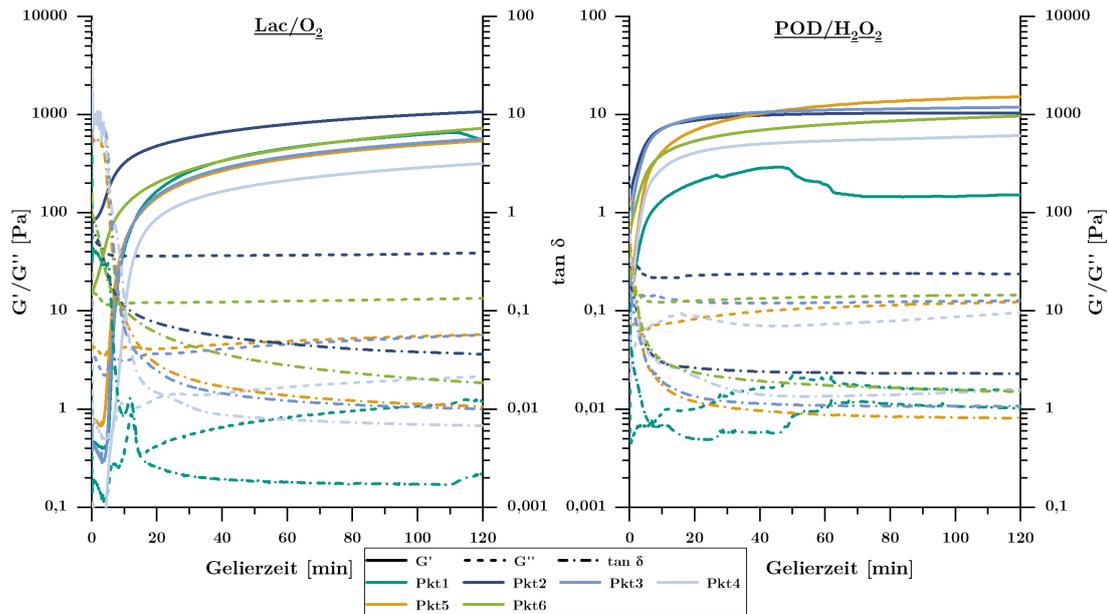


Abb. 4.10: Rheologische Untersuchung (5 % Deformation, 1 Hz) von Pektin gelen in Abhängigkeit von der Extraktion: Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') sowie die daraus resultierenden $\tan \delta$ -Werte über den Verlauf der Gelierung von 4%igen Lösungen (w/v) der extrahierten Pektine über einen Zeitraum von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/H₂O₂.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

Um Präparierfehler der Gele auszuschließen, die Aussagen zu Korrelationen zwischen Viskoelastizität und Struktureigenschaften verhindern, wurde die Reproduzierbarkeit der Herstellung der Pkt-Gele durch Wiederholmessungen überprüft. Dazu wurden ausgewählte Gele an unterschiedlichen Tagen unter identischen Bedingungen erneut hergestellt und analysiert. Für die Lac-induzierte Gelierung wurden exemplarisch Pkt2 und Pkt7 wiederholt analysiert, während für POD-induzierte Gele zusätzlich Pkt3 und Pkt4 mehrfach getestet wurden. In Abb. 4.11 ist der Gelierverlauf von G' der Gele an unterschiedlichen Tagen dargestellt. So zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit für POD-induzierte Gele aus Pkt2 und Pkt3 sowie das Lac-induzierte Gel von Pkt6, während G' der POD-induzierte Gele aus Pkt4 sowie Lac-induzierte Gele aus Pkt2 kleine

Abweichungen zeigen. Da allerdings die relativen Verhältnisse der verschiedenen Pkt-Gele trotz Messung an unterschiedlichen Tagen bestehen bleiben, ist davon auszugehen, dass auch mögliche Korrelationen Aussagekraft haben.

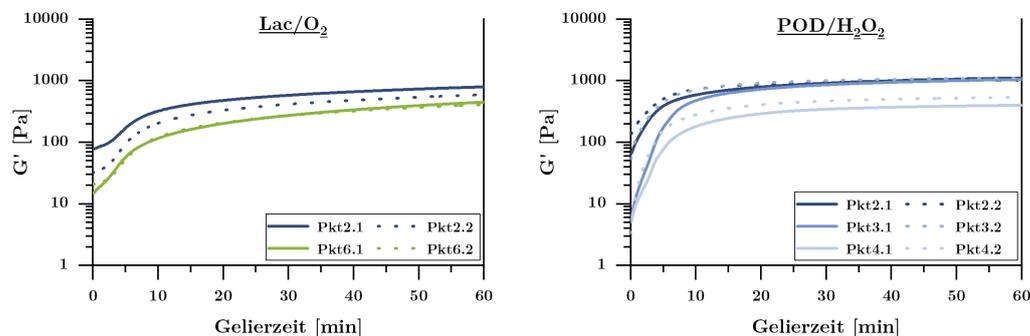


Abb. 4.11: Zur Reproduzierbarkeit der Gelherstellung: Rheologische Untersuchung (5% Deformation, 1 Hz) des Speichermoduls (G') über den Verlauf der Gelierung von mehrfach hergestellten 4%igen Lösungen (w/v) von Pkt2-4 und Pkt6 über einen Zeitraum von 1 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/ H_2O_2 .

Extraktionsbedingungen: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

Die rheologischen Daten zur Gelbildung der verschiedenen extrahierten Pkt (s. Abb. 4.10) zeigen somit eine Abhängigkeit der viskoelastischen Geleigenschaften von den Extraktionsbedingungen der Pkt, wodurch sie mutmaßlich von strukturellen Parametern der Pkt abhängen. In der Literatur konnte für AX bereits gezeigt werden, dass unter identischen Enzymbedingungen G' proportional zum FS-Gehalt ansteigt (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Kale *et al.*, 2013; Ayala-Soto *et al.*, 2016). Bei den untersuchten Pkt weisen Pkt1, Pkt2 und Pkt5 ähnliche FS-Gehalte auf, bilden jedoch unterschiedliche Geleigenschaften aus, womit neben dem FS-Gehalt auch weitere Faktoren entscheidend sind. Pkt2-4 unterscheiden sich beispielsweise neben dem FS-Gehalt auch im Gehalt an AN und damit einhergehend im M_w , die jeweils die räumliche Struktur der Pkt beeinflussen. Dies hat potenziell Auswirkung auf die räumliche Orientierung der Polymerketten während der Gelbildung und damit auf die Vernetzung. Um den Einfluss des AN-Gehalts sowie des M_w näher zu untersuchen, wurden die enzymatisch modifizierten Pektine analog analysiert. Da der Gehalt an FS zwischen Pkt2 sowie den daraus gewonnenen enzymatisch modifizierten Pkt weitestgehend konstant ist, kann der Einfluss des AN-Gehalts der AN-verdauten Pkt (AN18 und AN48) im Vergleich zu Pkt2 überprüft werden. Gleichzeitig war durch die geringfügige Nebenaktivität der *endo*-Galactanase eine Variation des M_w für die *endo*-Galactanase verdauten Pkt (GN18+GN48) möglich, während der FS-Gehalt sowie andere untersuchte Strukturparameter konstant waren. In Abb. 4.12 sind die Geliervläufe der enzymatisch modifizierten Pkt im Vergleich zum Rohmaterial Pkt2 dargestellt, während die Ergebnisse der Frequenz- und Amplituden-

tests in Abb. 9.13 zusammengefasst sind. Sowohl für die Lac- als auch POD-induzierten Gele zeigt sich ein ähnliches Gelverhalten, wobei die Gelierung durch die Lac-Katalyse tendenziell langsamer verläuft, was sich am langsameren Anstieg von G' widerspiegelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des AN-Gehalts (und damit auch M_w) in einer Abnahme von G' resultiert. Gleichmaßen hat eine alleinige Reduktion des M_w eine Senkung von G' zur Folge, jedoch in etwas geringerem Ausmaß als die Reduktion des AN-Gehalts. Bei Betrachtung der Amplitudentests (Abb. 9.13) zeigt sich dagegen eine Erhöhung der Deformationsstabilität durch Abbau der AN-Ketten (Bruch bei etwa 65 % im Vergleich zu 15 % Deformation) und der damit einhergehenden Simplifizierung der RG I-Struktur. Das gleiche Verhalten zeigt sich für Lac-induzierte Gele durch die Spaltung des HG-Rückgrats (GN18+GN48) und der damit einhergehenden Reduktion des M_w . Für POD-induzierte Gele konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden. Zusammen mit den Ergebnissen der säureextrahierten Pkt deutet dies darauf hin, dass die Verknüpfung simpler Polymerketten zu weniger elastischen aber tendenziell stabileren Netzwerken führt. Im Umkehrschluss resultiert die Kopplung großer, strukturell verzweigter Polymerketten in elastischen, aber weniger stabilen dreidimensionalen Netzwerken, wobei die Stabilität besonders durch AN negativ beeinflusst wird.

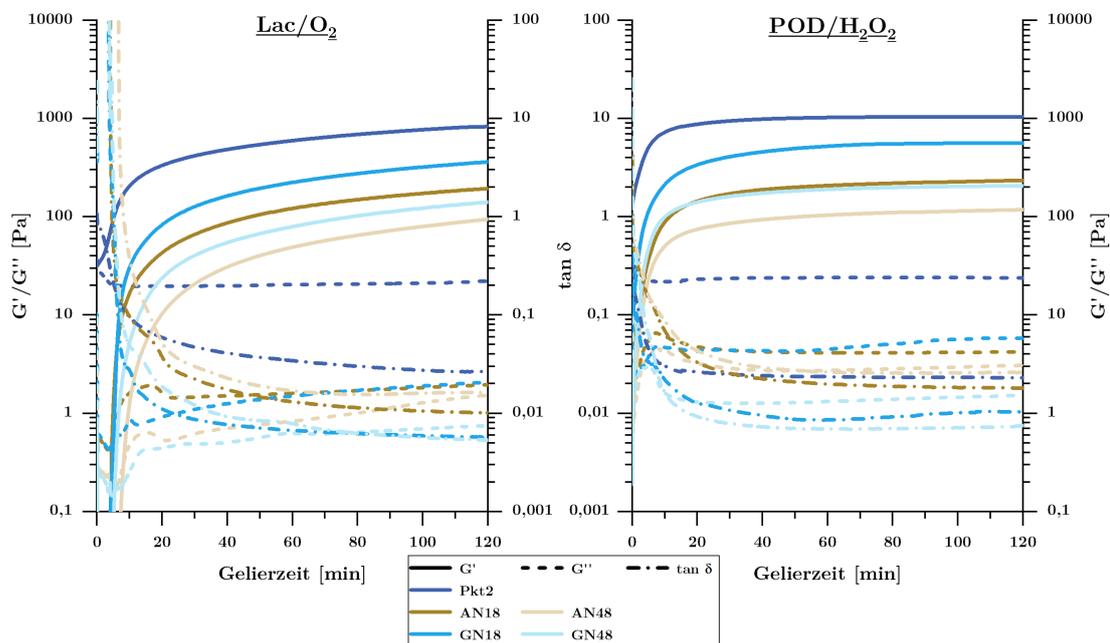


Abb. 4.12: Rheologische Untersuchung (5 % Deformation, 1 Hz) von Gelen enzymatisch modifizierter Pektine: Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') sowie die daraus resultierenden $\tan \delta$ -Werte über den Verlauf der Gelierung von 4%igen Lösungen (w/v) der enzymatisch modifizierten Pektine über einen Zeitraum von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/ H_2O_2 . AN18 und AN48 sind Resultat eines 18 bzw. 48stündigen Verdaus von Pkt2 mit *exo*-Arabinofuranosidase. GN18 und GN48 wurden durch 18 bzw. 48stündige Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Galactanase erhalten.

4.3.1.2 Diffusionseigenschaften

Die Ermittlung von D_{eff} von Wasser als Fluid und zugesetzter Glc als Gastmolekül mittels PFG-STE-NMR ermöglicht die Untersuchung des Netzwerks auf sehr viel kürzeren Längenskalen. So wechselwirken die Moleküle auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Netzwerk, wodurch ihre translatorische Beweglichkeit unterschiedlich stark eingeschränkt wird (s. Kap. 1.4.2.2). Einerseits ist es denkbar, dass die Diffusion durch u.a. ionische oder hydratisierende Effekte beeinflusst wird. Andererseits führt die sterische Hinderung der freien Bewegung durch das ausgebildete Netzwerk zu einer Reduktion von D_{eff} , beschrieben durch die Umwegwahrscheinlichkeit (Tortuosität) im Netzwerk. In diesem Bild ist eine Abnahme von D_{eff} mit steigendem Δ für die Beschreibung der Diffusion in einer Netzwerkstruktur zu erwarten (s. Kap. 1.4.2.2). Sofern eine Abhängigkeit der Diffusion von Δ vorlag, wurde τ_{Tort} nach Latour und Mitarbeitern (1993) modelliert und als Zahlenwert mitangegeben. Bei den hier durchgeführten Analysen konnte dieses zeitabhängige Verhalten jedoch nicht immer beobachtet werden, was mutmaßlich auf zu groß gewählte Δ hindeutet, wodurch die Abnahme von D_{eff} bei kleiner Mobilitätseinschränkung nicht erfasst werden kann. Durch die eingesetzte Pulssequenz war der minimale Wert von Δ auf 40 ms beschränkt. Gleichzeitig war teilweise eine kleine Zunahme von D_{eff} mit Δ zu beobachten. Da die Messungen bei 20 °C und damit unterhalb der Raumtemperatur von ca. 25 °C durchgeführt wurden, könnte dies die Folge von Konvektion sein, die auch durch Reduzierung des Probevolumens nicht ausreichend minimiert werden konnte. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich Angaben zu D_{eff} -Werten im weiteren Verlauf auf die gemessenen Werte bei $\Delta = 2, 5$ s. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Werte jeweils in Relation zur freien Diffusion D_0 , d.h. ohne Polysaccharid dargestellt sind.

Im ersten Schritt wurde analog zu den rheologischen Messungen der Einfluss der Polysaccharidkonzentration auf das Diffusionsverhalten untersucht. In Abb. 4.13 ist D_{eff}/D_0 von Wasser als Funktion von Δ sowohl für 2-4 %ige Lac-induzierte als auch POD-induzierte Gele von Pkt2 dargestellt. Für die Lac-induzierten Gele wurde zusätzlich die Diffusion von Glc nach Zugabe von 50 mg/ml $^{13}\text{C}_6$ -Glc analysiert. Diese Konzentration wurde von Karin Michalski in ihrer Masterarbeit als Kompromiss zwischen einer physiologischen Konzentration sowie einer ausreichenden Messgenauigkeit gewählt. Hier konnte gezeigt werden, dass das Lösen von Glc im Gelmedium durch Hydratisierung eine Abnahme der Wasserdiffusion zur Folge hat, was bei paralleler Messung der Wasserdiffusion in glucosehaltigen Gelmedien berücksichtigt werden muss (Michalski, 2020; Junker

et al., 2021). Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch zwei getrennte Gele präpariert und analysiert, sodass dieser Faktor bei der Ergebnisdiskussion keine Rolle spielt. Die Betrachtung der Ergebnisse der Wasserdiffusion zeigt für die Gele, unabhängig davon, mit welchem Enzym sie hergestellt wurden, eine Erhöhung der Diffusionshinderung mit steigender Polysaccharidkonzentration, was durch reduzierte Werte von D_{eff}/D_0 impliziert wird. In den 4 %igen Gelen nahm die relative Wasserdiffusion auf ca. 72 % (Lac/O₂) bzw. 70 % (POD/H₂O₂) ab. Dies geht mutmaßlich auf eine höhere Vernetzungsdichte durch den steigenden Anteil an Netzwerkbildner zurück und einer damit einhergehenden Ausbildung eines dichteren Maschennetzwerks, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Interaktion des Wassers mit dem Netzwerk steigt. Allerdings unterscheidet sich die Diffusionshinderung für 3 und 4 %ige POD-induzierte Gele kaum. Möglicherweise sind die Konzentrationsunterschiede zu klein, um auf mikroskopischer Ebene Unterschiede zu bedingen. Andererseits könnte dies auch auf kleine Abweichungen in der Gelpräparation zurückgeführt werden, die beispielsweise geringe Konzentrationsunterschiede zur Folge haben. Über die Modellierung mittels des τ_{Tort} -Modells konnte für die meisten Gele zusätzlich ein ansteigender Obstruktionseffekt mit der Polysaccharidkonzentration festgestellt werden, was sich beispielhaft im Anstieg von τ_{Tort} von 1,38 im 3 %igen Gel auf 1,45 im 4 %igen der Lac-induzierten Gele äußerte. Dagegen zeigte sich für das 2 %ige Lac-induzierte Gel zwar eine Diffusionssenkung auf ca. 95 %, jedoch auch eine Zunahme der Diffusion mit steigendem Δ , was mutmaßlich auf Konvektion zurückzuführen ist, womit eine lose Netzwerkstruktur angedeutet wird. Dadurch kann im betrachteten Zeitintervall kaum eine Einschränkung durch die Netzwerkstruktur detektiert werden, womit eine τ_{Tort} -Modellierung nicht möglich ist.

Die Verläufe von D_{eff}/D_0 der Glc mit Δ (2A in Abb. 4.13) sind im Vergleich zur Wasserdiffusion durch streuende Messpunkte gekennzeichnet, was auf die deutlich kleinere Empfindlichkeit zurückzuführen ist. Der Faktor der kleineren natürlichen Häufigkeit von ¹³C (1,1 %) konnte durch die Verwendung von ¹³C₆-angereicherter Glc eliminiert werden. Allerdings hat ¹³C ein um ca. den Faktor 4 niedrigeres gyromagnetisches Verhältnis als ¹H. Zusätzlich liegt die eingesetzte Glc in einer etwa 200fach kleineren molaren Konzentration als Wasser vor, was die Messgenauigkeit weiter verschlechtert. Eine gleichmäßige Abnahme mit Δ konnte somit nicht beobachtet werden, weswegen die τ_{Tort} -Modellierung nicht zielführend war. Dennoch zeigt sich eine eindeutige Abhängigkeit der relativen Glucosediffusion von der Polysaccharidkonzentration, was durch Auftragung von $D_{eff}/D_0(\Delta \rightarrow 0)$ gegen die Polysaccharidkonzentration (3A in Abb. 4.13) anschaulicher dargestellt wird. $D_{eff}/D_0(\Delta \rightarrow 0)$ wurde durch lineare Extrapolation der

Daten ermittelt und stellt den theoretischen Grundwert der Glucosediffusion dar, der nicht durch Obstruktionseffekte beeinflusst wird. Die abnehmenden Werte mit steigender Polysaccharidkonzentration deuten auf Wechselwirkungen der Glc mit Wasser oder OH-Gruppen des Netzwerks hin. Dadurch wird auf sehr kurzen Zeitskalen eine Abnahme der translatorischen Bewegung induziert, die mit Hilfe der Messmethode nicht direkt erfasst werden kann. Auf Grund dessen, dass der Wassergehalt in sämtlichen Gelen konstant ist, scheint die Glucosediffusion hauptsächlich durch die Wechselwirkungen mit dem Netzwerk beeinflusst, womit die relative Glucosediffusion auf bis zu 83 % in 4%igen Gelen abnimmt.

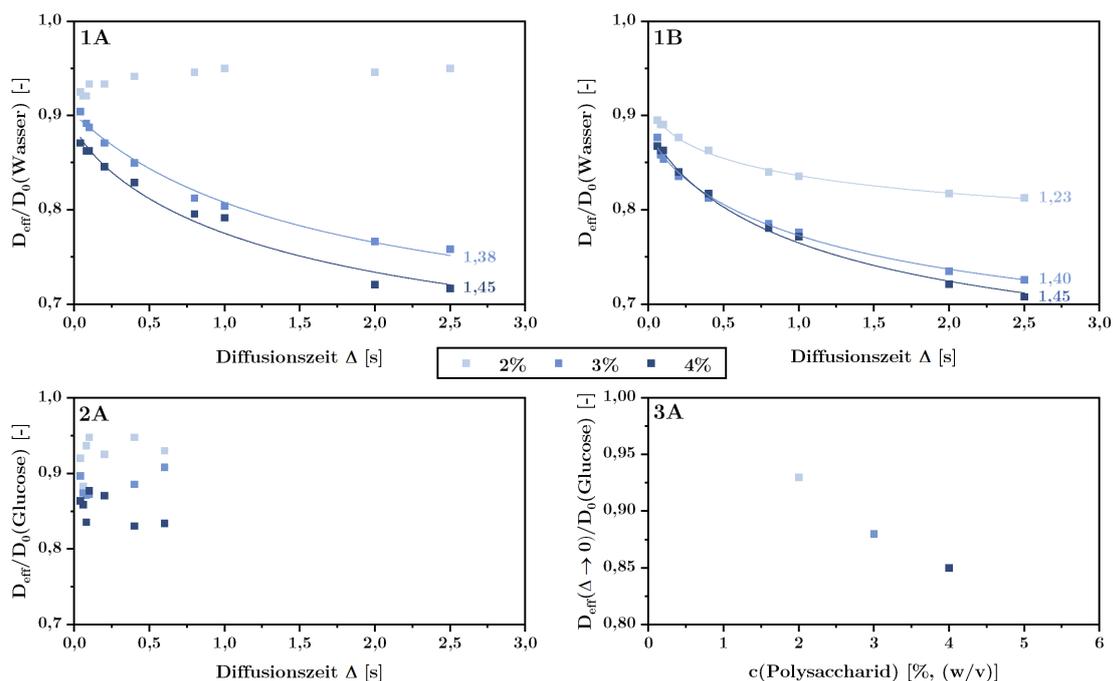


Abb. 4.13: Diffusionsverhalten in Pektingelen in Abhängigkeit von der Polysaccharidkonzentration: Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser (1) und Glucose (2, $c = 50 \text{ mg/ml}$) in 2 – 4%igen Gelen (w/v) von Pkt2 nach Zugabe von A) Laccase und B) Peroxidase/ H_2O_2 . In 3A) sind die Werte der relativen Glucosediffusion aus 2A für $\Delta \rightarrow 0$ gegen die Polysaccharidkonzentration aufgetragen. Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist.

Extraktionsbedingung: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2

Inwieweit die Diffusion von Wasser durch das ausgebildete Netzwerk oder durch die reine Solubilisierung des Polysaccharids in Puffer beeinflusst wird, wurde in zusätzlichen Versuchen untersucht. So wurden 2 – 4%ige Lösungen von Pkt2 in Puffer hergestellt und die Lösungen ohne Zugabe der Enzyme analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 9.14 im Anhang zusammengefasst. Aus ihnen geht hervor, dass in kleinem Umfang bereits eine Diffusionshinderung lediglich durch Lösen des Polysaccharids in Puffer und einer damit einhergehenden Viskositätserhöhung zu beobachten ist. Dabei konnte kein

Unterschied zwischen 3 und 4 %igen Lösungen festgestellt werden. Gleichzeitig ist die Diffusion von Wasser in einer 2 %igen Lösung vergleichbar zur Diffusion im 2 %igen Lac-induzierten Gel ist. Gleichermaßen wurde überprüft, ob die eingesetzte Konzentration an Na^+ -Ionen als Resultat des verwendeten Puffers Einfluss auf die Gelierung hat. Hierzu wurde einerseits Pkt2 wie gewohnt in 50 mM Natriumacetatpuffer und zum anderen in Wasser gelöst. Durch die Zugabe von NaCl konnten so unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen hergestellt und durch anschließende Zugabe von Lac ihr Einfluss auf die Gelierung überprüft werden. In Abb. 4.14 sind die relativen D_{eff}/D_0 in Abhängigkeit von Δ sowie die aus dem Fit mittels Latour-Pade-Gleichung ermittelten Werte für τ_{Tort} gegen die Konzentration an Na^+ aufgetragen. So zeigte sich kein Unterschied zwischen der Gelbildung mit Wasser, die auf Grund der pH-Beeinflussung durch die gelösten Pkt bei einem pH-Wert von ca. 2,8 stattfand und der Gelbildung in Puffer bei einem pH Wert von 5. Damit ist keine physikalische Gelierung als Folge des eingesetzten Natriumacetatpuffers zu erwarten. Während eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration in in Wasser erzeugten Gelen keine Veränderungen in τ_{Tort} zur Folge hatte (1,18 – 1,21), resultierte eine Verdopplung der Konzentration in den Puffergelen überraschend in einer erheblichen Reduktion der Wasserdiffusion, was sich in einer τ_{Tort} -Erhöhung von 1,23 auf 1,45 äußerte.

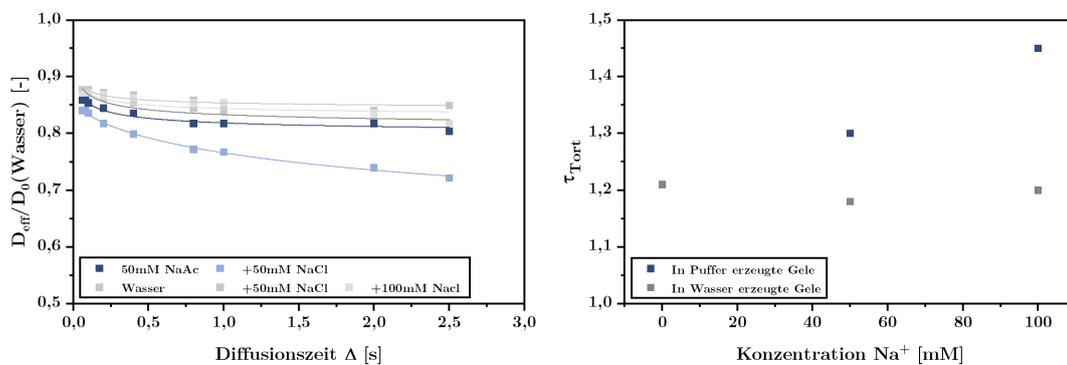


Abb. 4.14: Diffusionsverhalten in Pektingelen in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration: Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{\text{eff}}/D_0(\Delta)$) von Wasser (links) in 4 %igen Gelen (w/v) von Pkt2 in 50 mM Natriumacetatpuffer (NaAc, blau) sowie Wasser (grau) nach Zugabe von Laccase. Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} rechts gegen die Na^+ -Konzentration aufgetragen wurde. Extraktionsbedingung: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2

Im nächsten Schritt wurden 4 %ige Gele aus den verschiedenen extrahierten Pektinen hergestellt und hinsichtlich ihrer Diffusionseigenschaften untersucht, um zu überprüfen inwieweit verschiedene Extraktionstechniken der Pkt eine Änderung der Gelstruktur auf molekularer Ebene bewirken (s. Abb. 4.15). Bei Betrachtung der relativen Diffusion von Wasser zeigte sich sowohl für Lac- als auch POD-induzierte Gele eine Abhängigkeit von

der Extraktion. Allerdings sind die Ergebnisse der Lac-induzierten Gele nicht mit den Ergebnissen der POD-induzierten Gele in Einklang zu bringen, womit auf molekularer Ebene potenziell ein unterschiedlicher Prozess stattfinden könnte: für Lac-induzierte Gele resultiert eine längere Säurebehandlung der Pkt (Pkt2-4) in einer erhöhten relativen Wasserdiffusion in den daraus gebildeten Gelen. Dies könnte auf größere Maschenweiten in Folge geringerer FS-Gehalte zurückgeführt werden. Ein Einfluss der AN-Gehalte ist ebenfalls denkbar. Allerdings konnte lediglich für Pkt2 ein Obstruktionseffekt durch das Netzwerk festgestellt werden und dadurch τ_{Tort} extrahiert werden. Für POD-induzierte Gele konnte der Anstieg der relativen Wasserdiffusion mit der Extraktionsdauer der Pkt in Säure nicht bestätigt werden. So wird die relative Wasserdiffusion in Gelen aus dem mild extrahierten Pkt2 und dem unter harschen Extraktionsbedingungen gewonnenen Pkt4 mit ca. 80 % am wenigsten beeinflusst. Pkt3 ist bezüglich der Extraktionsdauer zwischen Pkt2 und Pkt4 einzuordnen, jedoch hat dessen Gelierung die ausgeprägteste Reduktion des relativen Diffusionskoeffizienten auf ca. 70 % zur Folge. Damit ist sie vergleichbar zu Gelen aus Pkt5 bzw. 6, die bei pH 3 bzw. nach Ultraschallbehandlung gewonnen wurden und die Wasserdiffusion nach Lac-Induktion ebenfalls am stärksten beeinflussten. Allgemein zeigt sich eine größere Hinderung der Wasserdiffusion in POD-induzierten Gelen, was durch die höheren τ_{Tort} für die POD-induzierten Gele verdeutlicht wird. Der lineare Verlauf des relativen D_{eff} mit Δ des Lac-induzierten Gels von Pkt1 bei ca. 0,93 impliziert nur einen geringen Einfluss des Netzwerks auf die Diffusion von Wasser. Hier ist anzumerken, dass Gele von Pkt1 im Vergleich zu Gelen aus säureextrahierten Pkt durch eine Phasentrennung charakterisiert waren, die sich optisch durch Wasserbläschen im NMR-Probengefäß bemerkbar machte. Dadurch ist es denkbar, dass dieser Wasseraustritt als Folge der Synärese zu einer fehlerbehafteten Messung von D_{eff} führte, indem unter Umständen nicht das im Hydrogel gespeicherte, sondern das ausgetretene Wasser erfasst wurde.

Die Diffusion von Glc wurde in Lac-induzierten Gelen von Pkt2-4 auf ca. 85 % gesenkt, wodurch Glc einer ausgeprägteren Diffusionsminderung unterliegt als Wasser. Die Extrapolation von D_{eff}/D_0 für $\Delta \rightarrow 0$ impliziert für alle drei untersuchten Pkt eine Senkung der theoretischen Grunddiffusion auf ca. 86 %, die nicht durch eine geometrische Hinderung durch das Netzwerk induziert wird, sondern durch Wechselwirkungen der Glc mit Wasser oder OH-Gruppen des Netzwerks, die auf sehr kurzen Zeitskalen eine Diffusionsänderung bewirken. Diese sind für alle untersuchten Pkt gleich (Abb. 4.15 3A) und werden somit eher durch die Polysaccharidkonzentration und dem damit einhergehenden unterschiedlichen Gehalt an funktionellen Gruppen bedingt (vgl. Abb. 4.13 3A).

Im Rahmen der Messgenauigkeit konnte für die drei Gele zudem eine Abnahme von D_{eff}/D_0 mit Δ beobachtet werden, womit ein Hinderungseinfluss durch das ausgebildete Netzwerk impliziert wird.

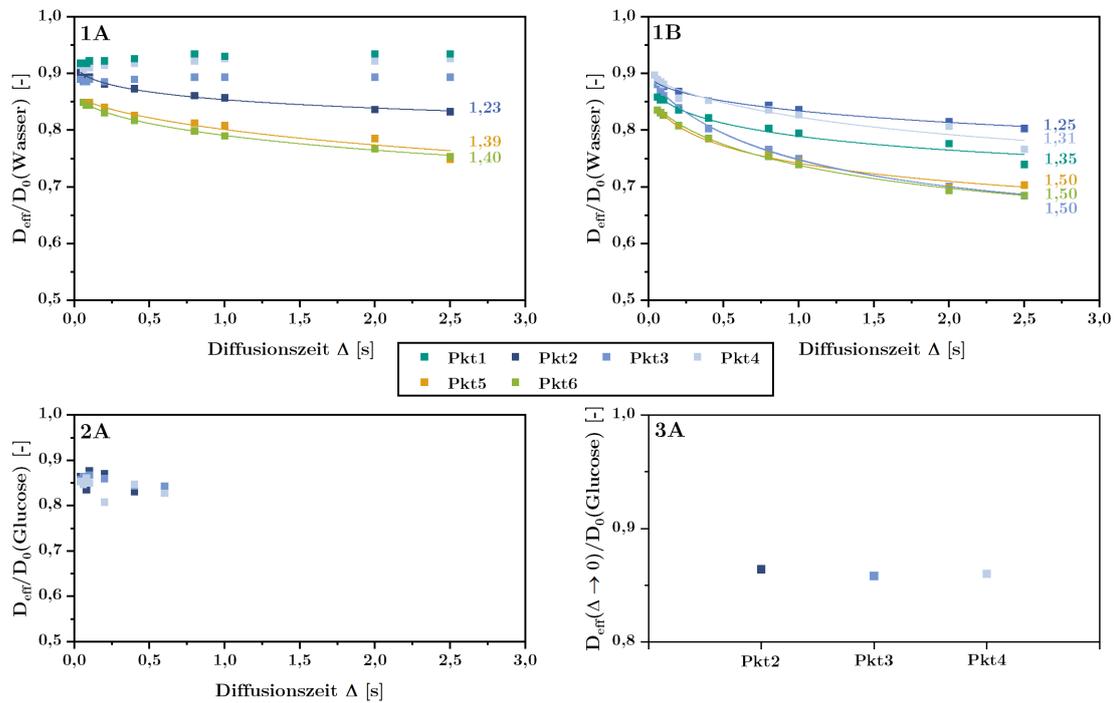


Abb. 4.15: Diffusionsverhalten in Pektin Gelen in Abhängigkeit von der Extraktion: Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser (1) und Glucose (2, $c = 50 \text{ mg/ml}$) in 4%igen Gelen (w/v) unterschiedlich extrahierter Pektine nach Zugabe von A) Laccase und B) Peroxidase (POD)/ H_2O_2 . In 3A) sind die Werte der relativen Glucosediffusion aus 2A für $\Delta \rightarrow 0$ der untersuchten Pektin gelee dargestellt. Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

Anhand der vorliegenden D_{eff} -Daten (¹H) konnten teilweise Korrelationen zwischen Diffusionshinderung und Extraktionstechnik der extrahierten Polysaccharide ausfindig gemacht werden. So resultierte eine Ultraschallbehandlung der Pkt sowie die Extraktion bei pH 3 sowohl für Lac- als auch POD-induzierte Gele in den kleinsten relativen D_{eff} . Inwieweit einzelne Strukturparameter der Pkt diese Eigenschaften bedingen, kann nicht vorhergesagt werden. Dies wird insbesondere am Vergleich der Gele aus Pkt2-4 deutlich: Nach Lac-Induktion zeigte sich mit der Dauer der Säurebehandlung ein Trend in Richtung einer kleinen Diffusionshinderung, womit Korrelationen zum AN-Gehalt, M_w oder FS-Gehalt bestehen. Nach POD-induzierter Gelierung dieser Pkt konnte jedoch weder ein Trend in Richtung größerer noch kleinerer Diffusionshinderung festgestellt werden.

Um den Einfluss einer Reduktion des AN-Gehalts oder des M_w bei gleichzeitigem Erhalt der FS-Gehalte auf die intrinsischen Geleigenschaften näher zu untersuchen, wurden die

enzymatisch modifizierten Pkt analog zu den bisherigen Pkt geliert und analysiert (s. Abb. 4.16). Die Reduktion des AN-Gehalts (AN18+AN48) bzw. des M_w (GN18+GN48) hat allgemein eine Senkung des relativen D_{eff} zur Folge, jedoch äußert sich diese für Lac- und POD-induzierte Gele in unterschiedlichem Ausmaß. Während für Lac-induzierte Gele nur kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen enzymatisch modifizierten Pkt zu erkennen sind (τ_{Tort} zwischen 1,01 und 1,08), ist für POD-induzierte Gele ein erhöhter Obstruktionseffekt mit zunehmendem M_w sowie AN-Gehalt zu beobachten, wobei Pkt mit einem AN-Gehalt von 17,6 mol% (AN18) in gleichem Ausmaß die Diffusion beeinflusst wie die Kontrollprobe mit 42,2 mol%, während eine weitere Senkung auf 6,4 mol% (AN48) keine Diffusionshinderung induzierte. Hierbei ist anzumerken, dass insbesondere die Lac-induzierten Gele durch eine Phasenseparierung als Folge von Synärese gekennzeichnet waren, womit analog zu Pkt1-Gelen ggf. nicht das gespeicherte, sondern das ausgetretene Wasser erfasst wurde. Diese Proben waren interessanterweise in Kontrast zu Pkt1-Gelen in rheologischen Messungen unauffällig.

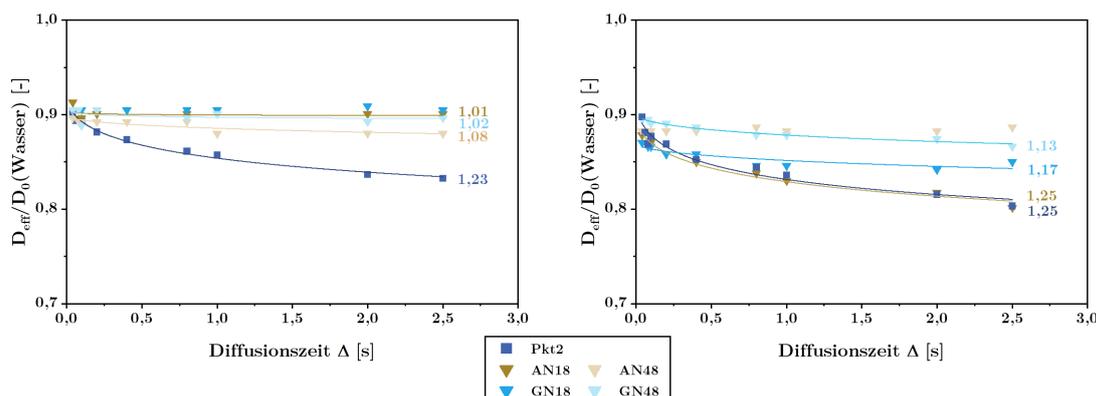


Abb. 4.16: Diffusionsverhalten in Gelen von enzymatisch modifizierten Pektinen. Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser in 4 %igen Gelen (w/v) der enzymatisch modifizierten Pektine nach Zugabe von Laccase (links) und Peroxidase/ H_2O_2 (rechts). Die Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist. AN18 und AN48 sind Resultat eines 18 bzw. 48 stündigen Verdaus von Pkt2 mit *exo*-Arabinofuranosidase. GN18 und GN48 wurden durch 18 bzw. 48 stündige Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Galactanase erhalten.

Damit scheint für POD-induzierte Gele die Abnahme der relativen Wasserdiffusion mit steigendem AN-Gehalt sowie M_w zu korrelieren, während für Lac-induzierte Gele mutmaßlich auf Grund von Synärese keine Aussagen möglich waren. Jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Synärese in Pkt-Gelen mit geringen M_w der Gelbildner einhergeht.

Die Datenerhebung wurde in Einfachbestimmung durchgeführt, weswegen ebenfalls der Faktor der Gelreproduzierbarkeit betrachtet werden muss, um mögliche Fehler durch Gelpräparation auszuschließen. Daher wurden Daten von 4 %igen Gelen von

Pkt2 miteinander verglichen, die an unterschiedlichen Tagen unter mutmaßlich gleichen Bedingungen hergestellt und analysiert wurden (Abb. 4.17).

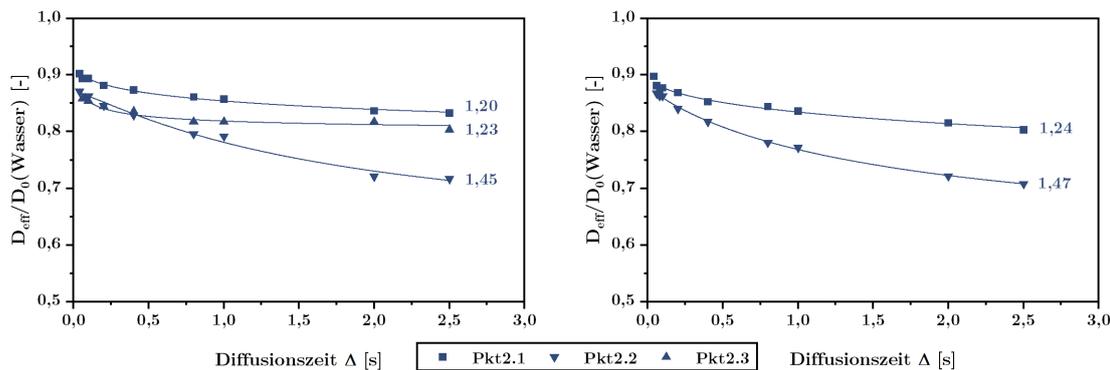


Abb. 4.17: Zur Reproduzierbarkeit der Gelherstellung: relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser in mehrfach hergestellten 4%igen Gelen (w/v) von Pkt2 nach Zugabe von Laccase (links) bzw. Peroxidase/H₂O₂ (rechts). Die Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist.

Zwar zeigt sich für alle Gele ein eindeutiger obstruktiver Effekt für Wasser, jedoch schwanken die absoluten Werte von D_{eff}/D_0 zwischen 0,83 und 0,72 für Lac-induzierte Gele und 0,71 und 0,80 für POD-induzierte Gele. Diese Abweichungen liegen im Schwankungsbereich der erhobenen Diffusionsdaten der Gele aus extrahierten und enzymatisch modifizierten Pkt, die zeitbedingt ebenfalls nicht an identischen Tagen hergestellt und analysiert werden konnten. Somit kann nicht sichergestellt werden, dass die erhobenen Diffusionsdaten tatsächlich miteinander vergleichbar sind.

Auf makroskopischer Ebene konnten sowohl für POD- als auch Lac-induzierte Gele reproduzierbare Korrelationen zwischen Gelelastizität und einzelnen Strukturparametern identifiziert werden. Dies konnte jedoch nicht auf die mikroskopische Ebene übertragen werden, was darauf hindeutet, dass zusätzliche, unbekannte Faktoren der Gelbildung ein reproduzierbares Abbild der Mikrostruktur verhindern. Dabei war der Prozess der Gelbildung für rheologische und diffusive Messungen weitestgehend gleich. So wurde jeweils die gleiche Charge der Pkt-Extraktion verwendet, um Einflüsse der hohen biologischen Variabilität der erhaltenen Strukturen zu minimieren. Gleichmaßen war durch die Solubilisierung der Polysaccharide in Puffer über Nacht eine Homogenisierung der Lösung möglich, die bei kürzeren Hydratisierungszeiten nicht erreicht werden konnte. Während die Gelierung für rheologische Messungen in der Messgeometrie durch Zugabe der Reagenzien in die Flüssigkeit parallel zur Messung stattfand, konnte dies für NMR-Messungen nicht durchgeführt werden. So wurden die Polysaccharidlösungen extern mit den Reagenzien vorgemischt und sofort in das Probengefäß überführt. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass die Enzym- und Substratkonzentrationen für

alle Gele gleich eingestellt wurden. Die Überführung der bereits gelierenden Polysaccharidlösungen in das Probengefäß war auf Grund der teilweise hohen Viskosität jedoch schwer einheitlich durchzuführen, wodurch ggf. für Lac-induzierte Gele die Sättigung mit Luftsauerstoff und damit die Quervernetzung variiert. Gleichermaßen wurde darauf geachtet, dass die Gelierung für alle Proben unter möglichst gleichwertigen Bedingungen bei 25 °C stattfindet. Tagesabhängig kam es jedoch trotz Temperiereinheit zu Temperaturschwankungen von ± 2 °C, die potenziell Auswirkung auf die Enzymaktivität und damit einhergehend auf den *cross-link*-Prozess haben. Falls Temperaturschwankungen ursächlich sind, ist der Vergleich von Gelen am Besten geeignet, die am gleichen Tag präpariert wurden. Dazu zählen z.B. jeweils die Lac- und POD-induzierten Gele der enzymatisch modifizierten Pkt (Abb. 4.16), womit in POD-induzierten Gelen der Einfluss auf die Wasserdiffusion mit dem AN-Gehalt und M_w sinkt. Jedoch zeigten die ebenfalls am gleichen Tag hergestellten POD-induzierten Gele von Pkt2-4 (Abb. 4.13) keine Korrelation in eine Richtung, womit ggf. andere Parameter der Gelpräparation relevant sind.

Welche Faktoren letztendlich zur geringen Reproduzierbarkeit beitragen, konnte abschließend nicht geklärt werden. Somit ließen sich für Pkt-Gele kaum Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der mikroskopischen Eigenschaften von strukturellen Parametern ziehen. Was sich jedoch herauskristallisiert hat, waren Einflüsse des Netzwerks auf die Diffusion, die nicht auf die Obstruktion, sondern durch Wechselwirkungen der Moleküle mit den Polymerketten im Netzwerk hervorgerufen werden und damit nur auf sehr kleinen Zeitskalen sichtbar wurden. Diese waren dabei unabhängig von der Art des Gelbildners, jedoch abhängig von seiner Konzentration.

4.3.1.3 Veränderungen der phenolischen Komponenten

Die Analyse der phenolischen Komponenten vor und nach oxidativer Kopplung der Polysaccharide ermöglicht einerseits Aussagen zum Einbau von FS in intra- und intermolekulare *cross-links*. Gleichzeitig bietet die Quantifizierung der gebildeten OFS die Möglichkeit zur Überprüfung, ob ihre Bildung abhängig von der Extraktion der Polysaccharide und damit einhergehend von der mikromolekularen Umgebung der FS ist. Dazu wurden 2%ige Gele hergestellt und nach einer Gelierzeit von 2 h verseift. In Abb. 4.18 sind die Gehalte an FS vor und nach Gelierung dargestellt. So zeigt sich durch die oxidative Kopplung für alle Pkt eine Abnahme der FS-Gehalte um 75 – 98 %, wobei durch die Katalyse mittels POD/H₂O₂ tendenziell mehr FS umgesetzt wird.

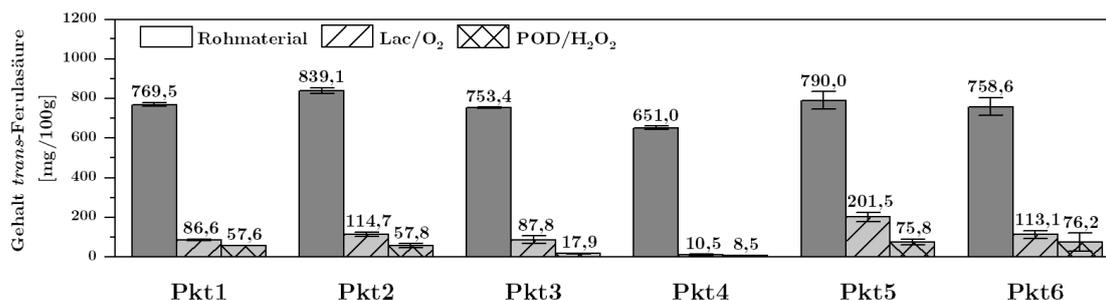


Abb. 4.18: Gehalte von *trans*-Ferulasäure (mg/100 g \pm s_{x0}, n = 3) von 2%igen (w/v) Lösungen der extrahierten Pektine vor und nach 2 h Inkubation (25 °C) mit Laccase (Lac)/O₂ bzw. Peroxidase (POD)/H₂O₂.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

Die unterschiedliche Reduktion der FS-Gehalte impliziert einen potenziellen Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die Bildung von OFS. So wurde für das stark säurebehandelte Pkt4 mit den einfachsten Strukturen die größte Abnahme an FS (98 %) verzeichnet, während für die Gelierung des milder extrahierten Pkt5 lediglich 75 % (Lac/O₂) bzw. 90 % (POD/H₂O₂) umgesetzt wurden. Gleichmaßen nimmt die Umsetzung mit steigender Dauer der Säurebehandlung bei pH 2 von 86 (Pkt2) auf 88 (Pkt3) und weiter auf 98 % (Pkt4) zu. Dies deutet auf eine sterische Hinderung der enzymatischen Kopplung durch die Polysaccharidstruktur hin, beispielsweise dadurch, dass sich FS, abhängig von der Komplexität der Struktur, unterschiedlich annähern können, um vernetzt zu werden. Dieser Einfluss erscheint dabei ausgeprägter für das System Lac/O₂ als für POD/H₂O₂. Literaturdaten hierzu sind bis dato nicht existent.

Die Abnahme der FS hat gleichzeitig eine Zunahme der OFS zur Folge, deren Gehalte in Abb. 4.19 mitsamt der prozentualen Anteile der einzelnen DFS und TriFS zusammengefasst sind. So stiegen die Gesamtgehalte von ca. 60 auf bis zu 620 (Lac/O₂) bzw. 544 mg/100 g (POD/H₂O₂) an. Bemerkenswert ist, dass die Gehalte nach POD-Katalyse niedriger sind als nach Lac-Induktion, obwohl für die POD-induzierten Gele ein höherer Verlust an FS zu beobachten war. Dies entspricht weitestgehend den Ergebnissen von Zaidel und Mitarbeitern (2012), die jedoch keine erhöhte Abnahme der FS-Gehalte für das POD/H₂O₂-System feststellten. Zusätzlich hat die Gelierung von Pkt1 trotz des hohen FS-Gehalts im Rohmaterial die geringste Zunahme an OFS zur Folge. Pkt1 weist im Vergleich zu Pkt2 bei weitestgehend identischer Polysaccharidstruktur ein deutlich geringeres M_w auf (s. Tab. 4.6), was potenziell auf Brüche des Rückgrats unter den autoklaven Extraktionsbedingungen zurückzuführen ist. Somit ist es denkbar, dass die resultierenden kurzen Ketten im Pkt1 eine enzymatische Kopplung unter Ausbildung von höher oligomeren Strukturen begünstigen, die methodisch jedoch nicht erfasst

werden können.

Die Betrachtung der prozentualen Verteilungen der einzelnen DFS und TriFS zeigt keine nennenswerten Unterschiede zwischen Lac- und POD-induzierten Gelen sowie zwischen den Gelen der säureextrahierten Pkt. So dominieren analog zum Rohmaterial 8-5-DFS (43 – 49 %) vor 8-O-4-DFS (8 – 11,5 %) analog zum Rohmaterial. Dies wurde ebenfalls in der Literatur gezeigt (Zaidel *et al.*, 2012). Jedoch zeigt sich für Pkt2-6 eine Zunahme der TriFS, insbesondere der 8-5nc/8-O-4- und 5-5/8-O-4-Derivate, was eine Oligomerisierung der dominierenden DFS impliziert. Im Gegensatz dazu wird durch oxidative Kopplung von Pkt1 bevorzugt die 8-O-4/8-O-4-TriFS gebildet.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Polysaccharidstruktur Auswirkung auf die oxidative Kopplung der estergebundenen FS hat. Hier ist das Pkt1 hervorzuheben, dessen Struktur eine Oligomerisierung in höhere Strukturen begünstigen könnte, was sich im Vergleich zu säureextrahierten Pkt in einer ähnlichen Abnahme von FS bei geringerem Anstieg der quantifizierbaren OFS äußert. Ein Einfluss der Polysaccharidstruktur auf das Profil der OFS konnte nicht festgestellt werden.

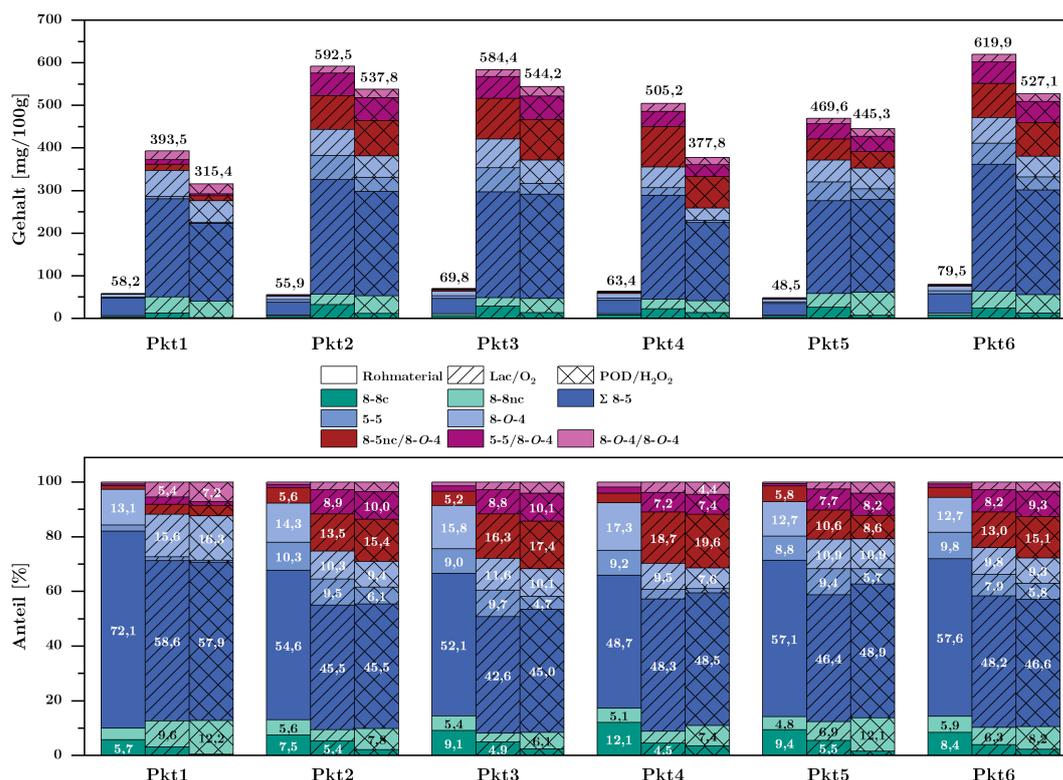


Abb. 4.19: Gehalte von oligomeren phenolischen Säuren ($\text{mg}/100\text{g} \pm s_{x0}$ ($n = 3$)) von 2%igen (w/v) Lösungen der extrahierten Pektine vor und nach 2 h Inkubation (25°C) mit Laccase (Lac)/ O_2 bzw. Peroxidase (POD)/ H_2O_2 (oben). Zusätzlich sind die prozentualen Gehalte der einzelnen Dehydrodi- und triferulasäuren am jeweiligen Gesamtgehalt angegeben (unten). nc, nicht-zyklisch; c, zyklisch

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121°C , pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80°C , pH 2; Pkt3, 4 h, 80°C , pH 2; Pkt4, 16 h, 80°C , pH 2; Pkt5, 4 h, 80°C , pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80°C , pH 2

4.3.2 Arabinoxylangele

4.3.2.1 Rheologische Eigenschaften

Die Charakterisierung der Gele aus AX erfolgte auf gleiche Weise wie für Pkt-Gele. Im ersten Schritt wurde an 1 – 4%igen Lösungen (w/v) von AX2 untersucht, wie sich die Konzentration des Netzwerkbildners auf die Viskoelastizität auswirkt. AX2 wurde als Referenzprobe eingesetzt, da es in größter Menge vorlag. Die Darstellung des Verhaltens der Gele bei variierender Frequenz und Deformation findet sich in Abb. 9.15 im Anhang. Der Frequenztest des 2%igen Gels konnte auf Grund eines Gerätefehlers nicht durchgeführt werden. Alle gemessenen Gele waren zwischen 0,16 Hz und 2 Hz stabil mit $G' > G''$. Gleichmaßen konnte über den gesamten Deformationsbereich zwischen 0,1 und 100 % kein Bruch der Gelstruktur beobachtet werden, was im Vergleich zu Pkt-Gele auf eine stabilere Gelstruktur schließen lässt. Der Geliervorlauf der Lösungen nach Zugabe von Lac bzw. POD und H_2O_2 ist in Abb. 4.20 abgebildet.

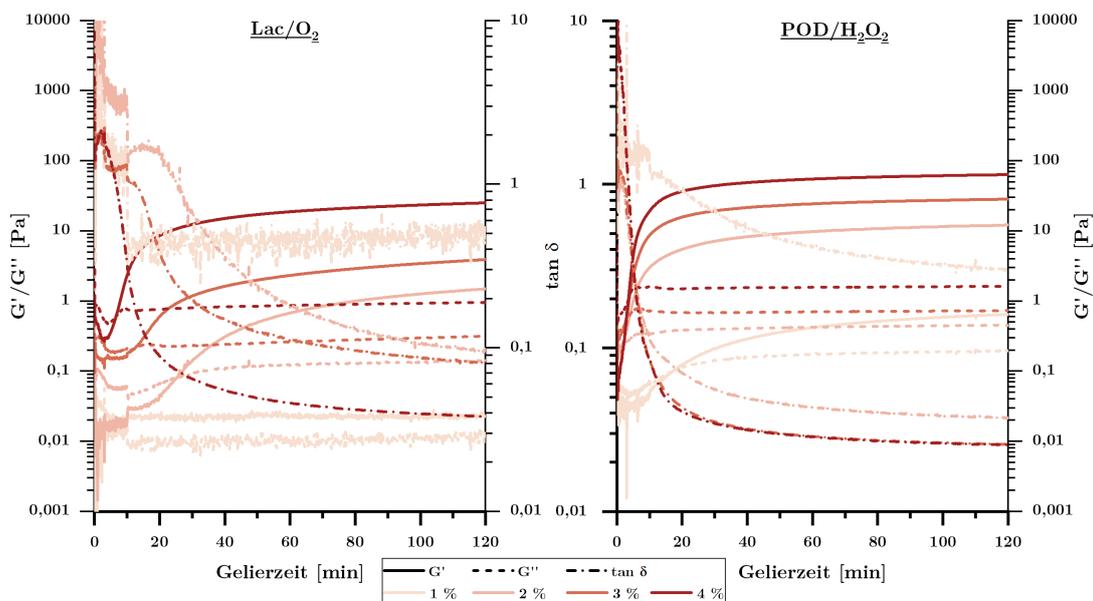


Abb. 4.20: Rheologische Untersuchung (5% Deformation, 1 Hz) von Arabinoxylangelen in Abhängigkeit von der Konzentration: Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') sowie die daraus resultierenden $\tan \delta$ -Werte über den Verlauf der Gelierung von 1 – 4%igen Lösungen (w/v) von AX2 über einen Zeitraum von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/ H_2O_2 .

Extraktionsbedingung: AX2, 4h, 30 °C, 0,25 M NaOH

Mit steigender Polysaccharidkonzentration wird die Gelierung beschleunigt, was mutmaßlich auf eine erhöhte Menge an Substrat zurückzuführen ist. Dies wird durch eine Verschiebung der Schnittpunkte von G' und G'' ($\tan \delta = 1$) angedeutet, was für Lac-induzierte Gele besonders zur Geltung kommt. So geliert das 4%ige Lac-induzierte Gel bereits nach 6,7 min, während der Geliervorlauf für das 2%ige Gel erst nach 25,5 min

auftritt. Für 1 %ige Lösungen konnte durch Lac-Induktion auch nach 2 h keine Gelierung festgestellt werden. POD führt zu einer schnelleren Vernetzung der Polymerketten, was sich in Gelierpunkten der 2-4 %igen Gele zwischen 2 und 4 min äußert. Gleichzeitig zeigt sich analog zu Gelen von Pkt2 eine Zunahme von G' mit steigender Konzentration, was für AX-Gele bereits in der Literatur gezeigt wurde und auf die Ausbildung eines engmaschigeren Netzwerks zurückgeführt wird (Carvajal-Millán *et al.*, 2005b).

Im nächsten Schritt wurden 4 %ige Lösungen der verschiedenen extrahierten Pkt geliert und der Verlauf von G' , G'' und $\tan \delta$ aufgezeichnet (s. Abb. 4.21). Für die Gele nach Lac-Induktion konnte eine Korrelation mit dem FS-Gehalt festgestellt werden, wonach G' proportional zum FS-Gehalt ansteigt. So resultierte die Gelierung von AX5 mit dem höchsten FS-Gehalt und einer damit einhergehenden mutmaßlich höheren Dichte an *cross-links* in den elastischsten Gelen mit $G' = 186$ Pa, während AX2 mit deutlich geringerem FS-Gehalt Gele mit G' von 25 Pa induzierte. Diese Abhängigkeit von G' vom FS-Gehalt wurde bereits in früheren Studien für Lac-induzierte Gele von AX aus Getreide beobachtet (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Kale *et al.*, 2013; Ayala-Soto *et al.*, 2016).

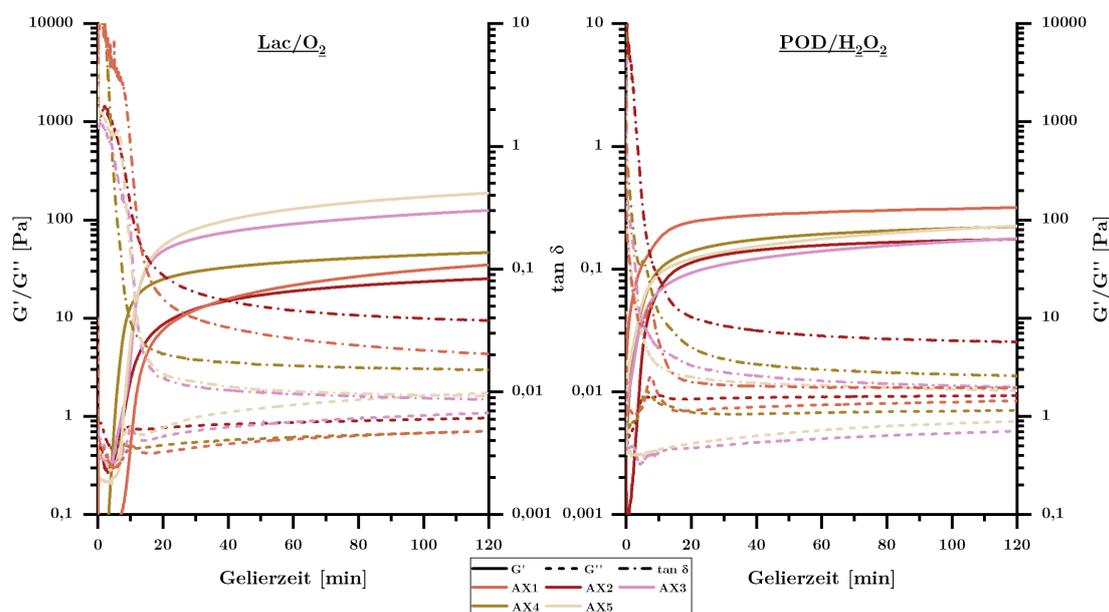


Abb. 4.21: Rheologische Untersuchung (5 % Deformation, 1 Hz) von Arabinoxylgelen in Abhängigkeit von der Extraktion: Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') sowie die daraus resultierenden $\tan \delta$ -Werte über den Verlauf der Gelierung von 1 – 4 %igen Lösungen (w/v) der extrahierten Arabinoxylane über einen Zeitraum von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase bzw. Peroxidase/ H_2O_2 .

Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

Die Gelierung mittels POD/ H_2O_2 führte zu tendenziell elastischeren Gelen, die ebenfalls schneller ausgebildet werden. Jedoch konnte hier überraschend keine Korrelation zwi-

schen FS-Gehalt und Elastizität festgestellt werden. Literaturdaten zur Abhängigkeit von G' vom FS-Gehalt für POD-induzierte AX-Gele sind nach bestem Gewissen nicht existent. Wiederholte Messungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit konnten auf Grund zu kleiner Mengen an Probenmaterial nicht durchgeführt werden.

4.3.2.2 Diffusionseigenschaften

Für die Beschreibung der mikroskopischen Eigenschaften der AX-Gele wurde analog zu den Pkt-Gele die Diffusion von Wasser sowie für ausgewählte Gele von Glc gemessen. Der Einfluss der Polysaccharidkonzentration auf Lac- und POD-induzierte Gele von AX2 ist in Abb. 4.22 dargestellt. Für Lac-induzierte Gele nimmt die relative Wasserdiffusion von 0,95 (2%, w/v) auf 0,88 (4%, w/v) mit steigender Polysaccharidkonzentration kaum ab. Ein Obstruktionseffekt als Abnahme von $D_{eff}/D_0(\Delta)$ konnte nicht festgestellt werden. Im Gegenteil: der Wert stieg sogar leicht an, was mutmaßlich auf Konvektion zurückzuführen ist. Für POD-induzierte Gele zeigte sich dagegen ein obstruierender Einfluss des Netzwerks, jedoch konnte kaum eine Abhängigkeit der relativen Wasserdiffusion von der Konzentration des Netzwerkbildners festgestellt werden. Dies ist potenziell Resultat zu klein gewählter Konzentrationsunterschiede, die auf mikroskopischer Ebene kaum Unterschiede induzieren.

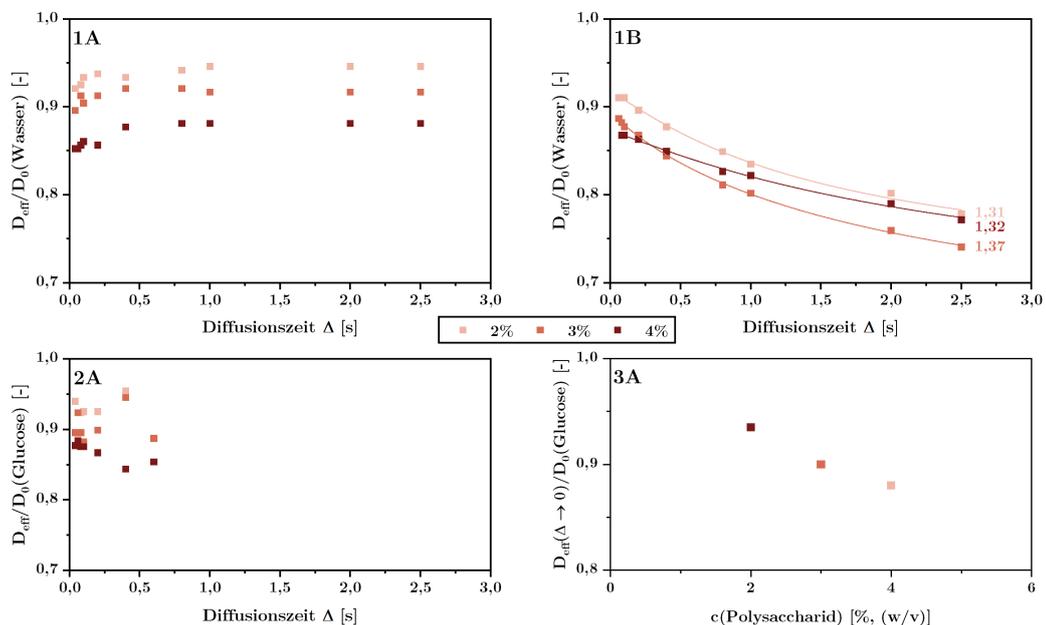


Abb. 4.22: Diffusionsverhalten in Arabinoxylangelen in Abhängigkeit von der Polysaccharidkonzentration: relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser (1) und Glucose (2, $c = 50 \text{ mg/ml}$) in 2 – 4%igen Gelen (w/v) von AX2 nach Zugabe von A) Laccase und B) Peroxidase/ H_2O_2 . In 3A) sind die Werte der relativen Glucosediffusion aus 2A für $\Delta \rightarrow 0$ gegen die Polysaccharidkonzentration aufgetragen. Linien in 1B repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist. Extraktionsbedingung: AX2, 4 h, 30 °C, 0,25 M NaOH

Bei Betrachtung der Startwerte der Diffusion ($\Delta \rightarrow 0$) zeigt sich für beide Enzyme ebenfalls eine Abhängigkeit von der Polysaccharidkonzentration, was auf unterschiedlich ausgeprägte Wechselwirkungen von Wasser mit dem Netzwerk hindeutet. Dies ist ebenfalls deutlich für die relative Glucosediffusion zu sehen (Abb. 4.22 2A und 3A). Im weiteren Verlauf von Δ nimmt die relative Glucosediffusion weiter auf bis zu ca. 85% im 4%igen Gel ab. Zusätzlich geht aus den Daten ein Obstruktionseffekt hervor, der sich mit der Polysaccharidkonzentration stärker ausprägt. Jedoch war auf Grund der Streuung keine Modellierung mittels τ_{Tort} -Modell und damit keine Quantifizierung der Obstruktion über τ_{Tort} möglich.

Ebenso wurde untersucht, ob die reine Lösung des Polysaccharids in Puffer durch hydratisierende Effekte bereits eine Reduktion der Wasserdiffusion zur Folge hat (s. Abb. 9.14 im Anhang). Im Gegensatz zu gelöstem Pkt2 war hier jedoch nur ein minimaler Effekt zu beobachten, der gleichzeitig von der eingesetzten Konzentration unabhängig war. Es ist somit davon auszugehen, dass die gemessene Diffusionsminderung von Wasser in den Gelen hauptsächlich durch das ausgebildete Netzwerk zustande kommt.

Zuletzt wurden die unterschiedlich extrahierten AX geliert und analysiert (s. Abb. 4.23). Auf die Messung von AX1-Gelen musste auf Grund zu kleiner Mengen an Probenmaterial verzichtet werden. Die Polysaccharide unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem FS-Gehalt und damit in der potenziellen Anzahl auszubildender *cross-links*. Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich für die ultraschallbehandelten AX (AX4 und AX5) tendenziell eine höhere Hinderung der Wasserdiffusion, wie es bereits für ultraschallbehandeltes Pkt festgestellt wurde. Während allerdings für POD-induzierte Gele eine zeitabhängige Abnahme der Diffusion zu beobachten war, ist die Diffusion in Lac-induzierten Gelen durch Konvektion überdeckt, was wiederum auf eine kleinere Beeinflussung durch die Gelstruktur schließen lässt. Die Messung von ausgetretenem Wasser als Folge von Synärese wurde optisch ausgeschlossen. Eine Abhängigkeit der relativen Wasserdiffusion vom FS-Gehalt war nicht zu beobachten. So induziert AX5 als AX mit dem höchsten FS-Gehalt zwar die höchste relative Diffusionshinderung in POD-induzierten Gelen ($D_{\text{eff}}/D_0 = 0,76$), jedoch wird sie gleichzeitig in AX3 mit einem ähnlichen FS-Gehalt am schwächsten beeinflusst ($D_{\text{eff}}/D_0 = 0,86$).

Bemerkenswert ist, dass für sämtliche AX der Startwert der Diffusion ($\Delta \rightarrow 0$) in einen gleichen Wert konvergiert (s. Abb. 4.23), womit für alle AX die gleichen, nicht-sterisch bedingten Wechselwirkungen des Wassers mit dem ausgebildeten Netzwerk zu erwarten sind. Dieser ist vergleichbar mit dem Startwert der relativen Glucosediffusion. Dadurch wird die Beobachtung aus der Untersuchung der Pkt-Gele weiter untermauert,

wonach die Wechselwirkungen auf sehr kurzen Zeitskalen unabhängig vom eingesetzten Polysaccharid, jedoch abhängig von der Konzentration sind. Eine ähnliche Hinderung erfährt Glc in Lac-induzierten Gelen, wo ebenfalls kaum eine Abhängigkeit von der Extraktion der AX vorliegt. Dennoch sinkt die relative effektive Diffusion auf ca 85 %.

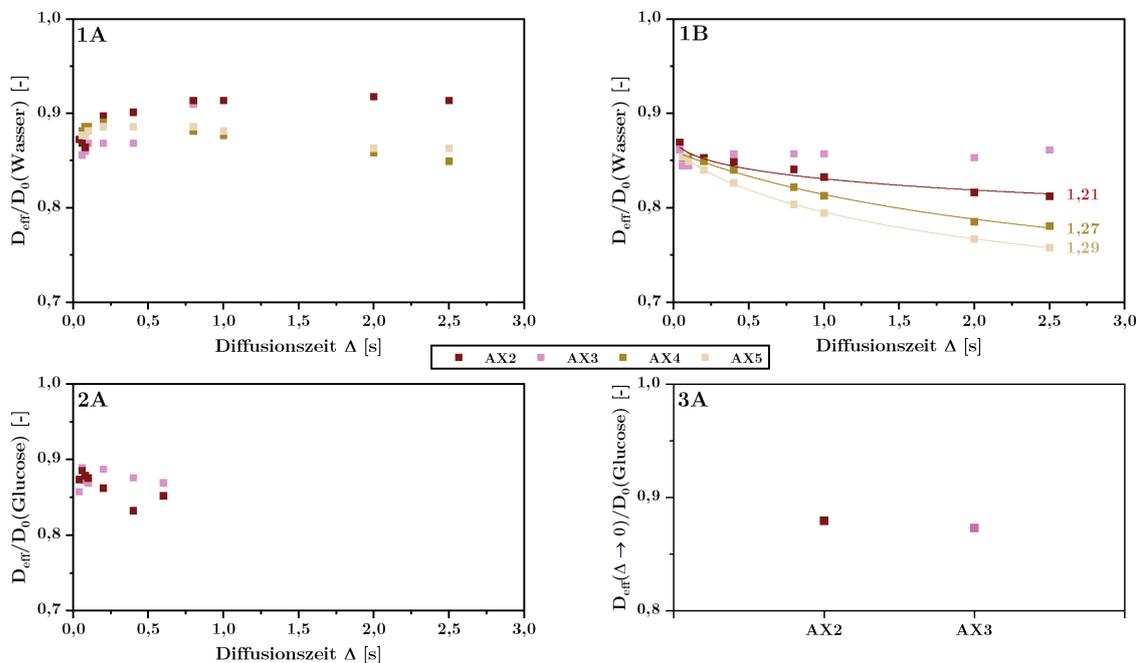


Abb. 4.23: Diffusionsverhalten in Arabinoxylgelen in Abhängigkeit von der Extraktion: relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser (1) und Glucose (2, $c = 50 \text{ mg/ml}$) in 4 %igen Arabinoxylgelen (w/v) in Abhängigkeit von der Extraktion nach Zugabe von A) Laccase und B) Peroxidase (POD)/ H_2O_2 . In 3A) sind die Werte der relativen Glucosediffusion aus 2A für $\Delta \rightarrow 0$ der untersuchten Arabinoxylgelen dargestellt. Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist.

Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

Analog zu den Pkt-Gelen könnte eine geringe Reproduzierbarkeit der mikromolekularen Umgebung die Ergebnisse erklären. Der Vergleich mit neu hergestellten Gelen konnte dies jedoch nur bedingt bestätigen (s. Abb. 9.17 im Anhang). Zur genaueren Überprüfung sind hier mehrfache Messungen nötig, die zeitlich sowie von der Menge des nötigen Materials nicht möglich waren. Da der Gelierprozess für Pkt und AX auf gleiche Weise durchgeführt wurde, ist es jedoch denkbar, dass auch die Parameter, die zur Reproduzierbarkeit beitragen, vergleichbar sind. Solange diese Faktoren nicht bekannt sind, scheinen Aussagen zu Struktur-Eigenschafts-Beziehungen vage. Es ist jedoch evident, dass Ergebnisse auf der makroskopischen Ebene nicht vergleichbar sind mit denen der mikroskopischen Umgebung. Obwohl auf makroskopischer Ebene ein deutlicher Unterschied zwischen Pkt-Gelen ($200 < G' < 1.200 \text{ Pa}$) und AX-Gelen ($20 < G' < 200 \text{ Pa}$) zu verzeichnen ist, hat die mikromolekulare Umgebung einen

ähnlichen Einfluss auf das Diffusionsverhalten von Wasser und Glc. So liegen gemessene relative D_{eff} in Gelen beider Polysaccharidspezies zwischen 0,7 und 0,9. Speziell hinsichtlich diffusionsbestimmter Fragestellungen wie beispielsweise bei der Wirkstofffreisetzung, ist eine alleinige Betrachtung der makroskopischen Eigenschaften somit nicht aussagekräftig.

4.3.2.3 Veränderungen der phenolischen Komponenten

Wie sich die Gelierung auf molekularer Ebene hinsichtlich der Ausbildung von *cross-links* auswirkt, wurde durch die Analyse der monomeren sowie oligomeren FS untersucht (s. Abb. 4.24).

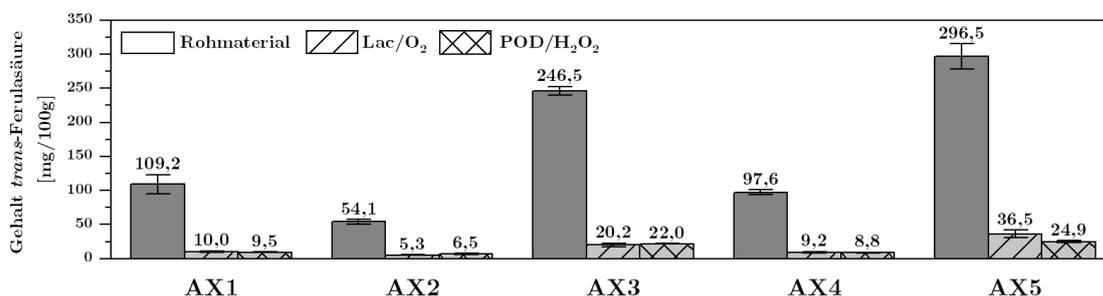


Abb. 4.24: Gehalte von *trans*-Ferulasäure (mg/100 g \pm s_{x0}, n = 3) von 2%igen (w/v) Lösungen der extrahierten Arabinoxylane vor und nach 2 h Inkubation (25 °C) mit Laccase (Lac)/O₂ bzw. Peroxidase (POD)/H₂O₂.

Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

So zeigt sich für alle AX eine Abnahme der FS durch die enzymatische Behandlung mit Lac/O₂ bzw. POD/H₂O₂. Hier ist auffällig, dass der FS-Gehalt sowohl für AX mit hohem als auch niedrigem FS-Gehalt um ca. 90 % abnimmt. Der Restgehalt könnte darauf hindeuten, dass ein Teil der FS mutmaßlich auf Grund der sterischen Komplexität nicht in *cross-links* eingebaut werden kann. Aus diesem Grund wurden die Gele ebenfalls hinsichtlich ihres Gehalts an den komplexen Seitenkettenelementen FA, FAX und FAXG untersucht (s. Tab. 4.17). So waren in nahezu sämtlichen Gelen geringe Mengen an FA quantifizierbar. Die Betrachtung der prozentualen Abnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zeigte, dass Lac und POD jeweils ähnliche Mengen an FA umsetzen (81,8 – 93,0 %), wobei in POD-induzierten Gelen meist eine leicht höhere Abnahme zu verzeichnen war. Die Abnahme des FA-Gehalts der Lac-induzierten Gele aus AX2 weicht mit 66,7% von den anderen Lac-induzierten Gelen (81,8 – 92,8 %) ab. FAX konnte in allen Gelen nachgewiesen, jedoch nicht bestimmt werden. Zusätzlich war lediglich in POD-induzierten Gelen aus AX1, AX3 und AX5 FAXG in geringen Mengen quantifizierbar. Somit könnte sich die höhere Komplexität der FAXG-Seitenketten negativ auf die enzymatische Kopplung mit POD auswirken, während sich die Kopplung

mit Lac anhand der vorliegenden Daten unabhängig von der FS-Lokalisation verhält. Es ist ebenfalls denkbar, dass FS, die in höher komplexen Elementen wie FAXGG oder FAXGX gebunden vorliegt und welche ebenfalls in den AX nachgewiesen wurden, unterschiedlich an der oxidativen Kopplung teilnimmt. Diese Strukturen können methodisch jedoch nicht erfasst werden, womit keine Aussagen hierzu möglich sind.

Tab. 4.17: Gehalte der ferulasäurehaltigen Seitenkettenstrukturen in 2%igen (w/v) Lösungen der extrahierten Arabinoxylane nach 2 h Inkubation (25 °C) mit Laccase(Lac)/O₂ bzw. Peroxidase (POD)/H₂O₂. Die Werte sind als Mittelwerte in $\mu\text{mol/g} \pm s_{x0}$ (n = 3) angegeben. Die prozentualen Abnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial sind in Klammern angegeben. FA, 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAX, β -D-Xylopyranosyl-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAXG, α -L-Galactopyranosyl-(1→2)- β -D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; n.q. nicht quantifizierbar
Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

	AX1		AX2		AX3		AX4		AX5	
	Lac ^a	POD	Lac	POD	Lac	POD	Lac	POD	Lac ^a	POD
FA	0,4 ± 0,0 (81,8%)	0,2 ± 0,0 (90,9%)	0,4 ± 0,0 (66,7%)	n.q.	0,4 ± 0,0 (90,7%)	0,3 ± 0,1 (93,0%)	0,3 ± 0,0 (82,4%)	0,2 ± 0,0 (88,2%)	0,5 ± 0,1 (92,8%)	0,6 ± 0,2 (91,3%)
FAX	n.q.		n.q.		n.q.		n.q.		n.q.	
FAXG	n.q.	0,1 ± 0,0 (88,9%)	n.q.		n.q.	0,2 ± 0,0 (95,1%)	n.q.		n.q.	0,3 ± 0,0 (93,2%)

^a n = 2

Inwieweit sich der Abbau der FS auf die Gehalte an OFS sowie die Verteilung der DFS und TriFS auswirkt ist in Abb. 4.25 zusammengefasst. Entgegen der Daten zu Pkt-Gelen zeigt sich für AX1-4 eine Abnahme der OFS-Gehalte, während sie für Gele aus AX5 nur leicht zunehmen. Dies erscheint ungewöhnlich, wurde jedoch bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Grabber *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2009; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Martínez-López *et al.*, 2019). So ist es denkbar, dass höher oligomere Strukturen im für die HPLC-Injektion verwendeten Lösungsmittel MeOH/Wasser nicht ausreichend löslich sind und somit unterbestimmt werden. Zusätzliche Untersuchungen mittels THF/Wasser bzw. Dioxan/Wasser als Lösungsmittel der extrahierten OFS, mit denen in der Literatur eine bessere Wiederfindung für manche DFS und TriFS erzielt werden konnte (Jilek & Bunzel, 2013), zeigten jedoch keine Unterschiede. Somit erscheint eine Oligomerisierung in höher oligomere Strukturen, die methodisch nicht erfasst werden können, wahrscheinlicher (Bunzel, 2010). Der Gehalt der gebildeten, quantifizierbaren OFS ist dabei höher in Gelen aus AX, die unter vergleichsweise milden Bedingungen extrahiert wurden und damit abhängig vom FS-Gehalt im Rohmaterial.

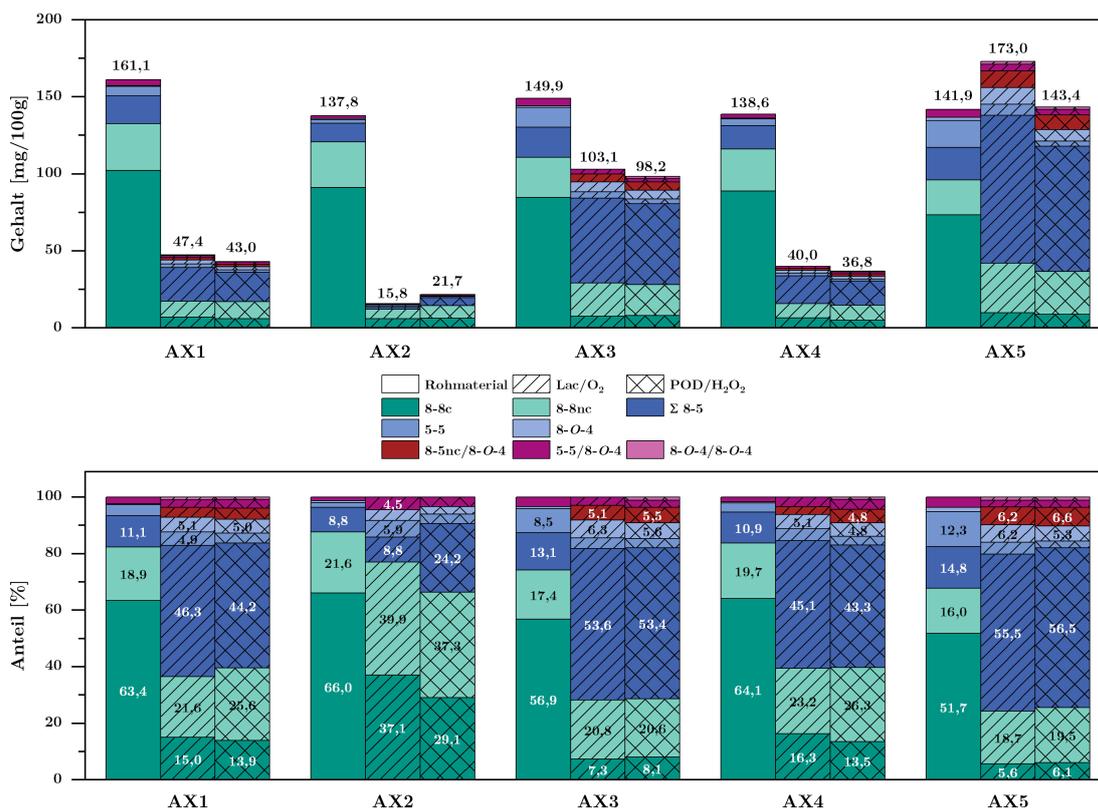


Abb. 4.25: Gehalte von oligomeren phenolischen Säuren ($\text{mg}/100\text{ g} \pm s_{x0}$ ($n = 3$)) von 2%igen (w/v) Lösungen der extrahierten Arabinoxylane vor und nach 2 h Inkubation ($25\text{ }^\circ\text{C}$) mit Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/ H_2O_2 (oben). Zusätzlich sind die prozentualen Gehalte der einzelnen Dehydrodi- und triferulasäuren am jeweiligen Gesamtgehalt angegeben (unten). nc, nicht-zyklisch; c, zyklisch
 Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, $25\text{ }^\circ\text{C}$; AX2, 4 h, $30\text{ }^\circ\text{C}$; AX3, 1,5 h, $30\text{ }^\circ\text{C}$; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, $30\text{ }^\circ\text{C}$; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, $30\text{ }^\circ\text{C}$

Zusätzlich hat die oxidative Kopplung eine Veränderung der OFS-Verteilungen zur Folge. So dominieren im Vergleich zum Rohmaterial 8-5-DFS, während 8-8nc- und 8-8c-DFS ebenfalls in größeren Anteilen vorhanden sind. In den absoluten Anteilen ist für die 8-8-DFS jedoch teilweise eine Abnahme zu beobachten, sodass bereits bestehende 8-8-DFS mutmaßlich in höher oligomere OFS weiterreagieren. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, da keine TriFS mit 8-8-Verknüpfung quantifiziert wurden. Als TriFS sind 8-5nc/8-O-4- sowie 8-O-4/8-O-4-TriFS neu gebildet worden.

Analog zur Struktur von Pkt1 scheint die Struktur der AX, jedoch in deutlich höherem Ausmaß, eine Oligomerisierung der FS zu begünstigen. Ob dies mit der linearen Struktur der AX, ihrem geringen M_w oder mit weiteren, unbekanntenen Faktoren zusammenhängt, kann nicht vorhergesagt werden.

4.3.3 Heterogene Pektin- und Arabinoxylangele

Wie in Kap. 4.3.1.1 erwähnt waren Gele von Pkt1 durch eine Phasentrennung charakterisiert, was mutmaßlich auf Synärese zurückzuführen ist. Dies schränkt den Nutzen dieser Gele für Anwendungen im Lebensmittelbereich oder in der Pharmazie erheblich ein. Dieses Verhalten könnte mit dem hohen Gehalt an FS und einer damit einhergehenden Verringerung des Gelvolumens durch enger verknüpfte Polymerketten zusammenhängen, wie es Morales-Burgos und Mitarbeiter (2017) für Lac-induzierte Gele von AX aus Mais vorschlugen. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Synärese in Pkt-Gelelen und geringen M_w der Gelbildner sichtbar. Im Gegensatz zu Pkt1 waren Gele aus AX mit ähnlichen M_w und vergleichsweise niedrigen Gehalten an FS äußerst homogen. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Zugabe von AX zu Pkt1 eine Stabilisierung der Gele bewirken kann. Dazu wurden 4%ige Gele mit unterschiedlichen Anteilen von Pkt1 und AX2 (75:25, 50:50, 25:75 %, w/w) hergestellt. Dadurch konnte ab einem Anteil von 50 % AX optisch eine Phasentrennung verhindert werden. Inwieweit sich die Mischung auf die viskoelastischen Eigenschaften der Gele auswirkt, wurde rheologisch untersucht (s. Abb. 4.26).

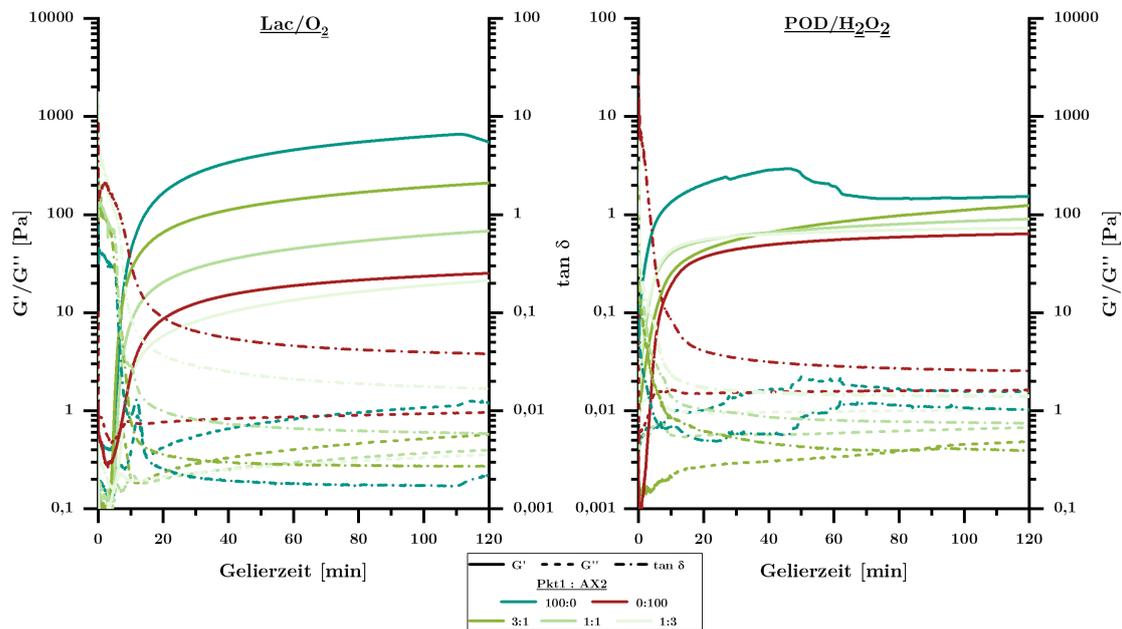


Abb. 4.26: Rheologische Untersuchung (5 % Deformation, 1 Hz) von heterogenen Gelen: Speicher- (G') und Verlustmodule (G'') sowie die daraus resultierenden $\tan \delta$ -Werte über den Verlauf der Gelierung von gemischten 4%igen Lösungen (w/v) von Pkt1 und AX2 über einen Zeitraum von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase (Lac) bzw. Peroxidase (POD)/H₂O₂. Extraktionsbedingungen: Pkt1, 40 min, 121 °C, 2,1 bar; AX2, 4 h, 30 °C, 0,25 M NaOH

Während reine Gele von Pkt1 einen inhomogenen Geliervverlauf aufweisen, führt die Zugabe von AX2 zu einem stabilen Anstieg von G' . Hierbei ist anzumerken, dass G'

des Lac-induzierten Gels mit 75 % AX2 (w/w) knapp unterhalb des reinen AX2-Gels verläuft. Jedoch ist der Unterschied mit 4 Pa marginal. Die anderen Mischgele ordnen sich nach einer Gelierzeit von 2 h entsprechend des Pkt1-Anteils zwischen den Werten von reinem Pkt1 und reinem AX2 ein.

Auf mikroskopischer Ebene zeigte sich dagegen keine Beeinflussung der Geleigenschaften (Abb. 4.27). Für alle Gele zeigte sich zwar eine Abnahme der Wasserdiffusion, jedoch konnte nur für POD-induzierte Gele ein Obstruktionseffekt durch das Netzwerk festgestellt werden. Lac-induzierte Mischgele ähnelten sich in ihrem Diffusionsverhalten weitestgehend Gelen von reinen AX2, was durch vergleichbare zeitabhängige Verläufe der relativen Wasserdiffusion angedeutet wird.

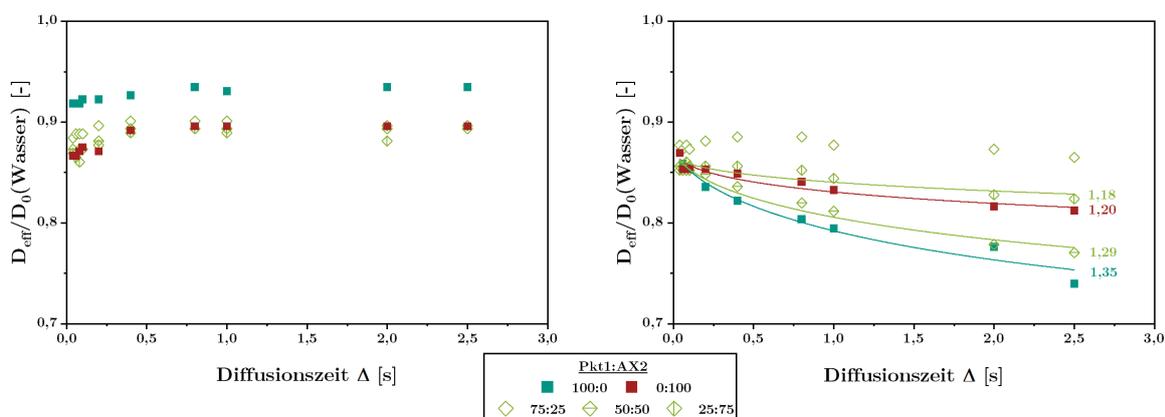


Abb. 4.27: Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser in 4%igen Mischgelen (w/v) von Pkt1 und AX2 in 50 mM Natriumacetatpuffer nach Zugabe von Laccase (links) und Peroxidase/H₂O₂ (rechts). Die Linien repräsentieren den Fit des Tortuositätsmodells, dessen Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist.

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 40 min, 121 °C, 2,1 bar; AX2, 4 h, 30 °C, 0,25 M NaOH

Dagegen ließen die Daten der POD-induzierten Gele keine Aussagen zu: Während die relative Wasserdiffusion in Gelen aus gleichen Anteilen von Pkt1 und AX2 ähnlich zu reinen Pkt1-Gelen verringert wurde, war sie in Gelen aus 75 % Pkt1 und 25 % AX2 (w/v) am wenigsten beeinflusst. Dies ist potenziell auf die geringe Reproduzierbarkeit der Geleigenschaften auf mikroskopischer Ebene zurückzuführen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugabe von AX zu Pkt1 zu einer Verringerung der Synäreseneigung führen kann. Hierbei eröffnet sich die Fragestellung, inwiefern die verschiedenen Polysaccharide miteinander interagieren. Grundsätzlich werden beim Vorliegen zweier Gelbildner, wie in Kap. 1.3.1.2 beschrieben, mehrere Mechanismen diskutiert (de Vries, 2004). So ist es möglich, dass AX und Pkt zwei interpenetrierende Netzwerke ausbilden, die miteinander jedoch nicht verknüpft sind. Gleichmaßen kann auch nur ein Polysaccharid eine Gelstruktur aufbauen, ohne dass das andere dazu beiträgt. Auf Grund des enzymatischen *cross-link*-Prozesses und des äquivalenten

Vorliegens der FS als Substrat in beiden Polysacchariden ist jedoch ein gemeinsames Netzwerk aus Pkt und AX wahrscheinlich. Bis dato konnte diese heterogene Verknüpfung zwischen Pkt und AX jedoch nicht bestätigt werden. Hierzu müssten Studien aufgesetzt werden, mit dem Ziel, *cross-link*-Fragmente zu isolieren, die gleichzeitig eindeutig zuzuordnende Strukturelemente von Pkt und AX enthalten.

4.4 Zusammenfassende Diskussion

Durch enzymatische Kopplung von FS-haltigen Pkt und AX mit Lac/O₂ bzw. POD/H₂O₂ wurden kovalente Hydrogele hergestellt, deren Eigenschaften mutmaßlich von den Strukturparametern der eingesetzten Polysaccharide abhängig sind. Für die präparative Gewinnung von Pkt wurden Zuckerrübenschnitzel gewählt, da diese auf Grund ihrer botanischen Herkunft FS-haltige Pkt enthalten, die im Vergleich zu Pkt aus Äpfeln oder Zitrusfrüchten zur Herstellung kovalenter Gele geeignet sind. Des Weiteren fallen Zuckerrübenschnitzel als Nebenströme der Saccharosegewinnung an. Somit stellt die Gewinnung von Pkt daraus eine Möglichkeit dar, diese aufzuwerten. Die Extraktion der Pkt geschah u.a. im sauren Milieu bei unterschiedlichen Inkubationszeiten, pH-Werten sowie teilweise unter Einsatz der Ultraschallbehandlung. Die Autoklavierung des Rohmaterials ermöglichte hierbei eine ähnliche Ausbeute bei der Extraktion von Pkt im Neutralen wie bei der Säurebehandlung. Darüber hinaus ermöglichte dies die Gewinnung einer nicht säurebehandelten Fraktion mit eigenen Charakteristika. Analog dazu wurden AX durch alkalische Behandlung mit und ohne Ultraschallbehandlung aus UBS von Popcornmais erhalten, die sich durch hochkomplexe Strukturen auszeichnen und damit für die Untersuchung von Struktur-Geleigenschaftsbeziehungen geeignet sind. Anhand etablierter Methoden wurden die isolierten Polysaccharide charakterisiert, mit dem Ziel, Eigenschaften der daraus gebildeten Gele auf die Strukturen der Gelbildner zurückführen zu können.

Die Variation der Extraktionsbedingungen ermöglichte die Gewinnung strukturell unterschiedlicher Pkt. Hierbei war durch Senkung des pH-Werts sowie durch Erhöhung der Extraktionsdauer im Sauren ein Abbau der AN als neutrale Seitenketten des RG I zu beobachten, was auf die Säurelabilität der α -furanosidisch verknüpften Ara zurückzuführen ist. Damit einhergehend sank auch das M_w . Im Vergleich dazu wurde durch Autoklavenextraktion eine hinsichtlich der Zusammensetzung mit mild säureextrahiertem Pkt vergleichbare Probe erhalten. Jedoch hatte die Autoklavenbehandlung eine Spaltung des Rückgrats zur Folge, was sich in kleinen M_w äußerte. Mit steigender Säure-

rebehandlung kam es zu einer Abnahme der FS-Gehalte um bis zu 20 %, was auf eine säurekatalysierte Abspaltung der FS und/oder den Abbau FS-haltiger AN hindeutet. Ein Einfluss der Extraktion auf die Gehalte an OFS war nicht festzustellen, wobei sich für alle Pkt 8-5-DFS als mengenmäßig bedeutendste DFS herauskristallisierte.

Ein Fokus der Polysaccharidcharakterisierung lag auf den Seitenkettenstrukturen, da diese einerseits die Komplexität der Polysaccharide bedingen und andererseits FS als charakteristisches Strukturelement tragen. Damit einhergehend spielen sie für die oxidative Kopplung eine maßgebliche Rolle. Hierfür konnte auf bereits entwickelte Screeningmethoden zur Analyse charakteristischer OS nach enzymatischer Freisetzung aus AN und GN zurückgegriffen werden (Wefers & Bunzel, 2016). So weisen Pkt aus Zuckerrüben hochverzweigte, überwiegend an Position O3 verzweigte AN auf, die bei intensiverer Säurebehandlung zunehmend an Komplexität verlieren. Dies war ebenso durch die Abnahme verzweigter Araf (1,3,5- und 1,2,3,5-) in der Methylierungsanalyse ersichtlich. Hinsichtlich der GN deuteten die Ergebnisse der Methylierungsanalyse auf (1→4)-verknüpfte Strukturen hin. Anteile von (1→3)- und (1→6)-verknüpfter Galp implizierten zudem das Vorkommen von AGN Typ II. Mit Hilfe des GN-Screenings konnten β -(1→4)-verknüpfte GN-OS mit geringen Anteilen an Arap analysiert werden, die aus der enzymatischen Spaltung linearer Abschnitte β -(1→4)-verknüpfter GN hervorgehen. Jedoch ist die Methode nicht in der Lage, FS-haltige und FS-freie OS aus AN bzw. GN zu unterscheiden.

Daher war es ein weiteres Ziel der Arbeit, das AN- und GN-Screening zu erweitern, um FS-haltige und FS-freie OS getrennt analysieren zu können und damit einhergehend Informationen zur Bindung der FS im Polysaccharid zu erhalten. So konnte an einer semipräparativen Phenyl-Hexyl-HPLC-Säule eine effektive Auftrennung der FS-freien und FS-haltigen OS erreicht werden, die mit Hilfe eines Fraktionierventils automatisiert erhalten wurden. Die Analyse der FS-freien Fraktionen mittels HPAEC-PAD zeigte, dass die OS-Verteilung der FS-freien AN- und GN-OS weitestgehend der Verteilung ohne vorheriger Separation entsprach. Die Analyse der FS-haltigen OS mittels HPAEC-PAD nach enzymatischer Hydrolyse estergebundener FS ermöglichte eine indirekte semiquantitative Bestimmung der FS-haltigen OS. Dazu wurde auf die publizierten relativen Responsefaktoren der entsprechenden Analoga zurückgegriffen (Wefers & Bunzel, 2016). So konnten für Pkt aus Zuckerrübe, aber auch für UBS und LBS aus Quinoa und Amaranth bereits beschriebene FS-haltige Strukturelemente bestätigt werden, die in vorangegangenen, publizierten Arbeiten erst nach aufwändiger Auftrennung erhalten wurden (Ishii, 1994; Ralet *et al.*, 1994a; Bunzel *et al.*, 2005; Wefers *et al.*,

2015a). Eine Unterscheidung zwischen einfach, mehrfach sowie mit OFS substituierten OS ist mit der erweiterten Methode jedoch nicht möglich. Die direkte Analyse der FS-OS mittels HPLC-MSⁿ ermöglichte qualitative Aussagen zu den erhaltenen FS-haltigen Strukturen, womit in den aus Zuckerrüben extrahierten Pkt drei bisher nicht beschriebene FS-haltige GN-OS anhand ihrer Fragmentierungsmuster identifiziert werden konnten. Hierbei ist besonders ein Galactotetrasaccharid hervorzuheben, in dem neben β -(1→4)-Verknüpfungen zusätzlich eine (1→6)-Verknüpfung der Gal vorliegt. Die Bestätigung der Strukturen mittels NMR-Experimenten war auf Grund zu geringer Konzentrationen allerdings nicht möglich. Durch wiederholte Inkubation der FS-OS mit *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase zeigte sich eine hindernde Wirkung der FS auf den enzymatischen Verdau, was in der Literatur bereits für Arabinofuranosidasen an FS-haltigen AXOS demonstriert wurde (Rémond *et al.*, 2008; Schendel *et al.*, 2016c). Gleichzeitig zeigte sich für AN-reduzierte und damit GN-angereicherte Pkt aus Zuckerrüben nach Säurebehandlung, dass FS in GN hauptsächlich in der unmittelbaren Umgebung von β -(1→6)-verknüpfter Gal, mutmaßlich an Position O6 gebunden, vorliegt, wie es bereits von Saulnier & Thibault (1999) postuliert wurde. Demnach können in der Methylierungsanalyse bestimmte Anteile (1→6)-verknüpfter Gal neben AGN Typ II auch auf FS-haltige Strukturen als Teil der AGN Typ I zurückgeführt werden.

Die durch Variation der Extraktionsbedingungen erhaltenen sechs Pkt unterscheiden sich zwar hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, M_w , Komplexität der Seitenketten und FS-Gehalt. Da die Extraktion jedoch relativ unspezifische Veränderungen hervorrief, wurden dabei meist mehrere Parameter gleichzeitig verändert. Um die Gehalte an AN und GN bei gleichzeitigem Erhalt anderer Strukturparameter gezielt zu verändern, wurden Pkt zusätzlich mit Hilfe strukturspezifischer Enzyme behandelt. Der Einsatz von *exo*-Arabinofuranosidase mit unterschiedlichen Inkubationszeiten ergab zwei modifizierte Pkt, die sich bei gleichem FS-Gehalt nur in ihrem Gehalt an AN und damit einhergehend im M_w unterschieden. Dazu gingen aus der Behandlung von Pkt mit *endo*-Galactanase bei unterschiedlichen Inkubationszeiten zwei modifizierte Pkt hervor, die sich bei gleichem FS-Gehalt vornehmlich in ihrem M_w unterschieden. Dies ging auf einen Abbau des HG-Rückgrats zurück, der durch die geringe Polygalacturonasenebenaktivität des Enzyms induziert wurde. Der GN-Gehalt konnte mutmaßlich auf Grund der geringen enzymatischen Zugänglichkeit (potenziell bedingt durch die Bindung von FS) nur geringfügig verringert werden, sodass mögliche Geleigenschaftsveränderungen vorrangig auf die Reduktion des M_w zurückgeführt werden können.

Gleichermaßen war durch Variation der alkalischen Behandlung von UBS aus Popcornmais die Isolierung von fünf AX möglich. Jedoch gestaltete sich die Extraktion reiner AX als schwierig. So wiesen die AX nach alkalischer Extraktion aus den mutmaßlich stärkefreien UBS Anteile an Reststärke und Restprotein auf. Dies lässt darauf schließen, dass eine alkalische Behandlung der UBS eine Freisetzung von enzymatisch unzugänglicher Stärke zur Folge haben kann, die selbst durch wiederholte Inkubation mit stärkeabbauenden Enzymen nicht weiter reduziert werden konnte. Gleichzeitig waren die AX durch hohe Gehalte an Protease-unverdaulichem, prolinreichem Protein gekennzeichnet. Die Analyse der M_w ergab für alle AX vergleichbare Molekülgrößen, die mit ca. 200 kDa in etwa dem des Autoklavenpektins entsprachen und damit kleiner als säureextrahierte Pkt waren. Ebenso zeigte die Charakterisierung der Polysaccharidzusammensetzung keine nennenswerten Unterschiede zwischen den AX-Präparaten, wobei erwartungsgemäß jeweils Xyl und Ara als dominierende Monosaccharide festgestellt wurden. Dies resultierte in vergleichbaren, hohen Werten für A/x , die eine hohe Substitutionsdichte der AX implizierten. Jedoch war anhand der Methylierungsanalyse das Vorkommen hochkomplexer Seitenkettenelemente ersichtlich, was durch erhöhte Mengen an in Seitenketten gebundener Xylp, (1→2)- und (1→3)-glykosidisch verknüpfter Araf sowie terminaler und (1→3)-glykosidisch verknüpfter Galp angedeutet wurde. Dadurch sind Aussagen zur Substitutionsdichte anhand des A/x vage. Das Vorkommen hochkomplexer Strukturen wie FAXGG oder FAXGX, wie sie bereits für Mais beschrieben wurden (Allerdings *et al.*, 2006), wurde mittels Methylierungsanalyse bestätigt. Ein genaueres Bild der komplexen Seitenkettenelemente war durch die Analyse FS-haltiger Seitenketten nach milder Säurehydrolyse möglich, wonach die Gehalte an FA, FAX und FAXG mit steigender Alkalibehandlung der AX abnahmen. Dies impliziert fälschlicherweise eine Abnahme der Komplexität der AX-Seitenketten unter harschen Extraktionsbedingungen. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass estergebundene FS im Zuge der Alkalibehandlung partiell freigesetzt wird, womit die Seitenketten methodisch nicht mehr erfasst werden. Das niedrige Verhältnis von FA zu FAX (je nach AX zwischen 4,1 und 4,7) deutete zudem auf hohe Anteile komplexer Seitenketten hin, wie sie für UBS aus Popcornmais beschrieben wurden (Schendel *et al.*, 2016a). Die partielle Verseifung der FS-Ester spiegelte sich erwartungsgemäß in den Gesamtgehalten an FS wider, wodurch die extrahierten AX hauptsächlich im FS-Gehalt variierten. Diese waren im Vergleich zu den untersuchten Pkt um den Faktor 3-12 niedriger. Andere Strukturparameter unterschieden sich zwischen den unterschiedlich extrahierten AX kaum. So waren auch die OFS-Gehalte der AX weitestgehend konstant, wobei

überraschend 8-8-DFS dominierten, was in der Literatur für das Ausgangsmaterial, Popcornmais, nicht beschrieben wurde (Jilek & Bunzel, 2013). Der Vergleich mit den UBS aus Popcorn, aus denen die Fraktionen extrahiert wurden, zeigte jedoch, dass andere Regioisomere im Vergleich zu den 8-8-DFS während der alkalischen Extraktion vermehrt abgespalten werden, woraus eine Verschiebung des OFS-Profiles resultierte.

Nach Gewinnung strukturell unterschiedlicher Pkt- und AX-Polysaccharide wurden diese schließlich oxidativ mittels Lac/O₂ sowie POD/H₂O₂ vernetzt, um Hydrogele zu erhalten. Hierbei war durch die ausreichende Hydratisierung der Polysaccharide in Puffer vor Enzymzugabe eine Homogenisierung der Probenlösungen möglich, womit gleichbleibende Gelierbedingungen geschaffen werden sollten. Jedoch neigten insbesondere säureextrahierte Pkt bereits vor der Gelierung zur Bildung hochviskoser Flüssigkeiten, was die Handhabung erschwerte. Auf makroskopischer Ebene konnten so nach Enzym- und Substratzugabe reproduzierbare Geleigenschaften geschaffen werden, was anhand der viskoelastischen Eigenschaften dokumentiert wurde. Damit waren Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Viskoelastizität und der Struktur des Gelbildners möglich. Mit steigender Polysaccharidkonzentration kam es sowohl für Pkt-Gele als auch für AX-Gele zu einer Verkürzung der Gelierzeit sowie einer höheren Elastizität der Gele als Resultat einer mutmaßlich ansteigenden *cross-link*-Dichte, was in frühen Studien bereits gezeigt wurde (Oosterveld *et al.*, 2000b; Carvajal-Millán *et al.*, 2005b; Zaidel *et al.*, 2012). Der Vergleich der Geleigenschaften der strukturell abweichenden Pkt wies auf Korrelationen zwischen der Elastizität und dem FS-Gehalt, dem AN-Gehalt sowie dem M_w hin. Dabei nahm beim Vergleich unterschiedlich lang extrahierter Pkt die Elastizität mit sinkendem FS-Gehalt, aber auch AN-Gehalt (und damit M_w) ab, während die Gelstabilität zunahm. Durch enzymatische Modifikation der Pkt konnte der Parameter des FS-Gehalts konstant gehalten werden, während die AN-Gehalte (und damit gleichzeitig M_w) sowie das M_w alleinig getrennt variiert wurden. Die Gelelastizität sank mit beiden Parametern, jedoch ausgeprägter bei abnehmenden AN-Gehalten, wobei gleichzeitig die Deformationsstabilität der Gele zunahm. Somit ist ein Mechanismus denkbar, nach dem große und räumlich komplexe Moleküle auf Grund ihrer verzweigten Struktur die Ausbildung elastischer Netzwerke fördern. Gleichzeitig könnten diese jedoch durch die natürlichen Verzweigungen der AN in deren Stabilität gemindert werden. Um diese These zu bestätigen, sollte jedoch eine erhöhte Probenzahl mit stark abweichenden AN-Gehalten untersucht werden.

Die Elastizitäten der AX-Gele, gemessen über G' , lagen um etwa den Faktor 10-100

unterhalb der Pkt-Gele, vermutlich ein Resultat der geringeren *cross-link*-Dichte. Für Lac-induzierte Gele stieg die Elastizität dabei mit dem FS-Gehalt an, was bereits für AX aus Mais demonstriert wurde (Carvajal-Millán *et al.*, 2005c; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Kale *et al.*, 2013; Ayala-Soto *et al.*, 2016). Allerdings konnte diese Korrelation für POD-induzierte Gele nicht bestätigt werden. Auf Grund zu kleiner Mengen an Probenmaterial war eine Wiederholung der Messung jedoch nicht möglich, wodurch Präparationsfehler nicht ausgeschlossen werden können.

Der Einsatz der PFG-STE-NMR ermöglichte einen Blick auf die mikroskopische Ebene der Gele durch Messung der translatorischen Bewegung von Wasser und Glucose. Demnach sank die Diffusion der beiden Moleküle im Gel mit steigender Polysaccharidkonzentration, wobei insbesondere bei AX-Gelen durch Konvektion kein zeitabhängiges Diffusionsverhalten festgestellt wurde. Anhand der Diffusion für $\Delta \rightarrow 0$ wurden jedoch auch nicht-obstruierende Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und dem Netzwerk ersichtlich, die auf sehr kurzen Zeitskalen zur konzentrationsabhängigen Abnahme der Diffusion beitragen. Denkbar wären hier Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit polaren funktionellen Gruppen des Netzwerks. Diese waren jedoch nur von der Konzentration und nicht von der Struktur abhängig, was der Vergleich strukturverschiedener Gelbildner zeigte. Jedoch wurden abhängig vom eingesetzten Polysaccharid unterschiedliche Gele ausgebildet, was anhand unterschiedlicher Diffusionshinderungen von Wasser und Glucose ersichtlich wurde. Demnach ist mutmaßlich auch die mikroskopische Umgebung innerhalb der Gele von strukturellen Parametern abhängig. Das Auftreten von Synärese sowie Konvektion machten jedoch eine Erfassung der tatsächlichen Diffusion in manchen Gelen unmöglich. Dabei wurde das Auftreten von Synärese in Gelen aus Pkt mit geringem M_w festgestellt. Durch Zugabe von AX zu Autoklavenpektin, das zur Synärese neigte, konnte ab einem Gehalt von 50 % (w/w) ein Wasseraustritt vermieden werden. Dies deutet auf die Ausbildung eines heterogenen Pkt-AX-Netzwerks hin, was jedoch nicht genauer untersucht wurde.

Darüber hinaus ging aus der Messung von Gelen, die unter mutmaßlich gleichen Bedingungen hergestellt wurden, eine geringe Reproduzierbarkeit der mikroskopischen Gelstruktur hervor, wodurch Aussagen zu Korrelationen zwischen Diffusionshinderung und Strukturparametern fraglich sind. Dies verdeutlicht die Genauigkeit der Messmethode, wonach selbst kleinste Abweichungen der Gelpräparation durch größere Unterschiede in den mikromolekularen Geleigenschaften (insbesondere in Pkt-Gelen) sichtbar werden. Gleichzeitig bedeutet dies aber auch, dass unbekannte Faktoren während der Gelbildung

in Kontrast zur makroskopischen, viskoelastischen Ebene ein reproduzierbares Abbild der mikroskopischen Gelstruktur verhindern. Denkbar wären Temperaturschwankungen während der Gelbildung, nicht ausreichende Vermischung nach Enzymzugabe oder Probleme bei der Überführung des Gels in das Probengefäß. Um dies zu klären, sollte der Prozess der Gelbildung durch Variation einzelner Parameter unter möglichst standardisierten Bedingungen genauer kontrolliert werden. Dadurch können Präparationsfehler in Zukunft vermieden und repräsentative Aussagen erhalten werden. Unter der Annahme, dass lediglich Temperaturschwankungen die geringe Reproduzierbarkeit bedingen, scheint die Diffusionshinderung in Pkt-Gelen mit dem sinkenden AN-Gehalt und M_w abzunehmen, was durch die Analyse der Gele der modifizierten Pkt angedeutet wurde, die am selben Tag hergestellt und analysiert wurden. Für AX-Gele konnten dagegen keine Korrelationen zwischen Diffusion und Strukturparametern festgestellt werden.

Eine chemische Beschreibung der molekularen Gelstruktur war in Teilen durch die Analyse der OFS möglich, die im Zuge der oxidativen Kopplung gebildet wurden. So nahmen die Gehalte an FS durch die oxidative Behandlung stark ab, wobei bei der POD-generierten Gelierung von AX eine leichte Hinderung zu beobachten war, wenn FS an höherkomplexe Seitenketten gebunden vorliegt. Für Lac-induzierte Gele konnte keine Beeinflussung der oxidativen Kopplung der FS in Abhängigkeit der Komplexität der FS-haltigen Seitenketten festgestellt werden. Bei der Gelierung von Pkt kam es mit Abnahme der FS-Gehalte zu einer Zunahme der OFS-Gehalte, wobei ihr Gehalt abhängig vom M_w (und teilweise FS-Gehalt) unterschiedlich stark anstieg. Dagegen war für AX meist eine Abnahme der OFS-Gehalte zu beobachten, was auf die Bildung höher oligomerer Strukturen zurückgeführt werden kann, die methodisch nicht erfasst werden können (Bunzel, 2010). Hierbei wird angenommen, dass die Oligomerisierung durch strukturelle Parameter der Polysaccharidmatrix beeinflusst wird. Bezüglich des Regioisomerenprofils der gebildeten OFS konnten keine strukturell bedingten Abhängigkeiten festgestellt werden. Sowohl für Pkt als auch AX war die Bildung von 8-5-DFS hervorzuheben.

Die gewonnenen Daten deuten an, dass die strukturelle Komplexität der Polysaccharide Auswirkungen auf die Eigenschaften der daraus gebildeten kovalenten Gele hat. Dies kann auf makroskopischer Ebene durch etablierte rheologische Messungen gezeigt werden. Auf mikroskopischer Ebene können die Gele über das Diffusionsverhalten von kleinen Gastmolekülen beschrieben werden. Dies ermöglicht eine detaillierte Charakterisierung der Gele, welche für Applikationen im Rahmen der Wirkstofffreisetzung etc.

notwendig ist. Aus den Daten ging hervor, dass die Beschreibung auf unterschiedlichen Längenskalen nicht miteinander in Einklang zu bringen war. So zeigte sich auf kurzen Längenskalen eine geringe Reproduzierbarkeit in der Herstellung der Gelstruktur, so dass kaum Zusammenhänge zwischen Strukturparametern und Diffusionseigenschaften identifiziert werden konnten. Welche Faktoren letztendlich ursächlich für die geringe Reproduzierbarkeit sind, konnte nicht geklärt werden. Sichtbar wurden jedoch strukturunabhängige Wechselwirkungen mit dem Netzwerk. Die Charakterisierung der Gele auf makroskopischer Ebene zeigte dagegen, dass die viskoelastischen Eigenschaften der Gele reproduzierbar erzeugt werden können. Dies resultierte in der Beschreibung der Einflüsse von Strukturparametern auf Geleigenschaften. So konnten aus den rheologischen Daten Zusammenhänge zwischen Gelelastizität und Deformationsstabilität und Polysaccharidkonzentration, FS-Gehalt sowie AN-Gehalt (und M_w) im Gelbildner festgestellt werden. Gleichzeitig verdeutlichen diese Daten, dass anhand der makroskopischen Eigenschaften kaum Rückschlüsse auf die mikroskopischen Eigenschaften der Gele gezogen werden können: während die Gelviskoelastizität robust gegenüber leichten Variationen in der Gelherstellung ist, verhindern unbekannte Faktoren eine Standardisierung der Gele auf mikroskopischer Ebene und induzieren damit einhergehend stets abweichende Geleigenschaften auf kurzen Längenskalen. Gleichmaßen zeigt der Vergleich der Gele aus AX und Pkt, dass sich trotz erheblicher Unterschiede in der Viskoelastizität das Diffusionsverhalten von Molekülen in diesen Gelen nur geringfügig variiert.

Der Einsatz von ferulasäurebasierten Hydrogelen im Lebensmittel- oder Arzneimittelbereich erfordert dementsprechend weitergehende Untersuchungen. Ein besonderer Fokus muss dabei auf der Standardisierung der Gelierbedingungen liegen, um auf allen Beschreibungsebenen Gele reproduzierbar generieren zu können. Ebenfalls stellt der Wasseraustritt aus den Gelen als Folge der Synärese einen unerwünschten Nebeneffekt dar. Erste Ansätze zu dessen Vermeidung wurden in dieser Arbeit vorgelegt, die jedoch in größer angelegten Studien genauer evaluiert werden müssen. Die vorliegende Arbeit stellt erste Untersuchungen der translatorischen Beweglichkeit kleiner Moleküle, Wasser und Glucose, in Netzwerken ferulasäurebasierter Hydrogele vor. Die Untersuchung von größeren Molekülen wie Nanopartikeln, die in der Größenordnung der Maschenweiten liegen und keine chemischen Interaktionen mit dem Netzwerk zeigen, könnte anhand der geometrischen Hinderung dazu dienen, Gelparameter wie Vernetzungsdichte und Maschenweiten näher zu beschreiben. Gleichmaßen ermöglicht die Diffusionsmessung weiterer Moleküle wie von Arzneistoffen oder Proteinen eine Evaluierung des Einsatzes

entsprechender Gele als *Carrier* für dickdarmgerichtete Wirkstoffe, indem unter Berücksichtigung unterschiedlicher physiologischer Bedingungen die Wirkstofffreisetzung im Magen-Darm-Trakt simuliert wird.

5 Zusammenfassung

Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand spielen in der menschlichen Ernährung eine bedeutende Rolle, da ihnen einerseits ernährungsphysiologisch positive Eigenschaften zugesprochen werden, sie andererseits aber auch dazu dienen, in Form von Stabilisatoren, Gelbildnern oder Dickungsmitteln die Textur von Lebensmitteln einzustellen. Da diese funktionellen Polysaccharide den mengenmäßig bedeutendsten Anteil in pflanzlichen Nebenströmen aus z.B. der Zucker- oder Stärkegewinnung ausmachen, kann ihre Extraktion daraus dazu beitragen, natürliche Ressourcen nachhaltig zu nutzen. Der Einsatz als Lebensmittelzusatzstoff wird dabei durch strukturelle Charakteristika bedingt, die teilweise anhand der taxonomischen Klassifikation vorgegeben sind. So stellt die Substitution mit *trans*-Ferulasäure (FS) eine besondere Eigenschaft von Pektinen aus Pflanzen der Familie Amaranthaceae oder Arabinoxylanen aus Pflanzen der Familien Poaceae dar. Durch oxidative Kopplung dieser ferulasäurehaltigen Polysaccharide können kovalent vernetzte Hydrogele hergestellt werden. Genannte Polysaccharide weisen teilweise komplexe Strukturelemente als Seitenketten auf. Ob und wie diese auf Grund ihrer Sterik zu speziellen Gelcharakteristika beitragen, ist nicht bekannt. Dies betrifft die Geleigenschaften auf verschiedenen Längenskalen.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere strukturell abweichende Pektine aus Zuckerrübenschnitzeln (*Beta vulgaris* sp.) sowie Arabinoxylane aus unlöslichen Ballaststoffen aus Popcornmais (*Zea mays* L. var. *everta*) extrahiert. Die erhaltenen Präparate wurden hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung, der Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse mit anschließender Säurehydrolyse sowie ihrer Bindungstypen (Methylierungsanalyse) charakterisiert. Der Gehalt estergebundener FS der Polysaccharide, der die Eignung der Polysaccharide zur Herstellung der kovalenten Gele bestimmt, wurde nach Verseifung flüssigchromatographisch bestimmt. Ebenso wurden die Gehalte an Oligoferulasäuren ermittelt, die sich unter natürlichen Bedingungen während der Pflanzenentwicklung bilden und in den extrahierten Polysacchariden vorliegen. Da die phenolischen Komponenten Teil der Seitenketten der untersuchten Polysaccharide sind, wurden die Seitenkettenstrukturen durch Anwendung zum Teil etablierter Screeningverfahren analysiert. Um auch für Pektine Aussagen zur Bindung der FS in den Seitenketten treffen zu können, wurde ein chromatographischer Zwischenschritt in ein etabliertes Screeningverfahren implementiert, der die getrennte Analyse FS-haltiger und FS-freier Arabinan- und Galactanligosaccharide ermöglichte. Dadurch konnte neben bereits beschriebenen FS-haltigen Arabinan- und Galactanstrukturen auch das Vorkom-

men dreier bislang unbekannter FS-haltiger Galactooligosaccharide beschrieben werden.

Die strukturelle Analyse der extrahierten Pektine zeigte hohe Anteile an hochverzweigten Seitenkettenstrukturen des Typ I Rhamnogalacturonans, die durch Veränderung der sauren Extraktionsbedingungen im Anteil als auch in ihrer Komplexität variiert werden konnten. Gleichermaßen war der FS-Gehalt sowie das Molekulargewicht abhängig von den gewählten Extraktionsbedingungen. Die spezifischere Variation des Arabinangehalts sowie des Molekulargewichts bei gleichzeitigem Erhalt der FS war durch enzymatische Behandlung mit spezifischen Enzymen möglich, wodurch strukturell modifizierte Pektine erhalten wurden. Für die verschieden extrahierten Arabinoxylane ergaben sich hauptsächlich Variationen im FS-Gehalt, der im Vergleich zu den Pektinen jedoch deutlich geringer war. Entsprechend ihrer Herkunft aus Popcornmais waren die Arabinoxylane durch komplexe ferulasäurehaltige Seitenketten charakterisiert.

Die extrahierten und modifizierten Polysaccharide wurden durch Inkubation mit Laccase/O₂ bzw. Peroxidase/H₂O₂ unter standardisierten Bedingungen geliert, und der Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die Geleigenschaften wurde untersucht. So wurden hocholigomere, methodisch nicht zu erfassende Oligoferulasäuren insbesondere bei der Gelierung von Arabinoxylanen gebildet, während sich das Regioisomerenprofil der neu gebildeten Di- und Triferulasäuren als unabhängig von den eingesetzten Polysacchariden erwies.

Anhand rheologischer Messungen wurden die Veränderungen der viskoelastischen Eigenschaften während der Gelierung sowie ihre Beeinflussung durch strukturelle Charakteristika der Ausgangspolysaccharide dokumentiert. Die makroskopische Ebene konnte dabei reproduzierbar dargestellt werden, wobei die Kopplung hochmolekularer, arabinanreicher und auch FS-reicher Pektine in höheren Elastizitäten der Pektingele resultierte. Im Vergleich dazu nahm die Stabilität der Gele mit dem Arabinangehalt ab, was ggf. durch deren sterische Einflüsse bedingt wird. In Kontrast zu den Pektingelen waren Gele der Arabinoxylane deutlich inelastischer, aber stabiler gegenüber Deformation. Das Auftreten von Synärese war zudem auf pektinbasierte Gele beschränkt, die aus Pektinen mit einem geringen Molekulargewicht hergestellt wurden, und konnte durch die Mischung mit Arabinoxylanen vermieden werden. Dies deutete auf die Ausbildung heterogener Netzwerke hin.

Anders als bei der Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften war eine reproduzierbare Darstellung der mikroskopischen Ebene nicht möglich. Diese wurde durch die translatorische Beweglichkeit von Wasser und Glucose, die mittels *Pulsed Field*

Gradient-Stimulated Echo-NMR quantifiziert wurde, abgebildet. Die Daten legen nahe, dass die mikromolekulare Gelstruktur bereits bei geringen Unterschieden in den Gelbildungsbedingungen stark variiert. Dadurch waren Aussagen zu strukturellen Einflüssen der Polysaccharide auf die Geleigenschaften auf mikroskopischer Ebene kaum möglich. In zukünftigen Studien müssen Einflussfaktoren der Gelbildung detailliert evaluiert werden, um neben der makroskopischen auch die mikroskopische Umgebung reproduzierbar abzubilden. Jedoch zeigte sich bereits in dieser Arbeit, dass die Extraktionsbedingungen der Polysaccharide eine Veränderung der Netzwerkstruktur zur Folge haben. Zudem ging aus den Daten eine Abhängigkeit der Diffusion von der Polysaccharidkonzentration hervor, die nicht nur auf geometrische Einflüsse sondern auch auf Wechselwirkungen der Moleküle mit den funktionellen Gruppen des Netzwerks zurückzuführen ist.

Abweichend von den viskoelastischen Eigenschaften zeigten sich bei der translatorischen Beweglichkeit von Wasser und Glucose in den Gelstrukturen kaum Unterschiede zwischen den Gelen aus Pektinen und Arabinoxylanen, obwohl diese strukturell erheblich voneinander abwichen. Daher ist davon auszugehen, dass die alleinige Betrachtung der makroskopischen Eigenschaften kaum dazu geeignet ist, auch mikromolekulare Prozesse zu beschreiben.

Zusammenfassend stellt die Extraktion von ferulasäurehaltigen Pektinen bzw. Arabinoxylanen eine Möglichkeit dar, pflanzliche Nebenströme aufzuwerten. Ihre oxidative Kopplung ermöglicht die Herstellung von kovalenten Gelen, die sowohl für die Lebensmittelindustrie als auch die Pharmaindustrie interessant sind. Allerdings ist hierfür neben strukturell vergleichbaren ferulasäurehaltigen Arabinoxylanen bzw. Pektinen eine Standardisierung der Gelherstellung notwendig, um Gele zu erhalten, die sowohl auf makroskopischer als auch mikroskopischer Ebene reproduzierbare Eigenschaften aufweisen.

6 Literaturverzeichnis

- AACC (2001)**. The definition of dietary fiber. In: *Cereal Foods World*, 112–126.
- 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. In: *Carbohydrate Research*, 5, 340–345.
- Allerdings, E., Ralph, J., Schatz, P. F., Gniechwitz, D., Steinhart, H. & Bunzel, M. (2005)**. Isolation and structural identification of di-arabinosyl 8-*O*-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. In: *Phytochemistry*, 66, 113–124.
- Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H. & Bunzel, M. (2006)**. Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. In: *Phytochemistry*, 67, 1276–1286.
- Amsden, B. (1998)**. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. In: *Macromolecules*, 31, 8382–8395.
- Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S. & Hansen, s. (1999)**. Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 411–413.
- Aspinall, G. O. & Ferrier, R. J. (1958)**. 300. The synthesis of 2-*O*- β -D-xylopyranosyl-L-arabinose and its isolation from the partial hydrolysis of esparto hemicellulose. In: *Journal of the Chemical Society*, 1501–1505.
- Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldívar, S. O., García-Lara, S. & Pérez-Carrillo, E. (2014)**. Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. In: *Food Hydrocolloids*, 35, 471–475.
- Ayala-Soto, F. E., Serna-Saldívar, S. O. & Welti-Chanes, J. (2016)**. Effect of processing time, temperature and alkali concentration on yield extraction, structure and gelling properties of corn fiber arabinoxylans. In: *Food Hydrocolloids*, 60, 21–28.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A. & Mohtashamy, M. (2011)**. Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50, 1237–1243.
- Baldrian, P. (2006)**. Fungal laccases - occurrence and properties. In: *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215–242.
- Barberousse, H., Roiseux, O., Robert, C., Paquot, M., Deroanne, C. & Blecker, C. (2008)**. Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1494–1511.

- Barkholt, V. & Jensen, A. L. (1989).** Amino acid analysis: determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. In: *Analytical Biochemistry*, 177, 318–322.
- Baydoun, E. A.-H., Pavlencheva, N., Cumming, C. M., Waldron, K. W. & Brett, C. T. (2004).** Control of dehydrodiferulate cross-linking in pectins from sugar-beet tissues. In: *Phytochemistry*, 65, 1107–1115.
- Belton, P. S. (1997).** NMR and the mobility of water in polysaccharide gels. In: *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 81–88.
- Bender, D., Nemeth, R., Wimmer, M., Götschhofer, S., Biolchi, M., Török, K., Tömösközi, S., D’Amico, S. & Schoenlechner, R. (2017).** Optimization of arabinoxylan isolation from rye bran by adapting extraction solvent and use of enzymes. In: *Journal of Food Science*, 82, 2562–2568.
- Berlanga-Reyes, C. M., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., Marquez-Escalante, J. A. & Martínez-López, A. L. (2009).** Maize arabinoxylan gels as protein delivery matrices. In: *Molecules*, 14, 1475–1482.
- Bernin, D., Goudappel, G.-J., van Ruijven, M., Altskär, A., Ström, A., Rudemo, M., Hermansson, A.-M. & Nydén, M. (2011).** Microstructure of polymer hydrogels studied by pulsed field gradient NMR diffusion and TEM methods. In: *Soft Matter*, 7, 5711–5716.
- Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S. & Ribbeck, K. (2015).** Material properties of biofilms - a review of methods for understanding permeability and mechanics. In: *Reports on Progress in Physics. Physical Society (Great Britain)*, 78, 036601.
- Bindereif, B., Eichhöfer, H., Bunzel, M., Karbstein, H. P., Wefers, D. & van der Schaaf, U. S. (2021).** Arabinan side-chains strongly affect the emulsifying properties of acid-extracted sugar beet pectins. In: *Food Hydrocolloids*, 121, 106968.
- Bitenc, L. (2017).** „Bestimmung der Diffusionseigenschaften von Polysaccharidgelen mittels NMR-Spektroskopie“. Masterarbeit. Karlsruher Institut für Technologie.
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973).** New method for quantitative determination of uronic acids. In: *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489.
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003).** Lignin biosynthesis. In: *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546.
- Braccini, I. & Pérez, S. (2001).** Molecular basis of Ca(2+)-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. In: *Biomacromolecules*, 2, 1089–1096.
- Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., van de Wiele, T., Verstraete, W. & Delcour, J. A. (2011).** Prebiotic and other health-related effects of cereal-

- derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 178–194.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. & Steinhart, H. (2000).** Identification of 4-*O*-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3166–3169.
- Bunzel, M. (2001).** „Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen“. Dissertation. Universität Hamburg.
- Bunzel, M. (2010).** Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. In: *Phytochemistry Reviews*, 9, 47–64.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Sinwell, V., Ralph, J. & Steinhart, H. (2002).** Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. In: *European Food Research and Technology*, 214, 482–488.
- Bunzel, M., Heuermann, B., Kim, H. & Ralph, J. (2008).** Peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid esters. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10368–10375.
- Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P. & Steinhart, H. (2006).** Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6409–6418.
- Bunzel, M., Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Ralph, S. A., Marita, J. M., Hatfield, R. D. & Steinhart, H. (2003).** Sinapate dehydrodimers and sinapate-ferulate heterodimers in cereal dietary fiber. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1427–1434.
- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D. & Steinhart, H. (2001).** Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 653–660.
- Bunzel, M., Ralph, J. & Steinhart, H. (2005).** Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. In: *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 551–559.
- Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009).** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. In: *Carbohydrate Research*, 344, 1879–1900.
- Cardoso, S. M., Ferreira, J. A., Mafra, I., Silva, A. M. S. & Coimbra, M. A. (2007).** Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7124–7130.
- Carpita, N. C. & Whittern, D. (1986).** A highly substituted glucuronoarabinoxylan from developing maize coleoptiles. In: *Carbohydrate Research*, 146, 129–140.

- Carvajal-Millán, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X. & Micard, V. (2005a).** Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. In: *Carbohydrate Polymers*, 59, 181–188.
- Carvajal-Millán, E., Guilbert, S., Morel, M.-H. & Micard, V. (2005b).** Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties. In: *Carbohydrate Polymers*, 60, 431–438.
- Carvajal-Millán, E., Guilbert, S., Doublier, J.-L. & Micard, V. (2006).** Arabinoxylan/protein gels: structural, rheological and controlled release properties. In: *Food Hydrocolloids*, 20, 53–61.
- Carvajal-Millán, E., Landillon, V., Morel, M.-H., Rouau, X., Doublier, J.-L. & Micard, V. (2005c).** Arabinoxylan gels: impact of the feruloylation degree on their structure and properties. In: *Biomacromolecules*, 6, 309–317.
- Carvajal-Millán, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J. A., Micard, V., de León, N. P. & Gardea, A. (2007).** Maize bran gum: extraction, characterization and functional properties. In: *Carbohydrate Polymers*, 69, 280–285.
- Castillo, A., Rascón-Chu, A., Vargas, G., Carvajal-Millán, E., Valenzuela-Soto, E., Sotelo-Mundo, R. R. & Martínez, A. L. (2009).** *Trametes* sp. as a source of biopolymer cross-linking agents: laccase induced gelation of ferulated arabinoxylans. In: *Molecules*, 14, 4159–4165.
- Cervantes-Paz, B., Ornelas-Paz, J. d. J., Ruiz-Cruz, S., Rios-Velasco, C., Ibarra-Junquera, V., Yahia, E. M. & Gardea-Béjar, A. A. (2017).** Effects of pectin on lipid digestion and possible implications for carotenoid bioavailability during pre-absorptive stages: a review. In: *Food Research International*, 99, 917–927.
- Chan, S. Y., Choo, W. S., Young, D. J. & Loh, X. J. (2017).** Pectin as a rheology modifier: origin, structure, commercial production and rheology. In: *Carbohydrate Polymers*, 161, 118–139.
- Chen, H., Qiu, S., Liu, Y., Zhu, Q. & Yin, L. (2018).** Emulsifying properties and functional compositions of sugar beet pectins extracted under different conditions. In: *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39, 484–490.
- Chirani, N., Yahia, L., Gritsch, L., Motta, F. L., Chirani, S. & Faré, S. (2015).** History and applications of hydrogels. In: *Journal of Biomedical Science*, 04, 01–23.
- Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984).** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. In: *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Cohen, S. A. & Antonis, K. M. de (1994).** Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate. In: *Journal of Chromatography A*, 661, 25–34.

- Colquhoun, I. J., Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Faulds, C. B. & Williamson, G. (1994).** Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy. In: *Carbohydrate Research*, 263, 243–256.
- Colquhoun, I. J., Ruiter, G. A. de, Schols, H. A. & Voragen, A. G. (1990).** Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. In: *Carbohydrate Research*, 206, 131–144.
- Complex Carbohydrate Research Center (2022).** *The CCRC Spectral Database for PMAA's*.
- Damen, B., Verspreet, J., Pollet, A., Broekaert, W. F., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2011).** Prebiotic effects and intestinal fermentation of cereal arabinoxylans and arabinoxylan oligosaccharides in rats depend strongly on their structural properties and joint presence. In: *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 1862–1874.
- de Kort, D. W., van Duynhoven, J. P., Van As, H. & Mariette, F. (2015).** Nanoparticle diffusometry for quantitative assessment of submicron structure in food biopolymer networks. In: *Trends in Food Science & Technology*, 42, 13–26.
- de Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. & Rombouts, F. M. (1992a).** 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. In: *Analytical Biochemistry*, 207, 176–185.
- de Vries, J. (2004).** „Hydrocolloid gelling agents and their applications“. In: *Gums and Stabilisers for the Food Industry 12*, 23–31.
- Dervilly-Pinel, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R. & Åman, P. (2001).** Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. In: *Journal of Cereal Science*, 34, 207–214.
- Dobberstein, D. & Bunzel, M. (2010).** Identification of ferulate oligomers from corn stover. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1802–1810.
- Domon, B. & Costello, C. E. (1988).** A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. In: *Glycoconjugate Journal*, 5, 397–409.
- Einhorn-Stoll, U. & Drusch, S. (2015).** Methods for investigation of diffusion processes and biopolymer physics in food gels. In: *Current Opinion in Food Science*, 3, 118–124.

- Figuerola-Espinoza, M. C. & Rouau, X. (1998).** Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. In: *Cereal Chemistry Journal*, 75, 259–265.
- Funami, T., Nakauma, M., Ishihara, S., Tanaka, R., Inoue, T. & Phillips, G. O. (2011).** Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. In: *Food Hydrocolloids*, 25, 221–229.
- Funami, T., Zhang, G., Hiroe, M., Noda, S., Nakauma, M., Asai, I., Cowman, M. K., Al-Assaf, S. & Phillips, G. O. (2007).** Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin. In: *Food Hydrocolloids*, 21, 1319–1329.
- Funk, C., Braune, A., Grabber, J. H., Steinhart, H. & Bunzel, M. (2007).** Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2418–2423.
- Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H. & Bunzel, M. (2005).** Isolation and structural characterisation of 8-*O*-4/8-*O*-4- and 8-8/8-*O*-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. In: *Phytochemistry*, 66, 363–371.
- Garna, H., Mabon, N., Nott, K., Wathelet, B. & Paquot, M. (2006).** Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. In: *Food Chemistry*, 96, 477–484.
- Garna, H., Mabon, N., Wathelet, B. & Paquot, M. (2004).** New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4652–4659.
- Garozzo, D., Giuffrida, M., Impallomeni, G., Ballistreri, A. & Montaudo, G. (1990).** Determination of linkage position and identification of the reducing end in linear oligosaccharides by negative ion fast atom bombardment mass spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, 62, 279–286.
- Gibeaut, D. M., Pauly, M., Bacic, A. & Fincher, G. B. (2005).** Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles. In: *Planta*, 221, 729–738.
- González-Estrada, R., Calderón-Santoyo, M., Carvajal-Millán, E., Ascencio Valle, F. d. J., Ragazzo-Sánchez, J. A., Brown-Bojorquez, F. & Rascón-Chu, A. (2015).** Covalently cross-linked arabinoxylans films for *Debaryomyces hansenii* entrapment. In: *Molecules*, 20, 11373–11386.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D., Ralph, J., Zoñ, J. & Amrhein, N. (1995).** Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. In: *Phytochemistry*, 40, 1077–1082.

- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. & Thom, D. (1973).** Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. In: *FEBS Letters*, 32, 195–198.
- Gruppen, H., Hamer, R. J. & Voragen, A. (1991).** Barium hydroxide as a tool to extract pure arabinoxylans from water-insoluble cell wall material of wheat flour. In: *Journal of Cereal Science*, 13, 275–290.
- Gruppen, H., Hamer, R. J. & Voragen, A. (1992).** Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 1. Extraction of polymers with alkali. In: *Journal of Cereal Science*, 16, 41–51.
- Guillon, F. & Thibault, J.-F. (1990).** Oxidative cross-linking of chemically and enzymatically modified sugar-beet pectin. In: *Carbohydrate Polymers*, 12, 353–374.
- Guillon, F., Thibault, J.-F., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. & Pilnik, W. (1989).** Enzymic hydrolysis of the “hairy” fragments of sugar-beet pectins. In: *Carbohydrate Research*, 190, 97–108.
- Guo, X., Theissen, S., Claussen, J., Hildebrand, V., Kamphus, J., Wilhelm, M., Luy, B. & Guthausen, G. (2019).** Dynamics of sodium ions and water in swollen superabsorbent hydrogels as studied by ^{23}Na - and ^1H -NMR. In: *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220, 1800350.
- Habibi, Y., Mahrouz, M., Marais, M.-F. & Vignon, M. R. (2004).** An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. In: *Carbohydrate Research*, 339, 1201–1205.
- Hamilton, P. B. (1963).** Ion exchange chromatography of amino acids. a single column, high resolving, fully automatic procedure. In: *Analytical Chemistry*, 35, 2055–2064.
- Hartley, R. D., Morrison, W., Himmelsbach, D. S. & Borneman, W. S. (1990).** Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. In: *Phytochemistry*, 29, 3705–3709.
- Hatfield, R. D., Rancour, D. M. & Marita, J. M. (2017).** Grass cell walls: a story of cross-linking. In: *Frontiers in Plant Science*, 7, 2056.
- Hinz, S. W. A., Verhoef, R., Schols, H. A., Vincken, J.-P. & Voragen, A. G. J. (2005).** Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp structural elements. In: *Carbohydrate Research*, 340, 2135–2143.
- Holck, J., Lorentzen, A., Vignsæs, L. K., Licht, T. R., Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. (2011).** Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. in human fecal *in vitro* fermentations. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6511–6519.

- Hopkins, M. J., Englyst, H. N., Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G. T. & McBain, A. J. (2003).** Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6354–6360.
- Huisman, M., Schols, H. & Voragen, A. (2000).** Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls. In: *Carbohydrate Polymers*, 43, 269–279.
- Huisman, M. M., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A. & Voragen, A. G. (2001).** The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. In: *Carbohydrate Research*, 330, 103–114.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. & Stone, B. A. (1990).** Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. In: *Phytochemistry*, 29, 733–737.
- Ishii, T. (1991).** Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. In: *Carbohydrate Research*, 219, 15–22.
- Ishii, T. (1994).** Feruloyl oligosaccharides from cell walls of suspension-cultured spinach cells and sugar beet pulp. In: *Plant & Cell Physiology*, 35, 701–704.
- Ishii, T. & Tobita, T. (1993).** Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls. In: *Carbohydrate Research*, 248.
- Izydorczyk, M. S. & Biliaderis, C. G. (1995).** Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. In: *Carbohydrate Polymers*, 28, 33–48.
- Jayani, R. S., Saxena, S. & Gupta, R. (2005).** Microbial pectinolytic enzymes: a review. In: *Process Biochemistry*, 40, 2931–2944.
- Jilek, M. L. & Bunzel, M. (2013).** Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal flours. In: *Cereal Chemistry Journal*, 90, 507–514.
- Jones, T. M. & Albersheim, P. (1972).** A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. In: *Plant Physiology*, 49, 926–936.
- Junker, F., Michalski, K., Guthausen, G. & Bunzel, M. (2021).** Characterization of covalent, feruloylated polysaccharide gels by pulsed field gradient-stimulated echo (PFG-STE)-NMR. In: *Carbohydrate Polymers*, 267, 118232.
- Kabel, M. A., van den Borne, H., Vincken, J.-P., Voragen, A. G. & Schols, H. A. (2007).** Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. In: *Carbohydrate Polymers*, 69, 94–105.

- Kale, M. S., Hamaker, B. R. & Campanella, O. H. (2013).** Alkaline extraction conditions determine gelling properties of corn bran arabinoxylans. In: *Food Hydrocolloids*, 31, 121–126.
- Kale, M. S., Pai, D. A., Hamaker, B. R. & Campanella, O. H. (2010).** Structure–function relationships for corn bran arabinoxylans. In: *Journal of Cereal Science*, 52, 368–372.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M.-J., Sørensen, S. O. & Ralet, M.-C. (2014).** Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. In: *Annals of Botany*, 114, 1319–1326.
- Khan, S., Ullah, A., Ullah, K. & Rehman, N.-u. (2016).** Insight into hydrogels. In: *Designed Monomers and Polymers*, 19, 456–478.
- Kintner, P. K. & Buren, J. P. (1982).** Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the *m*-Hydroxydiphenyl method. In: *Journal of Food Science*, 47, 756–759.
- Kirby, A. R., MacDougall, A. J. & Morris, V. J. (2006).** Sugar beet pectin–protein complexes. In: *Food Biophysics*, 1, 51–56.
- Köhnke, T., Ostlund, A. & Brelid, H. (2011).** Adsorption of arabinoxylan on cellulosic surfaces: influence of degree of substitution and substitution pattern on adsorption characteristics. In: *Biomacromolecules*, 12, 2633–2641.
- Köhnke, T., Pujolras, C., Roubroeks, J. P. & Gatenholm, P. (2008).** The effect of barley husk arabinoxylan adsorption on the properties of cellulose fibres. In: *Cellulose*, 15, 537–546.
- Kravtchenko, T. P., Arnould, I., Voragen, A. & Pilnik, W. (1992).** Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. In: *Carbohydrate Polymers*, 19, 237–242.
- Kudanga, T., Nyanhongo, G. S., Guebitz, G. M. & Burton, S. (2011).** Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 195–208.
- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J. & Autio, K. (2003).** Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. In: *Food Hydrocolloids*, 17, 679–684.
- Lapierre, C., Pollet, B., Ralet, M.-C. & Saulnier, L. (2001).** The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. In: *Phytochemistry*, 57, 765–772.
- Latour, L. L., Mitra, P. P., Kleinberg, R. L. & Sotak, C. H. (1993).** Time-dependent diffusion coefficient of fluids in porous media as a probe of surface-to-volume ratio. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 101, 342–346.

- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G. & Albersheim, P. (1987). Treatment of rhamnogalacturonan I with lithium in ethylenediamine. In: *Carbohydrate Research*, 168, 245–274.
- Levigne, S., Thomas, M., Ralet, M.-C., Quemener, B. & Thibault, J.-F. (2002a). Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. In: *Food Hydrocolloids*, 16, 547–550.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., Quéméner, B. & Thibault, J.-F. (2004a). Isolation of diferulic bridges ester-linked to arabinan in sugar beet cell walls. In: *Carbohydrate Research*, 339, 2315–2319.
- Levigne, S., Ralet, M.-C. & Thibault, J.-F. (2002b). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. In: *Carbohydrate Polymers*, 49, 145–153.
- Levigne, S. V., Ralet, M.-C. J., Quéméner, B. C., Pollet, B. N.-L., Lapiere, C. & Thibault, J.-F. J. (2004b). Isolation from sugar beet cell walls of arabinan oligosaccharides esterified by two ferulic acid monomers. In: *Plant Physiology*, 134, 1173–1180.
- Lin, S., Agger, J. W., Wilkens, C. & Meyer, A. S. (2021). Feruloylated arabinoxylan and oligosaccharides: chemistry, nutritional functions, and options for enzymatic modification. In: *Annual Review of Food Science and Technology*.
- Littoz, F. & McClements, D. J. (2008). Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. In: *Food Hydrocolloids*, 22, 1203–1211.
- Liu, Z., Pi, F., Guo, X., Guo, X. & Yu, S. (2019). Characterization of the structural and emulsifying properties of sugar beet pectins obtained by sequential extraction. In: *Food Hydrocolloids*, 88, 31–42.
- Lopez, H. W., Levrat, M.-A., Guy, C., Messenger, A., Demigné, C. & Rémésy, C. (1999). Effects of soluble corn bran arabinoxylans on cecal digestion, lipid metabolism, and mineral balance (Ca, Mg) in rats. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 500–509.
- Lorén, N., Shtykova, L., Kidman, S., Jarvoll, P., Nydén, M. & Hermansson, A.-M. (2009). Dendrimer diffusion in kappa-carrageenan gel structures. In: *Biomacromolecules*, 10, 275–284.
- Lu, Z. X., Gibson, P. R., Muir, J. G., Fielding, M. & O’Dea, K. (2000a). Arabinoxylan fiber from a by-product of wheat flour processing behaves physiologically like a soluble, fermentable fiber in the large bowel of rats. In: *The Journal of Nutrition*, 130, 1984–1990.

- Lu, Z. X., Walker, K. Z., Muir, J. G., Mascara, T. & O’Dea, K. (2000b).** Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects. In: *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1123–1128.
- Macfarlane, G. T. & Macfarlane, S. (2011).** Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. In: *Journal of clinical gastroenterology*, 45 Suppl, S120–7.
- Maes, C. & Delcour, J. A. (2002).** Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. In: *Journal of Cereal Science*, 35, 315–326.
- Mandalari, G., Faulds, C. B., Sancho, A. I., Saija, A., Bisignano, G., LoCurto, R. & Waldron, K. W. (2005).** Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers’ spent grain and wheat bran. In: *Journal of Cereal Science*, 42, 205–212.
- Mares, J. D. & Stone, B. A. (1973).** Studies on wheat endosperm II. Properties of the wall components and studies on their organization in the wall. In: *Australian Journal of Biological Sciences*, 26, 813.
- Marquez-Escalante, J. A. & Carvajal-Millán, E. (2019).** Feruloylated arabinoxylans from maize distiller’s dried grains with solubles: effect of feruloyl esterase on their macromolecular characteristics, gelling, and antioxidant properties. In: *Sustainability*, 11, 6449.
- Marquez-Escalante, J. A., Carvajal-Millán, E., Yadav, M. P., Kale, M., Rascon-Chu, A., Gardea, A. A., Valenzuela-Soto, E. M., Lopez-Franco, Y. L., Lizardi-Mendoza, J. & Faulds, C. B. (2018).** Rheology and microstructure of gels based on wheat arabinoxylans enzymatically modified in arabinose to xylose ratio. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 914–922.
- Martin-Gallaussiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P. & Lapaque, N. (2021).** SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. In: *The Proceedings of the Nutrition Society*, 80, 37–49.
- Martínez-López, A. L., Carvajal-Millán, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J. & Martínez-Robinson, K. (2013).** Gels of ferulated arabinoxylans extracted from nixtamalized and non-nixtamalized maize bran: rheological and structural characteristics. In: *CyTA - Journal of Food*, 11, 22–28.
- Martínez-López, A. L., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., López-Franco, Y. L., Rascón-Chu, A., Salas-Muñoz, E., Barron, C. & Micard, V. (2011).** The peroxidase/H₂O₂ system as a free radical-generating agent for gelling maize bran arabinoxylans: rheological and structural properties. In: *Molecules*, 16, 8410–8418.

- Martínez-López, A. L., Carvajal-Millán, E., Marquez-Escalante, J., Campa-Mada, A. C., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y. L. & Lizardi-Mendoza, J. (2019). Enzymatic cross-linking of ferulated arabinoxylan: effect of laccase or peroxidase catalysis on the gel characteristics. In: *Food Science and Biotechnology*, 28, 311–318.
- Martínez-López, A. L., Carvajal-Millán, E., Micard, V., Rascón-Chu, A., Brown-Bojorquez, F., Sotelo-Cruz, N., López-Franco, Y. L. & Lizardi-Mendoza, J. (2016). *In vitro* degradation of covalently cross-linked arabinoxylan hydrogels by bifidobacteria. In: *Carbohydrate Polymers*, 144, 76–82.
- Masaro, L. & Zhu, X. (1999). Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. In: *Progress in Polymer Science*, 24, 731–775.
- Matuz, J., Bartók, T., Mórocz-Salamon, K. & Bóna, L. (2000). Structure and potential allergenic character of cereal proteins I. Protein content and amino acid composition. In: *Cereal Research Communications*, 28, 263–270.
- McCleary, B. V. & Cox, J. (2017). Evolution of a definition for dietary fiber and methodology to service this definition. In: *Luminacoids Research*, 21, 9–20.
- 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. In: *Starch - Stärke*, 67, 860–883.
- McComb, E. A. & McCready, R. M. (1957). Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. In: *Analytical Chemistry*, 29, 819–821.
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D. & Hillman, J. R. (1996). Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 133–150.
- Méndez-Encinas, M. A., Carvajal-Millán, E., Yadav, M. P., López-Franco, Y. L., Rascon-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Brown-Bojorquez, F., Silva-Campa, E. & Pedroza-Montero, M. (2019). Partial removal of protein associated with arabinoxylans: impact on the viscoelasticity, crosslinking content, and microstructure of the gels formed. In: *Journal of Applied Polymer Science*, 136, 47300.
- Michalski, K. (2020). „Gastmolekülverhalten in Gelen auf Basis von Arabinoxylanen und Pektinen“. Masterarbeit. Karlsruher Institut für Technologie.
- Michel, F., Thibault, J.-F., Mercier, C., Heitz, F. & Pouillaude, F. (1985). Extraction and characterization of pectins from sugar beet pulp. In: *Journal of Food Science*, 50, 1499–1500.
- Moore, S. & Stein, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. In: *Journal of Biological Chemistry*, 176, 367–388.

- Morais de Carvalho, D., Martínez-Abad, A., Evtuguin, D. V., Colodette, J. L., Lindström, M. E., Vilaplana, F. & Sevastyanova, O. (2017). Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. In: *Carbohydrate Polymers*, 156, 223–234.
- Morales-Burgos, A. M., Carvajal-Millán, E., López-Franco, Y. L., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Sotelo-Cruz, N., Brown-Bojórquez, F., Burgara-Estrella, A. & Pedroza-Montero, M. (2017). Syneresis in gels of highly ferulated arabinoxylans: Characterization of covalent cross-linking, rheology, and microstructure. In: *Polymers*, 9.
- Mort, A. J., Qiu, F. & Maness, N. O. (1993). Determination of the pattern of methyl esterification in pectin. Distribution of contiguous nonesterified residues. In: *Carbohydrate Research*, 247, 21–35.
- Müller-Maatsch, J., Caligiani, A., Tedeschi, T., Elst, K. & Sforza, S. (2014). Simple and validated quantitative ^1H NMR method for the determination of methylation, acetylation, and feruloylation degree of pectin. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9081–9087.
- Munk, L., Muschiol, J., Li, K., Liu, M., Perzon, A., Meier, S., Ulvskov, P. & Meyer, A. S. (2020). Selective enzymatic release and gel formation by cross-linking of feruloylated glucurono-arabinoxylan from corn bran. In: *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 8164–8174.
- Norsker, M., Jensen, M. & Adler-Nissen, J. (2000). Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. In: *Food Hydrocolloids (Food Hydrocolloids)*, 14, 237–243.
- O’Sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. In: *Cellulose*, 4, 173–207.
- Oakenfull, D. & Scott, A. (1984). Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. In: *Journal of Food Science*, 49, 1093–1098.
- Oosterveld, A. (2002). Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. In: *Carbohydrate Polymers*, 49, 407–413.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Searle-van Leeuwen, M. & Voragen, A. (2000a). Effect of enzymatic deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. In: *Carbohydrate Polymers*, 43, 249–256.
- Oosterveld, A., Beldman, G. & Voragen, A. G. (2000b). Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp. In: *Carbohydrate Research*, 328, 199–207.

- Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A. & Voragen, A. G. (1996). Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. In: *Carbohydrate Research*, 288, 143–153.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A. & Voragen, A. G. (2000c). Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. In: *Carbohydrate Research*, 328, 185–197.
- Oosterveld, A., Grabber, J. H., Beldman, G., Ralph, J. & Voragen, A. G. (1997). Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. In: *Carbohydrate Research*, 300, 179–181.
- Ou, S. & Kwok, K.-C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261–1269.
- Pastell, H., Virkki, L., Harju, E., Tuomainen, P. & Tenkanen, M. (2009). Presence of 1→3-linked 2-*O*-β-D-xylopyranosyl-α-L-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans. In: *Carbohydrate Research*, 344, 2480–2488.
- Paz-Samaniego, R., Rascón-Chu, A., Brown-Bojorquez, F., Carvajal-Millán, E., Pedroza-Montero, M., Silva-Campa, E., Sotelo-Cruz, N., López-Franco, Y. L. & Lizardi-Mendoza, J. (2018). Electrospray-assisted fabrication of core-shell arabinoxylan gel particles for insulin and probiotics entrapment. In: *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 46411.
- Peppas, N. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 27–46.
- Pereira, L. (2008). Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31, 1687–1731.
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B. & Bacic, A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. In: *Nature Protocols*, 7, 1590–1607.
- Piber, M. & Koehler, P. (2005). Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5276–5284.
- Pippen, E. L., McCready, R. M. & Owens, H. S. (1950). Gelation properties of partially acetylated pectins. In: *Journal of the American Chemical Society*, 72, 813–816.
- Pollet, A., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. In: *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 176–191.

- Prosby, 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. In: *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 68, 677–679.
- Quéméner, B. & Ralet, M.-C. (2004). Evidence for linkage position determination in known feruloylated mono- and disaccharides using electrospray ion trap mass spectrometry. In: *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 39, 1153–1160.
- Ralet, M.-C., André-Leroux, G., Quéméner, B. & Thibault, J.-F. (2005). Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. In: *Phytochemistry*, 66, 2800–2814.
- Ralet, M.-C., Faulds, C. B., Williamson, G. & Thibault, J.-F. (1994a). Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. In: *Carbohydrate Research*, 263, 257–269.
- Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Faulds, C. B. & Williamson, G. (1994b). Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. In: *Carbohydrate Research*, 263, 227–241.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H. & Hatfield, R. D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 3485.
- Rémond, C., Boukari, I., Chambat, G. & O'Donohue, M. (2008). Action of a GH 51 α -L-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabinoxylooligosaccharides. In: *Carbohydrate Polymers*, 72, 424–430.
- Rihouey, C., Morvan, C., Borissova, I., Jauneau, A., Demarty, M. & Jarvis, M. (1995). Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls. In: *Carbohydrate Polymers*, 28, 159–166.
- Rocklin, R. D. & Pohl, C. A. (1983). Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. In: *Journal of Liquid Chromatography*, 6, 1577–1590.
- Rogovina, L. Z., Vasil'ev, V. G. & Braudo, E. E. (2008). Definition of the concept of polymer gel. In: *Polymer Science Series C*, 50, 85–92.
- Rombouts, F. M. & Thibault, J.-F. (1986). Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. In: *Carbohydrate Research*, 154, 189–203.
- Roye, C., Bulckaen, K., Bondt, Y. de, Liberloo, I., van de Walle, D., Dewettinck, K. & Courtin, C. M. (2019). Side-by-side comparison of composition and structural properties of wheat, rye, oat, and maize bran and their impact on *in vitro* fermentability. In: *Cereal Chemistry Journal*, 97, 20–33.

- Ruiter, G. A. de, Schols, H. A., Voragen, A. G. & Rombouts, F. M. (1992b).** 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. In: *Analytical Biochemistry*, 207, 176–185.
- Saeman, J. F., Bubl, J. L. & Harris, E. E. (1945).** Quantitative saccharification of wood and cellulose. In: *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 17, 35–37.
- Saha, D. & Bhattacharya, S. (2010).** Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. In: *Journal of Food Science and Technology*, 47, 587–597.
- Saulnier, L., Crépeau, M.-J., Lahaye, M., Thibault, J.-F., Garcia-Conesa, M. T., Kroon, P. A. & Williamson, G. (1999).** Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. In: *Carbohydrate Research*, 320, 82–92.
- Saulnier, L. & Thibault, J.-F. (1999).** Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 396–402.
- Saulnier, L., Vigouroux, J. & Thibault, J.-F. (1995).** Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. In: *Carbohydrate Research*, 272, 241–253.
- Savary, B. J. & Nuñez, A. (2003).** Gas chromatography–mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. In: *Journal of Chromatography A*, 1017, 151–159.
- Schäfer, J. (2016).** „Charakterisierung von lager- und reifebedingten Zellwandveränderungen pflanzlicher Lebensmittel mittels spektroskopischer und chromatographischer Methoden“. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie.
- Schäfer, J., Hale, J., Hoffmann, C. M. & Bunzel, M. (2020).** Mechanical properties and compositional characteristics of beet (*Beta vulgaris* L.) varieties and their response to nitrogen application. In: *European Food Research and Technology*, 246, 2135–2146.
- Scheller, H. V. & Ulvskov, P. (2010).** Hemicelluloses. In: *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263–289.
- Schendel, R. R. (2016).** „Qualitative and quantitative screening of side-chain profiles of cereal grain arabinoxylans“. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie.

- Schendel, R. R., Becker, A., Tyl, C. E. & Bunzel, M. (2015)**. Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from the perennial cereal grain intermediate wheat grass (*Thinopyrum intermedium*). In: *Carbohydrate Research*, 407, 16–25.
- Schendel, R. R., Meyer, M. R. & Bunzel, M. (2016a)**. Quantitative profiling of feruloylated arabinoxylan side-chains from graminaceous cell walls. In: *Frontiers in Plant Science*, 6, 1249.
- Schendel, R. R., Puchbauer, A.-K., Britscho, N. & Bunzel, M. (2016b)**. Feruloylated wheat bran arabinoxylans: isolation and characterization of acetylated and *O*-2-monosubstituted structures. In: *Cereal Chemistry Journal*, 93, 493–501.
- Schendel, R. R., Puchbauer, A.-K. & Bunzel, M. (2016c)**. Glycoside hydrolase family 51 α -L-arabinofuranosidases from *Clostridium thermocellum* and *Cellvibrio japonicus* release *O*-5-feruloylated arabinose. In: *Cereal Chemistry Journal*, 93, 650–653.
- Schmid, V., Trabert, A., Keller, J., Bunzel, M., Karbstein, H. P. & Emin, M. A. (2021)**. Defined shear and heat treatment of apple pomace: impact on dietary fiber structures and functional properties. In: *European Food Research and Technology*, 247, 2109–2122.
- Schmidt, U. S., Schmidt, K., Kurz, T., Endreß, H.-U. & Schuchmann, H. P. (2015)**. Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions. In: *Food Hydrocolloids*, 46, 59–66.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D. & Voragen, A. G. (1995)**. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. In: *Carbohydrate Research*, 279, 265–279.
- Schooneveld-Bergmans, M., Dignum, M., Grabber, J., Beldman, G. & Voragen, A. (1999)**. Studies on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans from wheat flour and wheat bran. In: *Carbohydrate Polymers*, 38, 309–317.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C. & Hardt, P. D. (2010)**. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. In: *Obesity*, 18, 190–195.
- Selig, M. J., Thygesen, L. G., Felby, C. & Master, E. R. (2015)**. Debranching of soluble wheat arabinoxylan dramatically enhances recalcitrant binding to cellulose. In: *Biotechnology Letters*, 37, 633–641.
- Shibuya, N., Misaki, A. & Iwasaki, T. (1983)**. The structure of arabinoxylan and arabinoglucuronoxylan isolated from rice endosperm cell wall. In: *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 2223–2230.

- Showalter, A. M. (1993).** Structure and function of plant cell wall proteins. In: *The Plant Cell*, 5, 9–23.
- Snelders, J., Olaerts, H., Dornez, E., van de Wiele, T., Aura, A.-M., Vanhaecke, L., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2014).** Structural features and feruloylation modulate the fermentability and evolution of antioxidant properties of arabinoxylan oligosaccharides during *in vitro* fermentation by human gut derived microbiota. In: *Journal of Functional Foods*, 10, 1–12.
- Steck, J., Kaufhold, L. & Bunzel, M. (2021).** Structural profiling of xyloglucans from food plants by high-performance anion-exchange chromatography with parallel pulsed amperometric and mass spectrometric detection. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 8838–8849.
- Stejskal, E. O. & Tanner, J. E. (1965).** Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. In: *The Journal of Chemical Physics*, 42, 288–292.
- Sun, H. H., Wooten, J. B., Ryan, W. S., Bokelman, G. H. & Åman, P. (1987).** Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan. In: *Carbohydrate Polymers*, 7, 143–158.
- Sweet, D. P., Shapiro, R. H. & Albersheim, P. (1975).** Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. In: *Carbohydrate Research*, 40, 217–225.
- Thakur, B. R., Singh, R. K. & Handa, A. K. (1997).** Chemistry and uses of pectin - a review. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47–73.
- Thibault, J.-F. (1988).** Characterisation and oxidative crosslinking of sugar-beet pectins extracted from cossettes and pulps under different conditions. In: *Carbohydrate Polymers*, 8, 209–223.
- Thibault, J.-F., Renard, C. M., Axelos, M. A., Roger, P. & Crépeau, M.-J. (1993).** Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. In: *Carbohydrate Research*, 238, 271–286.
- Tong, L.-T., Zhong, K., Liu, L., Qiu, J., Guo, L., Zhou, X., Cao, L. & Zhou, S. (2014).** Effects of dietary wheat bran arabinoxylans on cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters. In: *Carbohydrate Polymers*, 112, 1–5.
- 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. In: *Carbohydrate Research*, 402, 56–66.

- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. & Md Akil, H. (2015).** Classification, processing and application of hydrogels: a review. In: *Materials Science & Engineering C*, 57, 414–433.
- Urbat, F., Müller, P., Hildebrand, A., Wefers, D. & Bunzel, M. (2019).** Comparison and optimization of different protein nitrogen quantitation and residual protein characterization methods in dietary fiber preparations. In: *Frontiers in nutrition*, 6, 127.
- Vansteenkiste, E., Babot, C., Rouau, X. & Micard, V. (2004).** Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. In: *Food Hydrocolloids*, 18, 557–564.
- Veitch, N. C. (2004).** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. In: *Phytochemistry*, 65, 249–259.
- Verbruggen, M. A., Spronk, B. A., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G., Thomas, J. R., Kamerling, J. P. & Vliegthart, J. F. (1998).** Structures of enzymically derived oligosaccharides from sorghum glucuronarabinoxylan. In: *Carbohydrate Research*, 306, 265–274.
- Villa-Rivera, M. G., Cano-Camacho, H., López-Romero, E. & Zavala-Páramo, M. G. (2021).** The role of arabinogalactan type II degradation in plant-microbe interactions. In: *Frontiers in Microbiology*, 12, 730543.
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. & Visser, R. G. F. (2003).** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. In: *Plant Physiology*, 132, 1781–1789.
- Vogel, B., Gallaher, D. D. & Bunzel, M. (2012).** Influence of cross-linked arabinoxylans on the postprandial blood glucose response in rats. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3847–3852.
- Vogel, J. (2008).** Unique aspects of the grass cell wall. In: *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 301–307.
- Voragen, A., Schols, H. A. & Pilnik, W. (1986).** Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. In: *Food Hydrocolloids*, 1, 65–70.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P. & Schols, H. A. (2009).** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. In: *Structural Chemistry*, 20, 263–275.
- Vries, J. A. de, Rombouts, F. M., Voragen, A. & Pilnik, W. (1982).** Enzymic degradation of apple pectins. In: *Carbohydrate Polymers*, 2, 25–33.

- Waldron, K. W., Ng, A., Parker, M. L. & Parr, A. J. (1997).** Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 221–228.
- Wang, Y., Black, B. A., Curtis, J. M. & Gänzle, M. G. (2014).** Characterization of α -galacto-oligosaccharides formed via heterologous expression of α -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2507–2517.
- Waterstraat, M. & Bunzel, M. (2019).** A stable isotope dilution approach to analyze ferulic acid oligomers in plant cell walls using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 5047–5062.
- Wefers, D. (2016).** „Entwicklung chromatographischer und spektroskopischer Profilingmethoden zur Analyse komplexer Strukturelemente neutraler Seitenketten“. Dissertation. Karlsruher Institut für Technologie.
- Wefers, D. & Bunzel, M. (2016).** Arabinan and galactan oligosaccharide profiling by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4656–4664.
- Wefers, D., Flörchinger, R. & Bunzel, M. (2018).** Detailed structural characterization of arabinans and galactans of 14 apple cultivars before and after cold storage. In: *Frontiers in Plant Science*, 9, 1451.
- Wefers, D., Gmeiner, B. M., Tyl, C. E. & Bunzel, M. (2015a).** Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.) In: *Phytochemistry*, 116, 320–328.
- Wefers, D., Tyl, C. E. & Bunzel, M. (2014).** Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. In: *Frontiers in Chemistry*, 2, 100.
- Wefers, D., Tyl, C. E. & Bunzel, M. (2015b).** Neutral pectin side chains of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) contain long, partially branched arabinans and short galactans, both with terminal arabinopyranoses. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 707–715.
- Wemmer, J., Holtgrave, S., Wiest, L., Michel, M., Leser, M. E. & Windhab, E. J. (2020).** Enzymatic cross-linking of pectin in a high-pressure foaming process. In: *Food & Function*, 11, 2040–2047.
- Westphal, Y., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. & Gruppen, H. (2010a).** Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. In: *Journal of Chromatography A*, 1217, 689–695.

- Westphal, Y., Kühnel, S., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. & Gruppen, H. (2010b). LC/CE-MS tools for the analysis of complex arabino-oligosaccharides. In: *Carbohydrate Research*, 345, 2239–2251.
- Westphal, Y., Kühnel, S., Waard, P. de, Hinz, S. W., Schols, H. A., Voragen, A. G. & Gruppen, H. (2010c). Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. In: *Carbohydrate Research*, 345, 1180–1189.
- Whistler, R. L. & McGilvray, D. I. (1955). 2-O- α -D-Xylopyranosyl-L-arabinose from Hemicellulose-B of Corn Cob. In: *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1884–1885.
- Wikiera, A., Mika, M. & Grabacka, M. (2015). Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. In: *Food Hydrocolloids*, 44, 156–161.
- Wikiera, A., Mika, M., Starzyńska-Janiszewska, A. & Stodolak, B. (2016). *Endo*-xylanase and *endo*-cellulase-assisted extraction of pectin from apple pomace. In: *Carbohydrate Polymers*, 142, 199–205.
- Willats, W. G., Knox, J. P. & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. In: *Trends in Food Science & Technology*, 17, 97–104.
- 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. In: *Industrial Crops and Products*, 29, 571–580.
- Wyatt, P. J. (1997). Multiangle light scattering: the basic tool for macromolecular characterization. In: *Instrumentation Science & Technology*, 25, 1–18.
- Yadav, M. P., Moreau, R. A. & Hicks, K. B. (2007). Phenolic acids, lipids, and proteins associated with purified corn fiber arabinoxylans. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 943–947.
- Yang, J., Martínez, I., Walter, J., Keshavarzian, A. & Rose, D. J. (2013). *In vitro* characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. In: *Anaerobe*, 23, 74–81.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B. & Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. In: *Food Chemistry*, 100, 1356–1364.
- Yapo, B. M. (2011). Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - a new hypothetical model. In: *Carbohydrate Polymers*, 86, 373–385.

- Yu, P., Maenz, D. D., McKinnon, J. J., Racz, V. J. & Christensen, D. A. (2002).** Release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus* ferulic acid esterase and trichoderma xylanase. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1625–1630.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. & Vioque, J. (2003).** Improvement of protein extraction from sunflower meal by hydrolysis with alcalase. In: *Grasas y Aceites*, 54.
- Zaidel, D. N. A., Chronakis, I. S. & Meyer, A. S. (2012).** Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: kinetics and rheology. In: *Food Hydrocolloids*, 28, 130–140.
- Zamil, M. S. & Geitmann, A. (2017).** The middle lamella - more than a glue. In: *Physical Biology*, 14, 015004.
- Zeeb, B., Gibis, M., Fischer, L. & Weiss, J. (2012).** Crosslinking of interfacial layers in multilayered oil-in-water emulsions using laccase: characterization and pH-stability. In: *Food Hydrocolloids*, 27, 126–136.
- Zhang, Z., Smith, C. & Li, W. (2014).** Extraction and modification technology of arabinoxylans from cereal by-products: a critical review. In: *Food Research International*, 65, 423–436.

7 Chemikalien und Instrumente

7.1 Chemikalien

CHEMIKALIE	HERSTELLER, REINHEIT	GHS- SYMBOLS	H-SÄTZE	P-SÄTZE
Aceton	VWR, HPLC-Grade		225, 319, 336	210, 305+351+338, 403+233
Aceton- <i>d</i> ₆	Sigma-Aldrich, 99,9 % D		225, 319, 336	210, 305+351+338, 403+233
Acetonitril	VWR, HPLC-Grade		225, 302+312+332	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Ammoniumchlorid			302, 319	305+351+338, 403+233
Ammoniak, NH ₃	Merck, 25 %		290, 314, 335, 400	260, 273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
D-Apiose	Sigma-Aldrich, > 99,9 %			
6-Aminochinoly- <i>N</i> - hydroxysuccinimidyl- carbammat, AQC	Chemodex, > 95 %		315, 319	P305+351+338
L-Arabinose	Sigma-Aldrich, > 99,9 %			
<i>trans-ortho</i> - Cumarsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 97 %		301, 315, 319, 335	261, 301+310, 305+351+338
Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 % D			
Dichlormethan	VWR, ≥ 99,5 %		315, 319, 335, 336, 351, 373	260, 280, 305+351+338
Diethylether	VWR p.a.		224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 403+235
Dimethylsulfoxid, DMSO	Carl Roth, ≥ 99,8 %			
Dinatriumhydrogen- phosphat	Riedel de-Haën			
Dinatriumtetraborat	Carl Roth, ≥ 99 %		360FD, 319	201, 305+351+338, 308+313
Essigsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 99,8 %		226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338

Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %		226, 302, 331, 314, 335	210, 260, 303+361+353, 305+351+338, 312
Ethanol	VWR, ≥ 99,5		225, 319	210, 233 305+351+338
trans-Ferulasäure	Sigma-Aldrich, 99 %		314, 319, 335	261, 305+351+338
L-Fucose	Alfa Aesar, ≥ 99 %			
D-Galactose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
D-Galacturonsäure Monohydrat	Fluka, ≥ 97 %			
D-Glucose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %			
D-Glucose-¹³C₆	Sigma-Aldrich, ≥ 99 % ¹³ C			
D-Glucuronsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %			
D-Mannit	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
D-Mannose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
Methanol, MeOH	VWR, HPLC-Grade/ MS-Grade		225, 301+311+331, 370	280, 301+310, 303+361+353, 308+311
Methanolische Salzsäure	Sigma-Aldrich, 1,25 M		225, 290, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %		302, 311, 314	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 308+310
Methyliodid	VWR, ≥ 99 %		301+331, 312, 315, 319, 335, 351, 410	273, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
Natriumbordeuterid, NaBD₄	Carl Roth, ≥ 98 % D		260, 301+311, 314	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 310, 402+404
Natriumdihydrogen- phosphat Dihydrat, NaH₂PO₄ · 2 H₂O	VWR p.a.			

Natriumhydroxid, NaOH	Carl Roth, ≥ 99 %		290,314	280, 301+330+331, 305+351+338, 310
Natriumnitrat, NaNO ₃	Merck, ≥ 99,5 %		272, 319	220, 305+351+338
Natriumtetraborat	Aldrich, 99 %		319, 360	201, 280, 305+351+338, 308+313
Natriumthiosulfat	Carl Roth, ≥ 99 %			
Natrium-2,2,3,3- trimethylsilyl- propionat- <i>d</i> ₄ , TMSP- <i>d</i> ₄	Merck, 98 atom%		315, 319, 335	280, 302+352, 305+351+338, 312
Phenylphenol, <i>meta</i> - Hydroxydiphenyl	Sigma-Aldrich, 85 %		315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Phosphorsäure, H ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich, 85 %		290, 302, 314	234, 270, 280, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
2-Propanol (Isopropanol)	VWR, ≥ 98 %		225, 319, 336	210, 240, 305+351+338, 403+233
Raffinose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
L-Rhamnose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
Salzsäure, HCl	Sigma-Aldrich, ≥ 37 %		290, 314, 335	280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310
Selenreaktionsgemisch	Fluka			
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, 95-97 %		290, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %		290, 314, 332, 412	260, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
D-Xylose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			

7.2 Hergestellte Lösungen und Reagenzien

- Natriumacetatpuffer (0,05 M, pH 5,0)
 - 552 mg Natriumacetat in 160 mL bidest. Wasser lösen
 - 187 µL Eisessig zugeben
 - mit 0,3 M NaOH auf pH 5,0 einstellen
 - mit bidest. Wasser auf 200 mL auffüllen

- Natriumacetatpuffer (0,06 M, pH 5,1)
 - 4,92 g Natriumacetat in 1 L bidest. Wasser lösen
 - mit konz. H_3PO_4 auf pH 5,1 einstellen
- Natriumnitrat (0,05 M)
 - 4,25 g Natriumnitrat in 1 L bidest. Wasser lösen
- Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0)
 - 12,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 L bidest. Wasser lösen
 - 11,36 g Na_2HPO_4 in 1 L bidest. Wasser lösen
 - NaH_2PO_4 -Lösung vorlegen und mit Na_2HPO_4 -Lösung auf pH 6,0 einstellen
- Phenylphenol-Lösung (0,15 % in 0,5 % NaOH)
 - 0,03 g 3-Phenylphenol in 20 mL 0,5 % NaOH (0,025 g NaOH/5 mL bidest. Wasser) lösen

7.3 Enzyme

ENZYM	HERKUNFT	HERSTELLER	AKTIVITÄT
α -Amylase (Termamyl 120L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes	-
Amyloglucosidase (AMG 300L)	<i>Aspergillus niger</i>	Novozymes	-
endo-Arabinanase (E-EARAB)	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	9 U/mg
exo-Arabinofuranosidase (E-AFASE)	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	300 U/ml
Ferulasäureesterase (E-FAERU)	Pansen-Mikroorganismen	Megazyme	400 U/ml
Ferulasäureesterase (E-FAEZCT)	<i>Clostridium thermocellum</i>	Megazyme	7 U/ml
endo-Galactanase (E-GALN)	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	408 U/mg
Protease (Alcalase 2,5 MG Type FG)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes	-

7.4 Instrumente

GC-FID

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

GC-MS

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

HPAEC-PAD

Hersteller	Thermo Scientific
Gerätebezeichnung	Dionex ICS-5000 System
Pumpe	Dionex ICS-5000 DP
Autosampler	Dionex AS-AP
Detektor	Dionex ICS-5000 DC, 2x Electrochemical Detector

HPAEC-PAD-MS

Hersteller	Thermo Scientific
Gerätebezeichnung	Dionex ICS-6000 System
Pumpe	Dionex ICS-6000 SP (Eluent) Dionex AXP (Regenerent) Dionex AXP-MS (LiCl)
Autosampler	Dionex AS-AP
Detektor	PAD: ICS-6000 DC, 2x Electrochemical Detector MS: ISQ EC Mass Spectrometer
Suppressor	Dionex AERS 500 (4 mm)

HPLC-DAD

Hersteller	Shimadzu
Gerätebezeichnung	
Pumpe	CBM-20A
Autosampler	SIL-20AC
Detektor	SPM20A

HPSEC-RI/MALLS

Hersteller	Hitachi, Merck
Gerätebezeichnung	LaChrom
Interface	D-7000
Pumpe	L-7100
Autosampler	L-7200
Detektor	L-7490 (RI) SLD7100 (MALLS)

LC-MS

Hersteller	Thermo Scientific
Gerätebezeichnung	Finnigan Surveyor
Pumpe	MS Pump Plus
Autosampler	MS Autosampler Plus
Säulenofen	Beckman Coulter, Jetstream Plus
DAD-Detektor	MS PDA Plus Detektor
Massenspektrometer	LXQ Linear Ion Trap MS mit ESI-Ionenquelle

500 MHz NMR-Spektrometer

Anwendung	Strukturaufklärung
Hersteller	Bruker
Gerätebezeichnung	Ascend 500 MHz
Probenkopf	CryoProbe Prodigy

400 MHz NMR-Spektrometer

Anwendung	Diffusometrie
Hersteller	Bruker
Gerätebezeichnung	WB Avance Neo
Probenkopf	DiffBB

300 MHz NMR-Spektrometer

Anwendung	Diffusometrie
Hersteller	Bruker
Gerätebezeichnung	SB Avance Nano Bay
Probenkopf	5 mm BBFO

200 MHz NMR-Spektrometer

Anwendung	Diffusometrie
Hersteller	Bruker
Gerätebezeichnung	SWB Avance HD III
Probenkopf	Diff30

UV/vis Spektrophotometer

Hersteller	Jasco
Gerätebezeichnung	V-550

8 Arbeitsvorschriften

8.1 Gewinnung des Probenmaterials

8.1.1 Ausgangsmaterialien

Rohmaterial	Bezug	Verarbeitung
Zuckerrübenschnitzel <i>Beta vulgaris</i> sp.	bereitgestellt von Südzucker AG	Mahlen (< 0,5 mm)
Popcornmais <i>Zea mays</i> L. var. <i>everta</i>	Alnatura GmbH	Mahlen (< 0,5 mm) Entfetten mit Aceton
Amaranth <i>Amaranthus</i> sp.	Alnatura GmbH	Mahlen (< 0,5 mm) Entfetten mit Aceton
Quinoa <i>Chenopodium quinoa</i> WILLD.	Alnatura GmbH	Mahlen (< 0,5 mm) Entfetten mit Aceton

8.1.2 Extraktion von Zuckerrübenpektinen

8.1.2.1 Autoklavenpektin (Pkt1)

- 10 g Zuckerrübenmaterial (<0,5 mm) in 200 mL destilliertem Wasser suspendieren
- 40 min bei 121 °C und 2,1 bar autoklavieren
- ca. 30 min im Eisbad abkühlen
- Zentrifugieren (7 min, 5.000 rpm) und über Miracloth filtrieren
- Mit Isopropanol auf dreifaches Volumen auffüllen und über Nacht präzipitieren
- Präzipitat abzentrifugieren
- 2x mit je 100 mL 80 % Isopropanol waschen, dabei auf gute Durchmischung des Präzipitats achten und anschließend Überstand abzentrifugieren
- 2x mit je 100 mL reinem Isopropanol waschen, dabei auf gute Durchmischung des Präzipitats achten und anschließend Überstand abzentrifugieren
- Trocknung des Rückstandes über Nacht im Abzug und ggf. im Trockenschrank (60 °C)

8.1.2.2 Säureextrahierte Pektine (Pkt2-6)

- 30 g Zuckerrübenmaterial (<0,5 mm) in 300 mL destilliertem Wasser suspendieren

Pkt2 – Suspension 1 h bei 50 °C im Wasserbad unter Rühren vorbehandeln
– 15 min bei RT abkühlen lassen
– Mit 4 M HNO₃ auf pH 2 einstellen
– Für 1 h bei 80 °C im Wasserbad inkubieren

Pkt3 – Suspension 1 h bei 50 °C im Wasserbad unter Rühren vorbehandeln
– 15 min bei RT abkühlen lassen
– Mit 4 M HNO₃ auf pH 2 einstellen
– Für 4 h bei 80 °C im Wasserbad inkubieren

Pkt4 – Suspension 1 h bei 50 °C im Wasserbad unter Rühren vorbehandeln
– 15 min bei RT abkühlen lassen
– Mit 4 M HNO₃ auf pH 2 einstellen
– Für 16 h bei 80 °C im Wasserbad inkubieren

Pkt5 – Suspension 1 h bei 50 °C im Wasserbad unter Rühren vorbehandeln
– 15 min bei RT abkühlen lassen
– Mit 4 M HNO₃ auf pH 3 einstellen
– Für 4 h bei 80 °C im Wasserbad inkubieren

Pkt6 – Suspension 30 min im Ultraschallbad und anschließend 30 min bei 50 °C im Wasserbad unter Rühren vorbehandeln
– 15 min bei RT abkühlen lassen
– Mit 4 M HNO₃ auf pH 2 einstellen
– Für 1 h bei 80 °C im Wasserbad inkubieren

- ca. 30 min im Eisbad abkühlen
- Zentrifugieren (7 min, 5.000 rpm) und über Miracloth filtrieren
- Mit Isopropanol auf dreifaches Volumen auffüllen und über Nacht präzipitieren
- Präzipitat abzentrifugieren
- 2x mit je 100 mL 80 % Isopropanol waschen, dabei auf gute Durchmischung des Präzipitats achten und anschließend Überstand abzentrifugieren
- 2x mit je 100 mL reinem Isopropanol waschen, dabei auf gute Durchmischung des Präzipitats achten und anschließend Überstand abzentrifugieren

- Trocknung des Rückstands über Nacht im Abzug und ggf. im Trockenschrank (60 °C)

8.1.2.3 Modifizierte Pektine (AN18, AN48, GN18, GN48)

- 1 g Pkt2 in 200 mL 100 mM Natriumacetatpuffer lösen und 20 min bei 95 °C erhitzen.
- Abkühlen auf Eis.

AN18 – 50 U *exo*-Arabinofuranosidase zugeben und 18 h bei 40 °C inkubieren

AN48 – 100 U *exo*-Arabinofuranosidase zugeben und 48 h bei 40 °C inkubieren

GN18 – 250 U *endo*-Galactanase zugeben und 18 h bei 40 °C inkubieren

GN48 – 500 U *endo*-Galactanase zugeben und 48 h bei 40 °C inkubieren

- Enzyme 5 min bei 95 °C inaktivieren
- Lösung abrotieren
- Rückstand in ca 10 mL bidest. Wasser aufnehmen und in Dialysemembran (*molecular weight cutoff* < 3,5 kDa) überführen
- 48 h gegen destilliertes Wasser dialysieren, dabei regelmäßig Wasser wechseln
- Dialysat einrotieren und gefriertrocknen

8.1.3 Präparative Isolierung von Ballaststoffen

8.1.3.1 Unlösliche Ballaststoffe

- 30 g entfettetes Popcornmaismehl (< 0,5 mm) in 300 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0) suspendieren
- Suspension auf Heizplatte aufkochen
- 2,8 mL thermostabile α -Amylase zugeben und 45 min im kochenden Wasserbad inkubieren (regelmäßig schwenken)
- Suspension auf Eis abkühlen und mit 0,4 M NaOH auf pH 7,5 einstellen
- 1 mL Protease zugeben und 45 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren (regelmäßig schwenken)
- Suspension auf Eis abkühlen und mit 0,5 M HCl auf pH 4,5 einstellen
- 1 mL Amyloglucosidase zugeben und 45 min bei 60 °C inkubieren (regelmäßig schwenken)

- Warme Suspension 15 min bei 5.000 rpm zentrifugieren und Überstand sammeln (enthält LBS)
- Rückstand 2x mit je 200 mL Wasser (60 °C) waschen, zentrifugieren und Überstände vereinigen
- Rückstand 2x mit je 200 mL Ethanol waschen, zentrifugieren und Überstände verwerfen
- Rückstand 2x mit je 200 mL Aceton (60 °C) waschen, zentrifugieren und Überstände verwerfen
- Trocknung des Rückstands (UBS) über Nacht im Trockenschrank (60 °C)

8.1.3.2 Lösliche Ballaststoffe

- Vereinigte Überstände nach enzymatischem Verdau mit Ethanol auf fünffaches Volumen auffüllen, um LBS über Nacht zu präzipitieren
- Lösung 10 min bei 5.000 rpm abzentrifugieren und Überstände jeweils verwerfen
- Rückstand 2x mit je 200 mL 80% Ethanol waschen, dabei auf gute Durchmischung achten und anschließend Überstand abzentrifugieren und verwerfen
- Rückstand 2x mit je 200 mL Ethanol waschen, dabei auf gute Durchmischung achten und anschließend Überstand abzentrifugieren und verwerfen
- Rückstand 2x mit je 200 mL Aceton waschen, dabei auf gute Durchmischung achten und anschließend Überstand abzentrifugieren und verwerfen
- Trocknung des Rückstands (LBS) über Nacht im Trockenschrank (60 °C)

8.1.4 Extraktion von wasserunlöslichen Arabinoxylanen mit integriertem Stärke- und Proteinnachverdau

- Als Material werden jeweils UBS aus Popcornmais eingesetzt
 - AX1** – 10 g gemörserte UBS in 200 mL 0,25 M NaOH suspendieren
– 4 h bei 25 °C im Schüttelinkubator inkubieren
 - AX2** – 10 g gemörserte UBS in 200 mL 0,25 M NaOH suspendieren
– 4 h bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubieren
 - AX3** – 10 g gemörserte UBS in 200 mL 0,25 M NaOH suspendieren
– 1,5 h bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubieren
 - AX4** – 10 g gemörserte UBS in 200 mL 0,25 M NaOH suspendieren
– 30 min im Ultraschallbad behandeln
– 1 h bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubieren
 - AX5** – 10 g gemörserte UBS in 100 mL bidest. Wasser suspendieren
– 30 min im Ultraschallbad behandeln
– 100 mL 0,5M NaOH zugeben
– 1 h bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubieren
- 10 min bei 5.000 rpm zentrifugieren und Überstand über Miracloth abfiltrieren und sammeln
- Gesammelten Überstand mit 6 M HCl auf pH 6 einstellen
- Rückstand mit 200 mL 0,25 M NaOH versetzen und 1 h bei 30 °C nachinkubieren
- 10 min bei 5.000 rpm zentrifugieren und mit gesammeltem Überstand vereinigen
- Gesammelte Überstände mit 6 M HCl auf pH 6 einstellen und Lösung auf 90 °C erhitzen
- 1 mL Amylase zugeben und 30 min bei 95 °C erhitzen
- Lösung auf Eis abkühlen und mit 0,4 M NaOH auf pH 7,5 einstellen
- 1 mL Protease zugeben und 45 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren (regelmäßig schwenken)
- Lösung auf Eis abkühlen und mit 0,5 M HCl auf pH 4,5 einstellen
- 500 µL Amyloglucosidase zugeben und 30 min bei 60 °C inkubieren (regelmäßig schwenken)

- mit 0,5 M HCl auf pH 4 einstellen
- Mit Ethanol auf vierfaches Volumen auffüllen und über Nacht präzipitieren
- Präzipitat abzentrifugieren
- Präzipitat 2x mit je 100 mL 80 % Ethanol waschen, dabei auf gute Durchmischung achten und anschließend Überstand abzentrifugieren
- Rückstand 2x mit je 100 mL reinem Ethanol waschen, dabei auf gute Durchmischung achten und anschließend Überstand abzentrifugieren
- Trocknung des Rückstands über Nacht im Trockenschrank (60 °C)
- Mit Iod/Stärke-Test auf Stärke überprüfen und ggf. nachverdauen

8.2 Grundcharakterisierung

8.2.1 Bestimmung des Aschegehalts

- 100-200 mg Probe in konstant gewogenen Tiegel einwiegen
- 5 h bei 520 °C veraschen

8.2.2 Bestimmung des Proteingehalts

- 100 mg Probe mit Glasperlen in Kjeldahlkolben einwiegen
- 500 mg Selenreaktionsgemisch und 5 mL konz. Schwefelsäure zugeben
- 1-1,5 h bis zum Entfärben der Lösung auf Heizblock aufschließen
- Lösung auf Eis abkühlen und quantitativ durch Spülen mit bidest. Wasser in 50 mL Messkolben überführen
- 1 mL verdünnte Lösung in Becherglas zu 49 mL bidest. Wasser geben
- 3 mL 2 M NaOH zugeben, um Ammonium-Ionen vollständig in Ammoniak zu überführen
- Messung mit Ammoniak-sensitiver Elektrode
- Drei-Punkt-Kalibrierung mit Ammoniumchlorid (0, 1, 1, 10 mg N/L)

8.2.3 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Hydrolyse

- 50 mg Probe in 15 mL Pyrexglas einwiegen
- 2,5 mL 6 M HCl zugeben und Gefäßraum mit Stickstoff begasen
- 20 h bei 120 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- Abkühlen und 4 min bei 2.500 rpm zentrifugieren
- Überstand durch PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm) filtrieren und 1:10 verdünnen
- Fünf-Punkt-Kalibrierung mit Aminosäure-Lösungen (0,0025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 mM)

Derivatisierung

- 20 μL verdünnte Probelösung bzw. Kalibrierlösung mit 20 μL Norleucin (0,1 mM) versetzen
- 180 μL Boratpuffer (0,06 M, pH = 8,8) sowie 50 μL AQC-Reagenz (0,01 M) zugeben und vortexen
- 10 min bei 55 °C inkubieren
- Analyse mittels HPLC-FLD

HPLC-Parameter

Tab. 8.1: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Bedingungen für die Bestimmung der Aminosäurederivate. FLD, Fluoreszenz-Detektor

Säule	Luna C18(2) (250 mm x 4,6 mm, 5 μm)
Fließmittel	A: 60 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,1, mit konz. Phosphorsäure eingestellt) B: Acetonitril C: bidest.
Flussrate	1 mL/min
Injektionsvolumen	10 μL
Ofentemperatur	35 °C
Detektor	FLD
	$\lambda_{\text{Abs.}} = 250 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 395 \text{ nm}$

Tab. 8.2: Gradientenprogramme zur Analyse der einzelnen Aminosäurederivate mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Fluoreszenz-Detektion

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	94	6	0
30	87	13	0
30,5	80	20	0
38	76	24	0
48	73,7	26,3	0
55	0	50	50
55,5	94	6	0
65	94	6	0
50	87	0	13

8.2.4 Bestimmung des Molekulargewichts

- 15 mg Probe in 5 mL 50 mM NaNO_3 unter Rotation und bei 40 °C über Nacht lösen (15 mL FalconTube)
- 10 min bei 5.000 rpm zentrifugieren und Überstand (Probenlösung) abnehmen
- Rückstand 2x mit je 5 mL Ethanol waschen, dazwischen jeweils zentrifugieren und Überstand werfen

- Rückstand 2x mit je 5 mL Aceton waschen, dazwischen jeweils zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Rückstand über Nacht im Trockenschrank (60 °C) trocknen und anschließend auswiegen, um exakte Konzentration der Probenlösung zu bestimmen
- Konzentrationsreihe der Probenlösung herstellen (0, 1,5, 3 g/L)
- Analyse mittels HPSEC-RI

HPSEC-Parameter

Tab. 8.3: Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie-Bedingungen für die Bestimmung des Molekulargewichts. RI, Brechungsindex; MALLS, Mehrwinkellichtstreuung

Säule (in Serie)	TSKgel PW _{XL} (40 mm x 6,0 mm, 12 µm, Vorsäule) + TSKgel G6000PW _{XL} (300 mm x 7,8 mm, 13 µm) + TSKgel G4000PW _{XL} (300 mm x 7,8 mm, 10 µm)
Fließmittel	50 mM NaNO ₃
Flussrate	1 mL/min
Injektionsvolumen	50 µL
Ofentemperatur	50 °C
Detektion	RI MALLS

8.3 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

8.3.1 Methanolyse mit TFA-Hydrolyse

- Ca. 7 mg LBS/Pkt/AX in 4 mL GC-Vial einwiegen
- 0,5 mL 1,25 M methanolische HCl zugeben und mischen
- Vial gasdicht verschließen und 16 h bei 80 °C im Trockenschrank inkubieren
- Abkühlen und grobe Teilchen absetzen lassen
- 10 µL des Überstands in 1,5 mL GC-Vial überführen
- 10 min im Evaporator bis zur Trockne eindampfen
- 125 µL 2 M TFA zugeben
- Vial gasdicht verschließen und 1 h bei 121 °C im Trockenschrank inkubieren
- 1 h im Evaporator bis zur Trockne eindampfen
- 2x je 100 µL EtOH zugeben und jeweils 10 min im Evaporator trocknen
- Rückstand in 180 µL bidest. Wasser aufnehmen und mit 20 µL D-Mannit versetzen
- Lösung ggf. verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren

8.3.2 H₂SO₄-Hydrolyse

- Ca. 10 mg UBS in 4 mL GC-Vial mit Glasperlen einwiegen
- 150 µL 12 M H₂SO₄ zugeben und mischen
- 30 min im Eisbad inkubieren, dabei alle 10 min mischen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei alle 30 min mischen (auf vollständige Benetzung des Materials achten)
- 975 µL bidest. Wasser zugeben und 3 h bei 100°C im Trockenschrank hydrolysieren
- Reaktionsgemisch auf Eis abkühlen und durch einen 0,45 µm PTFE-Filter filtrieren
- 100 µL Filtrat mit 75 µL 4 M NaOH und 825 µL bidest. Wasser versetzen
- 20 µL Probelösung mit 20 µL D-Mannit und 160 µL bidest. Wasser versetzen
- Analyse mittels HPAEC-PAD

HPAEC-Parameter

Tab. 8.4: Hochleistungsanionenaustauschchromatographie-Bedingungen für die Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung. PAD, Gepulst amperometrischer Detektor

Säule	CarboPac PA-20
Fließmittel	A: H ₂ O B: 0,1 M NaOH C: 0,1 M NaOH + 0,2 M NaOAc
Flussrate	0,4 mL/min
Injektionsvolumen	25 µL
Detektor	PAD (AgCl-Elektrode)

Tab. 8.5: Gradientenprogramme zur Analyse der einzelnen Monosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischer Detektion

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	97	3	0
22,0	97	3	0
32,0	0	100	0
32,1	0	60	40
42,0	0	0	100

8.4 Bestimmung der Bindungsverhältnisse

Methylierung

- Ca. 5 mg Pkt/AX in 15 mL Pyrexglas einwiegen

- 2 mL DMSO zugeben und über Nacht lösen
- 30 min im Ultraschallbad behandeln
- 100 mg unter Stickstoff gemörserte NaOH zugeben
- Nacheinander 90 min im Ultraschallbad (Eis zugeben) und 90 min bei RT reagieren lassen
- 1 mL Methyljodid zugeben und nacheinander 30 min im Ultraschallbad und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3 mL Dichlormethan zugeben
- 5 mL 0,1 M Natriumthiosulfatlösung zugeben und gründlich vortexen
- 1 min bei 1.500 rpm zentrifugieren
- Obere (wässrige) Phase verwerfen
- Organische Phase 2x mit je 5 mL bidest. Wasser waschen, zentrifugieren und wässrige Phase jeweils verwerfen
- Organische Phase abrotieren und unter Stickstoff trocknen
- Rückstand über Nacht im Vakuumtrockenschrank trocknen
- Kompletten Vorgang wiederholen und anschließend mit nächstem Schritt fortfahren

Hydrolyse

- Rückstand nach zweifacher Methylierung in 2 mL TFA aufnehmen
- 90 min bei 121 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- Lösung abkühlen, abrotieren und ggf. mit Stickstoff fertig trocknen

Reduktion

- 20 mg Natriumbordeuterid in 0,3 mL 2 M Ammoniak zugeben (Schaumbildung!)
- 1 h bei RT stehen lassen
- Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 100 µL Eisessig (Schaumbildung!)

Acetylierung

- Probe auf Eis kühlen
- 450 μL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- 30 min bei RT stehen lassen
- Probe auf Eis abkühlen und mit 3 mL bidest. Wasser versetzen
- Abkühlen, 5 mL Dichlormethan zugeben und gründlich vortexen
- Obere (wässrige) Phase verwerfen
- Organische Phase 3x mit je 5 mL bidest. Wasser waschen und wässrige Phase jeweils verwerfen
- Restwasser über Nacht im Gefrierschrank ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) ausfrieren
- Analyse mittels GC-MS/GC-FID an einer DB-225 Trennsäule
 - Zur Trennung der 1,2-4- und 1,3,4-Xylp wurde eine DB-5-Trennsäule eingesetzt, um anhand der resultierenden Peakflächen, die prozentualen Anteile der beiden PMAA nach Analyse mittels DB-225-Trennsäule annähernd zu bestimmen

GC-Parameter

Tab. 8.6: Gaschromatographie-Bedingungen für die Bestimmung der partiell methylierten Alditolacetate. MS, Massenspektrometer; FI, Flammenionisation; EI, Elektronenstoßionisation

	GC-MS	GC-FID
Säule	DB-225MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)	DB-225 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)
Trägergas		Helium
Trägergasgeschwindigkeit		40 cm^3/s
Temperaturprogramm	140 $^{\circ}\text{C}$ - 1 min - 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ - 220 $^{\circ}\text{C}$ - 25 min	
Injektionsvolumen		1 μL
Injektortemperatur		220 $^{\circ}\text{C}$
Injektionsmethode		Split
Split Rate	30:1	10:1
<u>MS-Detektion</u>		
EI	70 eV	-
Transferline-Temperatur	220 $^{\circ}\text{C}$	-
<u>FI-Detektion</u>		
Temperatur	-	240 $^{\circ}\text{C}$
Makeup Gas	-	Stickstoff

Tab. 8.7: Gaschromatographie-Bedingungen für die Trennung der partiell methylierten Alditolacetate der 1,2,4- und 1,3,4-Xylpp. MS, Massenspektrometer; EI, Elektronenstoßionisation

GC-MS	
Säule	DB-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)
Trägergas	Helium
Trägergasgeschwindigkeit	40 cm/s
Temperaturprogramm	140 °C - 2 min - 1 °C/min - 180 °C - 5 min - 10 °C/min - 300 °C - 5 min
Injektionsvolumen	1 µL
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsmethode	Split
Split Rate	30:1
<u>MS-Detektion</u>	
	EI 70 eV
Transferline-Temperatur	275 °C

8.5 Analyse der phenolischen Säuren

8.5.1 Rohmaterial

- Ca. 25 mg AX oder Pkt in 15 mL Pyrexglas einwiegen
- 2,5 mL 2M NaOH (mit Stickstoff begast) zugeben
- Unter Stickstoffatmosphäre und lichtgeschützt für 18h verseifen
- Ansäuern mit 0,5 mL konz. HCl (pH < 2)
- Zugabe der internen Standardsubstanzen
 - AX: 15 µL *o*-Cumarsäure-Lösung (c = 1 mg/mL) und 100 µL 5,5-(methylierte) Diferulasäure (c = 100 µg/mL)
 - Pkt: 75 µL *o*-Cumarsäure-Lösung (c = 1 mg/mL) und 25 µL 5,5-(methylierte) Diferulasäure (c = 100 µg/mL)
- 20min äquilibrieren
- 3x mit je 3 mL Diethylether extrahieren, obere Phase sammeln
- Ether-Extrakt unter Stickstoffstrom trocknen
- Rückstand in 500 µL (AX) bzw. 250 µL (Pkt) MeOH/Wasser (50:50, v:v) aufnehmen
 - AX: Monomere und Oligomere phenolische Säuren direkt aus erhaltener Lösung
 - Pkt: 1:10 Verdünnung für monomere phenolische Säuren

8.5.2 Laccase bzw. Peroxidase/H₂O₂-Gele

- Ca. 50 mg AX oder Pkt in 15 mL Pyrexglas mit Rührfisch einwiegen
- 2,45 mL 0,05 M Natriumacetatpuffer (pH 5) zugeben und lichtgeschützt und unter rühren über Nacht hydratisieren
- Start der Gelierung durch Zugabe von Lac bzw. POD/H₂O₂ (auf gründliche Durchmischung achten!)
 - Lac-Gele: 50 µL Lac-Lösung ($c = 0,08 \text{ U}/\mu\text{L}$)
 - POD/H₂O₂-Gele: 25 µL H₂O₂-Lösung ($c = 0,12 \text{ }\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) und 25 µL POD-Lösung ($c = 0,16 \text{ U}/\mu\text{L}$)
- 2 h bei 25 °C lichtgeschützt gelieren
- 2,5 mL 4 M NaOH (Mit Stickstoff begast) zugeben und gründlich vortexen
- Unter Stickstoffatmosphäre und lichtgeschützt für 18h verseifen
- Ansäuern mit 1 mL konz. HCl (pH < 2)
- Für Pektingele wird ein 2 mL Aliquot entnommen
- Zugabe der internen Standardsubstanzen
 - AX: 25 µL *o*-Cumarsäure-Lösung ($c = 1 \text{ mg}/\text{mL}$) und 25 µL 5,5-(methylierte) Diferulasäure ($c = 100 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)
 - Pkt: 50 µL *o*-Cumarsäure-Lösung ($c = 1 \text{ mg}/\text{mL}$) und 50 µL 5,5-(methylierte) Diferulasäure ($c = 100 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)
- 20min äquilibrieren
- 3x mit je 3 mL Diethylether extrahieren, obere Phase sammeln
- Ether-Extrakt unter Stickstoffstrom trocknen
- Rückstand in 250 µL (AX) bzw. 500 µL (Pkt) MeOH/Wasser (50:50, v:v) aufnehmen
 - AX: monomere und oligomere phenolische Säuren direkt aus erhaltener Lösung
 - Pkt: 1:10 Verdünnung für monomere phenolische Säuren

HPLC-Parameter

Tab. 8.8: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Bedingungen für die Bestimmung der phenolischen Säuren. DAD, *Diodenarray*-Detektor

Säule	Luna Phenyl-Hexyl (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Fließmittel	A: 1mM TFA B: MeOH:1 mM TFA (90:10, v:v) C: Acetonitril:1 mM TFA (90:10, v:v)
Flussrate	1 mL/min
Injektionsvolumen	20 μ L
Ofentemperatur	45°C
Detektor	DAD-Detektor 308 nm: <i>cis</i> -Ferulasäure, <i>p</i> -Cumarsäure 323 nm: <i>trans</i> -Ferulasäure, <i>o</i> -Cumarsäure 280 nm: Di- und Trimere

Tab. 8.9: Gradientenprogramme zur Analyse der monomeren und oligomeren phenolischen Säuren mittels HPLC-DAD

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
Trennung der Monomere			
0	87	0	13
10	87	0	13
20	77	3	5
25	70	5	25
30	25	25	50
35	0	50	50
40	0	50	50
45	87	0	13
50	87	0	13
Trennung der Di- und Trimere			
0	82	0	18
15	82	0	18
20	80	0	20
25	72	3	25
30	70	5	25
55	70	5	25
60	65	5	30
65	55	5	40
70	55	5	40
73	0	20	80
78	0	20	80
82	82	0	18
87	82	0	18

8.6 Screening von Arabinanen und Galactanen

Das Screening von AN und GN wurde mittels zweier Methoden durchgeführt. Das gemischte Screening analysiert die freigesetzten OS direkt nach enzymatischem Verdau und unterscheidet somit nicht zwischen FS-freien und -haltigen AN- und GN-OS. Dagegen wird beim erweiterten Screening vor der Analyse mittels HPAEC-PAD eine Auftrennung der beiden Fraktionen durchgeführt.

8.6.1 Gemischtes Screening von ferulasäurefreien und -haltigen Arabinanen und Galactanen

8.6.1.1 Zuckerrübenpektin und Lösliche Ballaststoffe

- 10 mg Probe in 10 mL bidest. Wasser suspendieren und 20 min bei 95 °C im Wasserbad lösen
- 200 µL der Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren
- 2 µL einer *endo*-Arabinanase-Lösung ($c = 20 \text{ U/mL}$, entspricht 20 U/100 mg Probe) bzw. 2 µL einer *endo*-Galactanase-Lösung ($c = 100 \text{ U/mL}$, entspricht 100 U/100 mg Probe) zugeben
- 24 h bei 40 °C unter Lichtausschluss schüttelnd inkubieren
- Enzyme durch Erhitzen der Lösung für 5 min bei 95 °C inaktivieren
- In Eppendorf-Reaktionsgefäß 120 µL bidest. Wasser vorlegen, 15 µL 100 µM Raffinose-Lösung und 15 µL Probelösung zugeben (entspricht 1:10 Verdünnung der Probe)
- Für andere Verdünnungen müssen Anteile bidest. Wasser und Probelösung bei gleichbleibender Raffinosemenge (10 µM im Endvolumen) angepasst werden
- Analyse mittels HPAEC-PAD

8.6.1.2 Unlösliche Ballaststoffe

- 5 mg UBS in Glasvial in 500 µL bidest. Wasser suspendieren und Gefäß gasdicht verschließen
- gründlich vortexen
- 40 min bei 121 °C im Trockenschrank inkubieren
- Abkühlen auf Raumtemperatur und 10 U *endo*-Arabinanase bzw. 50 U *endo*-Galactanase zugeben (Getrennte Ansätze)
- 24 h bei 40 °C unter Lichtausschluss schüttelnd inkubieren
- Enzyme durch Erhitzen der Lösung für 5 min bei 95 °C inaktivieren
- Suspension in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und 10 min bei 12.000 rpm zentrifugieren
- Überstand (Oligosaccharid-Gemisch) in weiteres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen, Rückstand verwerfen
- In Eppendorf-Reaktionsgefäß 105 µL bidest. Wasser vorlegen, 15 µL 100 µM Raffinose-Lösung und 30 µL Probelösung zugeben (entspricht 1:5 Verdünnung der Probe)
- Für andere Verdünnungen müssen Anteile bidest. Wasser und Probelösung bei gleichbleibender Raffinosemenge (10 µM im Endvolumen) angepasst werden
- Analyse mittels HPAEC-PAD

Analyse mittels HPAEC-PAD

Tab. 8.10: Hochleistungsanionenaustauschchromatographie-Bedingungen für die Analyse von Arabinan- und Galactan oligosacchariden. PAD, Gepulst amperometrischer Detektor

Säule	CarboPac PA-200
Fließmittel	A: bidest. Wasser B: 0,1 M NaOH C: 0,1 M NaOH + 0,2 M NaOAc
Flussrate	0,4 mL/min
Injektionsvolumen	25 µL
Detektor	PAD (AgCl-Elektrode)

Tab. 8.11: Gradientenprogramme für die Analyse von Arabinan- und Galactan oligosacchariden mittels HPAEC-PAD

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
Trennung der Arabinan oligosaccharide			
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
60	50	30	20
75	0	40	60
75,1	0	0	100
90,0	0	0	100
Trennung der Galactan oligosaccharide			
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	90	10	0
20,0	50	50	0
60	50	40	10
75	0	50	50
80,0	0	0	100
90,0	0	0	100

8.6.2 Erweitertes Screening von ferulasäurehaltigen Arabinanen und Galactanen

8.6.2.1 Enzymatischer Verdau

1. Zuckerrübenpektin und Lösliche Ballaststoffe

- 100 mg Probe in 100 mL bidest. Wasser suspendieren und 20 min bei 95 °C im Wasserbad quellen lassen
- 20 U *endo*-Arabinanase bzw. 100 U *endo*-Galactanase zugeben

- 24 h bei 40 °C unter Lichtausschluss schüttelnd inkubieren
- Enzyme durch Erhitzen der Lösung für 5 min bei 95 °C inaktivieren
- Polymeres Material durch Zugabe von Isopropanol über Nacht präzipitieren (Isopropanol-Endkonzentration: 66,7 %)
- Präzipitat abzentrifugieren und verwerfen
- Überstand (Oligosaccharid-Gemisch) auf < 50 mL einrotieren und anschließend gefriertrocknen

2. Unlösliche Ballaststoffe

- 500 mg UBS in Schottflasche in 50 mL bidest. Wasser suspendieren
- 40 min bei 121 °C im Trockenschrank inkubieren
- Abkühlen auf Raumtemperatur und 10 U *endo*-Arabinanase bzw. 50 U *endo*-Galactanase zugeben
- 24 h bei 40 °C unter Lichtausschluss schüttelnd inkubieren
- Enzyme durch Erhitzen der Lösung für 5 min bei 95 °C inaktivieren
- Polymeres Material durch Zugabe von Isopropanol über Nacht präzipitieren (Isopropanol-Endkonzentration: 66,7 %)
- Präzipitat abzentrifugieren und verwerfen
- Überstand (Oligosaccharid-Gemisch) auf < 50 mL einrotieren und anschließend gefriertrocknen

8.6.2.2 Chromatographische Auftrennung von ferulasäurehaltigen und -freien Arabinan- und Galactan oligosacchariden

- Gefriergetrocknetes Hydrolysat in bidest. Wasser aufnehmen ($c = 20 - 30 \text{ mg/mL}$)
- Lösung durch PTFE-Filter (0,45 μm) filtrieren
- 100 μL mittels semipräparativer HPLC aufreinigen (s. Tab. 8.12 und Tab. 8.13)
- Fraktionen der FS-freien OS und FS-haltigen OS in lichtgeschützte Gefäße sammeln und evaporieren

8.6.2.3 Analyse von ferulasäurefreien und -haltigen Oligosaccharidfraktionen FS-freie OS

- Rückstand in 1 mL bidest. Wasser aufnehmen
- In Eppendorf-Reaktionsgefäß 105 μL bidest. Wasser vorlegen, 15 μL 100 μM Raffinose-Lösung und 30 μL Probelösung zugeben (entspricht 1:5 Verdünnung der Probe)
- Für andere Verdünnungen müssen Anteile bidest. Wasser und Probelösung bei gleichbleibender Raffinosemenge (10 μM im Endvolumen) angepasst werden
- Analyse mittels HPAEC-PAD analog zum gemischten Screening (s. Tab. 8.10 und Tab. 8.11)

FS-haltige OS

- Rückstand in 200 μL bidest. Wasser aufnehmen
- Je 5 μL FS-Esterasen (E-FAEZCT und E-FAERU) zugeben
- über Nacht bei 40 °C inkubieren
- Enzyme 5 min bei 95 °C inaktivieren
- Lösung evaporieren und in 200 μL bidest. Wasser aufnehmen
- Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und 5 min bei 12.000 rpm zentrifugieren
- In Eppendorf-Reaktionsgefäß 105 μL bidest. Wasser vorlegen, 15 μL 100 μM Raffinose-Lösung und 30 μL Überstand zugeben (entspricht 1:5 Verdünnung der Probe)
- Für andere Verdünnungen müssen Anteile bidest. Wasser und Überstand bei gleichbleibender Raffinosemenge (10 μM im Endvolumen) angepasst werden
- Analyse mittels HPAEC-PAD analog zum gemischten Screening (s. Tab. 8.10 und Tab. 8.11)

HPLC-Parameter**Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC**

Tab. 8.12: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Bedingungen für die Auftrennung von ferulasäurefreien und -haltigen Oligosacchariden. ELSD, Lichtstredetektor; DAD, *Diodenarray*-Detektor; FS, *trans*-Ferulasäure

Säule	Luna Phenyl-Hexyl (250 mm x 10 mm, 5 μm)
Fließmittel	A: bidest. Wasser B: MeOH
Flussrate	1 mL/min
Injektionsvolumen	100 μL
Ofentemperatur	Raumtemperatur
Detektor	ELSD und DAD (325 nm)
Fraktionierung	16-Wege Fraktionierventil nach Säule ELSD 1:20 Fraktionierventil FS-freie OS: 9-15 min FS-haltige OS: 29,5-33 min

Tab. 8.13: Gradientenprogramm für die Auftrennung von ferulasäurefreien und -haltigen Oligosacchariden (OS) mittels HPLC-DAD/ELSD

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	80	20
15	80	20
16	20	80
34,5	20	80
35	80	20
50	80	20

Analyse von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden mittels MS bzw. HPLC-MSⁿ

Zur Identifizierung der gesammelten Fraktionen (FS-freie und -haltige AN- und GN-OS) wurden diese zum einen direkt in die ESI-Quelle injiziert und mit den MS-Bedingungen von Tab. 8.14 analysiert. Die vorherige chromatographische Auftrennung an einer PGC (FS-freie OS)- bzw. C18 (FS-haltige OS)-Trennsäule ermöglichte die MSⁿ-Analyse einzelner FS-freier oder -haltiger OS. Die chromatographischen Bedingungen sind dabei für die Analyse FS-freier bzw. -haltiger OS konzipiert.

Tab. 8.14: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Bedingungen für die Analyse von ferulasäurefreien und -haltigen Oligosacchariden. FS, *trans*-Ferulasäure; PGC, *Porous Graphitized Carbon*; MS, Massenspektrometer; DAD, *Diodenarray*-Detektor

	FS-frei	FS-haltig
Säule	Thermo Hypercarb (PGC) (100 mm x 2,1 mm, 3 µm)	Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Fließmittel	A: bidest. Wasser (+25 mM LiCl) B: Acetonitril	bidest. Wasser (+0,1% Ameisensäure) Acetonitril
Flussrate	0,2 mL/min	0,5 mL/min
Injektionsvolumen	20 µL	25 µL
Ofentemperatur	70 °C	Raumtemperatur
Detektor	MS ²	DAD (325 nm), MS ²
<u>MS-Parameter</u>		ESI(+)
Kapillartemperatur		350 °C
Sprayspannung		4 kV
Kapillarspannung		12 V

Tab. 8.15: Gradientenprogramm für die Analyse von Arabinan- und Galactan-Oligosacchariden mittels HPLC-(DAD)-MSⁿ. FS, *trans*-Ferulasäure

FS-frei			FS-haltig		
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0	0,0	95	5
1,0	100	0	4,0	95	5
20,0	85	15	8,0	90	10
28,0	30	70	10,0	90	10
31,0	20	80	14,0	84	16
35,0	20	80	23,0	84	16
36,0	100	0	33,0	50	50
41,0	100	0	34,0	5	95
			36,0	5	95
			37,0	95	5
			42,0	95	95

Tab. 8.16: Massen von einfach ferulasäurehaltigen (FS-) und ferulasäurefreien Arabinan (AN)- und Galactan (GN)-Oligosacchariden (OS), die für die Zuordnung von Signalen nach direkter Injektion sowie für die HPLC-MSⁿ-Analysen verwendet wurden. Der Polymerisationsgrad (DP) bezieht sich jeweils auf die Anzahl der enthaltenen Monosaccharide. m/z , Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

Pentose-OS				
DP	m/z	m/z	DP	m/z
AN-OS	[M+Na] ⁺	[M+Li] ⁺	FS-AN-OS	[M+Na] ⁺
1	173	157	1	349
2	305	289	2	481
3	437	421	3	613
4	569	553	4	745
5	701	685	5	877
6	833	817	6	1009
7	965	949	7	1141
8	1097	1081	8	1273
9	1229	1213	9	1405
10	1361	1345	10	1537
11	1493	1477	11	1669

Hexose-OS				
DP	m/z	m/z	DP	m/z
GN-OS	[M+Na] ⁺	[M+Li] ⁺	FS-GN-OS	[M+Na] ⁺
1	203	187	1	379
2	365	349	2	541
3	527	511	3	703
4	689	673	4	865
5	851	835	5	1027

8.7 Screening der Seitenketten von Arabinoxylanen

Hydrolyse

1. Rohmaterial

- 100 mg AX in 15 mL Pyrexglas einwiegen
- 5 mL 50 mM TFA und kleinen Rührfisch zugeben und gründlich vortexen
- 2 h lichtgeschützt bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- Abkühlen auf Eis
- Zentrifugieren und Aliquot des Überstandes (4 mL) abnehmen

2. Laccase bzw. Peroxidase/H₂O₂-Gele

- 80 mg AX in 15 mL Pyrexglas einwiegen
- 3,92 mL 0,05 M Natriumacetatpuffer (pH 5) und kleinen Rührfisch zugeben und über Nacht hydratisieren

- Start der Gelierung durch Zugabe von Lac bzw. POD/H₂O₂ (auf gründliche Durchmischung achten!)
 - Lac-Gele: 80 µL Lac-Lösung ($c = 0,08 \text{ U}/\mu\text{L}$)
 - POD/H₂O₂-Gele: 40 µL H₂O₂-Lösung ($c = 0,12 \text{ } \mu\text{mol}/\mu\text{L}$) und 40 µL POD-Lösung ($c = 0,16 \text{ U}/\mu\text{L}$)
- 2 h bei 25 °C gelieren
- 1 mL 250 mM TFA zugeben und gründlich vortexen
- 2 h lichtgeschützt bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- Abkühlen auf Eis
- Zentrifugieren und Aliquot des Überstandes (4 mL) abnehmen

Festphasenextraktion

- C18-SPE-Säulenmaterial (500 mg) mit 6 mL MeOH und 6 mL bidest. Wasser nacheinander waschen (Material nicht austrocknen lassen)
- Aliquot der Probe vorsichtig aufgeben und tropfenweise das Material passieren lassen
- Beladenes Säulenmaterial tropfenweise mit 6 mL bidest. Wasser waschen
- FS-OS mit 6 mL MeOH in 15 mL Pyrexglas eluieren
- Probe abrotieren und über Nacht im Vakuumtrockenschrank (40 °C) resttrocknen

Reduktion

- 2 mL frische Natriumborhydrid-Lösung (30 mg/mL DMSO) zugeben
- Rührfisch zugeben, Gefäß schnell gasdicht verschließen, um Feuchtaufnahme zu reduzieren
- Gefäße lichtgeschützt 18 h bei 30 °C unter Rühren inkubieren
- Auf Eis abkühlen
- Stopp der Reaktion durch Zugabe von 2 mL 1 M HCl (Schaumbildung!, pH sollte < 2 sein)
- Analyse mittels HPLC-DAD/MS

Externe Kalibrierung

- Fünf-Punkt-Kalibrierung aus FA/FAX/FAXG
 - FA: 10, 70, 130, 190, 250 µM
 - FAX: 5, 10, 15, 20, 25 µM
 - FAX: 5, 10, 15, 20, 25 µM
- Kalibrierpunkte werden eingedampft und analog zur Probe reduziert und analysiert (Konzentration entspricht der Konzentration im Endvolumen)

HPLC-Parameter

Tab. 8.17: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Bedingungen für die Analyse von FA, FAX und FAXG. FA, 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FS, *trans*-Ferulasäure; DAD, *Diodenarray*-Detektor; MS, Massenspektrometer; FAX, β -D-Xylopyranosyl-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; FAXG, α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose

Säule	Luna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m)
Fließmittel	A: bidest. Wasser (+0,1% Ameisensäure) B: Acetonitril
Flussrate	0,5 mL/min
Gradientenprogramm	s. Tab. 8.15 für FS-haltige Oligosaccharide
Injektionsvolumen	25 μ L
Ofentemperatur	Raumtemperatur
Detektor	DAD (325 nm), MS
MS-Parameter	ESI(+)
Kapillartemperatur	350 °C
Sprayspannung	4 kV
Kapillarspannung	5 V

8.8 Bestimmung des Veresterungsgrads

8.8.1 Uronsäurebestimmung

Vorhydrolyse

- 10 mg Pkt in 3,5 mL Vial mit Lochdeckel und Septum einwiegen (Glasperlen dazu)
- 300 μ L 12 M Schwefelsäure dazu und gründlich vortexen
- 30 min ins Eisbad stellen, alle 10 min vortexen
- 2 h bei RT stehen lassen, alle 30 min vortexen
- 1.950 μ L bidest. Wasser zugeben
- Lösung durch PTFE-Spritzenfilter (0,45 μ m) filtrieren
- Filtrat 1:60 verdünnen

Photometrische Bestimmung

- je 600 μ L verdünnte Probe in zwei 15 mL Pyrexgläser pipettieren
- Unter Kühlung 3,6 mL 12,5 mM Natriumtetraboratlösung (in konz. Schwefelsäure) zugeben und gründlich vortexen
- 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren, anschließend sofort auf Eis kühlen
- Blindwert: Zu einem Pyrexglas 60 μ L 0,5 % NaOH zugeben und vortexen
- Anderes Pyrexglas mit 60 μ L *meta*-Hydroxydiphenyllösung (0,15 % in 0,5 % NaOH) versetzen

- nach 20 min Extinktion ($\lambda = 520 \text{ nm}$) messen
- Sechs-Punkt-Kalibrierung mit GalA ($10 - 85 \text{ mg/L}$)
 - Vorgehen analog zur Probe
 - Für jeden Kalibrierpunkt Blindwert aufnehmen

8.8.2 Methanol- und Essigsäurebestimmung

Alkalische Hydrolyse

- 20 mg Pkt in 3,5 mL Vial einwiegen
- 1,5 mL 2 M NaOH (in D_2O) und 150 μL TMSP- d_4 -Lösung ($0,5 \text{ mg/mL}$ in D_2O) zugeben
- 2 h bei RT im Ultraschallbad behandeln
- Grobe Teilchen absetzen lassen und Überstand in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand durch PTFE-Spritzenfilter ($0,45 \mu\text{m}$) filtrieren
- 550 μL mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysieren

$^1\text{H-NMR}$ -Parameter

Tab. 8.18: Spezifische Parameter zur Quantifizierung von Methanol und Essigsäure mittels Kernspinresonanzspektroskopie. D1, *Relaxation Delay*

Gerät	Bruker Ascend 500 MHz
Pulsprogramm	zg30
Scanzahl	32
Anzahl der Datenpunkte	65536
D1-Delay	35 s
Spektrale Breite	19,9947 ppm
Akquisitionszeit	3,277 s
Verwendete Signale	Methanol: 3,33 s Essigsäure: 1,92 ppm TMSP- d_4 : 0,0 ppm (Referenz + Interne Standardsubstanz)

8.9 Rheologische Messungen

Probenvorbereitung

Es wurden 1 - 4 %ige Polysaccharidlösungen vorbereitet und im Rheometer geliert. Dabei wurde jeweils das doppelte Volumen Polysaccharidlösung vorbereitet, um das einfache Volumen quantitativ in die Apparatur pipettieren zu können. Für viskose Lösungen wurde eine Verdrängungspipette eingesetzt.

- 20/40/60/80 mg ($\cong 1/2/3/4$ %igen Gelen) Polysaccharid in 3,5 mL Glasvial einwiegen

- 1.960 μL 50 mM Natriumacetat-Puffer zugeben und über Nacht auf dem Schüttelinkubator hydratisieren
- gründlich vortexen
- 980 μL Polysaccharidlösung in Hohlzylinder der Messgeometrie pipettieren (Bei hoher Viskosität eignen sich Verdrängungspipetten)
- Oberen Zylinder auf etwa 50 mm Messhöhe ablassen
- Zugabe von 20 μL Lac für Lac-Gele bzw. je 10 μL H_2O_2 /POD für POD-Gele (Enzymlösungen zuvor auf 4 % kühlen)
 - Verwendete Lac-Konzentrationen ($\cong 0,08 \text{ U/mg}$ im Gel):
 - $c_1 \% = 0,04 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_2 \% = 0,08 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_3 \% = 0,12 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_4 \% = 0,16 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - Verwendete H_2O_2 -Konzentrationen ($\cong 0,06 \mu\text{mol/mg}$ im Gel)
 - $c_1 \% = 0,06 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - $c_2 \% = 0,12 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - $c_3 \% = 0,18 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - $c_4 \% = 0,24 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - Verwendete POD-Konzentrationen ($\cong 0,08 \text{ U/mg}$ im Gel)
 - $c_1 \% = 0,08 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_2 \% = 0,16 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_3 \% = 0,24 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_4 \% = 0,32 \text{ U}/\mu\text{L}$
- mit Pipettenspitze umrühren, Zylinder in Probe absenken und Messung sofort starten

Messung

Tab. 8.19: Verwendete Messparameter für die rheologischen Messungen der Gele.

Frequenz	1 Hz
Deformation	5 %
Messprogramm	3 min - 4 °C auf 25 °C - 117 min - 25 °C
Frequenztest	16 Hz auf 0,016 Hz (logarithmisch, 20 Messpunkte)
Amplitudentest	0,1 % auf 100 % (logarithmisch, 25 Messpunkte)

8.10 Diffusionsmessungen

Probenvorbereitung

- 10/20/30/40 mg (\cong 1/2/3/4%igen Gelen) Polysaccharid in 3,5 mL Glasvial einwiegen
- 980 μ L 50 mM Natriumacetat-Puffer zugeben und über Nacht auf dem Schüttelinkubator hydratisieren
 - Für Glucosemessungen wird eine 50 mg/mL $^{13}\text{C}_6$ -Glucoselösung in 50 mM Natriumacetat-Puffer verwendet
- gründlich vortexen
- Zugabe von 20 μ L Lac für Lac-Gele bzw. je 10 μ L H_2O_2 /POD für POD-Gele
 - Verwendete Lac-Konzentrationen (\cong 0,08 U/mg im Gel):
 - $c_1\% = 0,04 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_2\% = 0,08 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_3\% = 0,12 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_4\% = 0,16 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - Verwendete H_2O_2 -Konzentrationen (\cong 0,06 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ im Gel)
 - $c_1\% = 0,06 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - $c_2\% = 0,12 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - $c_3\% = 0,18 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - $c_4\% = 0,24 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$
 - Verwendete POD-Konzentrationen (\cong 0,08 U/mg im Gel)
 - $c_1\% = 0,08 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_2\% = 0,16 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_3\% = 0,24 \text{ U}/\mu\text{L}$
 - $c_4\% = 0,32 \text{ U}/\mu\text{L}$
- mit Enzymspatel umrühren und Lösung ggf. mit Verdrängungspipette (hochviskose Lösungen) sofort in vorbereitete Spritze ohne Stempel pipettieren
- Durch Hineindrücken des Spritzenstempels das sich bildende Gel schnell durch eine lange Kanüle in 5 mm NMR-Röhrchen überführen (Füllhöhe ca. 1 cm)
- über Nacht bei 25 °C ausgelieren. Für Lac-Gele muss das Röhrchen offen bleiben

Parameter der PFG-STE-NMR

Der Großteil der Messungen, u.a. sämtliche Glucosemessungen, wurden am 400 MHz-Gerät durchgeführt. Auf Grund eines Probenkopfdefekts mussten für die Untersuchung des Diffusionsverhaltens von Wasser und Glucose jedoch drei verschiedene NMR-Geräte verwendet werden. Die Analyse der Wasserdiffusion in Blindmessungen, d.h. Polysaccharidlösungen ohne Enzymzugabe fand am 200 MHz-Gerät statt. Die Wasserdiffusion in Gelen von Pkt1, Pkt5 und Pkt6 sowie AX4 und AX5 wurde am 300 MHz analysiert.

Tab. 8.20: Verwendete Messparameter für die Analyse der effektiven Diffusionskoeffizienten von Wasser (^1H) bzw. Glucose (^{13}C) mittels *Pulsed Field Gradient-Stimulated Echo* (PFG-STE)-NMR

	400 MHz	300 MHz	200 MHz
^1H -PFG-STE-NMR			
Pulsprogramm		diffSte	
Anzahl der Datenpunkte	8.192	8.192	8.192
Anzahl der Scans	4-8	8	8
Gradientenpulsdauer δ_p	2 ms	3 ms	3 ms
Gradientenschritte	16	16	16
Diffusionszeit		40 – 2.500 ms	
Repetitionszeit	6 – 10 s	6 s	7 s
^{13}C -PFG-STE-NMR			
Pulsprogramm	diffSte		-
Anzahl der Datenpunkte	8.192		-
Anzahl der Scans	64		-
Gradientenpulsdauer δ_p	2 ms		-
Gradientenschritte	16		-
Diffusionszeit Δ	40 – 600 ms		-
Repetitionszeit	6 s		-

9 Abbildungen und Tabellen

9.1 Tabellen

Tab. 9.1: Relative molare Verhältnisse von Arabinan- und Galactanoligosacchariden ohne Auftrennung von ferulasäurefreien und ferulasäurehaltigen Fraktionen von zwei Zuckerrübenpektinen sowie unlöslichen (UBS) und löslichen (LBS) Ballaststoffen von Amaranth- und Quinoasamen. Die Werte sind als Mittelwerte in mol% \pm R/2 (n = 2) angegeben. n.q., nicht quantifizierbar

Extraktionsbedingungen: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2

Oligosaccharid	Zuckerrübe		Amaranth		Quinoa	
	Pkt2	Pkt4	UBS	LBS	UBS	LBS
	Arabinanoligosaccharide					
A-2a	54,3 \pm 0,4	45,1 \pm 0,2	67,0 \pm 0,7	53,6 \pm 4,0	69,8 \pm 0,6	66,4 \pm 4,1
A-2b	-	-	2,3 \pm 0,1	6,9 \pm 1,5	-	-
A-3a	1,1 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	17,8 \pm 1,5	0,9 \pm 0,0	12,8 \pm 2,5
A-3b	4,2 \pm 0,1	46,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	-	1,2 \pm 0,0	-
A-4a	16,8 \pm 0,0	7,0 \pm 0,2	15,5 \pm 0,3	15,1 \pm 2,8	14,2 \pm 0,6	12,1 \pm 1,4
A-4b	1,3 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	n.q.	0,8 \pm 0,0	-
A-5a	1,7 \pm 0,0	-	1,2 \pm 0,0	2,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
A-5b	-	-	n.q.	-	1,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1
A-5c	-	-	-	-	3,2 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1
A-5d	-	-	-	-	-	-
A-6a	4,8 \pm 0,1	-	2,4 \pm 0,1	n.q.	2,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
A-6b	3,8 \pm 0,2	-	-	-	-	-
A-7a	0,6 \pm 0,0	-	-	-	-	-
A-7b	11,5 \pm 0,0	-	6,7 \pm 0,1	1,9 \pm 0,4	5,7 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
	Galactanoligosaccharide					
G-2a	96,5 \pm 0,4	97,9 \pm 0,1	100,0	100,0	-	-
G-2b	3,5 \pm 0,4	2,1 \pm 0,1	-	-	-	-

Tab. 9.2: Relative molare Verhältnisse von ferulasäurehaltigen und ferulasäurefreien Arabinanoligosacchariden nach 24 und 48stündiger Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Arabinanase. Die Werte sind als Mittelwerte in mol% $\pm R/2$ ($n = 2$) angegeben. Extraktionsbedingung: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2

	A-2a	A-3a	A-3b	A-4a	A-4b	A-5a	A-6a	A-6b	A-7a	A-7b
24 h Inkubation										
ferulasäurefrei	57,8 $\pm 0,8$	1,7 $\pm 0,0$	3,7 $\pm 0,1$	16,6 $\pm 0,2$	1,4 $\pm 0,0$	1,7 $\pm 0,0$	4,1 $\pm 0,1$	2,6 $\pm 0,1$	0,5 $\pm 0,0$	10,0 $\pm 0,3$
ferulasäurehaltig	16,7 $\pm 0,7$	27,8 $\pm 0,0$	6,7 $\pm 0,1$	14,5 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$	1,4 $\pm 0,0$	2,3 $\pm 0,1$	7,7 $\pm 1,0$	3,9 $\pm 0,1$	19,1 $\pm 0,4$
48 h Inkubation										
ferulasäurefrei	53.4 ± 0.5	0.5 ± 0.0	7.7 ± 0.0	17.3 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	9.6 ± 0.1
ferulasäurehaltig	29.1 ± 1.0	19.5 ± 0.2	10.0 ± 0.2	10.8 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.5 ± 0.1	2.8 ± 0.3	9.8 ± 0.2	3.1 ± 0.3	12.7 ± 0.2

Tab. 9.3: Relative molare Verhältnisse von Arabinan- und Galactanoligosacchariden ohne Auftrennung von ferulasäurefreien und ferulasäurehaltigen Fraktionen der extrahierten Zuckerrübenpektine. Die Werte sind als Mittelwerte in mol% $\pm R/2$ ($n = 2$) angegeben. Der besseren Übersicht wegen sind die Daten von Pkt2 und Pkt4 erneut (s. Tab. 9.1) dargestellt. Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

	Pkt1	Pkt2	Pkt3	Pkt4	Pkt5	Pkt6
Oligosaccharid	Arabinanoligosaccharide					
A-2a	54,2 $\pm 1,0$	54,3 $\pm 0,4$	50,0 $\pm 0,4$	45,1 $\pm 0,2$	55,4 $\pm 0,1$	53,9 $\pm 0,1$
A-3a	0,8 $\pm 0,1$	1,1 $\pm 0,0$	1,1 $\pm 0,0$	1,1 $\pm 0,1$	1,0 $\pm 0,1$	1,0 $\pm 0,1$
A-3b	2,8 $\pm 0,5$	4,2 $\pm 0,1$	10,8 $\pm 0,5$	46,1 $\pm 0,1$	3,0 $\pm 0,0$	4,8 $\pm 0,1$
A-4a	17,1 $\pm 0,1$	16,8 $\pm 0,0$	16,0 $\pm 0,1$	7,0 $\pm 0,2$	17,0 $\pm 0,1$	16,6 $\pm 0,0$
A-4b	1,5 $\pm 0,0$	1,3 $\pm 0,1$	1,4 $\pm 0,1$	0,7 $\pm 0,1$	1,5 $\pm 0,0$	1,4 $\pm 0,0$
A-5a	1,5 $\pm 0,0$	1,7 $\pm 0,0$	1,6 $\pm 0,1$	-	1,7 $\pm 0,0$	1,6 $\pm 0,0$
A-6a	5,4 $\pm 0,2$	4,8 $\pm 0,1$	4,4 $\pm 0,1$	-	4,8 $\pm 0,0$	5,0 $\pm 0,0$
A-7a	0,6 $\pm 0,0$	0,6 $\pm 0,0$	0,5 $\pm 0,0$	-	0,6 $\pm 0,0$	0,6 $\pm 0,0$
A-6b	3,6 $\pm 0,6$	3,8 $\pm 0,2$	6,4 $\pm 0,2$	-	3,0 $\pm 0,0$	3,9 $\pm 0,1$
A-7b	12,5 $\pm 0,2$	11,5 $\pm 0,0$	7,7 $\pm 0,3$	-	12,1 $\pm 0,1$	11,2 $\pm 0,0$
	Galactanoligosaccharide					
G-2a	96,7 $\pm 0,2$	96,5 $\pm 0,4$	97,1 $\pm 0,2$	97,9 $\pm 0,1$	96,6 $\pm 0,1$	96,8 $\pm 0,1$
G-2b	3,3 $\pm 0,2$	3,5 $\pm 0,4$	2,9 $\pm 0,2$	2,1 $\pm 0,1$	3,4 $\pm 0,1$	3,2 $\pm 0,1$

Tab. 9.4: Aminosäureprofile der extrahierten Arabinoxylane nach Bestimmung mittels *High Performance Liquid Chromatography* gekoppelt mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Werte sind als Mittelwerte in $\% \pm s_{x0}$ ($n = 3$) angegeben und auf 100 % normiert. Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

	AX1	AX2	AX3	AX4	AX5
Hydroxyprolin	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0
Asparaginsäure	4,2 ± 0,0	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1	5,5 ± 1,7
Glutaminsäure	9,0 ± 0,0	8,6 ± 0,4	8,2 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,78 ± 1,6
Serin	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1	5,7 ± 0,0	5,4 ± 0,0	6,0 ± 1,4
Glycin	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,4	7,9 ± 0,4	7,3 ± 0,1	7,6 ± 1,7
Histidin	5,0 ± 0,0	5,4 ± 0,2	5,2 ± 0,0	4,9 ± 0,1	4,6 ± 0,7
Arginin	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,0	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Threonin	4,8 ± 0,0	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,0	5,5 ± 0,4
Alanin	8,5 ± 0,02	7,8 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,6 ± 0,0	9,9 ± 2,5
Prolin	21,2 ± 0,1	21,8 ± 0,0	21,1 ± 0,3	20,4 ± 0,1	18,4 ± 4,3
Cystein	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,2
Tyrosin	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,1
Valin	8,6 ± 0,0	8,5 ± 0,2	8,6 ± 0,0	8,5 ± 0,0	8,1 ± 0,1
Methionin	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Lysin	3,4 ± 0,0	3,7 ± 0,3	3,6 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,2 ± 1,1
Isoleucin	3,2 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,0	3,0 ± 0,0
Leucin	10,5 ± 0,0	9,8 ± 0,2	9,1 ± 0,1	9,7 ± 0,1	9,3 ± 1,8
Phenylalanin	3,1 ± 0,0	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,0	2,8 ± 0,0	2,6 ± 0,5

9.2 Abbildungen

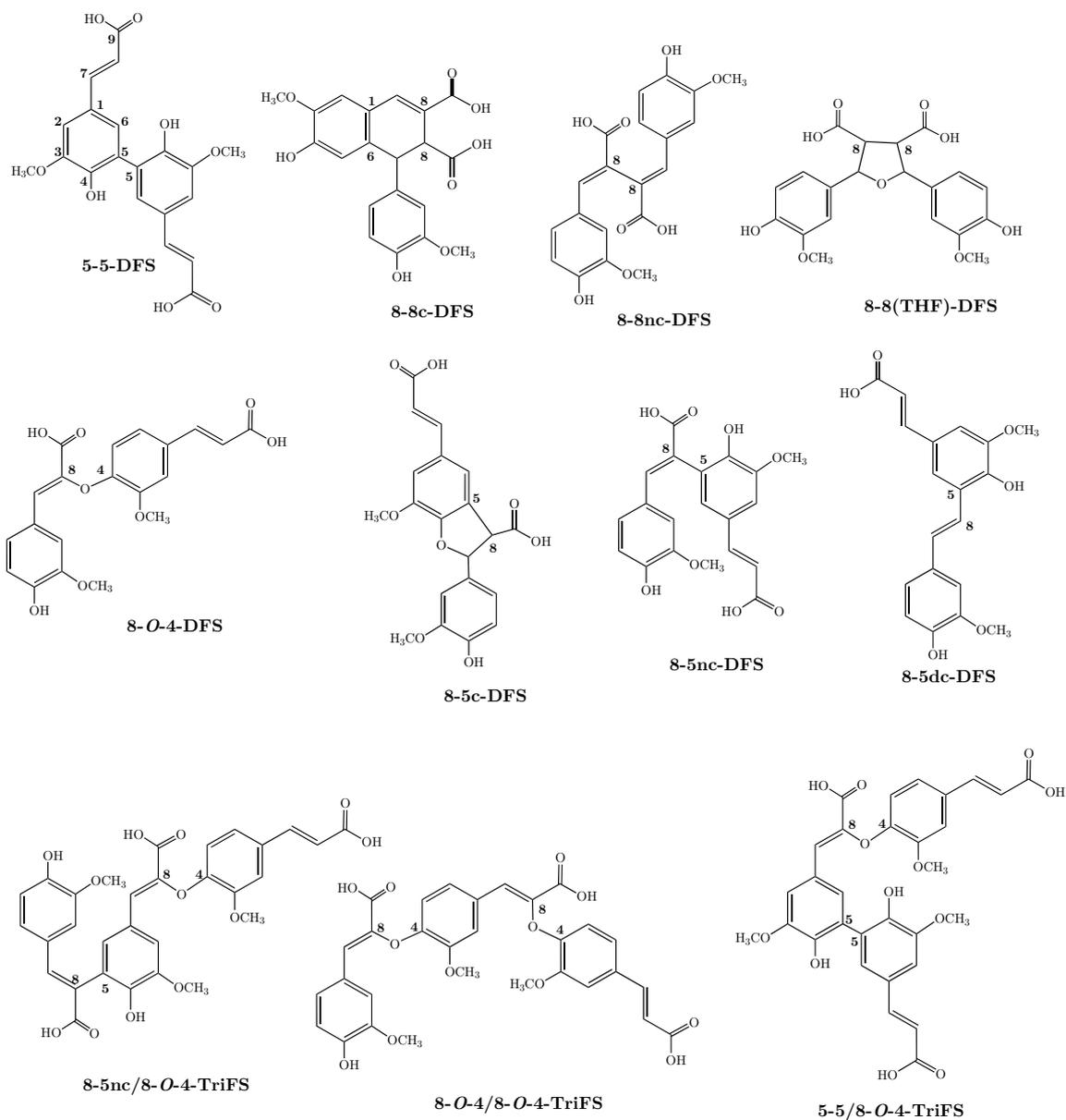


Abb. 9.1: Strukturen von Dehydrodi-(DFS) und -tri (TriFS)-ferulasäuren, die in dieser Arbeit in Arabinoxylenen und Pektinen quantifiziert wurden (Bunzel, 2010). c, zyklisch; nc, nicht-zyklisch; dc, decarboxyliert; THF, Tetrahydrofuran.

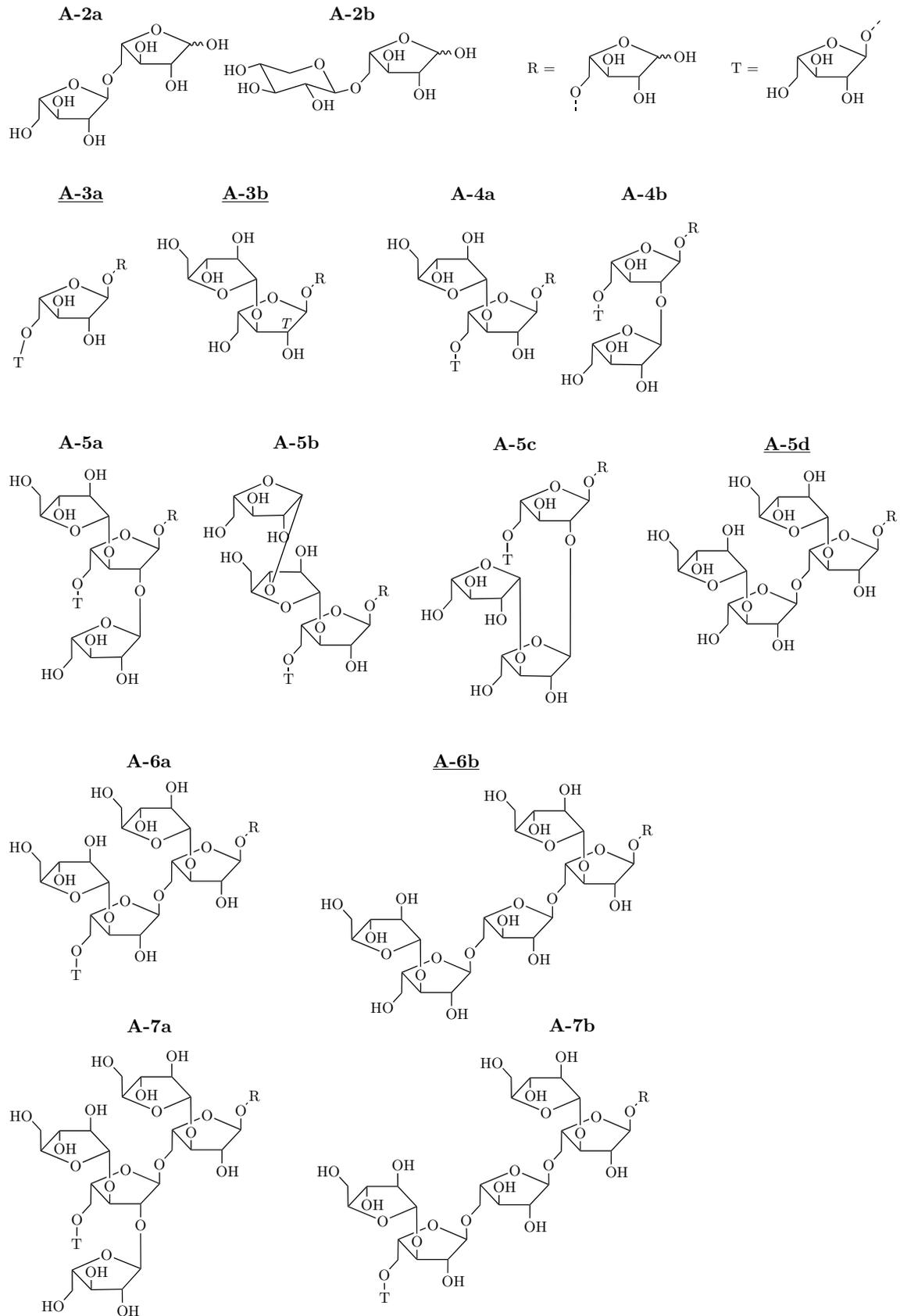


Abb. 9.2: Identifizierte und quantifizierte Arabinanligosaccharide nach enzymatischem Verdau mit *endo*- α -(1 \rightarrow 5)-Arabinanase (Wefers, 2016). Nebenstrukturen, die auf Nebenaktivitäten des Enzyms sowie unvollständigen Verdau zurückgeführt werden, sind unterstrichen.

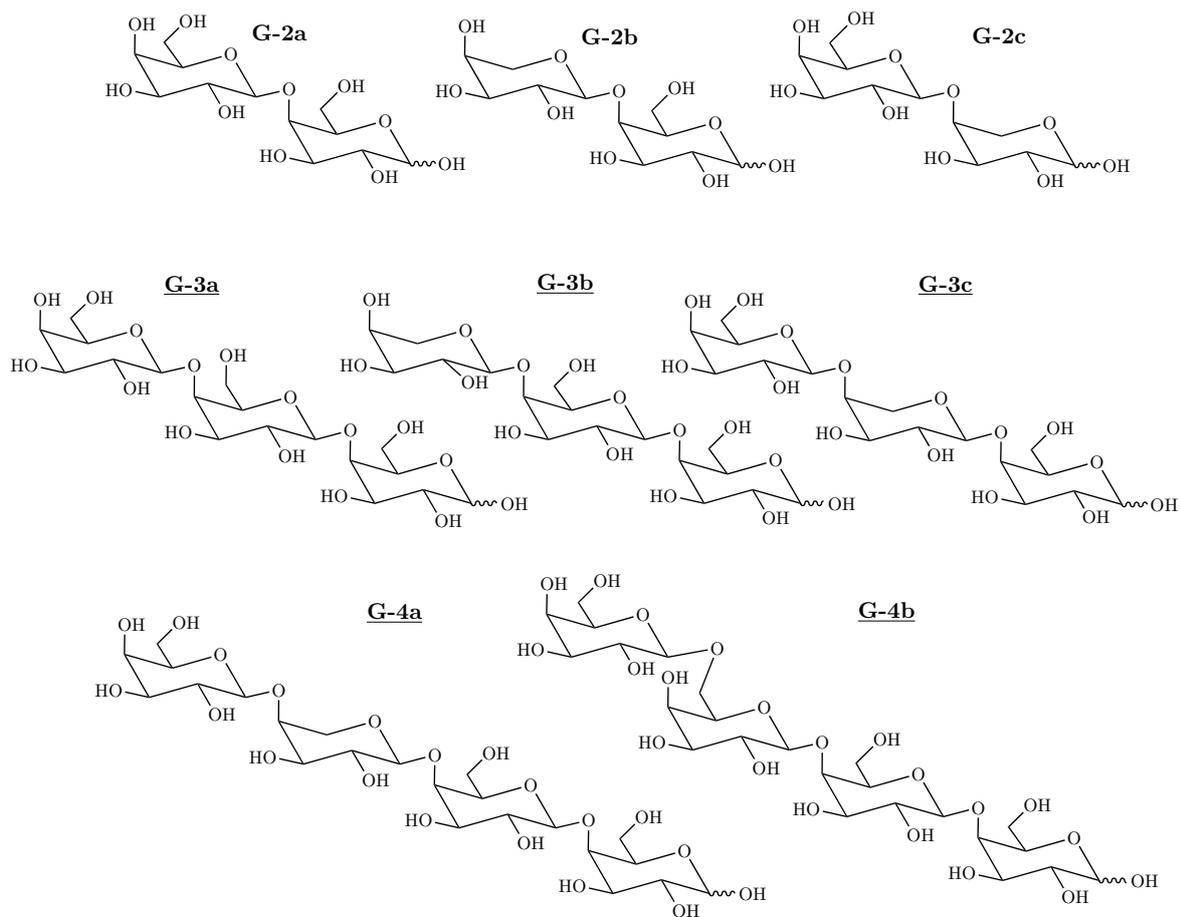


Abb. 9.3: Identifizierte und quantifizierte Galactanoligosaccharide nach enzymatischem Verdau mit *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactananase (Wefers, 2016). Das Tetrasaccharid G-4b wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Daniel Wefers aus löslichem Galactan aus Kartoffeln der Firma Megazyme mit dem Enzymgemisch Driselase isoliert (Wefers & Bunzel, 2016). Nebenstrukturen, die auf Nebenaktivitäten der Enzyme sowie unvollständigen Verdau zurückgeführt werden, sind unterstrichen.

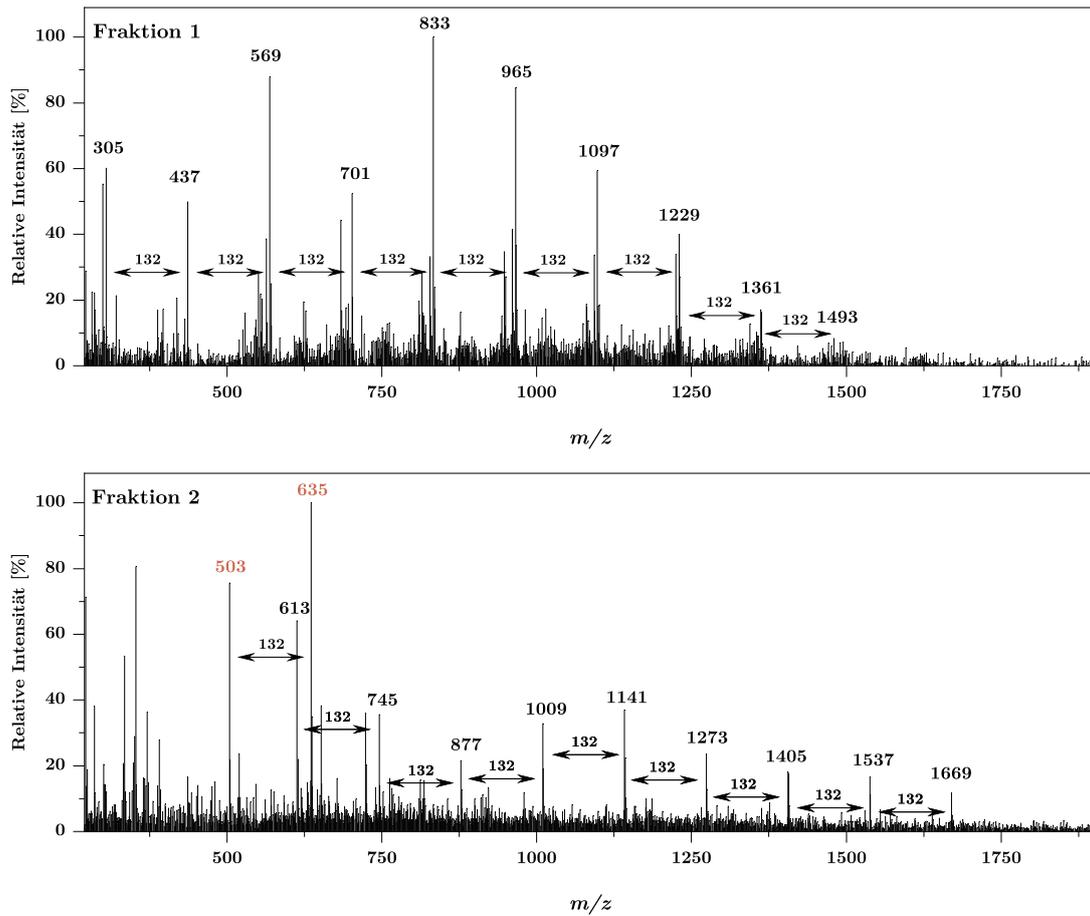


Abb. 9.4: ESI(+)-MS Spektren der bei Trennung auf einer PhenylHexyl-Trennsäule präparativ gesammelten Fraktionen 1 und 2 des *endo*- α -(1 \rightarrow 5)-Arabinanase-Hydrolysats von Pkt2. Dargestellt sind die Spektren bei direkter Injektion der Fraktionen in die ESI-Quelle. In schwarz sind die zugeordneten Signale bekannter ferulasäurehaltiger und ferulasäurefreier Pentose-Oligosaccharide (Vgl. Tab. 8.16) dargestellt, während nicht zugeordnete Signale rot gefärbt sind.

Extraktionsbedingung: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2

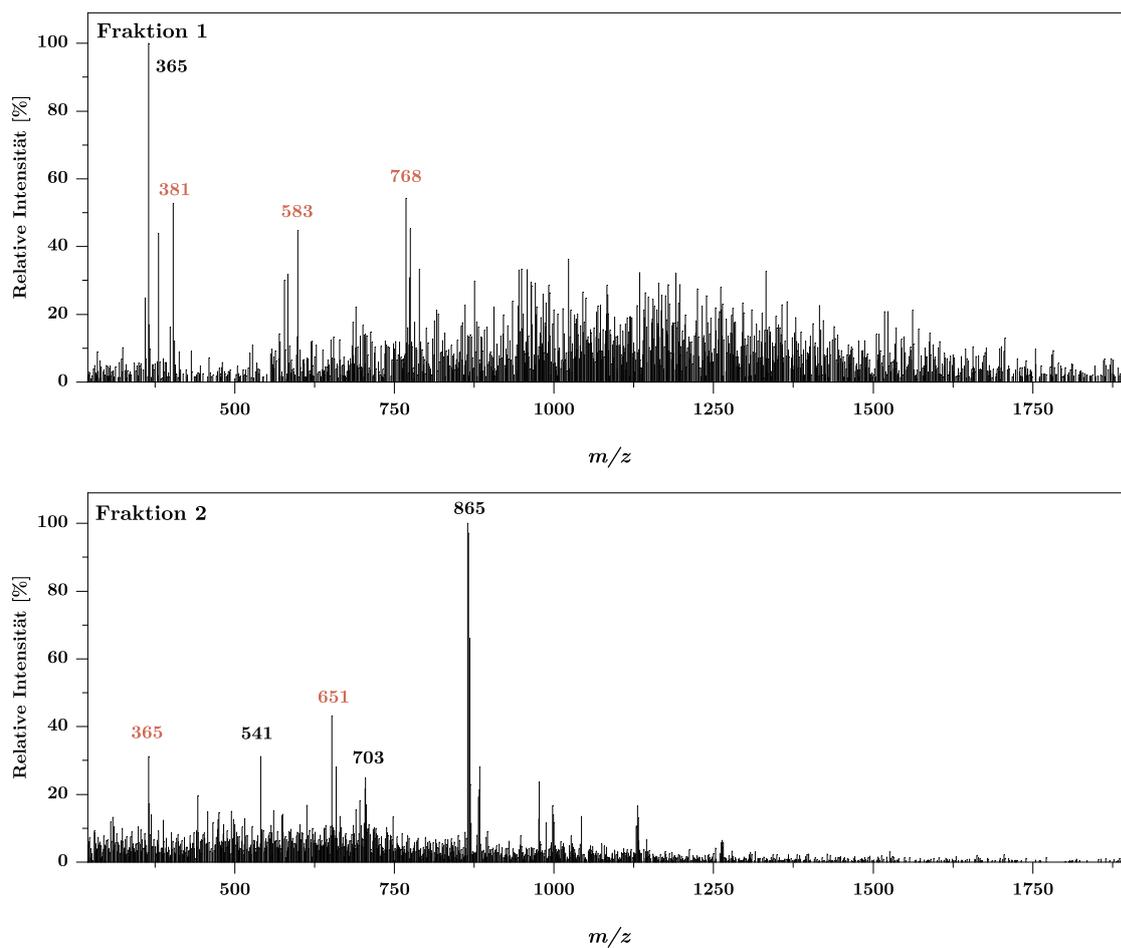


Abb. 9.5: ESI(+)-MS Spektren der bei Trennung auf einer PhenylHexyl-Trennsäule präparativ gesammelten Fraktionen 1 und 2 des *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-Galactanase-Hydrolysats von Pkt4. Dargestellt sind die Spektren bei direkter Injektion der Fraktionen in die ESI-Quelle. In schwarz sind die zugeordneten Signale bekannter ferulasäurehaltiger und ferulasäurefreier Hexose-Oligosaccharide (Vgl. Tab. 8.16) dargestellt, während nicht zugeordnete Signale rot gefärbt sind.

Extraktionsbedingung: Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2

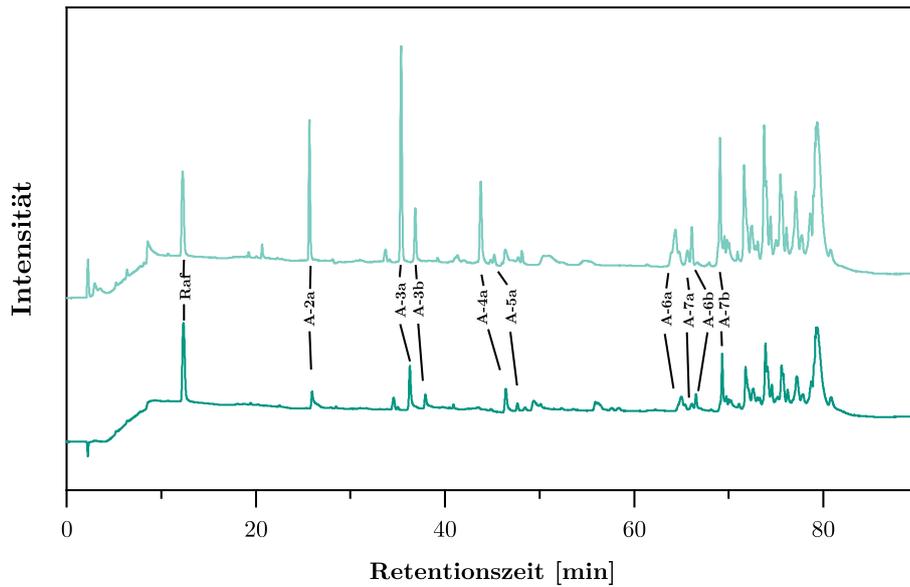


Abb. 9.6: Chromatogramme (HPAEC-PAD) der vorseparierten ferulasäurehaltigen Oligosaccharide nach *endo*-Arabinanase-Verdau von Pkt2 mit (oben) und ohne (unten) vorherige Behandlung mit *trans*-Ferulasäureesterasen. Die Strukturen der genannten Arabinan-Oligosaccharide sind in Abb. 9.2 dargestellt. Raf, Raffinose
Extraktionsbedingung: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2

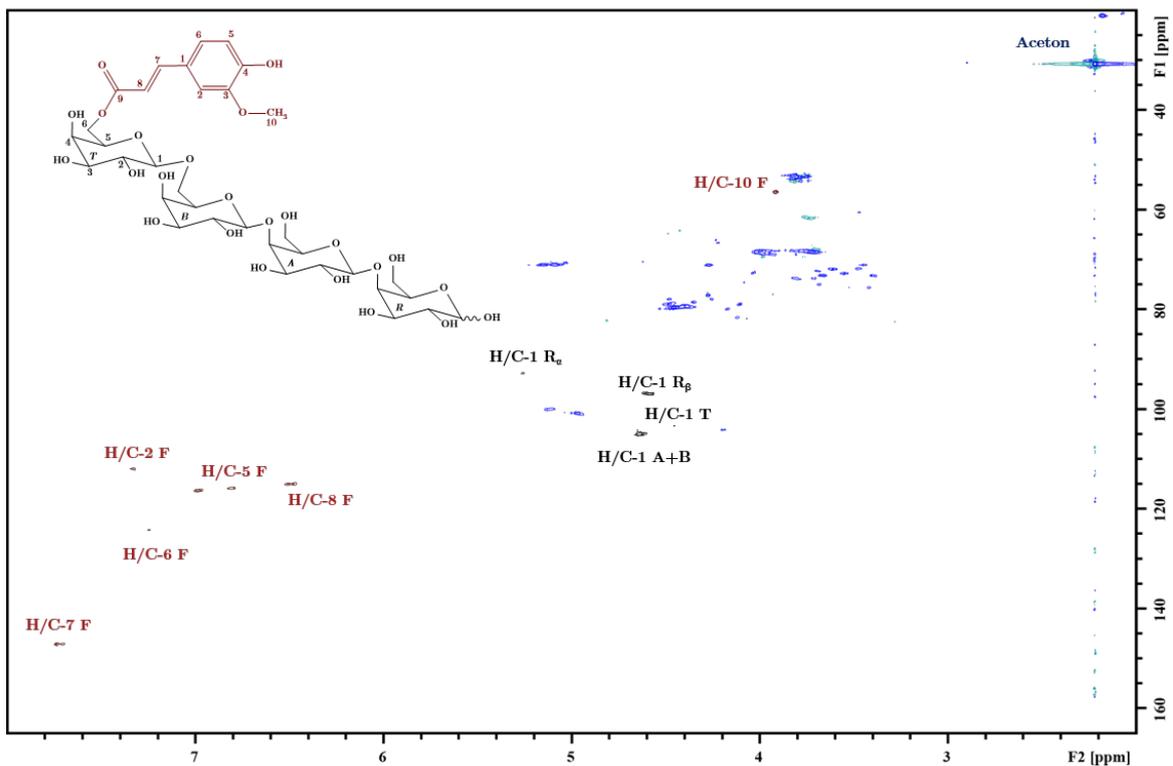


Abb. 9.7: 500 MHz $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ -Hetero Single Quantum Coherence-Spektrum der ferulasäurehaltigen Galactanoligosaccharidfraktion von Pkt4 mit einem Anteil von ca. 85 % ferulasäurehaltigem G-4b. Die Spektren wurden in D_2O aufgenommen und gegen Aceton referenziert. Die Signale der *trans*-Ferulasäure sind rot gefärbt, während die identifizierten Signale der anomeren Protonen der Galaktosen schwarz dargestellt sind.
Extraktionsbedingung: Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2

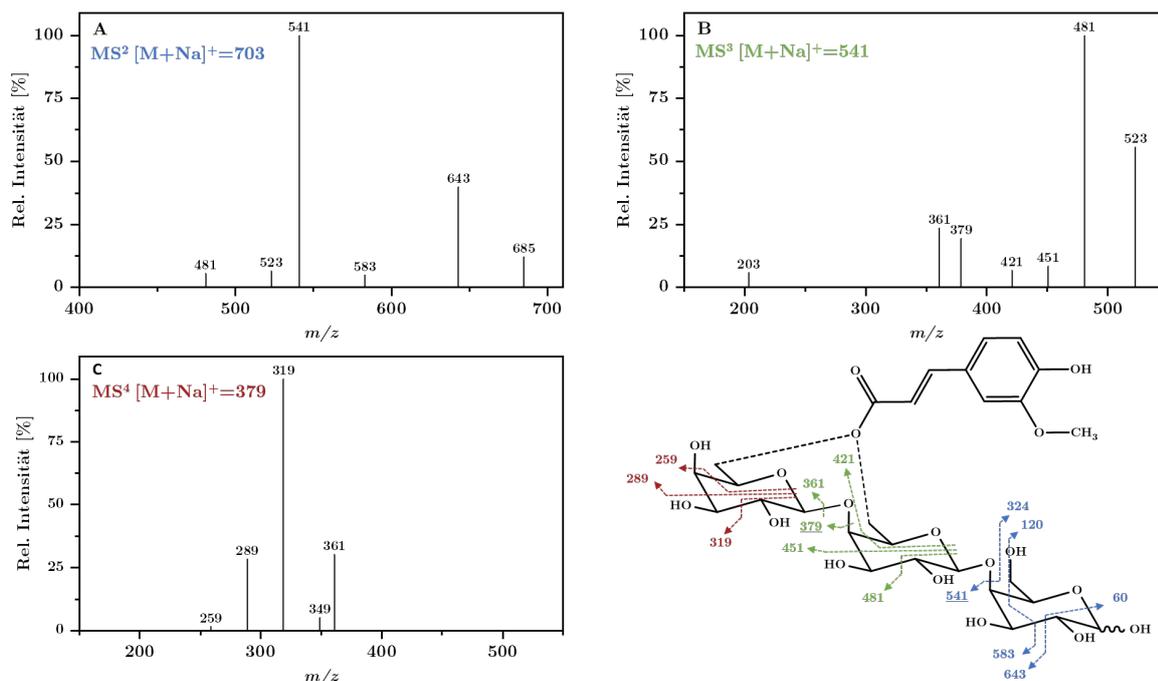


Abb. 9.8: HPLC-ESI(+)-MSⁿ-Spektren des ferulasäurehaltigen Galactotrisaccharids G-3a mit m/z 703 ($[M+Na]^n$). Das an Position O6 mit *trans*-Ferulasäure substituierte Monosaccharid konnte nicht eindeutig bestimmt werden. m/z , Masse-Ladungs-Verhältnis.

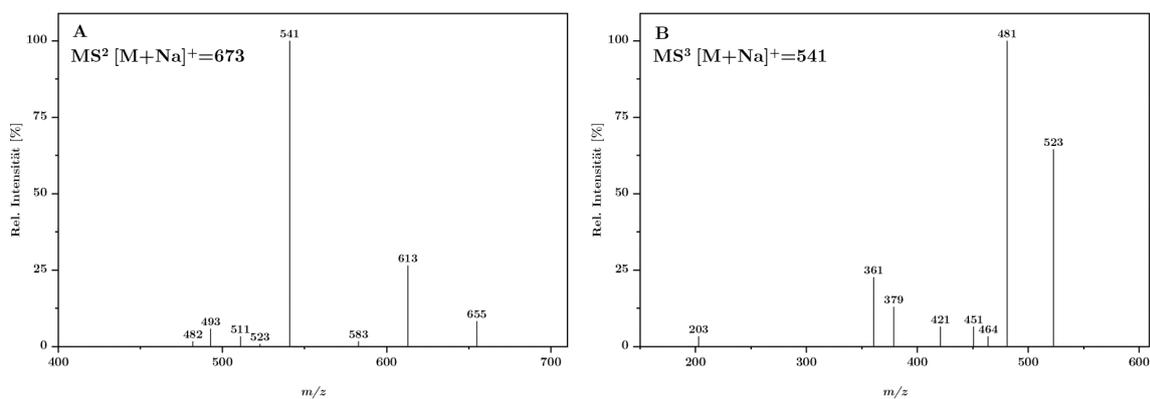


Abb. 9.9: HPLC-ESI(+)-MSⁿ-Spektren eines ferulasäurehaltigen Galactotrisaccharids mit m/z 673 ($[M+Na]^n$). Die exakte Struktur des Polysaccharids sowie das an Position O6 mit *trans*-Ferulasäure substituierte Monosaccharid konnte nicht eindeutig bestimmt werden. m/z , Masse-Ladungs-Verhältnis.

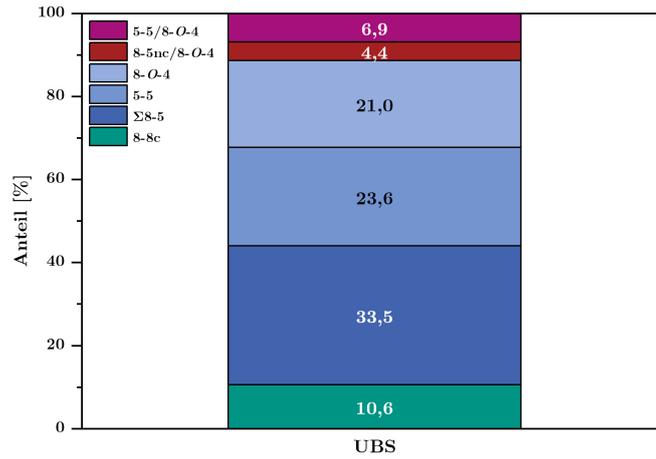


Abb. 9.10: Prozentuale Anteile der einzelnen Dehydrodiferulasäuren und Dehydrotriferulasäuren an der Gesamtsumme der enthaltenen Oligoferulasäuren in unlöslichen Ballaststoffen (UBS) aus Popcornmais. nc, nicht-zyklisch; c, zyklisch

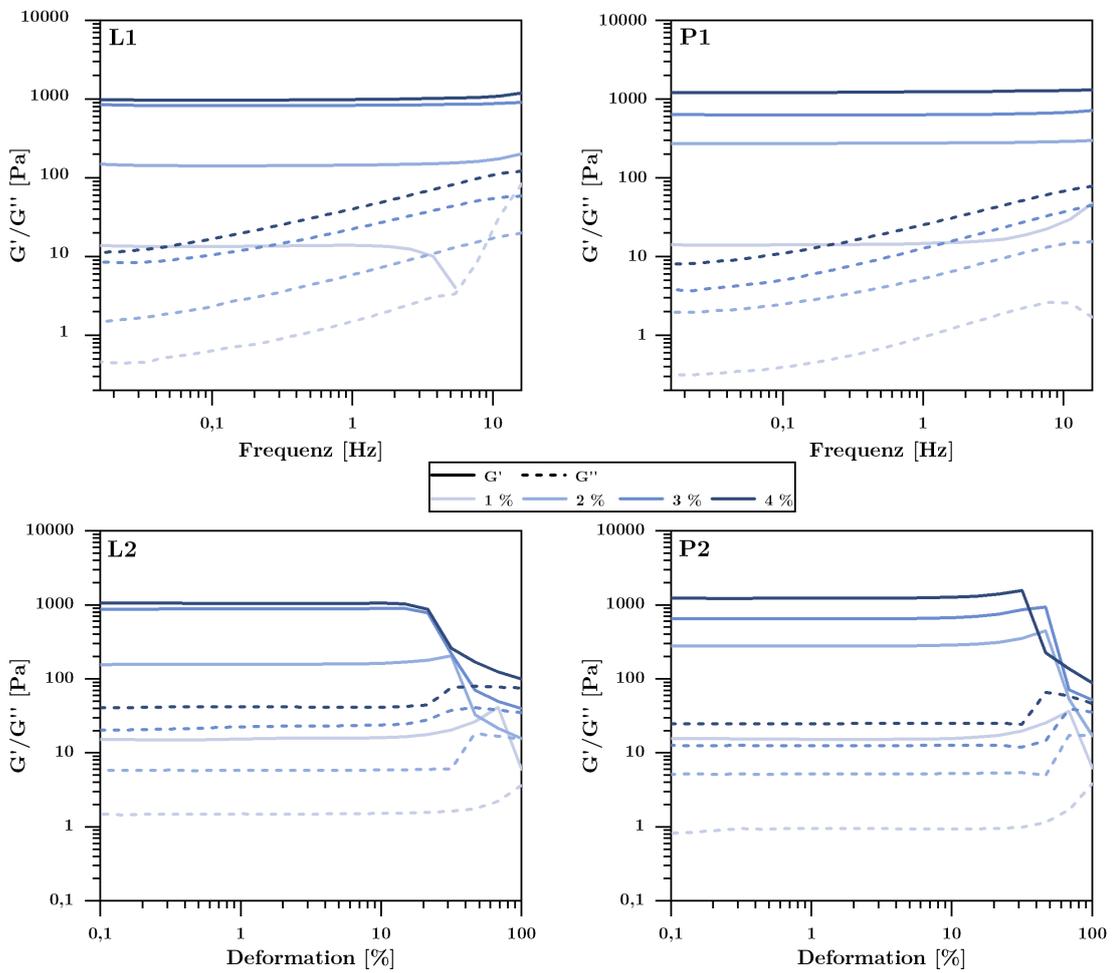


Abb. 9.11: Frequenz- (5 %, 0,016 – 16 Hz, oben) und Amplitudentests (0,01 – 100 %, 1 Hz, unten) von 1 – 4%igen Gelen (w/v) von Pkt2 nach einer Gelierzeit von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase/O₂ (L1+L2) bzw. Peroxidase/H₂O₂ (P1+P2). G' , Speichermodul; G'' , Verlustmodul

Extraktionsbedingung: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2

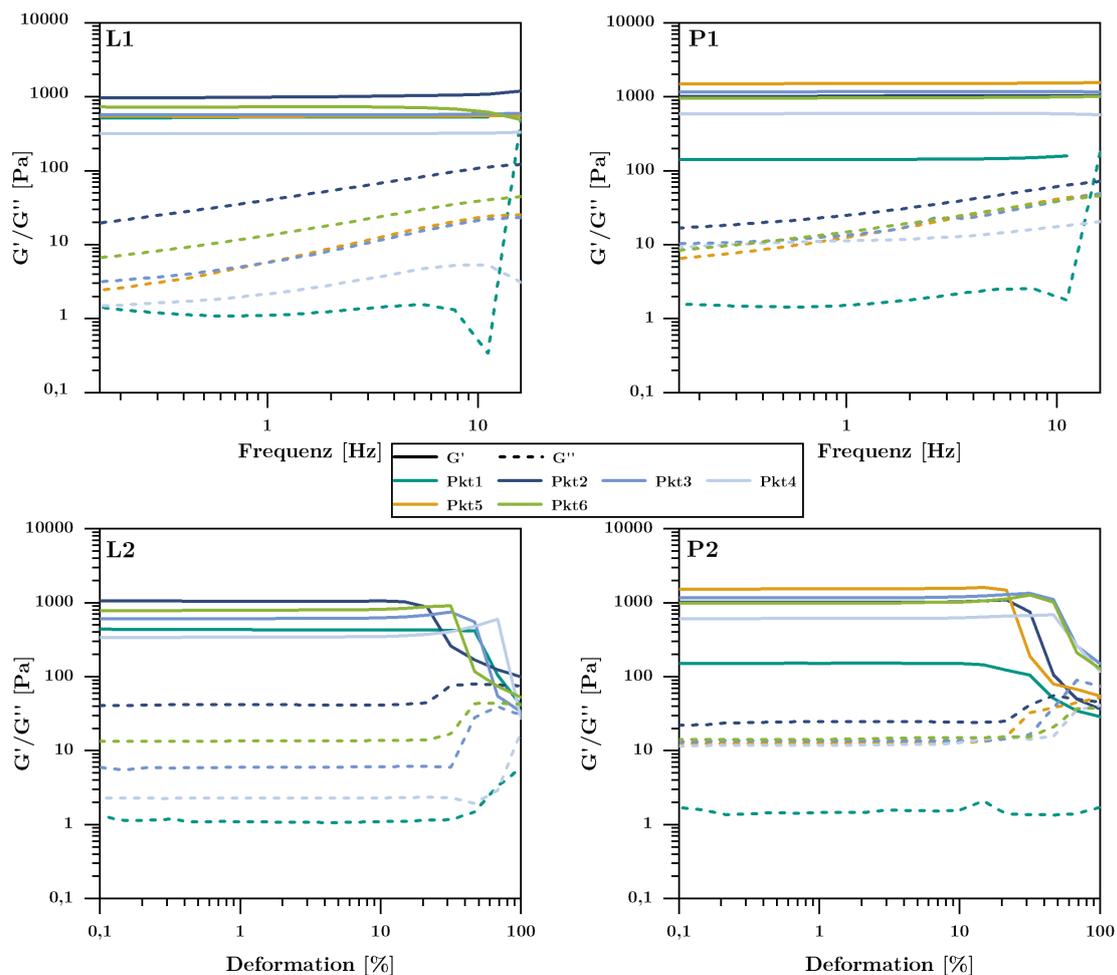


Abb. 9.12: Frequenz- (5 %, 0,016 – 16 Hz, oben) und Amplitudentests (0,01 – 100 %, 1 Hz, unten) von 4%igen Gelen (w/v) der extrahierten Pektine nach einer Gelierzeit von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase/O₂ (L1+L2) bzw. Peroxidase/H₂O₂ (P1+P2). G' , Speichermodul; G'' , Verlustmodul

Extraktionsbedingungen: Pkt1, 2,1 bar, 121 °C, pH 6,0; Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; Pkt3, 4 h, 80 °C, pH 2; Pkt4, 16 h, 80 °C, pH 2; Pkt5, 4 h, 80 °C, pH 3; Pkt6, 30 min Ultraschall, 1 h, 80 °C, pH 2

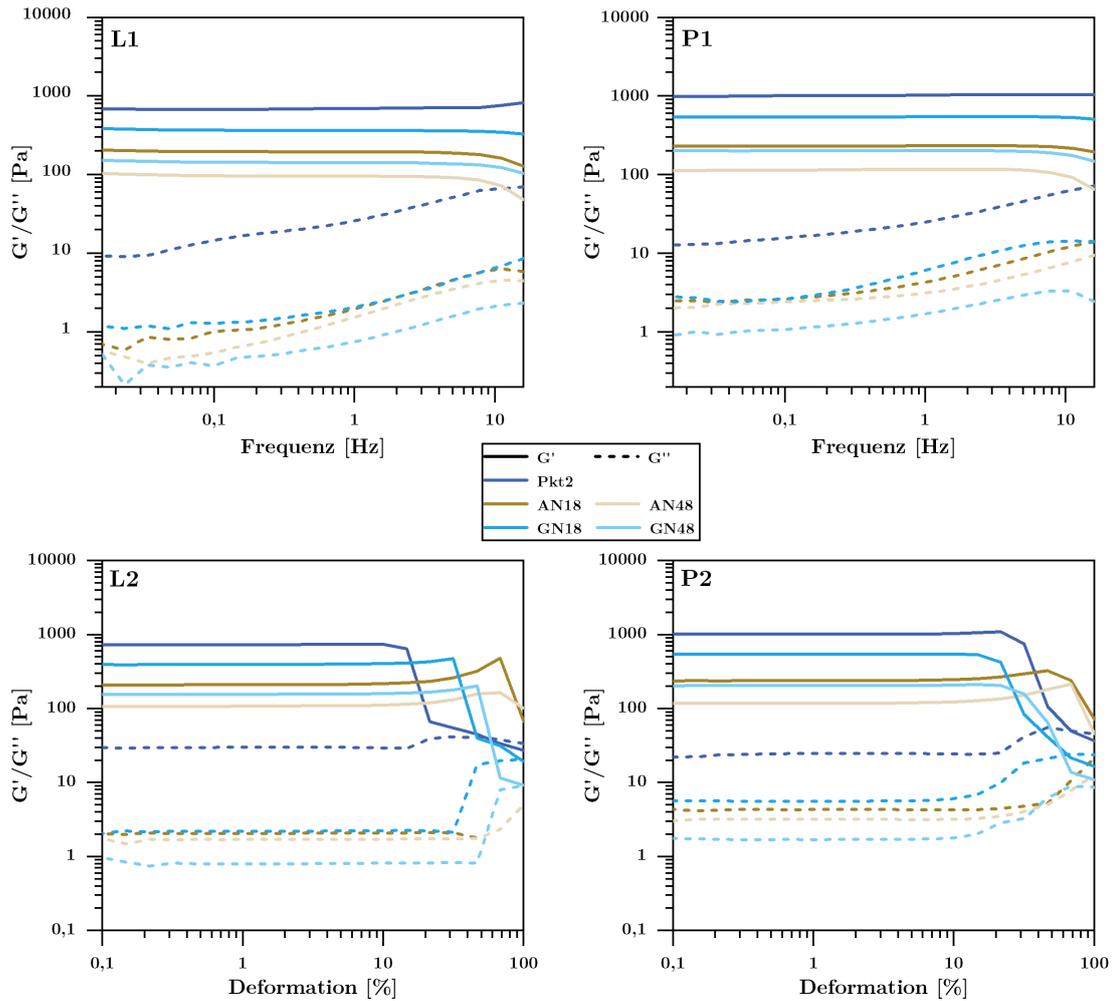


Abb. 9.13: Frequenz- (5 %, 0,016 – 16 Hz, oben) und Amplitudentests (0,01 – 100 %, 1 Hz, unten) von 4%igen Gelen (w/v) der enzymatisch modifizierten Pektine nach einer Gelierzeit von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase/O₂ (L1+L2) bzw. Peroxidase/H₂O₂ (P1+P2). G' , Speichermodul; G'' , Verlustmodul
AN18 und AN48 sind Resultat eines 18 bzw. 48stündigen Verdaus von Pkt2 mit *exo*-Arabinofuranosidase. GN18 und GN48 wurden durch 18 bzw. 48stündige Inkubation von Pkt2 mit *endo*-Galactanase erhalten.

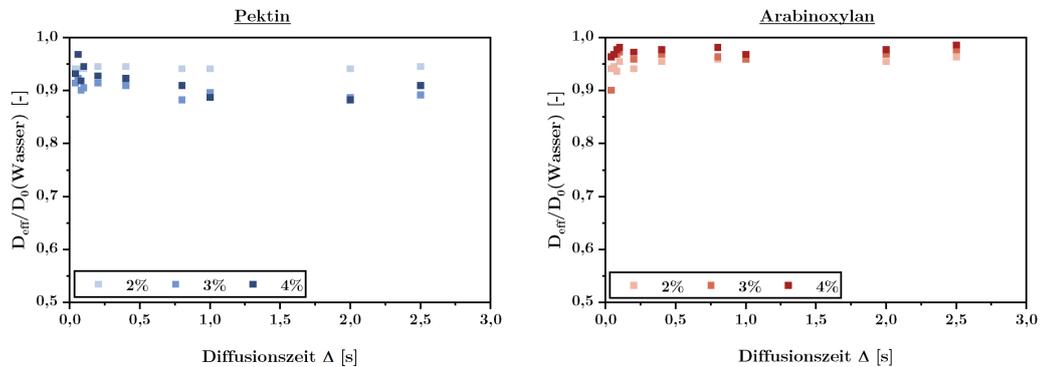


Abb. 9.14: Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser in 2 – 4%igen Lösungen (w/v) von Pkt2 (links) und AX2 (rechts) in 50 mM Natriumacetatpuffer. Extraktionsbedingungen: Pkt2, 1 h, 80 °C, pH 2; AX2, 4 h, 30 °C, 0,25M NaOH

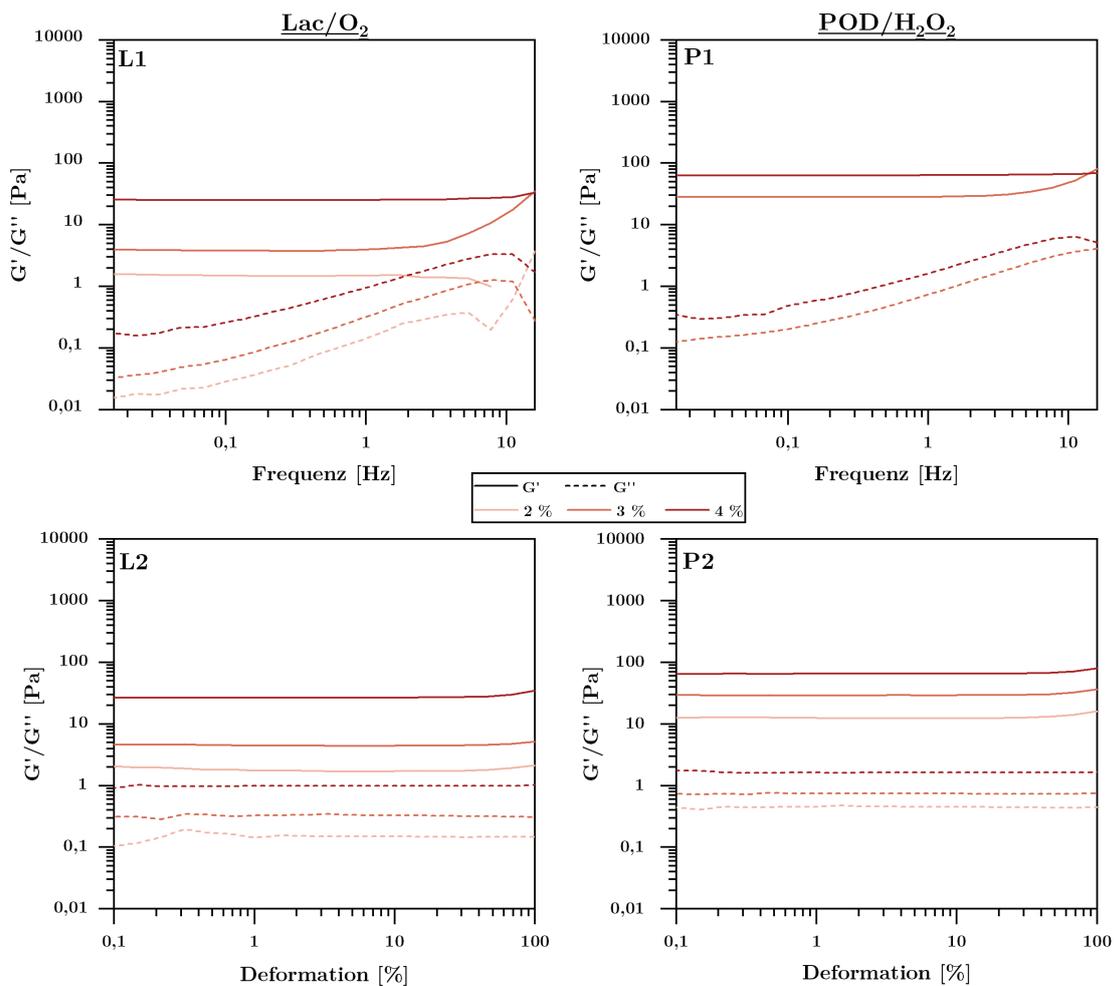


Abb. 9.15: Frequenz- (5%, 0,016 – 16 Hz, oben) und Amplitudentests (0,01 – 100%, 1 Hz, unten) von 1 – 4%igen Gelen (w/v) von AX2 nach einer Gelierzeit von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase/O₂ (L1+L2) bzw. Peroxidase/H₂O₂ (P1+P2). G' , Speichermodul; G'' , Verlustmodul

Extraktionsbedingung: 4 h, 30 °C, 0,25 M NaOH

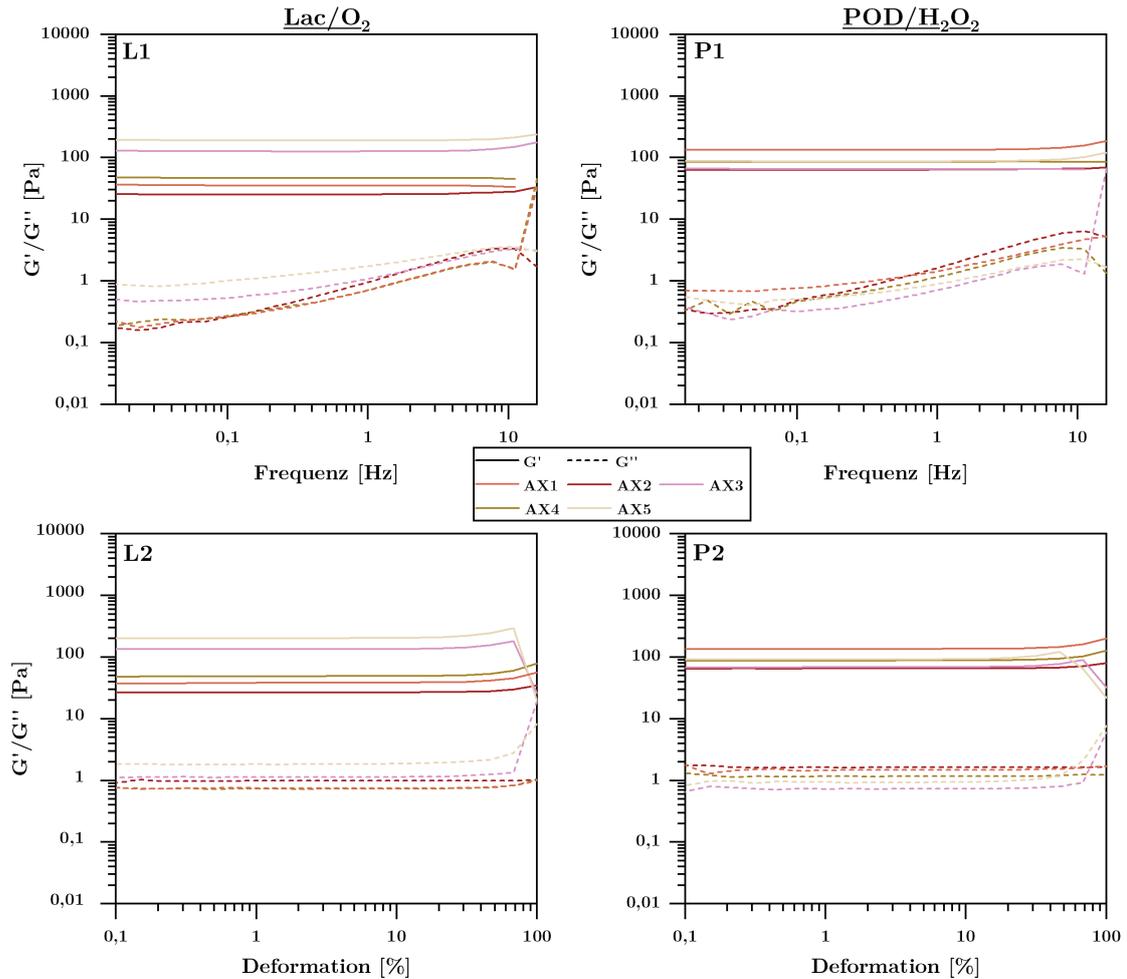


Abb. 9.16: Frequenz- (5 %, 0,016 – 16 Hz, oben) und Amplitudentests (0,01 – 100 %, 1 Hz, unten) von 4%igen Gelen (w/v) der extrahierten Arabinoxylane nach einer Gelierzeit von 2 h bei 25 °C nach Zugabe von Laccase/ O_2 (L1+L2) bzw. Peroxidase/ H_2O_2 (P1+P2). G' , Speichermodul; G'' , Verlustmodul

Extraktionsbedingungen (in 0,25 M NaOH): AX1, 4 h, 25 °C; AX2, 4 h, 30 °C; AX3, 1,5 h, 30 °C; AX4, 30 min Ultraschall in Lauge, 1 h, 30 °C; AX5, 30 min Ultraschall in Wasser, 1 h, 30 °C

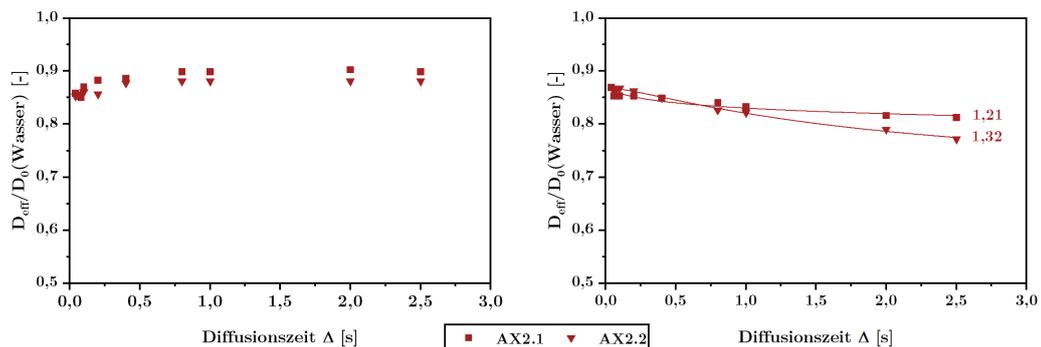


Abb. 9.17: Zur Reproduzierbarkeit der Arabinoxylangele: Relative effektive Diffusionskoeffizienten ($D_{eff}/D_0(\Delta)$) von Wasser in mehrfach hergestellten 4%igen Gelen (w/v) von AX2 nach Zugabe von Laccase (links) bzw. Peroxidase/ H_2O_2 (rechts). Linien repräsentieren den Fit durch das Tortuositätsmodell, deren Wert τ_{Tort} jeweils rechts angegeben ist.

Extraktionsbedingung: AX2, 4 h, 30 °C, 0,25 M NaOH

10 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Junker, F.; Michalski, K.; Guthausen, G.; Bunzel, M. (2021). Characterization of covalent, feruloylated polysaccharide gels by pulsed field gradient-stimulated echo (PFG-STE)-NMR, *Carbohydrate Polymers*, 267: 1-10.

Steck, J.; Junker, F.; Eichhöfer, H.; Bunzel, M. (2022). Chemically different but often mistaken phenolic polymers of food plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70 (37): 11704-11714.

Vorträge auf Fachtagungen

Junker, F.; Bunzel, M. (2023). Molekulare Charakterisierung kovalenter Pektin-gele, *Regionalverbandstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Karlsruhe.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

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

Junker, F.; Michalski, K.; Guthausen, G.; Bunzel, M. (2021). Charakterisierung kovalenter, ferulasäurehaltiger Polysaccharidgele mittels Pulsed field gradient-stimulated echo (PFG-STE)-NMR. 49. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Wuppertal, Germany.

Junker, F.; Bunzel, M. (2022). Profilingmethode zur strukturellen Charakterisierung ferulasäurehaltiger Arabinane und Galactane. 50. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg, Germany.