

Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Analyse von Oligosacchariden in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Daniela Simone Schäfer

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
 2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
- Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2023

*„Darin besteht das Wesen der Wissenschaft.
Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte.
Dann sieht man nach, ob es der Fall ist
und im Allgemeinen ist es nicht der Fall.“*

- Bertrand Russell

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 02.11.2023

Daniela Simone Schäfer

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Futtermittel in der Geflügelernährung.....	2
1.1.1	Mais (<i>Zea mays</i>).....	2
1.1.2	Sojabohne (<i>Glycine max</i> (L.) MERR.)	3
1.2	Kohlenhydrate in Futtermitteln	3
1.2.1	Di- und Oligosaccharide	4
1.2.2	Stärke.....	6
1.2.3	Nicht-Stärke-Polysaccharide.....	6
1.2.3.1	Aufbau der pflanzlichen Zellwand	6
1.2.3.2	Cellulose.....	7
1.2.3.3	Hemicellulosen.....	8
1.2.3.4	Pektine	12
1.3	Verdauungstrakt von Hühnergeflügel	14
1.3.1	Aufbau des Verdauungstrakts	15
1.3.2	Verdauung von Kohlenhydraten	17
1.3.3	Mikrobiom und mikrobieller Verdau von Kohlenhydraten	18
1.3.3.1	Zusammensetzung des Mikrobioms	19
1.3.3.2	Mikrobielle Enzyme zum Abbau von Nicht-Stärke-Polysacchariden....	21
1.4	Industrielle Hühnergeflügelmast und Futtereffizienz	23
1.4.1	Antinutritive und nutritive Effekte von Nicht-Stärke-Polysacchariden.....	24
1.4.2	Xylanasen.....	24
1.4.3	Wirkungsmechanismen von Xylanasen als Futterenzyme.....	25
1.4.4	Präbiotische Wirkung von Xylooligosacchariden und der Einfluss von Xylanasen auf das Mikrobiom	26
2.	Zielsetzung.....	31
3.	Material und Methoden.....	32
3.1	Fütterungsversuch, Probenmaterial und Probenbezeichnungen	32
3.2	Charakterisierung der Einzelfuttermittel	34
3.2.1	Grundcharakterisierung.....	35
3.2.1.1	Bestimmung und Isolierung des Zellwandmaterials	35
3.2.1.2	Analyse des Ligningehalts	36

3.2.1.3	Analyse der Oligosaccharide der Raffinose-Familie	37
3.2.2	Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide	38
3.2.2.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	38
3.2.2.2	Analyse der Bindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse.....	39
3.2.2.3	Untersuchung der Arabinan-, Galactan- und Xyloglucanstrukturen ...	41
3.2.2.4	Isolierung und Bestimmung der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure.....	42
3.2.2.5	Bestimmung der phenolischen Säuren und Oligoferulasäuren	44
3.3	Charakterisierung der zugesetzten Komponenten	45
3.3.1	HPAEC-Methode zur Trennung von (Arabino-)Xylooligosacchariden	45
3.3.2	Untersuchung des XOS-haltigen Materials.....	49
3.3.3	Charakterisierung der Xylanase	49
3.4	Analyse der Kohlenhydrate in den Ileum- und Caecumproben	50
3.4.1	Extraktion der niedermolekularen löslichen Kohlenhydrate.....	51
3.4.2	Aufreinigung mittels Festphasenextraktion.....	52
3.4.3	Analysen mittels HPAEC	55
3.4.3.1	Freie Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie	55
3.4.3.2	Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion	56
3.4.3.3	Erweitertes Oligosaccharidprofiling mittels HPAEC-PAD/MS.....	57
3.4.4	Methylierungsanalyse nach Enzymverdau.....	58
3.4.5	Auswahl der Ileum- und Caecumproben für die Analysen.....	59
4.	Ergebnisse und Diskussion	61
4.1	Charakterisierung der Einzelfuttermittel - Mais	61
4.1.1	Grundcharakterisierung.....	61
4.1.2	Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide.....	62
4.2	Charakterisierung der Einzelfuttermittel - Soja	66
4.2.1	Grundcharakterisierung.....	66
4.2.2	Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide.....	67
4.3	Analyse der zum Futter zugesetzten Komponenten.....	70
4.3.1	Bestimmung der Oligosaccharide im XOS-haltigen Material	70
4.3.2	Charakterisierung der Eigenschaften der Xylanase	72
4.3.2.1	Inaktivierung der Xylanase.....	74

4.3.2.2	Haupt- und Nebenaktivitäten der Xylanase.....	75
4.3.2.3	<i>in-vitro</i> -Inkubation der Einzelfuttermittel mit der Xylanase.....	76
4.4	Methodenentwicklung zur Analyse der Ileum- und Caecumproben.....	80
4.4.1	Extraktion der niedermolekularen Kohlenhydrate.....	80
4.4.2	Aufreinigung der Extrakte mittels Festphasenextraktion.....	82
4.4.3	Analyse der Monosaccharide mittels HPAEC-PAD.....	84
4.4.4	Erweitertes Oligosaccharidprofiling mittels HPAEC-PAD/MS.....	86
4.5	Untersuchung der Ileumproben.....	92
4.5.1	Freie Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie.....	92
4.5.2	Analyse der Oligosaccharide.....	97
4.5.2.1	Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion.....	97
4.5.2.2	Oligosaccharidprofile der Ileumproben.....	103
4.5.2.3	Bindungstypen nach enzymatischem Abbau der Malto- und Raffinose-Familie-Oligosaccharide.....	107
4.6	Untersuchung der Caecumproben.....	110
4.6.1	Freie Monosaccharide.....	110
4.6.2	Analyse der Oligosaccharide.....	113
4.6.2.1	Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion.....	113
4.6.2.2	Oligosaccharidprofile der Caecumproben.....	116
4.7	Zusammenfassende Diskussion.....	120
5.	Zusammenfassung.....	127
6.	Literaturverzeichnis.....	130
7.	Chemikalien und Instrumente.....	142
7.1	Chemikalien.....	142
7.2	Standardsubstanzen für Mono- und Oligosaccharide.....	144
7.3	Puffer und Reagenzien.....	145
7.4	Enzyme.....	146
7.5	Instrumente.....	146
7.5.1	Verwendete Säulen.....	146
7.5.2	Analysegeräte.....	147
8.	Arbeitsvorschriften.....	149
8.1	Grundcharakterisierung der Einzelfuttermittel.....	149

8.1.1	Mahlen	149
8.1.2	Bestimmung des Wassergehalts	149
8.1.3	Entfetten	149
8.1.4	Analytische Bestimmung des Gehalts an Zellwandmaterial	149
8.1.5	Präparative Isolierung des Zellwandmaterials.....	151
8.1.6	Bestimmung des Gehalts an Klason-Lignin	152
8.1.7	Bestimmung der Oligosaccharide der Raffinose-Familie	153
8.2	Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide	154
8.2.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	154
8.2.2	Methylierungsanalyse	155
8.2.3	Profiling von Arabinan- und Galactan oligosacchariden.....	157
8.2.4	Profiling von Xyloglucan oligosacchariden	158
8.2.5	Profiling zur Analyse der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure.....	160
8.2.6	Isolierung von Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure	161
8.2.7	Identifizierung der isolierten Arabinoxylanseitenketten	163
8.2.8	Präparative Gewinnung weiterer Arabinoxyloligosaccharide	164
8.2.9	Bestimmung der phenolischen Säuren und Oligoferulasäure.....	166
8.3	Charakterisierung der zugesetzten Komponenten	168
8.3.1	HPAEC-PAD/MS-Methode für (Arabino-)Xyloligosaccharide	168
8.3.2	Analyse der Mono- und Oligosaccharide der Xyloligosaccharid-Probe....	169
8.3.3	Charakterisierung der Xylanase	170
8.4	Analyse der Ileumproben	171
8.4.1	Extraktion.....	171
8.4.2	Bestimmung der freien Monosaccharide und Raffinoseoligosaccharide ...	171
8.4.3	Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (nPGC-SPE)	173
8.4.4	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	173
8.4.5	HPAEC-PAD/MS-Methode zur Bestimmung des Oligosaccharidprofils....	174
8.4.6	Bestimmung von Arabinan- und Galactan oligosacchariden	176
8.4.7	Abbau störender Oligosaccharide zur Analyse der Bindungstypen.....	176
8.5	Analyse der Caecumproben	177
8.5.1	Extraktion.....	177
8.5.2	Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (C18-nPGC-SPE).....	178

8.5.3	Bestimmung der freien Monosaccharide.....	179
8.5.4	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	179
8.5.5	Bestimmung von Rhamnose und Arabinose neben Galactosamin.....	179
8.5.6	Bestimmung des Oligosaccharidprofils.....	180
8.5.7	Bestimmung von Arabinan- und Galactanoligosacchariden	180
9.	Anhang (Abbildungen und Tabellen)	181
9.1	Abbildungen.....	181
9.2	Tabellen	197
10.	Publikationsliste.....	213

Abkürzungsverzeichnis

A/X	Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis
A ²⁺³ XX	2 ³ ,3 ³ -Di- α -L-Arabinofuranosylxylotriöse
A ² XX	2 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylotriöse
A ³ X	3 ² - α -L-Arabinofuranosylxylobiose
Ara	Arabinose
AUR	alkoholunlöslicher Rückstand (engl.: <i>Alcohol Insoluble Residue</i>)
AX	β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-L-Arabinose
AXOS	Arabinoxyloligosaccharide
AX-SK	Arabinoxylanseitenketten
BXU	Xylanase Units
c	cyclisch
C ₂ - C ₆	Cellooligosaccharide von Cellobiose bis Cellohexaose
CD	Leitfähigkeitsdetektor (engl.: <i>Conductivity Detector</i>)
CE	Kapillarelektrophorese (engl.: <i>Capillary Electrophoresis</i>)
COS	Cellooligosaccharide
DAD	Diodenarraydetektor
dc	decarboxyliert
DFS	Dehydrodiferulasäuren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisationsgrad (engl.: <i>Degree of Polymerization</i>)
EI	Elektronenstoßionisation
ELSD	Lichtstredetektor (engl.: <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
f	-furanose
FA	5- <i>O-trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FAX	β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5- <i>O-trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FAXG	α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5- <i>O-trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FCR	Futterumwandlungsrate (engl.: <i>Feed Conversion Ratio</i>)
FID	Flammenionisationsdetektor
Fru	Fructose
Fuc	Fucose
G+G - 3G+G	Invertaseabbauprodukte von Raffinose, Stachyose und Verbascose

Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatographie
GH	Glykosid-Hydrolasen
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
H2BC	<i>Heteronuclear 2-Bond Correlation</i>
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (engl.: <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (engl.: <i>High-Performance Anion-Exchange Chromatography</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC	Ionenchromatographie
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KH	Kohlenhydrate
Kon	Futtermitteldarstellung ohne Zusätze
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl.: <i>Liquid Chromatography</i>)
LOD	Nachweisgrenze (engl.: <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl.: <i>Limit of Quantification</i>)
LZM	lösliches Zellwandmaterial
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Mal ₂ - Mal ₅	Maltooligosaccharide von Maltose bis Maltopentaose
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MalOS	Maltooligosaccharide
Man	Mannose
Man ₂ - Man ₆	Mannooligosaccharide von Mannobiose bis Mannohexaose
ManOS	Mannooligosaccharide
MO	Mikroorganismen
Monos.	Monosaccharide
MS	Massenspektrometrie
MSZ	Monosaccharidzusammensetzung
nc	nicht-cyclisch

NLKH	niedermolekulare lösliche Kohlenhydrate
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
nPGC	nicht-poröser Graphit (engl.: <i>Non-Porous Graphitized Carbon</i>)
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
NSPasen	Nicht-Stärke-Polysaccharidabbauende Enzyme
OS	Oligosaccharide
<i>p</i>	-pyranose
PAD	gepulst amperometrische Detektion (engl.: <i>Pulsed Amperometric Detection</i>)
PGC	poröser Graphit (engl.: <i>Porous Graphitized Carbon</i>)
PMP	1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon
PUL	<i>Polysaccharide Utilization Systems</i>
Raf	Raffinose
RFO	Oligosaccharide der Raffinose-Familie (engl.: <i>Raffinose Family of Oligosaccharides</i>)
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
RID	Brechungsindexdetektor (engl.: <i>Refractive Index Detector</i>)
RP	Umkehrphase (engl.: <i>Reverse Phase</i>)
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (engl.: <i>Short-Chain Fatty Acids</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>Size-Exclusion Chromatography</i>)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SPE	Festphasenextraktion (engl.: <i>Solid Phase Extraction</i>)
Sta	Stachyose
t	terminal
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <i>Trifluoroacetic Acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TLC	Dünnschichtchromatographie (engl.: <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer (engl.: <i>Time of Flight Mass Spectrometer</i>)
TriFS	Triferulasäure
UV	ultraviolett
UZM	unlösliches Zellwandmaterial

Ver	Verbascose
X+X	Futtervariante mit Xylanase und XOS
X ₂ - X ₆	Xylooligosaccharide von Xylobiose bis Xylohexaose
XA	α -D-Xylopyranosyl-(1→3)-L-Arabinofuranose
XA ² XX	2 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylotetraose
XA ³ XX	3 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylotetraose
XOS	Xylooligosaccharide
Xyl	Xylose
Xyla	Futtervariante mit Xylanase

1. Einleitung

Seit vielen Jahrtausenden wird Geflügel vom Menschen als Nutztier zur Gewinnung von Fleisch und Eiern gehalten. Bis in die Mitte des letzten Jahrhunderts erfolgte die Produktion überwiegend in bäuerlichen Betrieben. Der zunehmende Bedarf führte jedoch zur Entstehung von Geflügelfarmen und zur weiteren Optimierung der Herstellungsprozesse. Bei der Produktion von Hühnerfleisch stehen vor allem schnelles Wachstum der Tiere und hohe Brustfleischausbeute, aber auch Effizienz bei der Futtermittelverwertung sowie die Vorbeugung von Erkrankungen zur Aufzucht gesunder Tiere im Vordergrund. Für eine wirtschaftliche und nachhaltige Erzeugung spielt insbesondere die Wahl des Futtermittels und die Futtermittelverwertung eine entscheidende Rolle. Etwa 70 % der Gesamtproduktionskosten entfallen auf die Futtermittel, demnach wirkt sich eine Steigerung der Futtermittelverwertung nicht nur auf ökologische Aspekte, wie die Reduktion der Futteranbauflächen und die Verminderung von Futtertransporten, sondern auch auf finanzielle Aspekte aus.

Neben der Optimierung der Nährstoffverwertung im Tier durch Züchtungen wurden im Futter vorkommende Inhaltsstoffe identifiziert, die die Verdaubarkeit herabsetzen können. Zu diesen antinutritiven Stoffen werden beispielsweise Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) gezählt. NSP sind Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand und können im Verdauungstrakt von Geflügel nicht von körpereigenen Enzymen abgebaut werden. Ihre antinutritiven Effekte werden unter anderem durch ihre viskositätserhöhenden Eigenschaften begründet, wodurch Verdauungs- und Resorptionsprozesse im Dünndarm verlangsamt werden können. Um diesen Effekten entgegenzuwirken, werden zum Geflügel-futtermittel schon seit mehreren Jahrzehnten Enzyme zum Abbau von NSP zugesetzt. Ein Hauptbestandteil des in der Geflügelindustrie eingesetzten Futters ist in der Regel Getreide und die in Getreide dominierenden NSP sind Arabinoxylane. Aus diesem Grund ist es naheliegend, dass häufig Xylanasen zur Spaltung der Arabinoxylane eingesetzt werden. In der wissenschaftlichen Literatur sind zahlreiche Fütterungsstudien beschrieben, die belegen, dass sich der Einsatz einer exogenen Xylanase im Futter positiv auf die Futtermittelverwertung und auch auf die Gesundheit der Tiere auswirken kann. Für diese Studien werden überwiegend Broiler (Jungmasthühner) verwendet, da diese die wirtschaftlich bedeutsamste Geflügelart darstellen.

Die Wirkweise der Xylanasen wurde lange Zeit hauptsächlich durch die viskositätserniedrigende Wirkung aufgrund der Spaltung von Arabinoxylanen begründet, bis vor ungefähr 15 Jahren in einem Fütterungsversuch beobachtet wurde, dass auch der Zusatz von (Arabino-)Xylooligosacchariden ((A)XOS) zum Futter ohne die Zugabe von Xylanasen zu ähnlichen positiven Effekten führt. Daraufhin wurden die Wirkmechanismen der Xylanase dahingehend überdacht, dass *in vivo* (A)XOS generiert werden, die sich positiv auf das Mikrobiom der Hühner auswirken und es dadurch zu den beschriebenen Effekten kommt. Weitere Fütterungsversuche mit teilweise inkonsistenten Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass es sich um einen komplexeren Wirkmechanismus handelt, der von

verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Diskutierte Einflussfaktoren sind beispielsweise die NSP-Zusammensetzung im Futter oder die Eigenschaften der eingesetzten Xylanase. Um die Beobachtungen in den Fütterungsversuchen zu verstehen, wurde damit begonnen, die Zusammensetzung des Darmmikrobioms der Tiere zu analysieren. Außerdem gibt es erste Studien, in denen die NSP im Futtermittel und die Oligosaccharide in verschiedenen Abschnitten des Verdauungstrakts analysiert wurden, um zusätzliche Informationen über die dort ablaufenden Prozesse zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kohlenhydrate im Futtermittel analysiert und eine Methode zur Analyse der Oligosaccharide in Proben aus dem Verdauungstrakt entwickelt. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Wirkmechanismen von Xylanase und (A)XOS im Futter besser erklären zu können, um einen gezielten Einsatz zur Verbesserung der Tiergesundheit und -leistung zu ermöglichen.

1.1 Futtermittel in der Geflügelernährung

Futtermittel dienen der Ernährung von Nutztieren, wobei die Zusammensetzung in Abhängigkeit von den Bedürfnissen der einzelnen Tierarten stark variiert. Bei der Aufzucht von Geflügel werden zur optimalen Bedarfsdeckung verschiedene Inhaltsstoffe benötigt. Neben Futtermittelzusatzstoffen wie Vitaminen, Mineralstoffen und essentiellen Aminosäuren besteht Geflügelfuttermittel hauptsächlich aus pflanzlichen Komponenten, wobei in der Regel zwei Komponenten mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen kombiniert werden. Die erste Komponente bildet ein Getreide, welches aufgrund des hohen Gehalts an Stärke hauptsächlich als Energielieferant dient. Die zweite Komponente trägt maßgeblich dazu bei, den Proteinbedarf zu decken. Hierfür eignen sich Pflanzen aus der Familie der Fabaceae (Leguminosen), da sie aufgrund ihrer Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien reich an Protein sind (Jeroch *et al.*, 2019). Als Getreide wird überwiegend Mais genutzt, seltener kommen auch Weizen, Gerste, Triticale, Hafer oder Roggen zum Einsatz (Bach Knudsen, 2014). Als Proteinkomponente wird fast ausschließlich Sojaextraktionsschrot verwendet. Hier werden Lupinen, Erbsen und Ackerbohnen als mögliche Alternativen diskutiert (Jezierny *et al.*, 2010; Olukosi *et al.*, 2019).

Die Proben aus dem Verdauungstrakt von Hühnern, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, stammen aus einem Fütterungsversuch, bei dem Futtermittel auf Mais-Soja-basis verwendet wurde. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf diese beiden Pflanzen detaillierter eingegangen.

1.1.1 Mais (*Zea mays*)

Mais ist eine einkeimblättrige Pflanze (Monokotyledone) und zählt zur Familie der Poaceae (Süßgräser). Die Körner eignen sich aufgrund des hohen Gehalts an Stärke sowie essentiellen Fettsäuren gut als Futtermittel. Der hohe Gehalt an Carotinoiden, welche für die gelbe Farbe der Maiskörner verantwortlich sind, wirkt sich bei Legegeflügel positiv

auf die Farbe des Eidotters aus. Über die Zeit wurden verschiedene Maissorten gezüchtet, beispielsweise um den Ertrag zu steigern oder um bestimmte Eigenschaften, wie die Stärkezusammensetzung, zu beeinflussen. Außerdem wurden gentechnisch veränderte Varianten mit Herbizidresistenzen entwickelt, um den Anbau zu optimieren. Inzwischen wird, weltweit gesehen, überwiegend gentechnisch veränderter Mais angebaut (Ranum *et al.*, 2014; Jeroch *et al.*, 2019).

1.1.2 Sojabohne (*Glycine max* (L.) MERR.)

Die Sojabohne ist eine dikotyle Pflanze, die zur Familie der Fabaceae (Leguminosen) gehört. Als Futterpflanze eignet sie sich besonders gut wegen des hohen Gehalts an Proteinen mit einem ernährungsphysiologisch wertvollen Aminosäureprofil. Sojaprotein weist verhältnismäßig hohe Anteile an Lysin und weiteren essenziellen Aminosäuren auf. Limitierend sind die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. Zu beachten ist, dass auch antinutritive Stoffe in der Sojabohne enthalten sind, hierzu zählen insbesondere Trypsininhibitoren und Lektine. Diese Stoffe können jedoch durch thermische Behandlung inaktiviert werden. Einige Leguminosen, darunter auch die Sojabohne, enthalten höhere Mengen an α -Galactooligosacchariden (vgl. Kapitel 1.2.1). Als Futtermittel wird überwiegend Sojaextraktionsschrot eingesetzt, welches nach der Extraktion von Sojaöl anfällt. Für die Ölgewinnung werden häufig ungeschälte Bohnen verwendet, es können aber auch geschälte Bohnen eingesetzt werden. Die Wahl des Ausgangsmaterials hat Einfluss auf die Zusammensetzung des Extraktionsschrotes, beispielsweise in Hinblick auf den Protein- und Fasergehalt. Grundsätzlich unterliegt die Zusammensetzung der Inhaltstoffe von pflanzlichen Erzeugnissen natürlichen Schwankungen und ist zum Beispiel abhängig von Herkunft, Anbau und Klimaeinflüssen (Jezierny *et al.*, 2010; Jeroch *et al.*, 2019).

1.2 Kohlenhydrate in Futtermitteln

Die Gruppe der Kohlenhydrate besteht aus einer Vielzahl von Verbindungen, die Monosaccharide sowie aus Monosacchariden aufgebaute Oligo- und Polymere umfasst. Üblicherweise werden sie anhand des Polymerisationsgrads (DP, engl.: *Degree of Polymerization*) in Gruppen eingeteilt. Hierbei wird in Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide unterschieden, wobei der Begriff Oligosaccharide zum Teil unterschiedlich ausgelegt wird. Laut offizieller Nomenklatur der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) sind Oligosaccharide definiert als Saccharide, die aus drei bis zehn Monomeren aufgebaut sind (IUPAC, 1995). Andere Einteilungen schließen Saccharide mit einem DP bis 19 in die Gruppe der Oligosaccharide mit ein (Mussatto & Mancilha, 2007).

Eine weitere Möglichkeit zur Einteilung von Kohlenhydraten basiert auf ihren ernährungsphysiologischen Eigenschaften. Abhängig davon, ob im Verdauungstrakt des Menschen bzw. Tiers Enzyme zum Abbau der entsprechenden Kohlenhydrate vorhanden sind

oder nicht, wird in verdaubare und nicht-verdaubare Kohlenhydrate unterschieden. Auf dieser Grundlage wurde die Gruppe der Ballaststoffe etabliert, wobei es sich dabei um eine sehr komplexe Gruppe an Stoffen handelt, die nach heutiger Definition zusätzlich zu den nicht-verdaubaren Kohlenhydraten weitere Komponenten umfasst (McDougall *et al.*, 1996; McCleary *et al.*, 2015). Stärke stellt das mengenmäßig bedeutsamste verdaubare Polysaccharid dar, daher wird im Bereich der Futtermittel häufig in Stärke und NSP unterteilt. Dabei umfassen NSP pflanzliche Zellwand- und Speicherpolysaccharide (Bach Knudsen, 1997).

Oligo- und Polysaccharide sind aus glykosidisch verknüpften Monosaccharideinheiten aufgebaut. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Monosaccharide. Sie können eine unterschiedliche Anzahl an Kohlenstoffatomen aufweisen, in D- und L-Konfiguration vorkommen und zusätzlich in verschiedenen Ringformen (Pyranose bzw. Furanose) vorliegen. Je nach Orientierung der Hydroxygruppe am anomeren C-Atom wird in α - oder β -Konfiguration unterschieden. Trotz der enormen Vielfalt kommen nur wenige Monosaccharide in bedeutenden Mengen in der Natur vor. Pflanzliche Polysaccharide sind hauptsächlich aus den Pentosen Arabinose und Xylose, den Hexosen Glucose, Galactose und Mannose, den 6-Desoxyhexosen Rhamnose und Fucose sowie den Uronsäuren Glucuronsäure und Galacturonsäure aufgebaut (Bach Knudsen, 1997). Abbildung 1 zeigt diese Monosaccharide in der Ringform, in der sie in Pflanzen vorrangig vorliegen. In pflanzlichen Oligosacchariden kann zusätzlich Fructose vorkommen (Mussatto & Mancilha, 2007). Aufgrund der verschiedenen Konfigurationen und Positionen der glykosidischen Bindungen ergibt sich daraus eine große Vielfalt möglicher, zum Teil sehr komplex aufgebauter Oligo- und Polysaccharide. In den folgenden Kapiteln werden die Strukturen und Funktionen der für Futtermittel relevanten Kohlenhydrate beschrieben.

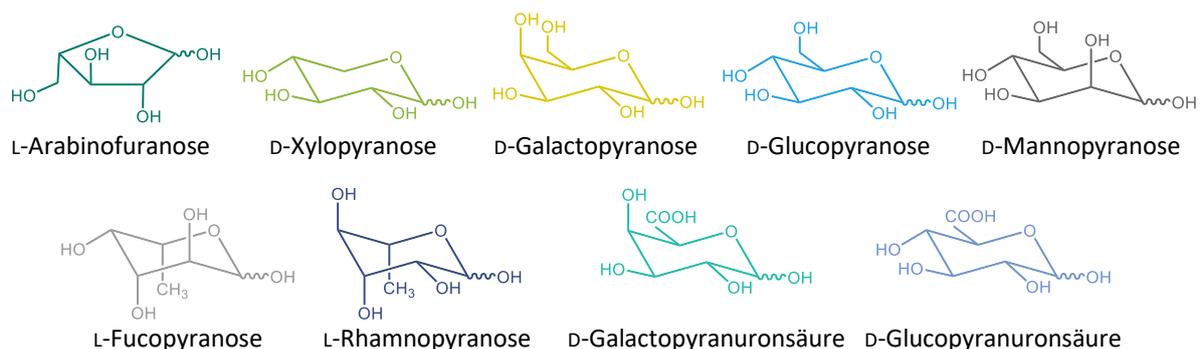


Abbildung 1: Übersicht der hauptsächlich in pflanzlichen Polysacchariden vorkommenden Monosaccharide in ihrer am häufigsten auftretenden strukturellen Form

1.2.1 Di- und Oligosaccharide

Disaccharide kommen in Pflanzen, die üblicherweise als Futtermittel verwendet werden, nur in geringen Mengen vor. Zu nennen ist Saccharose, welche beispielsweise in Sojamehl ungefähr 7 % der Trockenmasse ausmacht, in Futtergetreide liegen die Gehalte darunter

(Bach Knudsen, 1997). Saccharose ist aus 1,2-glykosidisch verknüpfter α -D-Glucopyranose und β -D-Fructofuranose aufgebaut.

Zur Gruppe der Oligosaccharide, die in Futterpflanzen in nennenswerten Mengen vorkommen, gehören die Oligosaccharide der Raffinose-Familie (RFO, engl.: *Raffinose Family of Oligosaccharides*), auch bezeichnet als α -Galactooligosaccharide oder α -Galactoside. Dabei handelt es sich um eine Reihe von Oligosacchariden, die strukturell auf Saccharose basieren und sich in ihrer Anzahl an gebundenen Galactoseeinheiten unterscheiden. Die Raffinose ist ein Trisaccharid, bestehend aus einer Saccharoseeinheit, an die eine D-Galactopyranoseeinheit α -(1 \rightarrow 6)-glykosidisch an die Glucoseeinheit gebunden ist. Das darauffolgende Tetrasaccharid, die Stachyose, basiert auf der Raffinose, wobei an der Galactoseeinheit eine weitere D-Galactopyranoseeinheit α -(1 \rightarrow 6)-glykosidisch gebunden ist. Als nächstes folgen Verbascose und Ajugose mit jeweils einer weiteren Galactoseeinheit (s. Abbildung 2). Die RFO dienen der Pflanze unter anderem als Speicherkohlenhydrate in den Samen und kommen überwiegend in Leguminosen wie Lupinen, Erbsen und Soja vor. Dort dominiert mengenmäßig oft Stachyose, gefolgt von Raffinose. Verbascose kommt in geringeren Mengen vor, während Ajugose in Samen nur in Spuren enthalten ist (Bach Knudsen, 1997; Peterbauer & Richter, 2001; Choct *et al.*, 2010).

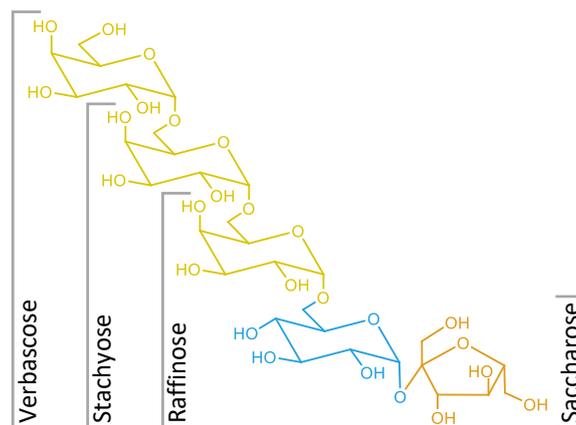


Abbildung 2: Strukturen der Oligosaccharide der Raffinose-Familie (gelb: D-Galactose, blau: D-Glucose, orange: D-Fructose)

Teilweise werden Oligosaccharide dem Futter zugesetzt, um positive Effekte auf die Tiergesundheit und -leistung zu erzielen (vgl. Kapitel 1.4.4). Dabei handelt es sich meistens um Oligosaccharide, die industriell durch saure oder enzymatische Hydrolyse aus pflanzlichen Polysacchariden gewonnen werden und nicht natürlicherweise als Oligosaccharide in der Pflanze vorkommen. Ein Beispiel hierfür sind lineare XOS. Sie werden aus Xylanen freigesetzt und bestehen aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Xylopyranosen. Die Kettenlänge kann stark variieren, wobei sie üblicherweise zwischen DP 2 und 7 liegt (Jahan *et al.*, 2022). Ebenfalls, wenn auch seltener, werden verzweigte AXOS eingesetzt. Dabei handelt es sich um Oligosaccharide, die aus Arabinoxylanen gewonnen werden. Sie bestehen aus einem Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpfter D-Xylopyranose und

tragen über die *O*-2 und/oder *O*-3-Position L-Arabinofuranoseeinheiten als Substituenten (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Des Weiteren werden in der Geflügelernährung Mannooligosaccharide (ManOS) sowie Fructooligosaccharide und β -Galactooligosaccharide eingesetzt (Jahan *et al.*, 2022).

1.2.2 Stärke

Stärke ist das wichtigste Speicherpolysaccharid der Pflanze. Sie ist in Stärkekörnern organisiert und setzt sich aus Amylose und Amylopektin zusammen. Je nach Pflanzenart unterscheiden sich die Anteile an Amylose und Amylopektin sowie die physikochemischen Eigenschaften der Stärke. Amylose besteht aus linearen Molekülen, die hauptsächlich aus α -(1→4)-glykosidisch verknüpfter D-Glucopyranose aufgebaut sind. In sehr geringem Ausmaß kommen Verzweigungen über α -(1→6)-glykosidische Verknüpfungen vor. Im Allgemeinen werden Kettenlängen zwischen 500 und 6000 Glucoseeinheiten angegeben. Amylopektin ist ebenfalls aus α -(1→4)-glykosidisch verknüpfter Glucose aufgebaut, allerdings treten deutlich mehr Verzweigungen über α -(1→6)-glykosidische Bindungen auf. Dadurch entstehen verzweigte Polysaccharide mit bedeutend höherem DP. In Futtergetreide ist Stärke die dominierende Polysaccharidkomponente und macht je nach Getreideart etwa 45 bis 70 % der Trockenmasse aus (Bach Knudsen, 1997). Im Verdauungstrakt wird Stärke von körpereigenen Enzymen gespalten und die freigesetzte Glucose resorbiert (vgl. Kapitel 1.3.2). Stärke und Stärkeabbauprodukte, die am Ende des Dünndarms nicht resorbiert wurden, werden als resistente Stärke bezeichnet (Weurding *et al.*, 2001).

1.2.3 Nicht-Stärke-Polysaccharide

Neben Stärke kommen in der Pflanze weitere Polysaccharide vor, die hauptsächlich Teil der pflanzlichen Zellwand sind. Dazu zählen Cellulose, Hemicellulosen und Pektine. Bei Hemicellulosen handelt es sich um eine Gruppe verschiedener Polysaccharide, zu denen Xylane, Xyloglucane, (Glucosyl-)Mannane und *mixed-linked* β -Glucane gezählt werden. Die detaillierten Strukturen werden in Kapitel 1.2.3.3 beschrieben. Pektine sind hochkomplexe Heteropolysaccharide, die aus mehreren Strukturelementen aufgebaut sind, welche in ihren Anteilen wiederum variieren können. Die Strukturelemente werden in Kapitel 1.2.3.4 ausführlich erläutert.

1.2.3.1 Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Die pflanzliche Zellwand erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Sie ist unter anderem für die Stabilität der pflanzlichen Zelle verantwortlich und schützt sie vor dem Austrocknen sowie vor Pflanzenpathogenen. Auch bei der Zell-Zell-Kommunikation spielt sie eine wichtige Rolle. Der hochkomplexe Aufbau der Pflanzenzellwand variiert je nach Art der Pflanze, Gewebe, Zelltyp, Reifegrad und Wachstumsbedingungen. Sie besteht aus Poly-

sacchariden, Strukturproteinen sowie phenolischen Komponenten und ist in mehreren Schichten aufgebaut (McDougall *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2021). Die äußerste Schicht stellt die Mittellamelle dar, welche hauptsächlich aus Pektinen aufgebaut ist. Sie befindet sich im Interzellularraum und ist maßgeblich an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt (Zamil & Geitmann, 2017). Darauf aufgelagert befindet sich die Primärzellwand. Sie besteht aus Cellulosemikrofibrillen, die von einer Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen und Strukturproteinen umgeben sind. Je nach Pflanze unterscheidet sich die Primärzellwand hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und den vorkommenden Polysacchariden. Dabei kann in zwei Typen unterschieden werden: Typ I kommt in nicht-commeliniden monokotylen und dikotylen Pflanzen, wie der Sojabohne, vor. Typ II ist in commeliniden Monokotyledonen vorzufinden, zu denen unter anderem die Süßgräser (Poaceae) gehören und somit auch der Mais (Carpita & Gibeaut, 1993; Vogel, 2008).

Die Primärzellwand des Typ I besteht aus einem Netzwerk aus Cellulose (ca. 15 - 30 % der Trockenmasse) und Xyloglucanen (20 - 25 %). Außerdem sind höhere Anteile an Pektinen (20 - 35 %) sowie Proteinen (10 %) vorzufinden. Xylane (5 %) und (Gluco-)Mannane (5 - 10 %) spielen eine untergeordnete Rolle. Beim Zellwandtyp II ist der Anteil an Xyloglucanen deutlich geringer (1 - 5 %), dafür kommen hohe Anteile an (Glucurono-)Arabinoxylanen (20 - 40 %) vor. Diese bilden zusammen mit der Cellulose (20 - 30 %) das Cellulose-Hemicellulose-Netzwerk aus. In manchen Pflanzen der Familie der Poaceae kommen zusätzlich *mixed-linked* β -Glucane in größeren Mengen (10 - 30 %) vor. Pektine (5 %), (Gluco-)Mannane (<1%) und Proteine (1 %) machen bei diesem Zellwandtyp nur einen geringen Anteil aus (Carpita & Gibeaut, 1993; Vogel, 2008).

Wenn das Wachstum der Zelle abgeschlossen ist, kann sich eine Sekundärzellwand auf die Primärzellwand auflagern. Diese besteht hauptsächlich aus einem Netzwerk aus Cellulose und Xylanen, in das je nach Gewebetyp Lignin eingelagert werden kann. Dieser Prozess wird auch als Verholzung bezeichnet (Harris & Smith, 2006; Vogel, 2008). Lignin ist ein komplexes, hydrophobes Polymer, das hauptsächlich aus den drei Monomeren *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol aufgebaut ist. Je nach Pflanzenart und Gewebe kommen die Monomere in unterschiedlichen Anteilen vor. Bei der Lignifizierung werden sie zufällig über radikalische Kopplungsreaktionen miteinander verknüpft und es entsteht ein komplexes phenolisches Polymer. Dabei bilden sich unterschiedliche Bindungen aus, die zum Teil sehr stabil und schwer abbaubar sind (Boerjan *et al.*, 2003). Lignin trägt vor allem zur Stabilität und Wasserundurchlässigkeit der Zellwand bei, dient aber auch als Barriere zum Schutz vor Austrocknung, Schädlingen sowie Krankheitserregern und anderen Umwelteinflüssen (Harris & Smith, 2006; Vogel, 2008; Liu *et al.*, 2018).

1.2.3.2 Cellulose

Cellulose ist ein unverzweigtes Homopolysaccharid, das aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut ist, wobei jede folgende Einheit um 180°

verdreht zur vorherigen vorliegt. Dadurch ergibt sich eine lineare Kette aus bis zu 15000 Glucoseeinheiten. Bedingt durch diese Struktur können sich eine Vielzahl von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen einzelnen Celluloseketten ausbilden, wodurch sie sich zu wasserunlöslichen Mikrofibrillen zusammenlagern. Aus diesen ist das Grundgerüst der pflanzlichen Zellwand aufgebaut. In der Sekundärzellwand liegt die Cellulose überwiegend in kristalliner Form vor, in der Primärzellwand kommen auch amorphe Bereiche vor (McDougall *et al.*, 1996).

1.2.3.3 Hemicellulosen

Hemicellulosen werden im Allgemeinen als Polysaccharide beschrieben, die unter alkalischen Bedingungen aus der pflanzlichen Zellwand extrahiert werden können. Diese Definition ist nicht allgemeingültig, da zum Teil auch Pektine unter diesen Bedingungen extrahiert werden können und es andererseits Polysaccharide gibt, die zu den Hemicellulosen gehören und die bereits im Wässrigen ohne Laugenzugabe extrahierbar sind. Dazu zählen beispielsweise *mixed-linked* β -Glucane sowie wasserlösliche Arabinoxylane. Eine andere Definition basiert auf Strukturmerkmalen anstelle von Extrahierbarkeit. Ihr zufolge sind Hemicellulosen Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand, die ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Einheiten besitzen, wobei die Monosaccharideinheiten des Rückgrats an C1 und C4 eine äquatoriale Konfiguration aufweisen (Scheller & Ulvskov, 2010). Unabhängig von der genauen Definition werden unter dem Begriff Hemicellulosen folgende vier große Polysaccharidgruppen zusammengefasst: Xylane, Xyloglucane, (Gluco-)Mannane und *mixed-linked* β -Glucane.

Xylane kommen in der pflanzlichen Zellwand in der Regel als Heteroxylane vor und haben ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Xylopyranoseeinheiten. Je nach Substituenten wird in Glucuronoxylane und (Glucurono-)Arabinoxylane unterschieden. Bei Glucuronoxylanen sind an das Xylanrückgrat über die O-2-Position D-Glucuronsäure- bzw. 4-O-Methyl-Glucuronsäureeinheiten gebunden. Außerdem können sie acetyliert vorliegen. Glucuronoxylane kommen hauptsächlich in der Sekundärzellwand von dikotylen Pflanzen vor (McDougall *et al.*, 1996; Vogel, 2008; Scheller & Ulvskov, 2010).

Arabinoxylane wiederum sind ein Hauptbestandteil der Zellwand von commeliniden monokotylen Pflanzen und kommen somit in größeren Mengen in Getreide vor. Ihr Xylanrückgrat liegt substituiert mit L-Arabinofuranoseeinheiten vor, die über die O-2- und/oder O-3-Position gebunden sind. Des Weiteren können D-Glucuronsäure sowie 4-O-Methyl-Glucuronsäure und Acetylgruppen als Substituenten vorkommen (s. Abbildung 3). Diese Polysaccharide werden zum Teil auch als Glucuronoarabinoxylane bezeichnet (Harris & Smith, 2006; Bach Knudsen, 2014). Das Substitutionsmuster von Arabinoxylanen variiert stark abhängig von der Art der Pflanze sowie dem untersuchten Gewebe. Häufig wird das Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis (A/X) zur Abschätzung des Substitutionsgrads angegeben. Beim Vergleich verschiedener Getreide weist beispielsweise Mais mit 0,74 ein höheres A/X auf als Weizen (0,62). Bei Gerste ist das A/X mit 0,48 eher gering

(Bach Knudsen, 2014). Aus diesen Verhältnissen lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf die Position der Bindung an das Rückgrat ziehen. Hierfür sind aufwendigere Analysemethoden wie beispielsweise die Methylierungsanalyse erforderlich (vgl. Kapitel 3.2.2.2). So ist zum Beispiel für Mais beschrieben, dass die Arabinoseeinheiten überwiegend über die *O*-3-Position an das Rückgrat gebunden sind, wobei auch ein höherer Anteil an disubstituierten Xyloseeinheiten vorkommt (Saulnier *et al.*, 1993; Huisman *et al.*, 2000).

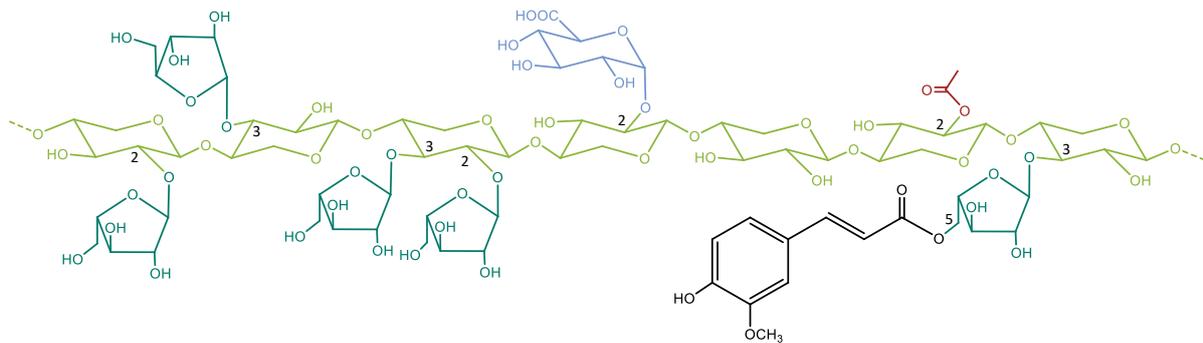


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strukturmerkmale von Arabinoxylanen. Das aus D-Xylopyranoseeinheiten (hellgrün) aufgebaute Rückgrat kann L-Arabinofuranose (dunkelgrün), D-Glucuronsäure (blau), Acetylgruppen (rot) oder mit Ferulasäure (schwarz) veresterte Seitenketten als Substituenten tragen.

In der Gruppe der Hemicellulosen weisen Arabinoxylane die Besonderheit auf, dass die Seitenketten mit Hydroxyzimtsäuren verestert vorliegen können. Dabei ist die an das Rückgrat gebundene Arabinoseeinheit über die *O*-5-Position mit der Hydroxyzimtsäure verknüpft. Hauptsächlich handelt es sich dabei um *trans*-Ferulasäure, wobei auch andere Hydroxyzimtsäuren wie die *trans-para*-Cumarsäure vorkommen können (Ishii, 1997; Allerdings *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2021). Durch die Reaktion zweier Ferulasäuren zu einer Dehydrodiferulasäure (DFS) können Crosslinks zwischen zwei Polysaccharidsträngen oder zwischen Polysacchariden und Lignin gebildet werden. Bei der radikalischen Kopplungsreaktion können aufgrund der resonanzstabilisierten phenolischen Struktur des intermediär auftretenden Ferulasäureradikals verschiedene DFS entstehen (mögliche Kopplungen: 5-5, 4-*O*-5, 8-5, 8-8 und 8-*O*-4). Außerdem können zum Teil cyclische (c), nicht-cyclische (nc), decarboxylierte (dc) oder Tetrahydrofuran (THF)-Formen vorkommen, welche jedoch nicht alle nativ vorliegen. In Abbildung A1 (Kapitel 9.1) sind einige Strukturen von in Mais vorkommenden DFS gezeigt. Neben Dimeren sind auch Tri- und Oligomere beschrieben (Bunzel, 2010; Jilek & Bunzel, 2013). Crosslinks tragen zur Stabilität der pflanzlichen Zellwand bei und sind beispielsweise an Abwehrmechanismen gegen Pathogene beteiligt (Bunzel, 2010; Santiago & Malvar, 2010).

Detailliertere Strukturanalysen der Arabinoxylane aus Getreiden zeigten komplexer aufgebaute Seitenketten, die zusätzlich zu Arabinose und Ferulasäure auch Xylose und Galactose aufweisen. Sie basieren auf der oben angeführten Struktureinheit 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FA) (s. Abbildung 4). Darauf aufbauend folgt, mit einer

weiteren D-Xylopyranoseeinheit, die β -(1 \rightarrow 2)-glykosidisch an die Arabinose gebunden ist, die Seitenkette β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FAX). Bei der nächstkomplexeren Struktur ist eine L-Galactopyranose α -(1 \rightarrow 2)-glykosidisch mit der Xyloseeinheit verknüpft. Dabei handelt es sich um die Seitenkette α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FAXG). Ungewöhnlich an dieser Struktur ist, dass Galactopyranose in pflanzlichen Polysacchariden normalerweise in D- und nicht in L-Konfiguration vorkommt (Saulnier *et al.*, 1995; Allerdings *et al.*, 2006). Schendel und Mitarbeitende (2016) konnten zeigen, dass diese Strukturen ubiquitär in Getreidekörnern vorkommen, wobei die Seitenkette FA dominiert. Das Verhältnis von FA zu FAX liegt zwischen 2,8 (Popcornmais) und 42,5 (*Thinopyrum intermedium*). FAXG kommt in sehr geringen Mengen vor. Bei allen drei untersuchten Seitenketten weisen die untersuchten Maisproben zum Teil deutlich höhere Gehalte auf als die anderen Getreidesorten (Schendel *et al.*, 2016).

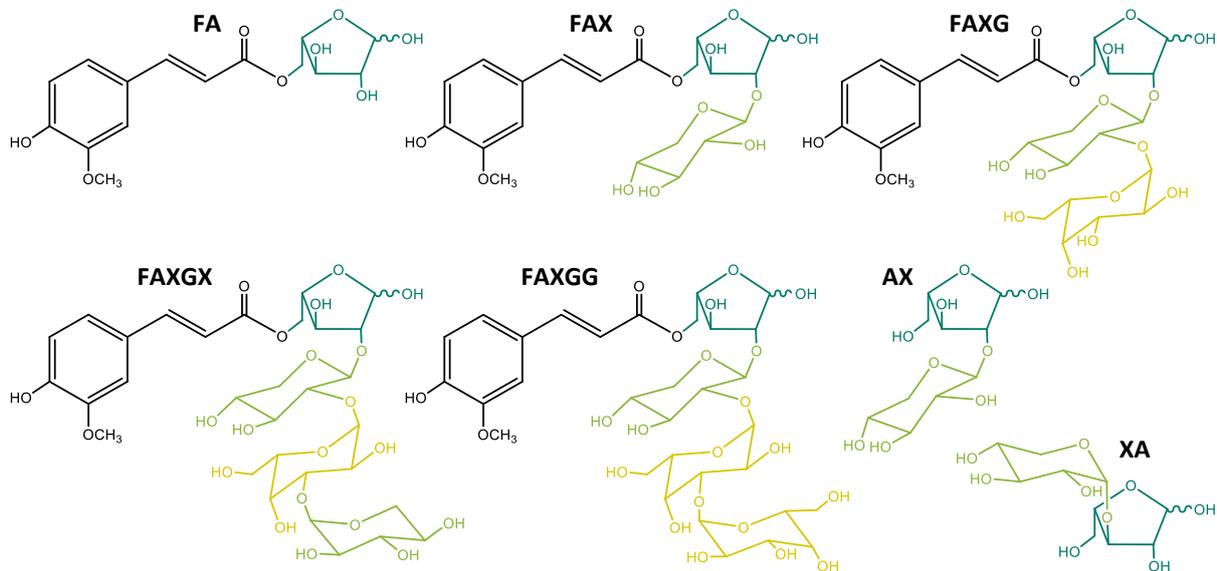


Abbildung 4: Strukturen der beschriebenen Arabinoxylanseitenketten. Abgebildet sind Seitenketten mit und ohne Ferulasäure (schwarz) aufgebaut aus Arabinose (dunkelgrün), Xylose (hellgrün) und Galactose (gelb) (FA: 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAXG: α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, 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, AX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-L-Arabinofuranose, XA: α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-L-Arabinofuranose; modifiziert nach Allerdings *et al.*, 2006; Schendel, 2016).

Es ist festzuhalten, dass Arabinoxylane aus Mais höhere Mengen an mit Ferulasäure veresterten Seitenketten aufweisen und diese zum Teil deutlich komplexer aufgebaut sind als die Seitenketten in anderen Getreidearten. Neben den bereits beschriebenen Seitenketten konnten aus Maiskleie zwei weitere auf FAXG basierende Seitenketten mit vier

Monosaccharideinheiten isoliert und charakterisiert werden. Sie sind in Abbildung 4 gezeigt (Allerdings *et al.*, 2006). Die Anzahl und Komplexität der Seitenketten beeinflusst die Eigenschaften des Arabinoxylans beispielsweise in Hinsicht auf die Löslichkeit, aber auch die Zugänglichkeit und damit Verdaubarkeit durch Enzyme (vgl. Kapitel 1.4.2).

In Arabinoxylanen kommen neben mit Ferulasäure veresterten Seitenketten auch Seitenketten vor, die nicht mit Ferulasäure verestert vorliegen, allerdings sind diese deutlich weniger umfangreich untersucht. In der Literatur werden zum Teil Seitenketten ohne Ferulasäure beschrieben, beispielsweise die Seitenkette β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-L-Arabinose (AX), die analog zu FAX aufgebaut ist (s. Abbildung 4) (Ebringerová *et al.*, 1992; Pastell *et al.*, 2009). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Arabinoxylane häufig unter alkalischen Bedingungen extrahiert werden. Dies führt dazu, dass die gebundene Ferulasäure während der Extraktion hydrolytisch abgespalten wird. Werden anschließend die Seitenketten untersucht, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Seitenkette in ihrer nativen Form mit Ferulasäure verestert vorlag oder nicht. Aus diesem Grund wurde in der Arbeit von Schendel (2016) während der gesamten Aufarbeitung auf alkalische Bedingungen verzichtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Seitenkette AX tatsächlich in verschiedenen Getreidesorten natürlicherweise vorkommt und es sich nicht nur um ein Abbauprodukt von FAX handelt. Zusätzlich wurde α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-L-Arabinose (XA) als weitere Arabinoxylanseitenkette ohne Ferulasäure isoliert und charakterisiert sowie in verschiedenen Getreidesorten nachgewiesen (Schendel, 2016).

Xyloglucane, die nächste Polysaccharidgruppe innerhalb der Hemicellulosen, sind insbesondere beim Aufbau der Zellwand von dikotylen und nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen von Bedeutung und nehmen dort im Hemicellulose-Cellulose-Netzwerk den Platz der Arabinoxylane ein. Sie besitzen, wie die Cellulose, ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfter D-Glucopyranose, an das in regelmäßiger Abfolge α -D-Xylopyranoseeinheiten als Substituenten über die O-6-Position glykosidisch gebunden sind. An diese können über die O-2-Position wiederum weitere Monosaccharide wie D-Galactopyranose, L-Arabinofuranose und D-Xylopyranose gebunden sein. Die Galactoseeinheiten können des Weiteren fucosyliert oder acetyliert vorliegen (Scheller & Ulvskov, 2010; Tuomivaara *et al.*, 2015). Zur einfacheren Benennung entwickelten Fry und Mitarbeitende (1993) eine Buchstabencodierung für die Seitenketten von Xyloglucanen. In Abbildung A2 (Kapitel 9.1) sind typische Struktureinheiten und ihr Buchstabencode gezeigt. Der Substitutionsgrad und das Substitutionsmuster sind abhängig von der Pflanzenfamilie sowie dem Gewebe (Schultink *et al.*, 2014).

Mannane spielen in der Zellwand mengenmäßig eine untergeordnete Rolle. Grundsätzlich können sie in vier Gruppen unterteilt werden: Lineare Mannane, Galactomannane, Glucmannane und Galactoglucomannane. Lineare Mannane sind Homopolysaccharide aufgebaut aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpfter D-Mannopyranose. Galactomannane kommen hauptsächlich als Speicherkohlenhydrate in Samen vor. Sie besitzen das gleiche Rückgrat wie lineare Mannane, jedoch liegen die Mannoseeinheiten in unterschiedlichen Abständen

über die *O*-6-Position mit α -D-Galactopyranoseeinheiten substituiert vor. Im Unterschied dazu ist das Rückgrat der Glucomannane aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Mannopyranose- und D-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut. Die Mannoseeinheiten können ebenfalls über die *O*-6-Position Galactoseeinheiten tragen. Ist dies der Fall wird das Polysaccharid als Galactoglucomannan bezeichnet. Beide kommen hauptsächlich in der Zellwand von Hölzern vor (Ebringerová, 2006; Moreira & Filho, 2008).

***Mixed-linked* β -Glucane** sind Hemicellulosen, die in der Familie der Süßgräser (Poaceae) vorkommen. Es handelt sich um unverzweigte Homopolysaccharide, die aus β -(1 \rightarrow 4)- und β -(1 \rightarrow 3)-verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut sind. Dabei liegen Blöcke aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Glucoseeinheiten vor, die über eine β -(1 \rightarrow 3)-Bindung miteinander verknüpft sind. Die Blöcke umfassen meist drei oder vier Glucoseeinheiten, zum Teil kommen auch längere β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Abschnitte vor (Scheller & Ulvskov, 2010). Der Gehalt von *mixed-linked* β -Glucanen liegt beispielsweise in Hafer und Gerste bei 3 - 12 % (Ebringerová, 2006), bei Mais sind die Anteile geringer (< 1 %) (Bach Knudsen, 1997).

1.2.3.4 Pektine

Pektine sind hochkomplexe Polysaccharide, die insbesondere in der Zellwand von dikotylen und nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen in größeren Mengen vorkommen. Sie bestehen aus mehreren Strukturelementen, die verschiedenste Polysaccharidstrukturen umfassen. Die Hauptstrukturelemente sind Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane Typ I, die mit neutralen Seitenketten substituiert vorliegen. Bei diesen Seitenketten handelt es sich um Arabinane sowie (Arabino-)Galactane Typ I und Typ II. Weitere Strukturelemente des Pektins sind Rhamnogalacturonane Typ II, welche in geringeren Mengen vorkommen und Xylogalacturonane, welche nur vereinzelt vorzufinden sind. In Abbildung 5 sind die Strukturelemente der Pektine schematisch dargestellt. Die einzelnen Strukturen werden im Folgenden detaillierter erläutert. Es gibt verschiedene Modelle, die die makromolekulare Struktur von Pektinen beschreiben. Das verbreitetste Modell ist das der *Smooth and Hairy Regions*. Es basiert darauf, dass in der Pektinstruktur Bereiche vorkommen, die aus linearen Homogalacturonanen aufgebaut sind, die sogenannten *Smooth Regions* und andere kovalent gebundene Bereiche, in denen die verzweigten Rhamnogalacturonane Typ I mit ihren neutralen Seitenketten dominieren, die sogenannten *Hairy Regions* (Vries *et al.*, 1982).

Homogalacturonane sind Homopolysaccharide, aufgebaut aus α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten. Die Säuregruppen können methylverestert vorliegen und über die *O*-2- und/oder *O*-3-Position können Acetylgruppen gebunden sein. Der Methylierungs- und Acetylierungsgrad variiert abhängig von Pflanze und Gewebe und hat großen Einfluss auf die Eigenschaften der Pektine (Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009).

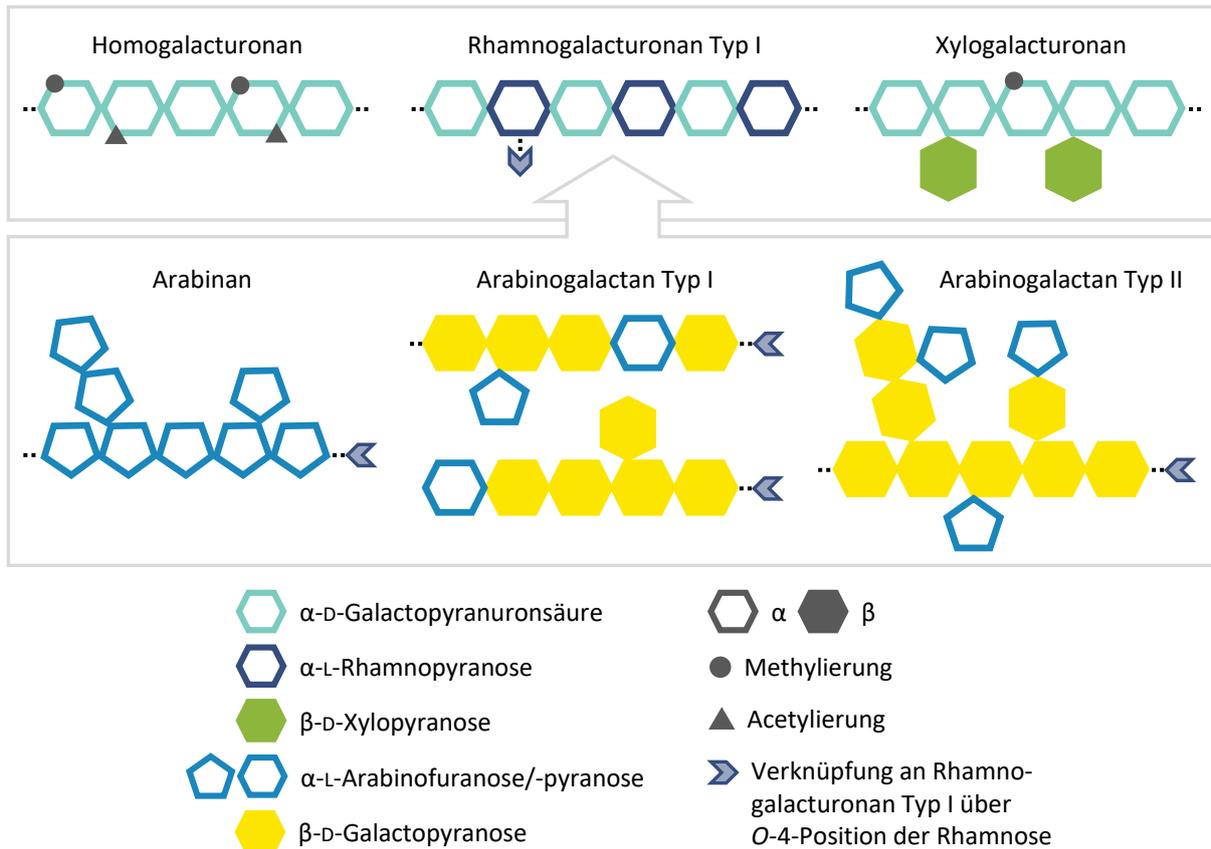


Abbildung 5: Schematische Darstellung der einzelnen Strukturelemente von Pektinen (ohne Rhamnogalacturonan Typ II)

Rhamnogalacturonane Typ I besitzen ein Rückgrat aus alternierenden α -(1 \rightarrow 2)-verknüpften L-Rhamnopyranoseeinheiten und α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten. Die Kettenlänge variiert je nach Quelle der Pektine. An dieses Rückgrat können über die O-4-Position der Rhamnose verschiedene neutrale Seitenketten, aufgebaut aus L-Arabinose und D-Galactose, gebunden sein. Diese können als einzelne Monosaccharideinheiten oder als oligomere Ketten vorliegen. Der Substitutionsgrad sowie die Länge und die Zusammensetzung der Seitenketten variieren stark und sind abhängig von Pflanzenart, Gewebe und Entwicklungsstadium (Kaczmarska *et al.*, 2022). Bei den Seitenketten des Rhamnogalacturonan Typ I wird in Arabinane und (Arabino-)Galactane Typ I und Typ II unterschieden.

Arabinane bestehen aus einer Hauptkette, die aus α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpften L-Arabinofuranoseeinheiten aufgebaut ist. Diese können über die O-2- und/oder O-3-Position mit α -L-Arabinofuranose oder kurzen Seitenketten aus α -(1 \rightarrow 3)-verknüpften L-Arabinofuranoseeinheiten substituiert sein (Voragen *et al.*, 2009).

(Arabino-)Galactane des Typ I besitzen ein Grundgerüst aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranoseeinheiten, in das weitere Arabinose- und Galactoseeinheiten integriert sein können. Die Galactoseeinheiten des Rückgrats können über die O-6-Position mit β -D-Galactopyranose substituiert vorliegen. Es ist beschrieben, dass vereinzelt

auch β -(1→3)-glykosidisch verknüpfte Galactoseeinheiten im Rückgrat auftreten können. An das Rückgrat kann außerdem α -L-Arabinofuranose über die *O*-3-Position gebunden sein. Des Weiteren kann eine L-Arabinopyranoseeinheit am nicht-reduzierenden Ende der Hauptkette vorkommen oder als interne Einheit in das Rückgrat integriert sein (Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009; Wefers *et al.*, 2014).

(Arabino-)Galactane Typ II sind hochverzweigte Strukturen, die auf einem Rückgrat aus β -(1→3)-glykosidisch verknüpfter D-Galactopyranose basieren. Daran können Arabinose- und vereinzelt Galactoseeinheiten sowie Ketten aus β -(1→6)-glykosidisch verknüpften Galactoseeinheiten, die wiederum mit Arabinose substituiert vorliegen können, gebunden sein. (Arabino-)Galactane Typ II liegen hauptsächlich mit Proteinen assoziiert vor (Carpita & Gibeaut, 1993; Voragen *et al.*, 2009).

Rhamnogalacturonane Typ II weisen eine hochkomplexe Struktur auf. Das Rückgrat besteht, wie beim Homogalacturonan, aus α -(1→4)-glykosidisch verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten, allerdings sind daran in diesem Fall verzweigte Seitenketten gebunden. Diese Seitenketten bestehen aus zwölf verschiedenen, zum Teil sehr selten vorkommenden Monosacchariden (z. B. L-Fucose und D-Apiose), die über verschiedenste Bindungstypen verknüpft sind. Eine Besonderheit des Rhamnogalacturonan Typ II ist, dass die Struktur als hochkonserviert gilt und über viele Pflanzenspezies hinweg anzutreffen ist (Mohnen, 2008; Caffall & Mohnen, 2009).

Xylogalacturonane basieren ebenfalls strukturell auf dem Homogalacturonanrückgrat, wobei die Galacturonsäureeinheiten über die *O*-3-Position mit β -D-Xylopyranose substituiert vorliegen können. Der Substitutionsgrad variiert zwischen 25 und 75 % je nach Ursprung der Pektine. Die Säuregruppen können ebenfalls, wie beim Homogalacturonan, methylverestert vorliegen. Xylogalacturonane kommen nicht in allen Pektinen vor. Sie sind hauptsächlich für Pektine aus reproduzierendem Gewebe wie Früchten und Samen beschrieben (Voragen *et al.*, 2009). Vereinzelt konnten neben monomeren Xyloseeinheiten auch Xylostedimere als Seitenketten nachgewiesen werden. Aus der löslichen Polysaccharidfraktion von Sojabohnen war es sogar möglich längere Xyloseseitenketten mit bis zu sieben Xyloseeinheiten zu identifizieren. Diese waren β -(1→4)-verknüpft und wiesen eine Verzweigung über die *O*-2-Position auf (Nakamura *et al.*, 2002; Caffall & Mohnen, 2009).

1.3 Verdauungstrakt von Hühnergeflügel

Im Verdauungstrakt findet die Zerkleinerung des Futters und anschließend die Resorption der Nährstoffe statt. Dazu müssen in der Nahrung enthaltene Makromoleküle zu resorbierbaren Stoffen umgesetzt werden. Hierfür werden vom Organismus spezifische Enzyme produziert, außerdem finden im unteren Abschnitt des Verdauungstraktes mikrobielle Fermentationsprozesse statt. Die Hauptnährstoffe im Futter sind Fette, Proteine und Kohlenhydrate. Da im Rahmen dieser Arbeit die Oligosaccharide, die im

Verdauungstrakt vorhanden sind, untersucht werden sollen, liegt der Fokus im Folgenden insbesondere auf der Verdauung von Kohlenhydraten.

1.3.1 Aufbau des Verdauungstrakts

Der Verdauungstrakt von Geflügel beginnt mit dem Schnabel und setzt sich anschließend zusammen aus Speiseröhre, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Dünndarm und Dickdarm. Dies ist in Abbildung 6 am Beispiel des Huhns schematisch dargestellt.

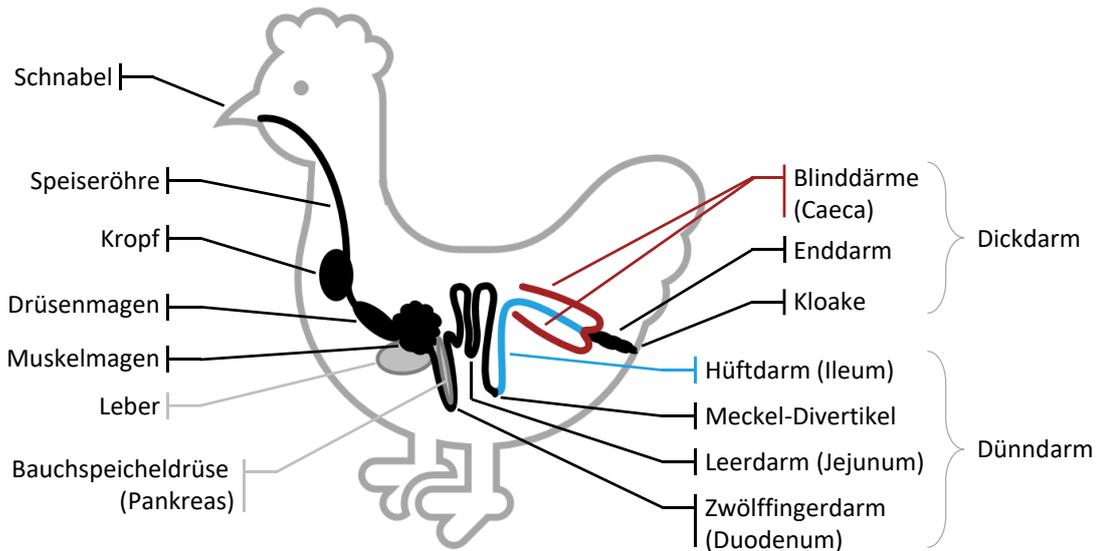


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Verdauungstrakts von Geflügel am Beispiel des Huhns. Hervorgehoben sind das Ileum in blau und die Caeca in rot (modifiziert nach Jeroch *et al.*, 2019).

Der Schnabel dient der Futteraufnahme. Nach Zugabe von Sekret aus den Speicheldrüsen gelangt das aufgenommene Futter vorerst unzerkleinert über die Speiseröhre in den Kropf. Dort kann es gespeichert werden, solange der nachfolgende Drüsenmagen voll ist. Im Drüsenmagen wird das aufgenommene Futter mit Drüsensekret versetzt, welches hauptsächlich Schleim, Pepsinogen und Salzsäure enthält. Darauf folgt der Muskelmagen, auch als Kaumagen bezeichnet, in dem die mechanische Zerkleinerung der Nahrung stattfindet. Der Muskelmagen besteht aus kräftigem Muskelgewebe und ist innen mit einer dicken, gefurchten Schicht Hornhaut, der sogenannten Koilinschicht, überzogen. Durch Kontraktion kann der Inhalt des Kaumagens zermahlen werden, womit er die Funktion der bei Vögeln nicht vorhandenen Zähne ersetzt. Dieser Mechanismus wird vom sogenannten Grit unterstützt. Dabei handelt es sich beispielsweise um kleine Steinchen, die mit dem Futter aufgenommen werden. Anschließend gelangt der Nahrungsbrei in den Dünndarm (Svihus, 2014; Jeroch *et al.*, 2019).

Im Dünndarm finden hauptsächlich Verdauungs- und Resorptionsprozesse statt. Hierfür werden in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) Enzyme zum Abbau der Makronährstoffe produziert und in den Dünndarm abgegeben. Die Bauchspeicheldrüse von Geflügel ist ähnlich aufgebaut wie bei Säugetieren. Ihr Sekret enthält unter anderem Amylasen,

Lipasen und Proteasen. Um die Resorption der Nährstoffe so effizient wie möglich zu gestalten, befinden sich an der Innenwand des Dünndarms Darmzotten und Mikrovilli, wodurch die Oberfläche um ein Vielfaches vergrößert wird. Der Dünndarm besteht, anders als bei Säugetieren, aus nur zwei Abschnitten: Duodenum (Zwölffingerdarm) und Jejunioileum (Leer- und Hüft darm). Bei Geflügel unterscheiden sich Jejunum und Ileum anatomisch nicht voneinander (Jeroch *et al.*, 2019). Für Analysezwecke wird das Gewebe oder der Inhalt des Jejunioileums dennoch häufig aufgeteilt und als Jejunum und Ileum separat voneinander gesammelt und untersucht. Da diese Abschnitte nicht eindeutig definiert sind, gibt es unterschiedliche Herangehensweisen bei der Probennahme. Das Duodenum liegt in Form einer länglichen Schleife vor, in die die Bauchspeicheldrüse eingebettet ist. Am Ende des Duodenums münden die Pankreas- und Gallengänge in den Dünndarm, dadurch kann das Duodenum eindeutig vom folgenden Jejunum abgegrenzt werden. Ungefähr in der Mitte des verbleibenden Abschnitts befindet sich das Meckel-Divertikel, ein Überbleibsel des embryonalen Dottersacks. Eine gängige Variante bei der Probengewinnung ist es, dieses Meckel-Divertikel als Übergang von Jejunum zu Ileum anzunehmen und das Jejunioileum entsprechend aufzuteilen. Der Dünndarm endet an der Stelle, an der die Blinddärme abzweigen und geht dort in den Enddarm über (Samanya & Yamauchi, 2002; de Verdal *et al.*, 2010; Jeroch *et al.*, 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die Verdauungs- und Resorptionsprozesse von Fetten, verdaubaren Kohlenhydraten und Proteinen am Ende des Jejunums nahezu vollständig abgeschlossen sind. Im Ileum werden diese Prozesse vollendet, wobei dort die Resorption von Mineralstoffen und Wasser überwiegen (Svihus, 2014).

Bei Vögeln werden unter dem Begriff Dickdarm die paarig angelegten Blinddärme (Caeca, Singular: Caecum) und der Enddarm (Rectum) zusammengefasst. Anders als bei Säugetieren gibt es in der Regel keinen Colonabschnitt (Grimmdarm). Dafür weist der Verdauungstrakt von Vögeln zwei Blinddärme auf, die an den Verdauungsprozessen beteiligt sind. In ihnen befindet sich ein Großteil des Mikrobioms, wodurch sie Hauptort des mikrobiellen Verdaus sind (vgl. Kapitel 1.3.3) (Jeroch *et al.*, 2019). Die Blinddärme sind sackförmig aufgebaut und haben je eine Öffnung, die zugleich Ein- und Ausgang ist. Bei ausgewachsenen Hühnern sind die Blinddärme ca. 13 - 22 cm lang (Morgan, 2023). Sie werden durch antiperistaltische Bewegungen gefüllt, wobei die Befüllung und Entleerung unregelmäßig und eher selten erfolgt (ca. 1 - 2 Mal am Tag). Somit gelangt nur ein Teil des Darminhalts in die Blinddärme und kann dort von Mikroorganismen verstoffwechselt werden, der Rest wird direkt in den Enddarm transportiert und ausgeschieden. Wie groß der Anteil ist, der in die Blinddärme gelangt, ist nicht abschließend geklärt. Die Durchmischung des Blinddarm Inhalts erfolgt durch peristaltische Bewegungen. Es wird beschrieben, dass aufgrund des schmalen Eingangs eine Selektion stattfindet und nur fein gemahlene Partikel sowie lösliche und niedermolekulare Stoffe in die Blinddärme gelangen (Svihus *et al.*, 2013; Svihus, 2014; Morgan, 2023). In der Literatur wird diskutiert, ob es einen Rückfluss, auch bezeichnet als *Reflux*, gibt, bei dem Darminhalt vom Enddarm zurück in das Ileum transportiert wird. Dadurch wäre es möglich, dass Mikro-

organismen und Fermentationsprodukte aus den Blinddärmen in das Ileum gelangen (Svihus *et al.*, 2013; Morgan, 2023). Es gibt mehrere Studien, bei denen solche Prozesse nicht zu beobachten waren (Svihus *et al.*, 2013). Sacranie und Mitarbeitende (2012) wiederum konnten zeigen, dass ein Marker, der in den Enddarm injiziert wurde, später in allen Abschnitten des Dünndarms sowie im Magen nachweisbar war, was auf antiperistaltische Bewegungen entlang des gesamten Verdauungstrakts hindeutet. Unumstritten ist, dass eine der Hauptaufgaben des Blinddarms die Resorption von Mineralstoffen und Wasser ist (Svihus, 2014). Der nachfolgende Enddarm ist sehr kurz und endet in der Kloake. Dort werden Kot und Harn vor der Ausscheidung gesammelt (Jeroch *et al.*, 2019). Die Futterdurchgangszeit ist bei jungem Geflügel verhältnismäßig kurz und beläuft sich insgesamt auf ca. vier Stunden, wobei die lange Verweildauer in den Caeca (mehrere Stunden bis ein Tag) nicht berücksichtigt ist. Nach der Futteraufnahme ist es vom Fütterungszustand abhängig, wie lange sich das aufgenommene Futter im Kropf befindet. Ist der Kropf leer, gelangt die Nahrung direkt in den Drüsenmagen und weiter in den Muskelmagen. Sind die Mägen gefüllt, wird die Nahrung im Kropf gespeichert und kontinuierlich in den Drüsenmagen abgegeben. Die mittlere Verweildauer in Drüsen- und Muskelmagen liegt bei ca. 30 bis 60 Minuten und ist unter anderem abhängig von der Partikelgröße des Futters, die die Dauer des Mahlprozesses beeinflusst. Die Aufenthaltszeit im Duodenum ist sehr kurz und wird auf wenige Minuten geschätzt. Um das Jejunum zu passieren, benötigt der Darminhalt etwa 40 bis 60 Minuten. Die Passagezeit für den Ileumabschnitt ist ungefähr doppelt so lang. Damit liegt die Durchgangszeit für den Dünndarmabschnitt bei insgesamt zwei bis drei Stunden (Svihus, 2014; Jeroch *et al.*, 2019).

Entlang des Verdauungstrakts liegen in den unterschiedlichen Abschnitten verschiedene pH-Werte vor, die mit den Optima der Verdauungsenzyme übereinstimmen. Der pH-Wert im Kropf ist stark abhängig vom Futter und liegt im Bereich von 4,5 bis 6,0. Der Verdauungssaft, der im Drüsenmagen produziert wird, hat einen pH-Wert von ungefähr 2,0, was zu einer Senkung des pH-Werts führt. Für den Inhalt des Muskelmagens werden in der Literatur Werte von pH 1,9 bis 4,5 angegeben, wobei der Mittelwert häufig zwischen pH 3,0 und 4,0 liegt. Im Duodenum werden Sekrete des Pankreas zugeführt und dadurch der pH-Wert des Dünndarminhalts auf ungefähr 6,0 angehoben. Der pH-Wert im Caecum wird unter anderem vom Mikrobiom beeinflusst und ist mit Werten im Bereich von pH 6,3 und 7,0 etwas höher als im Dünndarm (Svihus *et al.*, 2013; Svihus, 2014; Mabelebele *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2020).

1.3.2 Verdauung von Kohlenhydraten

Im Verdauungstrakt werden verschiedene Enzyme für den Abbau von Nährstoffen produziert. Die Hauptnährstoffe Kohlenhydrate, Proteine und Fette werden dadurch zu Monosacchariden, Aminosäuren und Monoglyceriden bzw. Glycerin und Fettsäuren abgebaut und anschließend resorbiert. Die Enzyme gelangen über Sekrete in das Lumen des Verdauungstrakts oder liegen membrangebunden in der Bürstensaumregion vor. Die

Enzyme und Resorptionsvorgänge von Monogastriern, zu denen sowohl viele Säugetiere (z. B. der Mensch) als auch die Vögel zählen, ähneln sich.

Der Verdau von Kohlenhydraten durch körpereigene Enzyme ist bei Geflügel, wie auch bei Säugetieren, auf den Abbau von Stärke und Glykogen sowie wenige Disaccharide begrenzt. Glykogen ist ein tierisches Speicherpolysaccharid und kommt in pflanzenbasierten Futtermitteln nicht vor. Anders als bei anderen Vögeln und Säugetieren produziert die Speicheldrüse von Hühnergeflügel keine α -Amylase. Dadurch beginnt der enzymatische Verdau von Kohlenhydraten durch körpereigene Enzyme erst im Duodenum, wo Pankreassekret und Gallensaft in den Dünndarm abgegeben werden. Das Pankreassekret enthält α -Amylase, ein Endoenzym, das α -(1→4)-glykosidische Bindungen zwischen Glucoseeinheiten spaltet. Dadurch wird Stärke in Di- und Oligosaccharide gespalten. Es entstehen Maltose, Maltotriose und weitere Oligosaccharide, die zum Teil α -(1→6)-glykosidische Verzweigungen, überwiegend aus dem Abbau von Amylopektin, aufweisen (vgl. Kapitel 1.2.2). Der weitere Abbau bis zur Glucose, die schließlich resorbiert wird, erfolgt durch membrangebundene Exoenzyme wie Glucoamylase, α -1,6-Glucosidase, Maltase, Isomaltase und Maltotriase. Weitere Enzyme zur Spaltung von Disacchariden, die nicht ausschließlich aus Glucose aufgebaut sind, liegen ebenfalls membrangebunden vor. Zu ihnen gehört die Invertase, die Saccharose in Glucose und Fructose spaltet. Lactase, zur Spaltung von Lactose, kommt im Verdauungstrakt von Geflügel nicht vor (Jeroch *et al.*, 2019).

Durch körpereigene Enzyme können nur die beschriebenen Kohlenhydrate gespalten werden. Es werden keine Enzyme zum Abbau von NSP produziert. Auch Oligosaccharide mit anderen Bindungstypen können nicht von körpereigenen Enzymen abgebaut werden. Dazu gehören beispielsweise RFO, für deren vollständige Spaltung ein Enzym mit α -Galactosidaseaktivität erforderlich wäre. Im Magen ist aufgrund des niedrigen pH-Werts ein geringfügiger Abbau von NSP durch saure Hydrolyse denkbar. Abgesehen davon können diese Kohlenhydrate nicht gespalten werden und gelangen unverdaut bis zum Ende des Dünndarms (Choct *et al.*, 2010). Ein Teil der nicht verdauten Kohlenhydrate gelangt in die Blinddärme und kann dort von Mikroorganismen verstoffwechselt werden. Diese Prozesse werden im folgenden Kapitel beschrieben.

1.3.3 Mikrobiom und mikrobieller Verdau von Kohlenhydraten

In allen Abschnitten des Verdauungstrakts kommen Mikroorganismen vor, die in ihrer Gesamtheit als das Mikrobiom bezeichnet werden. Bei Hühnergeflügel sind vor allem die Blinddärme stark besiedelt und damit, anders als bei den meisten Säugetieren, Hauptort der mikrobiellen Fermentation. Dabei werden hauptsächlich Kohlenhydrate zu Milchsäure (Lactat) und kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, engl.: *Short-Chain Fatty Acids*) umgesetzt. Überwiegend gebildete SCFA sind Essigsäure (Acetat), Propionsäure (Propionat) und Buttersäure (Butyrat). Die Fermentation wird durch die vergleichsweise lange Verweildauer des Darminhalts in den Blinddärmen begünstigt.

Bereits im Kropf und Magen kann es durch die dort vorkommenden Mikroorganismen zu einer geringfügigen Fermentation von verdaubaren Kohlenhydraten kommen, hierbei entstehen überwiegend Lactat und Acetat. Im Dünndarm vorkommende Bakterien können ebenfalls verdaubare Kohlenhydrate verwerten. Komplexere Saccharide werden hier nur in sehr geringem Umfang fermentiert und der Abbau beschränkt sich auf kurzkettige und lösliche Kohlenhydrate. Hauptfermentationsprodukte im Dünndarm sind ebenfalls Acetat und Lactat (Rehman *et al.*, 2007). Im Dünndarm nicht abgebaute und resorbierte Bestandteile der Nahrung gelangen in den Dickdarm und zum Teil in die Blinddärme (vgl. Kapitel 1.3.1). Dabei handelt es sich überwiegend um NSP, wobei auch kleine Anteile an nicht resorbierten Mono- und Oligosaccharide sowie resistente Stärke in die Blinddärme gelangen können. Bei Broilern sind im Durchschnitt 2 % der vorhandenen Stärke am Ende des Ileums noch nicht verdaut (Weurding *et al.*, 2001). In den Blinddärmen kommen Mikroorganismen vor, die in der Lage sind, Enzyme zum Abbau von NSP zu produzieren und diese zu verstoffwechseln. Dabei entstehen hauptsächlich Acetat, Butyrat und Propionat. Die Anteile und Konzentrationen der SCFAs sind unter anderem abhängig vom Futter und den darin enthaltenen NSP sowie der Zusammensetzung des Mikrobioms. Gebildete SCFAs können vom Wirt, in diesem Fall dem Huhn, resorbiert und als Energiequelle genutzt werden. Damit tragen NSP indirekt zum Energiehaushalt bei, wobei ihr Anteil als eher gering (ca. 3,5 % des Gesamtenergiebedarfs) eingeschätzt wird (Jeroch *et al.*, 2019). SCFAs haben noch weitere nützliche Eigenschaften, so wird insbesondere Butyrat, unter anderem aufgrund seiner entzündungshemmenden Eigenschaften, als positiv bewertet (Rehman *et al.*, 2007; Mahmood & Guo, 2020).

Das Mikrobiom von Hühnergeflügel hat neben der Fermentation von nichtverdauten Kohlenhydraten weitere wichtige Funktionen. Durch die Besiedelung der Innenseite der Darmwand kann die Ausbreitung von pathogenen Bakterien, wie *Salmonella* und *Campylobacter*, reduziert werden. Des Weiteren produzieren die Mikroorganismen wasserlösliche Vitamine und beeinflussen den Stickstoffhaushalt sowie das Immunsystem (Shang *et al.*, 2018).

1.3.3.1 Zusammensetzung des Mikrobioms

Die Zusammensetzung der Mikroorganismen ist sehr komplex. Bei Hühnern besteht das Mikrobiom aus Bakterien, *Archaea*, *Eukarya* (z. B. Pilze, Parasiten) und Viren, wobei Bakterien dominieren. Im Blinddarm beträgt ihr Anteil ungefähr 98 % (Glendinning *et al.*, 2020). Das Mikrobiom im Blinddarm ist sehr vielfältig und Daten aus der Literatur weisen große Unterschiede in der Zusammensetzung auf. Es gibt viele Faktoren, die das Mikrobiom beeinflussen können, dazu zählen Genotyp, Brutbedingungen und Gesundheit der Zuchttiere sowie Haltungform und Fütterung (Mahmood & Guo, 2020). In Studien konnte gezeigt werden, dass selbst bei Tieren aus der gleichen Herde (gleicher Broilergentyp, gleiches Futter) große Unterschiede im Mikrobiom auftreten können. Dies verdeutlicht die Diversität und Individualität des Mikrobioms (Stanley *et al.*, 2013; Elling-

Staats *et al.*, 2022). Bei der generellen Zusammensetzung des Mikrobioms von Hühnern haben sich drei Faktoren als besonders bedeutsam herausgestellt: Das Alter des Tiers, der Abschnitt des Verdauungstrakts und die Futterzusammensetzung (Shang *et al.*, 2018; Mahmood & Guo, 2020). Durch die Zusammensetzung des Futters und entsprechende Zusätze ist es möglich, das Mikrobiom zu beeinflussen. Diese Zusammenhänge werden in Kapitel 1.4.1 weiter ausgeführt.

Wenn ein Küken schlüpft, befinden sich im Verdauungstrakt sehr wenig Mikroorganismen. In der Natur kommt das Küken direkt mit dem Mikrobiom der Mutterhenne in Berührung, bei der kommerziellen Aufzucht fehlt dieser Kontakt für gewöhnlich. Die Besiedelung des Verdauungstrakts findet in den ersten Lebensstagen statt und ist stark von den Umweltbedingungen, z. B. vorhandene Mikroorganismen in Futter und Wasser, abhängig (Shang *et al.*, 2018; Mahmood & Guo, 2020; Bedford & Apajalahti, 2022). Bei sehr jungen Tieren sind die Funktionen des Verdauungstrakts noch nicht vollständig ausgebildet. Dadurch werden leichtverdaubare Nährstoffe nicht vollständig resorbiert und gelangen in die unteren Abschnitte des Verdauungstrakts, wo sie den Mikroorganismen zur Verfügung stehen. Wird das Tier älter, ist es in der Lage die verdaubaren Nährstoffe nahezu vollständig zu resorbieren. Zusätzlich entwickelt sich das Mikrobiom im Dünndarm und fermentiert leichtverdaubare Substrate wie beispielsweise Oligosaccharide und gut zugängliche Polysaccharide. In Folge dessen gelangen nur noch komplexere und schwerer bzw. nicht verdaubare Inhaltstoffe, wie NSP, in den Dickdarm und das Mikrobiom dort muss sich entsprechend anpassen. Allgemein wurde beobachtet, dass in einer Umgebung mit vielen verfügbaren Nährstoffen die Vielfalt an Mikroorganismen eher geringer ist. Dies trifft beispielsweise auf das Mikrobiom im Dünndarm zu. Sind weniger und überwiegend komplexere Substrate vorhanden, wie es im Blinddarm der Fall ist, werden für den Abbau in der Regel mehrere verschiedene Mikroorganismen benötigt, weshalb sich ein komplexeres Mikrobiom mit einer deutlich höheren Diversität ausbildet. (Bedford & Apajalahti, 2022). Bei einer Studie, in der das Mikrobiom im Blinddarm von Broilern täglich analysiert wurde, konnte gezeigt werden, dass sich das Mikrobiom bis Tag 12 schnell und divers entwickelt. Dabei variierten sowohl die vorkommenden Spezies als auch die Anzahl der Bakterien. Ab Tag 20 war eine Stabilisierung hinsichtlich beider Parameter festzustellen (Ijaz *et al.*, 2018). Daraus lässt sich schließen, dass sich ab diesem Zeitpunkt ein Gleichgewicht zwischen verfügbaren Nährstoffen und der Zusammensetzung des Mikrobioms eingestellt hat (Bedford & Apajalahti, 2022). Andere Studien konnten erst nach 28 oder mehr als 42 Tagen eine Stabilisierung der Mikrobiomzusammensetzung beobachten (Morgan, 2023).

Durch die unterschiedlichen Funktionen und verfügbaren Nährstoffe in den einzelnen Abschnitten des Verdauungstraktes siedeln sich dort unterschiedliche Mikroorganismen an. Im Kropf dominieren für gewöhnlich Lactobazillen. Im Magen ist die Fermentationsaktivität aufgrund des niedrigeren pH-Werts geringer. Hier kommen laut Literatur hauptsächlich Lactobazillen, Enterokokken, lactose-negative Enterobakterien und coliforme Bakterien vor. Im Duodenum sind überwiegend Lactobazillen, Clostridien,

Streptokokken und Enterobakterien vorzufinden. Für den restlichen Teil des Dünndarms variieren die Angaben in Abhängigkeit von Alter und anderen Einflussfaktoren. Im Ileum wird ebenfalls häufig die Gattung *Lactobacillus* als dominierend angegeben, außerdem ist unter anderem das Vorkommen von Clostridien, Streptokokken und Enterokokken beschrieben. Die Gesamtkeimzahl im Dünndarm liegt im Bereich von 10^8 bis 10^9 koloniebildenden Einheiten pro Gramm Darminhalt (Rehman *et al.*, 2007; Shang *et al.*, 2018).

Wie bereits erwähnt, ist die Anzahl und Diversität der Mikroorganismen im Blinddarm sehr hoch, die Gesamtkeimzahl dort liegt bei 10^{10} bis 10^{11} koloniebildenden Einheiten (Shang *et al.*, 2018). Wie ebenfalls beschrieben, gibt es große Unterschiede in den Literaturdaten bezüglich der Zusammensetzung des Blinddarmmikrobioms. Dies kann durch die vielen Einflussfaktoren (Futter, Umweltfaktoren etc.) sowie tierindividuelle Effekte begründet werden, aber auch durch die verwendeten Analysetechniken, die im Laufe der Zeit weiterentwickelt und optimiert wurden. Elling-Staars und Mitarbeitende (2022) haben eine Übersicht über die meisten im Blinddarm von Broilern vorkommenden Bakterien zusammengestellt. Demnach gehören 50 - 96 % der vorkommenden Bakterien zur Abteilung (Phylum) der Firmicutes. Ebenfalls häufig kommen Bakterien der Abteilung Bacteroidetes vor (0,2 - 21 %). Des Weiteren wurden Bakterien der Abteilungen Proteobacteria (0,3 - 14 %), Actinobacteria (0,2 - 2,5 %), Tenericutes (1,7 - 2,6 %), Cyanobacteria (0,2 - 2,5 %), Verrucomicrobiota (0,4 %) und Lentisphaerae (0,1 %) nachgewiesen. In Abbildung 7 sind einige im Broilermikrobiom vorkommende Bakteriengattungen und ihre taxonomische Einordnung aufgeführt. Neben den erfassten Bakterienarten kommen im Blinddarm von Hühnern viele bisher nicht identifizierte bzw. klassifizierte Bakterien vor (Elling-Staats *et al.*, 2022).

1.3.3.2 Mikrobielle Enzyme zum Abbau von Nicht-Stärke-Polysacchariden

Die Bakterien im Blinddarm von Hühnern sind in der Lage eine Vielzahl von Enzymen zum Abbau von NSP zu produzieren. Diese können auf unterschiedliche Arten charakterisiert werden. Eine Möglichkeit ist die Bestimmung der Enzymaktivität durch Zugabe eines bestimmten Substrats (Bautil *et al.*, 2019). Eine andere Herangehensweise ist die Sequenzierung und Auswertung der DNA, um durch einen Datenbankabgleich Genabschnitte zu identifizieren, die wahrscheinlich für bestimmte Enzymaktivitäten codieren. Dabei können diese Genabschnitte den Bakteriengruppen, in denen sie vorkommen, zugeordnet werden. Von Sergeant und Mitarbeitenden (2014) liegt hierzu eine ausführliche Metagenomstudie für das Blinddarmmikrobiom von 42 Tage alten Broilern vor. Darin wurde unter anderem das Vorkommen von Genabschnitten, die für Glykosid-Hydrolasen (GH) codieren, untersucht. Es konnten Sequenzen für mehr als 200 verschiedene Enzyme zum Abbau von NSP detektiert werden. Dabei traten vergleichsweise wenige Genabschnitte auf, die für Cellulasen und *endo*-Hemicellulasen codieren und viele,

Abteilung	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>
			Lachnospiraceae	
			Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>
				<i>Faecalibacterium</i>
	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
			Lactobacillales	Lactobacillaceae
		Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>
	Leuconostocaceae		<i>Weissella</i>	
	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Sporomusa</i> <i>Megamonas</i>
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae
Porphyromonadaceae				<i>Parabacteroides</i> <i>Tannerella</i>
Prevotallaceae				<i>Prevotella</i>
Rikenellaceae				<i>Alistipes</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>
		Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>
		Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i> <i>Escherichia</i>
	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Campylobacter</i>

Abbildung 7: Taxonomische Einordnung ausgewählter Bakterien, die im Mikrobiom des Blinddarms von Broilern nachgewiesen wurden (modifiziert nach Elling-Staats *et al.*, 2022)

denen Enzyme zum Abbau von Oligosacchariden zugeordnet werden. Dies unterstützt die Beobachtung, dass vorrangig niedermolekulare und lösliche Polysaccharide in die Blinddärme gelangen (vgl. Kapitel 1.3.1). Außerdem wurden mehr Sequenzen für Enzyme zum Abbau von Xylanen als zum Abbau von β -Glucanen gefunden. Die Sequenzen für Enzyme zur Spaltung von Xylanen, wie *endo*- und *exo*-Xylanasen, aber auch Arabinofuranosidasen, wurden hauptsächlich den drei Bakterienklassen Actinobacteria, Clostridia und Bacteroidia zugeordnet. Gene für Enzyme mit *endo*-Glucanaseaktivitäten waren vermehrt in den Bakterien der Klassen Negativicutes und Lentisphaerae vorzufinden. In Bakterien können spezielle Komplexe vorkommen, sogenannte *Polysaccharide Utilization Systems* (PUL), die Polysaccharide spalten und die Abbauprodukte direkt aufnehmen können. Im Blinddarmmikrobiom von Broilern konnte eine Vielzahl für solche Komplexe codierende Genabschnitte in der Abteilung der Bacteroidetes nachgewiesen werden (Sergeant *et al.*, 2014). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Bakterien der Familien Ruminococcaceae und Lachnospiraceae Genabschnitte besitzen, die für α - und β -Galactosidasen codieren (Biddle *et al.*, 2013).

1.4 Industrielle Hühnergeflügelmast und Futtereffizienz

Die Nachfrage nach Hühnerfleisch ist sehr groß und stetig im Wachstum. Weltweit werden über 100 Millionen Tonnen Hühnerfleisch pro Jahr produziert (Zampiga *et al.*, 2021). Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden über die Jahre schnellwachsende Jungmasthühner, auch als Broiler bezeichnet, gezüchtet. Häufig eingesetzte Broilergentypen sind „Ross 308“ und „Cobb 500“. Die Mastdauer beträgt, je nach Mastverfahren, zwischen 29 und 46 Tagen, und die Tiere erreichen zum Mastende üblicherweise ein Gewicht von 1,5 bis 3,2 kg (Jeroch *et al.*, 2019).

Neben der Zucht spielt in der Geflügelproduktion die Fütterung eine entscheidende Rolle. Die Kosten für das Futter betragen etwa 70 % der Gesamtkosten (Borda-Molina *et al.*, 2018). Der Futteraufwand liegt bei Hochleistungstieren ungefähr im Bereich von 1,5 bis 1,7 kg Futter pro kg Gewichtszunahme, abhängig vom Alter und der Mastdauer. Der mittlere Futtermittelverzehr liegt in der 1. Woche bei ca. 23 g Futter pro Tag und steigt bis zur 6. Woche auf ca. 200 g Futter pro Tag (Jeroch *et al.*, 2019). Zur Einschätzung der Futterverwertung bzw. Futtereffizienz wird in der Regel die Futterumwandlungsrate (FCR, engl.: *Feed Conversion Ratio*) angegeben. Diese stellt in der Geflügelmast das Verhältnis zwischen Futteraufnahme und Körpergewichtszunahme über eine bestimmte Zeit dar. Je kleiner dieser Wert, desto weniger Futter wird benötigt, um die gleiche Zunahme an Körpergewicht zu erreichen. Parameter wie Körpergewichtszunahme, Futteraufnahme und FCR werden häufig unter dem Begriff Leistung zusammengefasst. Grundsätzlich ist es erstrebenswert die Futtereffizienz zu steigern. Neben der Senkung der Futterkosten können dadurch auch Verbesserungen hinsichtlich ökologischer Aspekte erreicht werden. Wird der Futterbedarf gesenkt, werden beispielsweise weniger Flächen für die Produktion des Futtermittels benötigt und es muss weniger Futter transportiert werden, was sich z. B. positiv auf die CO₂-Bilanz auswirkt (Zampiga *et al.*, 2021).

Um die Futtereffizienz verbessern zu können, sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. Einer dieser Faktoren ist die Verstoffwechslung im Tier, welche durch gezielte Züchtung optimiert wurde. Ein anderer Faktor ist die Zusammensetzung des Futters und somit die darin vorkommenden Inhaltsstoffe. Dabei handelt es sich einerseits um Nährstoffe, andererseits können aber auch antinutritive Stoffe enthalten sein, die die Verdaulichkeit herabsetzen. Dazu zählen beispielsweise Trypsininhibitoren und Lektine in der Sojabohne (vgl. Kapitel 1.1.2). Werden diese Stoffe im Futter identifiziert und reduziert oder inaktiviert, kann dadurch die Futtereffizienz verbessert werden. NSP können von körpereigenen Enzymen nicht abgebaut werden und galten lange Zeit als antinutritive Stoffe. Zwischenzeitlich ist jedoch ihr Einfluss auf das Mikrobiom und die Bedeutung des Mikrobioms für die Gesundheit und damit auch die Leistung der Tiere bekannt. Deshalb wird aktuell angestrebt, die antinutritiven Eigenschaften der NSP besser zu verstehen und gezielt zu reduzieren, um beispielsweise die positiven Effekte auf das Mikrobiom besser nutzen zu können (Nguyen *et al.*, 2021).

1.4.1 Antinutritive und nutritive Effekte von Nicht-Stärke-Polysacchariden

NSP gelangen unverdaut bis zum unteren Teil des Verdauungstraktes und tragen nur indirekt zur Energiegewinnung bei (vgl. Kapitel 1.3). Um die Nährstoffdichte des Futters zu erhöhen, wird deshalb der Anteil der Fasern häufig möglichst gering gehalten. Außerdem können Nährstoffe in Zellwandstrukturen eingeschlossen und damit nicht zugänglich sein, was einer der Gründe ist, weshalb NSP als antinutritiv angesehen werden. Des Weiteren können einige NSP, beispielsweise Pektine und Arabinoxylane, die Viskosität des Darminhalts erhöhen. Dies hat eine verminderte Nährstofffreisetzung und -resorption zur Folge. Zusätzlich verändern sich dadurch die Passagezeiten im Verdauungstrakt, wodurch beispielsweise das Wachstum von pathogenen Mikroorganismen begünstigt werden kann (Bedford, 2018; Tejeda & Kim, 2021; Nguyen *et al.*, 2021). Zusammenfassend lassen sich zwei antinutritive Effekte festhalten: NSP können die Viskosität erhöhen und Nährstoffe einschließen.

Dem entgegen stehen Erkenntnisse darüber, dass NSP die Morphologie und Organaktivität des Verdauungstrakts sowie das Mikrobiom positiv beeinflussen können. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass durch einen höheren Fasergehalt das Gewicht und die Aktivität des Magens sowie die Verweildauer erhöht wird. Dadurch wird das Futter besser mechanisch zerkleinert und steht länger in Kontakt mit dem sauren pepsinhaltigen Magensaft, was zu einer verbesserten Verdaubarkeit führen kann (Mahmood & Guo, 2020; Tejeda & Kim, 2021). Werden verdaubare Kohlenhydrate im Dünndarm vermehrt resorbiert, stehen sie dem Mikrobiom im Blinddarm nicht mehr zur Verfügung, woraufhin sich dieses an die entsprechend verfügbaren Nährstoffe anpassen muss (vgl. Kapitel 1.3.3.1). Ein entscheidender Faktor ist die Art und Zusammensetzung der im Futter enthaltenen NSP. So konnte beispielsweise beobachtet werden, dass bei Broilern, die mit Weizen gefüttert wurden, vermehrt Bakterien der Familien Lactobacillaceae und Bifidobacteriaceae im Blinddarm nachzuweisen waren im Vergleich zu Broilern, die mit Mais gefüttert wurden (Morgan, 2023). Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, werden aktuell vermehrt Studien auf diesem Gebiet durchgeführt (Mahmood & Guo, 2020; Nguyen *et al.*, 2021; Tejeda & Kim, 2021).

Eine Möglichkeit, die oben beschriebenen antinutritiven Effekte der NSP zu minimieren, ist der Einsatz von NSP-spaltenden Enzymen (NSPasen) im Futtermittel. Dabei kommen unterschiedliche Enzymklassen zur Anwendung. Häufig eingesetzt werden Enzyme zur Spaltung von Arabinoxylanen, da diese in hohen Anteilen in Getreide vorkommen und zum Teil viskositätserhöhende Eigenschaften aufweisen (Bedford, 2018).

1.4.2 Xylanasen

Im Futtermittelbereich werden meist *endo*- β -1,4-Xylanasen verwendet. Diese spalten hydrolytisch die β -(1 \rightarrow 4)-glykosidischen Bindungen innerhalb des Xylanrückgrats. Xylanasen gehören überwiegend zu den GH der Familie 10 und 11, wobei auch beispielsweise

in den GH-Familien 5, 7, 8, 30 und 43 Xylanasen vorzufinden sind. Die Xylanasen spalten je nach GH-Familie bevorzugt an unterschiedlichen Stellen im Xylanrückgrat (Bhardwaj *et al.*, 2019). GH10-Xylanasen benötigen mindestens zwei aufeinander folgende unsubstituierte Xyloseeinheiten, um das Xylanrückgrat spalten zu können. Als kleinstes Spaltprodukt entsteht Xylobiose (X_2). Sind Seitenketten im Xylan vorhanden, entstehen als kleinste Spaltprodukte häufig Oligosaccharide, die aus drei Xyloseeinheiten aufgebaut sind und am nicht-reduzierenden Ende eine Seitenkette tragen. GH10-Xylanasen tolerieren auch Seitenketten, die mit Ferulasäure verestert vorliegen (Biely *et al.*, 2016; Nordberg Karlsson *et al.*, 2018). GH11-Xylanasen bevorzugen unsubstituierte Abschnitte. Sie benötigen für die Spaltung mindestens drei Xyloseeinheiten ohne Seitenketten, wobei die Endprodukte X_2 und/oder Xylotriose (X_3) sind. Spalten GH11-Xylanasen in Bereichen mit Seitenketten, entstehen als kleinste Einheiten in der Regel Oligosaccharide mit vier Xyloseeinheiten: Zwei unsubstituierte Einheiten am reduzierenden Ende, daran gebunden eine substituierte Einheit gefolgt von einer weiteren unsubstituierten Einheit am nicht-reduzierenden Ende (Biely *et al.*, 2016; Nordberg Karlsson *et al.*, 2018).

Wie in Kapitel 1.2.3.3 beschrieben, weisen die Arabinoxylane in Mais zum Teil komplexe Seitenketten und hohe Substitutionsgrade auf. Dadurch ist das Rückgrat für Enzyme schwerer zugänglich als bei Arabinoxylanen anderer Getreidesorten, was die enzymatische Hydrolyse durch Xylanasen beeinträchtigt. Es gibt erfolgreiche Versuche die Verdaulichkeit von Maisarabinoxylanen zu verbessern, indem dem Futter zusätzlich zu einer *endo*-Xylanase noch ein Enzym, das die Seitenketten abbauen kann (z. B. α -L-Arabinofuranosidasen oder Esterasen), zugesetzt wird (Ward, 2021).

1.4.3 Wirkungsmechanismen von Xylanasen als Futterenzyme

Futtermittelenzyme werden schon seit fast 40 Jahren in der Geflügelindustrie eingesetzt mit dem Ziel die Futtereffizienz zu steigern und damit die Leistung der Tiere zu verbessern. Aufgrund der oben beschriebenen antinutritiven Effekte von NSP wurden vermehrt NSPasen getestet. Ihr positiver Einfluss auf die Leistung ist schon seit den 1980er Jahren bekannt und gut beschrieben. Allerdings sind die dahinterstehenden Mechanismen bis heute nicht vollständig verstanden (Masey O'Neill *et al.*, 2014; Bedford, 2018; Nguyen *et al.*, 2021; Van Hoeck *et al.*, 2021). Es werden drei Hauptwirkungsmechanismen für NSPasen diskutiert: Reduktion der Viskosität, Zerstörung der Zellwand und Erzeugung von Präbiotika.

Die Reduktion der Viskosität erscheint naheliegend. Wird die Viskosität durch die Spaltung entsprechender Polysaccharide reduziert, kann der Darminhalt besser durchmischt werden, Verdauungsenzyme kommen vermehrt in Kontakt mit den Nährstoffen und die Nährstoffe können effizienter resorbiert werden, wodurch mehr Energie umgesetzt werden kann. Es konnte in Fütterungsversuchen beobachtet werden, dass durch Zugabe bestimmter NSPasen die Viskosität des Darminhalts reduziert werden kann und dass, wenn zu Futter mit hoher Viskosität geeignete Enzyme zugegeben werden, die Leistung von

Geflügel gesteigert werden kann. Bei diesen Studien zeigte sich, dass es eine Abhängigkeit zwischen der Viskosität des Darminhalts und dem Alter der Tiere gibt. Bei jüngeren Tieren ist der viskositätsreduzierende Effekt von Xylanasen größer als bei älteren (Bedford, 2018; Bedford & Apajalahti, 2022).

Der Hypothese der Zerstörung der Zellwand liegt zugrunde, dass Nährstoffe in der Zelle eingeschlossen sein können und somit für Verdauungsenzyme nicht zugänglich sind, wenn die Zellwand intakt ist. In *in-vitro*-Versuchen konnte jedoch keine ausreichende Schädigung der Zellwandstruktur durch geeignete Enzymmischungen und in Zeiträumen, die für den Verdauungstrakt von Hühnern relevant sind, gezeigt werden. Erst bei Enzymmengen, die 10- bis 50-fach über den empfohlenen Zugabemengen lagen und nach Zeiten, in denen der Darminhalt bereits im Jejunum angekommen wäre, wurde ein entsprechender Abbau beobachtet. Hinzu kommt, dass in den meisten Fütterungsversuchen nur ein einzelnes Enzym eingesetzt wird und keine Enzymmischung, wie bei den angeführten *in-vitro*-Versuchen. Aus diesen Gründen wird in Frage gestellt, ob und in welchem Ausmaß dieser Mechanismus tatsächlich zu den Effekten beiträgt (Bedford, 2018).

Der dritte diskutierte Wirkmechanismus ist die Erzeugung von Präbiotika. Bereits im Jahr 1995 wurde postuliert, dass Xylanasen durch die Generierung von Oligosacchariden das Mikrobiom beeinflussen können (Morgan *et al.*, 1995). Dieser Punkt bekam jedoch lange wenig Aufmerksamkeit und wurde erst in letzter Zeit eingehender untersucht (Bedford, 2018). Erkenntnisse hierzu lieferten Versuche, bei denen isolierte und aufgereinigte Oligosaccharide, beispielsweise AXOS aus Weizenkleie, anstatt Xylanasen zum Futter zugesetzt wurden (Courtin *et al.*, 2008). Durch den (A)XOS-Zusatz waren ähnliche Effekte zu beobachten (z. B. Verbesserung der FCR) wie beim Zusatz von Xylanasen, was zu dem Schluss führte, dass vergleichbare Mechanismen zugrunde liegen könnten. Da durch die Zugabe von isolierten (A)XOS zum Futter die NSP aus dem Futter im Darm nicht gespalten werden können und somit die beiden zuerst vorgestellten Wirkmechanismen (Reduktion der Viskosität durch Spaltung der NSP und Abbau der Zellwand) nicht für die beobachteten Effekte verantwortlich sein können, wurde vorgeschlagen, dass (A)XOS als Präbiotika wirken und es infolgedessen zu den beobachteten Effekten kommt (Courtin *et al.*, 2008; Bedford, 2018; Ribeiro *et al.*, 2018).

1.4.4 Präbiotische Wirkung von Xylooligosacchariden und der Einfluss von Xylanasen auf das Mikrobiom

Präbiotika sind Stoffe, die sich positiv auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auswirken, indem sie das Wachstum von nützlichen Mikroorganismen begünstigen. Dies fördert die Gesundheit und Leistung des Wirts, beispielsweise durch die Reduktion von pathogenen Bakterien und die Förderung der SCFA-Produktion. Als erwünscht werden im Allgemeinen die Bakterien der Gattung *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* angesehen, aber auch Bakterien, die vermehrt Butyrat produzieren (vgl. Kapitel 1.3.3) (Pourabedin *et al.*, 2017; Craig *et al.*, 2020; Bedford & Apajalahti, 2022; Jahan *et al.*, 2022). In den

letzten Jahren konnten einige Studien zeigen, dass durch den Zusatz von (A)XOS zum Futtermittel die Zusammensetzung des Mikrobioms sowie die Leistung von Broilern positiv beeinflusst wird. Beispielsweise konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von XOS zu einer erhöhten SCFA-Konzentration im Blinddarm führt. Die produzierten SCFA können wiederum als Energiequelle für das Huhn dienen und sich positiv auf die Verdauungsfunktionen sowie das Immunsystem auswirken (De Maesschalck *et al.*, 2015; Morgan *et al.*, 2019; Jahan *et al.*, 2022). Jedoch sind die Ergebnisse der Studien nicht konsistent und nicht bei allen Versuchen konnte eine Verbesserung der Leistung durch den Zusatz von XOS beobachtet werden (Suo *et al.*, 2015; Bautil *et al.*, 2020; Craig *et al.*, 2020). Eine weitere unerwartete Beobachtung war, dass selbst eine sehr geringe Menge an (A)XOS ausreicht, um Effekte hervorzurufen. Beschrieben sind Fütterungsversuche, bei denen die Dosierung zwischen 2 mg und 20 g XOS bzw. AXOS pro kg Futter lag (Jahan *et al.*, 2022; Morgan, 2023). Insbesondere bei den niedrigen Konzentrationen ist die Menge an Oligosacchariden zu gering, um daraus ausreichende Mengen SCFAs zu produzieren, mit denen die häufig beobachteten Steigerungen in der Leistung der Tiere und die damit einhergehenden Energiebilanzen erklärt werden könnten. Es wird vorgeschlagen, dass zusätzlich zur direkten Fermentation von XOS zu energieliefernden SCFAs, noch weitere Mechanismen am präbiotischen Effekt beteiligt sind (Bedford, 2018; Bautil *et al.*, 2020).

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, wird beim Zusatz von Xylanasen zum Futter diskutiert, ob Oligosaccharide mit potenziell präbiotischen Eigenschaften aus den NSP freigesetzt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass durch Zusatz einer Xylanase die Menge an Oligosacchariden im Dünndarm und eventuell im Caecum zunimmt. Jedoch wird auch hier davon ausgegangen, dass die potenziell freigesetzten Mengen zu klein sind, um die Steigerung der SCFA-Konzentrationen im Caecum erklären zu können (Ribeiro *et al.*, 2018; Craig *et al.*, 2020; Dale *et al.*, 2020). Die aktuellen Hypothesen gehen davon aus, dass eine Anpassung des Mikrobioms hin zu einer höheren Fermentation von zuvor nicht zugänglichen Substraten stattfindet, wodurch zusätzliche SCFA gebildet werden, was die beobachteten Effekte erklären würde. Im Falle von Xylanasen und (A)XOS bedeutet dies, dass angenommen wird, dass durch die *in vivo* generierten bzw. zugegebenen Oligosaccharide die Fähigkeit zur Fermentation von Xylanen im Blinddarm sukzessive zunimmt (Bedford & Apajalahti, 2022; Morgan, 2023). Das Mikrobiom wird demnach darauf „trainiert“, vermehrt Xylan abzubauen und zu SCFA umzusetzen. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass zum Teil Verzögerungen (bis zu mehreren Wochen) zwischen Fütterung der XOS und Eintritt der Effekte beobachtet wurden, obwohl die Umsetzung von XOS zu SCFA innerhalb von wenigen Stunden erfolgt. Demzufolge sind XOS nicht als klassische Präbiotika einzuordnen (Morgan *et al.*, 2021b; Morgan, 2023). In der Literatur wird in diesem Zusammenhang der Begriff Stimbiotika vorgeschlagen. Dabei handelt es sich um eine Komponente oder ein Signalmolekül, das selbst in sehr geringen Mengen die Mikroorganismen im Darm beeinflussen bzw. stimulieren kann, sodass diese vermehrt bestimmte Enzyme, z. B. zum Abbau von NSP, produzieren (Bedford & Apajalahti, 2022; Jahan *et al.*, 2022).

Beim Einsatz von Xylanasen werden noch weitere Mechanismen angeführt, die Einfluss auf das Mikrobiom und die beschriebenen Effekte haben könnten. Wie in Kapitel 1.4.3 erläutert, können NSPasen die Viskosität des Darminhalts reduzieren, wodurch die Resorption der verfügbaren Nährstoffe gesteigert wird. In Kapitel 1.3.3.1 sind die Zusammenhänge von verfügbaren Nährstoffen und der Entwicklung des Mikrobioms beschrieben. Wird durch die Zugabe von Xylanasen die Viskosität herabgesetzt, können Nährstoffe vermehrt im Dünndarm resorbiert werden und gelangen in geringerem Umfang in die Blinddärme. Dem Mikrobiom im Blinddarm stehen damit weniger leicht verdaubare Nährstoffe zur Verfügung und es muss sich folglich anpassen, um NSP abzubauen und als Energiequelle nutzen zu können. Im gleichen Zuge stehen durch die Xylanase freigesetzte (A)XOS zur Verfügung, die die Entwicklung des Mikrobioms hin zu einer erhöhten Xylanaseproduktion beeinflussen können. Diese Effekte wirken sich vor allem bei jungen Tieren aus, bei denen sich der Verdauungstrakt und das Mikrobiom in der Entwicklungsphase befinden (Bedford & Apajalahti, 2022; Morgan, 2023). Es könnte demnach mehrere ineinandergreifende Mechanismen geben, die an der Wirkweise von Xylanasen beteiligt sind. In Abbildung 8 sind die Zusammenhänge der vorgeschlagenen Wirkmechanismen von Xylanasen und (A)XOS schematisch dargestellt.

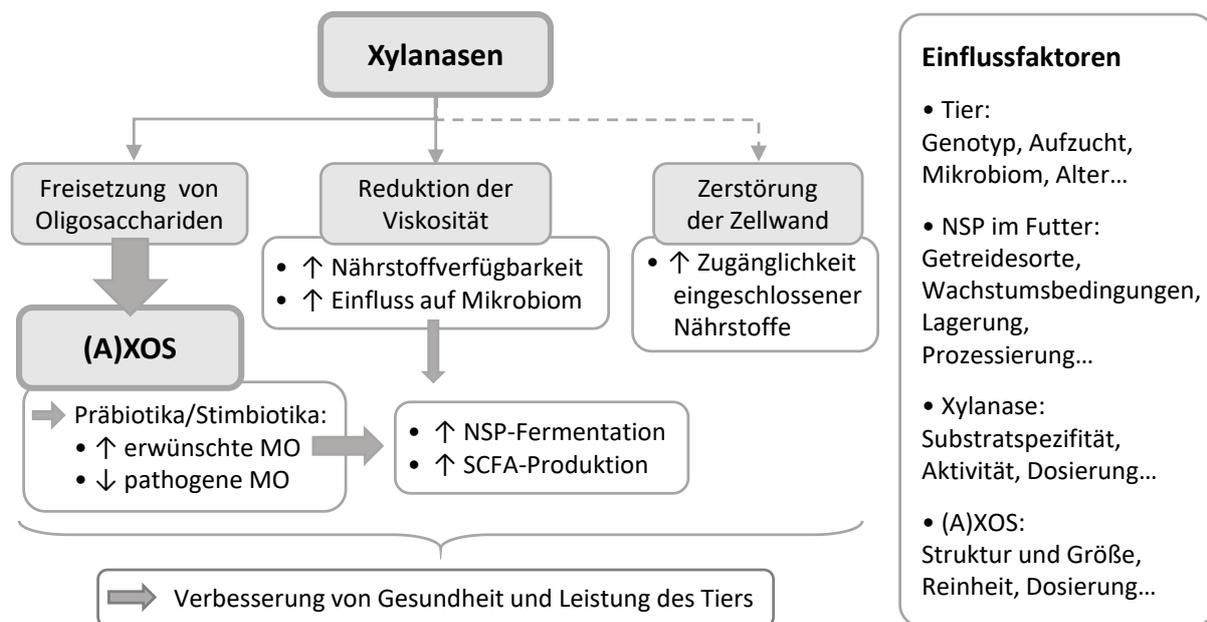


Abbildung 8: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Wirkmechanismen beim Zusatz von Xylanasen und/oder (Arabino-)Xylooligosacchariden ((A)XOS) zu Geflügelfutter (MO: Mikroorganismen, NSP: Nicht-Stärke-Polysaccharide, SCFA: *Short-Chain Fatty Acids*; zusammengestellt aus Bedford, 2018; Bedford & Apajalahti, 2022; Jahan *et al.*, 2022; Morgan, 2023)

Neben dem Zusatz von entweder Xylanasen oder (A)XOS gibt es auf dem Markt auch Präparate, die eine Kombination aus beiden enthalten. Damit sollen die positiven Effekte kombiniert und dadurch verstärkt werden (González-Ortiz *et al.*, 2021).

Wie bisher beschrieben, können sowohl Xylanasen als auch (A)XOS die Leistung und Gesundheit von Broilern positiv beeinflussen. Allerdings sind die in Studien beobachteten Effekte und Resultate teilweise nicht konsistent. Das trifft sowohl auf Versuche mit Xylanasen und (A)XOS als auch für Versuche mit anderen NSPasen und anderen Oligosaccharidtypen zu und erschwert somit die Aufklärung der Wirkmechanismen (Baker *et al.*, 2021; Bedford & Apajalahti, 2022; Jahan *et al.*, 2022; Morgan, 2023). Die unterschiedlichen Resultate können zum Teil durch die vielen Faktoren begründet werden, die an den Mechanismen beteiligt sind, beginnend bei der Zusammensetzung des Mikrobioms (vgl. Kapitel 1.3.3.1) über verschiedene Futtermittelzusammensetzungen bis hin zum Einsatz unterschiedlicher Xylanasen und (A)XOS-Präparaten. Diese beeinflussen die Vergleichbarkeit der Daten und erschweren die Interpretation.

Bei der Zusammensetzung des Futtermittels spielen viele Faktoren eine Rolle. Unterschiedliche Getreidesorten weisen beispielsweise eine unterschiedliche Zusammensetzung der enthaltenen NSP auf (Bach Knudsen, 1997). Außerdem können die NSP je nach Getreidesorte verschiedene Strukturmerkmale, wie z. B. unterschiedliche Substitutionsmuster, aufweisen (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Auch Wachstumsbedingungen, Umwelteinflüsse, Erntezeitpunkte, Lagerung und Verarbeitungsschritte haben Einfluss auf die Zusammensetzung der Futterrohstoffe. Dadurch kann sich die Zusammensetzung des Futters von Charge zu Charge unterscheiden (Nguyen *et al.*, 2021). Ebenfalls zu beachten ist, dass üblicherweise die Futterzusammensetzung mit dem Alter der Tiere hinsichtlich des Energie- und Proteinbedarfs angepasst wird. Bei Broilern bekommen in der Regel ältere Tiere Futter mit einem höheren Anteil an Getreide und einem reduzierten Anteil an Protein. Durch diese Anpassung werden die Verhältnisse der Rohstoffe und folglich die Anteile der enthaltenen NSP verändert. Bei Fütterungsversuchen werden die NSP in den Futtermitteln selten analysiert, weshalb diese Informationen für die Interpretation der Daten nur vereinzelt zur Verfügung stehen (Morgan, 2023).

Auch die Zusätze an sich werden meist nicht ausreichend charakterisiert bzw. beschrieben. Xylanasen können je nach GH-Familie unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen (vgl. Kapitel 1.4.2), wodurch unter anderem die Länge und die Struktur der freigesetzten Oligosaccharide variieren kann. Ebenfalls Einfluss hat, welches Getreide als Futter eingesetzt wird und in welchem Ausmaß die eingesetzte Xylanase die enthaltenen (Arabino-)Xylane abbauen kann. Abhängig davon stehen dem Mikrobiom andere Hydrolyseprodukte zur Verfügung. In einer Studie, bei der Broiler mit Futter basierend auf Mais oder Weizen mit und ohne Zusatz der gleichen Xylanase gefüttert wurden, konnten Unterschiede in Abhängigkeit von der Getreidesorte festgestellt werden (Kiarie *et al.*, 2014). Bei einer anderen Studie wurden zum gleichen Futter basierend auf Weizen und Soja zwei verschiedene Xylanasepräparate in drei Dosierungen zugegeben. Es konnten Unterschiede zwischen den beiden Enzympräparaten festgestellt werden, beispielsweise in Bezug auf den Abbau der Arabinoxylane in unterschiedlichen Abschnitten des Verdauungstrakts (Bautil *et al.*, 2021). Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Enzymmenge: Bei zu geringer Enzymmenge findet keine ausreichende Hydrolyse statt; wird zu viel

Enzym zugegeben, könnten die Poly- bzw. Oligosaccharide (beispielsweise aufgrund einer Xylosidasenebenaktivität) bis zu ihren monomeren Einheiten abgebaut werden und es verbleiben keine Oligosaccharide, die als Präbiotika wirken könnten. Ebenfalls Einfluss haben Parameter wie pH-Wert, Temperatur und Verweilzeiten im Verdauungstrakt, aber auch z. B. im Futter vorhandene Xylanaseinhibitoren (Baker *et al.*, 2021; Bautil *et al.*, 2021). Diese Faktoren, die zum Teil von Versuch zu Versuch schwanken und/oder schwer *in vitro* simuliert werden können, erschweren den Vergleich der eingesetzten Enzyme. Ein weiterer Punkt, der bei der Aufklärung der Wirkmechanismen von Xylanasen berücksichtigt werden sollte, sind eventuell auftretende Nebenaktivitäten des eingesetzten Enzympräparats. Werden weitere NSP gespalten und möglicherweise andere Typen von Oligosacchariden freigesetzt, könnten diese ebenfalls Einfluss auf die Mechanismen haben.

Einige dieser schwer einzuschätzenden Parameter bei der Fütterung von Xylanasen können durch die direkte Gabe von Oligosacchariden umgangen werden. Dadurch ist es möglich (A)XOS mit bestimmten Strukturmerkmalen sowie in einer vorgegebenen Menge einzusetzen und gezielt die Effekte auf Gesundheit, Leistung und Mikrobiom der Tiere zu untersuchen, um die dahinterstehenden Mechanismen besser einordnen zu können. Voraussetzung hierfür ist, dass die Oligosaccharidpräparate entsprechend analysiert und charakterisiert sind. Die Struktur, Zusammensetzung und Reinheit der isolierten Oligosaccharide können je nach Ausgangsmaterial und Herstellungsprozess variieren (Jahan *et al.*, 2022; Morgan, 2023). Da die Analyse von Kohlenhydraten spezielle Messtechniken erfordert und als zeitaufwendig und teuer gilt, wurden die Oligosaccharide im Futter und den Zusätzen bisher nur bei sehr wenigen Studien detailliert analysiert (Morgan, 2023).

2. Zielsetzung

In der Geflügelindustrie werden schon seit mehreren Jahrzehnten Enzyme den Futtermitteln zugesetzt, um die Futtermittelverwertung zu verbessern. Seit einigen Jahren wird zusätzlich der Einsatz von Oligosacchariden als Präbiotika untersucht. Es gilt als wahrscheinlich, dass sich die Zugabe von Xylanasen und/oder (A)XOS zum Futtermittel positiv auf die Gesundheit und Leistung von Broilern auswirkt, allerdings sind die beobachteten Effekte nicht konsistent. Beispielsweise bewirkt der Zusatz nicht in allen Fällen eine Steigerung der Leistung der Tiere und nach aktuellem Stand der Forschung sind die Gründe dafür nicht abschließend geklärt. Die Interpretation der Studien wird dadurch erschwert, dass verschiedene, komplexe und zum Teil ineinandergreifende Wirkmechanismen für die positiven Effekte diskutiert werden. Außerdem sind viele experimentelle Parameter zu berücksichtigen, die die Prozesse und damit die Ergebnisse der Studien beeinflussen können. Dazu zählen die Zusammensetzung des Futters, die Substratspezifität der eingesetzten Xylanasen und die Strukturen der zugesetzten (A)XOS. Bisher lag der Fokus der Studien auf der Erfassung von Kennwerten zur Leistung und zum Gesundheitszustand der Tiere sowie auf der Untersuchung der Zusammensetzung des Darmmikrobioms. Selten wurden die Futtermittelinhaltsstoffe und die Zusätze im Detail charakterisiert. Allerdings scheinen die freigesetzten oder zugefütterten Oligosaccharide aufgrund ihrer Interaktion mit dem Mikrobiom eine entscheidende Rolle bei den Wirkmechanismen einzunehmen. Daher wird angenommen, dass die Analyse dieser Oligosaccharide sowie der Oligo- und Polysaccharide in den Futtermitteln weiterführende Erkenntnisse liefert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Futtermittelproben aus einem von Kooperationspartnern durchgeführten Fütterungsversuch mit Broilern analysiert werden. In diesem Fütterungsversuch wurde der Einfluss verschiedener Maissorten sowie der Einsatz einer Xylanase und einer Kombination aus Xylanase und XOS auf die Gesundheit und Leistung der Broiler untersucht. Um ein möglichst vollständiges Bild der vorhandenen Poly- und Oligosaccharide zu erhalten, sollen die Einzelfuttermittel (Mais, Soja) sowie die zugesetzten Komponenten (Xylanase, XOS-Quelle) detailliert charakterisiert werden. Um die futtermittelabhängige Freisetzung von Oligosacchariden im Darm der Broiler zu analysieren, soll eine Methode zur Analyse von Oligosacchariden in Proben aus verschiedenen Abschnitten des Verdauungstrakts (Ileum, Caeca) entwickelt werden. Derartig komplexe Probenmatrizes erfordern probenangepasste Aufarbeitungsmethoden. Die Oligosaccharide sollen anschließend chromatographisch getrennt, identifiziert und, soweit möglich, quantifiziert werden. Da neben Oligosacchariden auch Monosaccharide freigesetzt werden, sollen ebenfalls freie, nicht resorbierte bzw. nicht fermentierte Monosaccharide in diesen Proben analysiert werden. Um altersabhängige Effekte abbilden zu können, wurden Proben 21 und 41 Tage nach Beginn der Fütterung entnommen und analysiert. Anhand der Ergebnisse sollen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Oligosaccharide in welchen Darmabschnitten vorkommen bzw. freigesetzt werden und wie bzw. ob dies von den verwendeten Einzelfuttermitteln und/oder den Zusätzen beeinflusst wird.

3. Material und Methoden

3.1 Fütterungsversuch, Probenmaterial und Probenbezeichnungen

Diese Arbeit ist Teil eines Kooperationsprojekts mit dem Industriepartner AB Vista. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben wurden von AB Vista sowie einem Kooperationspartner von der Autonomen Universität Barcelona zur Verfügung gestellt. Der Fütterungsversuch, aus dem die Proben für diese Arbeit stammten, wurde an der Universität in Barcelona im *Department of Animal and Food Science* von Diego Melo-Durán geleitet und durchgeführt. Ziel des Fütterungsversuchs war es, die Effekte des Einsatzes einer Xylanase und einer Kombination aus Xylanasen und XOS bei Verwendung verschiedener Maissorten hinsichtlich der Leistung von Broilern zu untersuchen. Die abschließende Auswertung der Leistungsparameter, die während des Fütterungsversuchs erfasst wurden, lag zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit nicht vor und konnte somit nicht in die Interpretation der hier generierten Daten einbezogen werden. Für den Fütterungsversuch wurden vier verschiedene Maissorten (Mais 1 - 4) ausgewählt, aus denen jeweils ein Basisfutter für junge Tiere (Tag 0 - 21, Starterfutter) mit 60 % Maisanteil und für ältere Tiere (Tag 21 - 41, Mastfutter) mit 65 % Maisanteil hergestellt wurde. Um den Proteingehalt optimal einzustellen, wurden zwei verschiedene Sojamehle (Soja 1 und 2) in unterschiedlichen Anteilen zugegeben. Das Futter wurde pelletiert (60 - 65 °C) und den Broilern *ad libitum* gefüttert. Die Futterrezepturen und Zusammensetzungen sind in Tabelle A1 (Kapitel 9.2) aufgeführt. Die Bezeichnungen und Probenkennungen der Maissorten sind in Tabelle A2 (Kapitel 9.2) festgehalten. Jedes Basisfutter wurde in drei Varianten hergestellt: Als Kontrolle ohne weitere Zusätze (Kon), mit Xylanase (Xyla; 16000 BXU) und mit Xylanase und XOS-Quelle (X+X; 16000 BXU und 50 mg/kg Futter). Ein BXU entspricht dabei der Menge an Enzym, die benötigt wird, um ein nmol Xylose pro Sekunde aus Birkenxylan freizusetzen. Insgesamt ergaben sich daraus zwölf Futtervarianten (s. Abbildung 9).

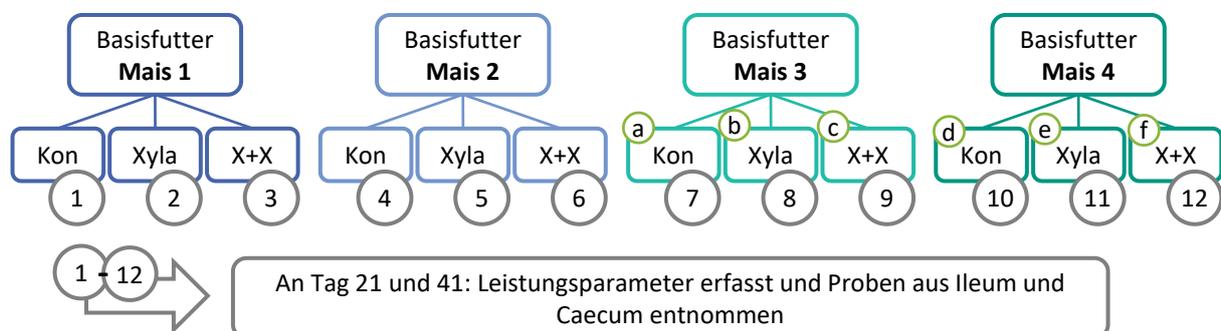


Abbildung 9: Übersicht über die zwölf Futtervarianten, die beim Fütterungsversuch eingesetzt wurden. Die Buchstaben a - f dienen der einfacheren Probenbenennung (Kon: Kontrolle ohne Zusätze, Xyla: mit Xylanase, X+X: mit Xylanase und Xylooligosacchariden).

Der Fütterungsversuch umfasste insgesamt 1152 Broiler (männlich, Rasse: Ross 308), die auf 96 Käfige mit je 12 Tieren aufgeteilt wurden (8 Käfige pro Futtervariante). Der Versuch war auf 41 Tage ausgelegt, wobei für Tag 21 und 41 die Leistungsparameter erfasst wurden. Zusätzlich wurden an Tag 21 und 41 unter anderem Proben des Darminhalts, im Folgenden bezeichnet als Darmproben, aus Ileum und Caecum für die Analyse der enthaltenen Oligosaccharide entnommen. Dafür wurden an Tag 21 pro Käfig 4 Tiere zufällig ausgewählt, getötet, aus jedem Tier Ileum- und Caecumproben entnommen und diese gepoolt, sodass pro Käfig eine Ileum- und eine Caecumprobe resultierte (Details s. unten). An Tag 41 wurden pro Käfig 2 der verbliebenen Tiere zufällig ausgewählt und deren Ileum- und Caecumproben analog entnommen und gepoolt. Da es insgesamt 8 Käfige pro Futtervariante gab, waren es folglich pro Futtervariante und Tag für Ileum und Caecum je acht gepoolte Proben (Tag 21 aus 4 Tieren, Tag 41 aus 2 Tieren). Bei diesen acht gepoolten Proben handelte es sich somit um biologische Replikate. Als Abgrenzung zwischen Jejunum und Ileum wurde das Meckel-Divertikel herangezogen (vgl. Kapitel 1.3.1), wobei die Ileumproben ab 5 cm nach dem Divertikel gesammelt wurden. Für die Caecumproben wurde der Inhalt aus beiden Ceaca entnommen. Die Probennahme erfolgte käfigweise: Direkt nachdem die Proben der vier bzw. zwei Tiere entnommen waren, wurden die Poolproben durchmischt und auf Trockeneis eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 bzw. -80 °C. Die Ileumproben wurden gefriergetrocknet, gemahlen und in kleinen Probenütchen zur Analyse an die Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am KIT geschickt. Die Caecumproben wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gefriergetrocknet und in dieser Form verschickt. Der Probensatz war aufgrund verschiedener Faktoren, wie geringe Probenmenge und Sterblichkeit der älteren Tiere, nicht vollständig (s. Tabelle A3 und Tabelle A4, Kapitel 9.2 sowie Kapitel 3.4.5).

Für diese Arbeit standen neben den Darmproben (s. unten) Proben der Einzelfuttermittel (Mais und Soja) sowie der zugegebenen Komponenten (Xylanase und XOS-Material) zur Verfügung. Die vier Maisproben wurden in Form von Maiskörnern verschickt. Die Sojaprogen wurden in gemahlener Form bereitgestellt. Bei der Probe Soja 1 handelte es sich um ein kommerziell erhältliches mikronisiertes Sojaproteinkonzentrat mit einem Proteingehalt von ca. 57 %. Die Probe Soja 2 war ein grob gemahlene Sojabohnenmehl mit einem Proteingehalt von ca. 47 %. Die Einzelfuttermittel wurden im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) analysiert. Es erfolgte eine Grundcharakterisierung sowie eine detaillierte Untersuchung der enthaltenen Zellwandpolysaccharide. Bei der zugesetzten Xylanase handelte es sich um eine thermostabile *endo*- β -1,4-Xylanase (EC 3.2.1.8, GH11, Optima: ca. 80 °C, pH 6,2) aus *Trichoderma reesei*, die von AB Vista zu Verfügung gestellt wurde. Für das Enzym sind nicht standardisierte Nebenaktivitäten wie β -Glucanase-, Mannanase- und Cellulasenebenaktivitäten bekannt. Die Standarddosierung liegt bei 16000 BXU pro kg Futter. Für die Laborversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden Verdünnungen hergestellt, die der Standarddosierung der Xylanase oder einem Vielfachen davon entsprachen. Eine Probe des XOS-haltigen Materials, das bei der dritten Futtervariante zugegeben wurde, wurde ebenfalls von AB Vista zur Verfügung gestellt. Dabei

handelte es sich um ein feinkörniges Pulver, das aus Maiskolben gewonnen wurde. Es enthält laut Hersteller lineare XOS mit DP 2 - 6 (282 - 810 Da) in einer Reinheit von 35 %. Die Probe wurde im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Sitter (2022) unter der Bezeichnung „XOS-Produkt A“ untersucht. Beim Fütterungsversuch wurden zum Futter 50 mg/kg des XOS-haltigen Materials zugegeben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden außerdem die Darmproben von Tag 21 und 41 aus Ileum und Caecum nach Fütterung auf Basis von Mais 3 und 4 (Erläuterung der Probenauswahl s. Kapitel 3.4.5) hinsichtlich der vorkommenden Mono- und Oligosaccharide analysiert. Die Probenbenennung erfolgte bei der Probennahme zufällig (Nr. 1 - 96) und wurde bei den für diese Arbeit durchgeführten Laboranalysen beibehalten, wodurch die Proben größtenteils randomisiert extrahiert und analysiert wurden. Für diese Niederschrift wurden die Proben zur einfacheren Beschreibung entsprechend folgendem Muster umbenannt: Die erste Ziffer entspricht der Nummer des biologischen Replikats (fortlaufend, 1 - 8), der Buchstabe (a - f) gibt die Futtermittellvariante an (s. Abbildung 9), die zweite Zahl (21, 41) entspricht dem Alter in Tagen und der letzte Buchstabe gibt an, ob die Probe aus dem Ileum (I) oder dem Caecum (C) stammt. Daraus ergibt sich beispielsweise die Probenbezeichnung 1a-21-I für das erste biologische Replikat der Futtermittellvariante a (Mais 3, Kon) von Tag 21 aus dem Ileum. In Tabelle A3 und Tabelle A4 (Kapitel 9.2) sind alle Ileum- und Caecumproben mit ursprünglicher und neuer Bezeichnung aufgeführt.

In den folgenden Kapiteln werden die verwendeten Aufarbeitungs- und Analysemethoden beschrieben und erläutert. Die verwendeten Chemikalien, Standardsubstanzen, Lösungen, Enzyme und Instrumente sind in Kapitel 7 aufgelistet. Die detaillierten Arbeitsvorschriften werden in Kapitel 8 ausgeführt.

3.2 Charakterisierung der Einzelfuttermittel

Das Standardverfahren zur Analyse von Futtermitteln ist die Weender Futtermittelanalyse. Dabei werden Rohwasser, Trockensubstanz, Rohprotein, Rohfett, Rohfaser, stickstofffreie Extraktstoffe und Rohasche bestimmt. Mit dieser Methode ist es jedoch nicht möglich die Kohlenhydratkomponenten genau zu erfassen, da sie sich sowohl in der Rohfaserfraktion als auch in der Fraktion der stickstofffreien Extraktstoffe wiederfinden. Deshalb schlug Van Soest (1963) die Detergenzienmethode zur Erweiterung der Futtermittelanalyse vor. Damit ist eine detailliertere Fraktionierung der Kohlenhydrat- und Zellwandkomponenten möglich. Seither hat sich die Analytik auf diesem Gebiet bedeutend weiterentwickelt und es kann eine deutlich präzisere Charakterisierung vorgenommen werden. Da es sich dabei allerdings um spezielle und zeitaufwändige Analysen handelt, werden diese nur selten im Futtermittelbereich durchgeführt (Nguyen *et al.*, 2021; Morgan, 2023).

Die Zusammensetzung der NSP im Futtermittel hat aufgrund verschiedener Faktoren einen bedeutenden Einfluss auf die Verdaubarkeit und die Wirkweise von Zusätzen wie Xylanasen und XOS (vgl. Kapitel 1.4). Um diesen Einfluss in dem durchgeführten

Fütterungsversuch besser einordnen zu können, wurden die Einzelfuttermittel, insbesondere in Bezug auf die enthaltenen NSP, im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) detailliert charakterisiert. Zunächst erfolgte eine Grundcharakterisierung des Zellwandmaterials, bei der die wasserunlöslichen und -löslichen Anteile in den Mais- und Sojaprobe sowie der Gehalt an Klason-Lignin in den Maisproben und der Gehalt an RFO in den Sojaprobe bestimmt wurden. Außerdem wurde für weitere Analysen wasserunlösliches und -lösliches Zellwandmaterial (UZM, LZM) aller Proben isoliert. Zur Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide wurde die Monosaccharidzusammensetzung dieser Fraktionen analysiert sowie die Bindungstypen der Monosaccharide in den Polysacchariden bestimmt. Zusätzlich wurden Profilingmethoden zur Aufklärung der Feinstruktur von Arabinanen, Galactanen und Xyloglucanen durchgeführt. Die Arabinoxylane im Mais wurden hinsichtlich ihrer Seitenketten sowie der zellwandgebundenen phenolischen Säuren untersucht (Wagner, 2022). Die verwendeten Methoden werden in den nächsten Kapiteln kurz erläutert, um die Ergebnisse einordnen zu können. Methoden, die auch für die Analyse der Oligosaccharide in den Darmproben relevant sind, werden an den entsprechenden Stellen benannt und ausführlicher beschrieben.

In einem vorbereitenden Schritt wurden alle sechs Einzelfuttermittelproben gemahlen (< 0,5 mm). Für die erhaltenen Probenmehle wurde der Wassergehalt bestimmt, um die Analyseergebnisse auf die Trockenmasse beziehen zu können. Ein Teil der Mehle wurde außerdem für weiterführende Analysen mit Aceton entfettet (Wagner, 2022). Die entsprechenden Arbeitsvorschriften sind in den Kapiteln 8.1.1 bis 8.1.3 aufgeführt.

3.2.1 Grundcharakterisierung

3.2.1.1 Bestimmung und Isolierung des Zellwandmaterials

Die Bestimmung der Gehalte an UZM und LZM zur Einschätzung des NSP-Gehalts erfolgte in Anlehnung an die Bestimmung von Ballaststoffen in Lebensmitteln. Diese werden üblicherweise mit einer enzymatisch-gravimetrischen oder enzymatisch-chemischen Methode bestimmt (Prosky *et al.*, 1985; Englyst *et al.*, 1994; McCleary *et al.*, 2010; McCleary *et al.*, 2013; McCleary *et al.*, 2015). Das Prinzip beruht darauf, dass alle nicht Ballaststoffkomponenten (neben Fetten, hauptsächlich freie Zucker, Stärke und Proteine) enzymatisch abgebaut und abgetrennt werden und anschließend die verbleibenden Stoffe gravimetrisch oder mittels chemischer Analysen bestimmt werden. Für den enzymatischen Abbau wird in der Regel eine Kombination aus α -Amylase, Amyloglucosidase und Protease verwendet. Je nach Ziel der Analyse können Enzyme mit unterschiedlichen Eigenschaften eingesetzt werden. Ist es erwünscht, dass beispielsweise resistente Stärke als Ballaststoff miterfasst wird, eignet sich der Einsatz einer Pankreas- α -Amylase unter physiologischen Bedingungen. Liegt der Fokus auf der Erfassung der NSP, wie in dieser Arbeit, kann eine thermostabile α -Amylase verwendet werden, die zusätzlich auch resistente Stärke abbaut (McCleary *et al.*, 2013). Nach dem enzymatischen Abbau wird der Rückstand abgetrennt, gewaschen und getrocknet, um die wasserunlösliche Fraktion,

im Folgenden als UZM bezeichnet, zu erhalten. Im Überstand befinden sich wasserlösliche Poly- und Oligosaccharide sowie hauptsächlich aus der Stärke freigesetzte Monosaccharide und andere lösliche Komponenten, wie Proteinabbauprodukte und Puffersalze. Zur Gewinnung der löslichen Polysaccharide werden diese mittels 80%igem Ethanol präzipitiert, abgetrennt und ebenfalls gewaschen und getrocknet. Diese Fraktion wird im Weiteren als LZM bezeichnet. Da beispielsweise bei der Ethanolpräzipitation Proteine und Puffersalze mitgefällt werden können, werden häufig der Protein- und Aschegehalt der erhaltenen Fraktionen bestimmt und die Ergebnisse entsprechend korrigiert (McCleary *et al.*, 2015).

Im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) wurden der UZM- und LZM-Gehalt aller sechs Einzelfuttermittelproben im analytischen Maßstab bestimmt ($n = 3$). Die Gehalte wurden um Restprotein- (Bestimmung nach Kjeldahl) und Aschegehalt (gravimetrische Bestimmung) korrigiert (Arbeitsvorschrift s. Kapitel 8.1.4). Zusätzlich wurden im präparativen Maßstab beide Fraktionen für weitere Analysen isoliert ($n = 3$). Die gewonnenen Fraktionen wurden auf vollständigen Stärkeabbau (mittels Jod-Stärkenachweis) und ausreichende Waschung (Bestimmung der freien Monosaccharide) überprüft (Arbeitsvorschrift s. Kapitel 8.1.5). Für beide Analysen wurde das entfettete Probenmehl verwendet, da Fettgehalte $> 10\%$ den enzymatischen Abbau beeinträchtigen können (McCleary *et al.*, 2015). Der enzymatische Verdau erfolgte jeweils mit einer thermostabilen α -Amylase, einer Protease und einer Amyloglucosidase (Wagner, 2022).

3.2.1.2 Analyse des Ligningehalts

Lignin ist ein nichtverdaubares phenolisches Polymer und Teil der pflanzlichen Zellwand (vgl. Kapitel 1.2.3.1). Aufgrund seiner Struktur ist es wasserunlöslich und wird somit, neben unlöslichen Polysacchariden, im UZM miterfasst. Zur besseren Charakterisierung der Zellwand und zur weiteren Abschätzung des NSP-Anteils wurde der Ligningehalt der verschiedenen Maissorten bestimmt, da diese beim Fütterungsversuch variiert wurden.

Es gibt verschiedene Methoden zur Analyse des Ligningehalts (Hatfield & Fukushima, 2005), wobei häufig die Bestimmung als Klason-Lignin durchgeführt wird. Dabei werden Zellwandpolysaccharide und weitere nicht-Ligninbestandteile mit Schwefelsäure hydrolysiert und anschließend abgetrennt. Der ligninhaltige Rückstand wird gewaschen, getrocknet und gravimetrisch bestimmt. Zu beachten ist, dass bei dieser Bestimmung in Säure unlösliche Komponenten wie Wachse, Suberin und Cutin miterfasst werden, wodurch es zu einer Überbestimmung des Ligningehalts kommen kann (Bunzel *et al.*, 2011).

Für die Maisproben wurde ausgehend vom UZM der Gehalt an Klason-Lignin entsprechend der Arbeitsvorschrift in Kapitel 8.1.6 bestimmt. Das Hydrolysat wurde für die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung des UZMs verwendet (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Es erfolgte, wie bei der Bestimmung des Gehalts an Zellwandmaterial, eine Korrektur um Protein- und Aschegehalt (Wagner, 2022).

3.2.1.3 Analyse der Oligosaccharide der Raffinose-Familie

In der Sojabohne kommen RFO in relevanten Mengen vor (vgl. Kapitel 1.2.1), wobei die Gehalte abhängig von Wachstumsbedingungen und Prozessierung variieren können (Bach Knudsen, 1997; Choct *et al.*, 2010). Da in den Darmproben das Vorkommen von Oligosacchariden untersucht werden sollten, ist es von Interesse den Gehalt dieser in den Futtermittelbestandteilen zu kennen, insbesondere da die Sojakomponenten in unterschiedlichen Anteilen in den Basisfuttermitteln enthalten waren (vgl. Kapitel 3.1).

Zur Analyse von Oligosacchariden eignen sich verschiedene Analysemethoden, wie die Kapillarelektrophorese (CE, engl.: *Capillary Electrophoresis*) oder Trennungen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: *High Performance Liquid Chromatography*). Hierbei können verschiedene Arten der Chromatographie eingesetzt werden, wie beispielsweise eine Umkehrphasen- (RP, engl.: *Reverse Phase*) oder die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC). Ebenfalls beschrieben sind Methoden mit porösem Graphit (PGC, engl.: *Porous Graphitized Carbon*) als stationäre Phase (Hemström & Irgum, 2006; Westphal *et al.*, 2010). Zur Detektion von Kohlenhydraten eignen sich beispielsweise der Brechungsindexdetektor (RID, engl.: *Refractive Index Detector*), der Lichtstreuendetektor (ELSD, engl.: *Evaporative Light Scattering Detector*) oder ein massenspektrometrischer (MS-)Detektor. Wird eine Derivatisierung durchgeführt, können auch z. B. Detektoren zur Messung der Fluoreszenz eingesetzt werden (Westphal *et al.*, 2010). Eine weitere Möglichkeit stellt die Trennung mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC, engl.: *High-Performance Anion-Exchange Chromatography*) dar. Hierbei eignet sich eine gepulst amperometrische Detektion (PAD, engl.: *Pulsed Amperometric Detection*) (Lee, 1990). Je nach Analyzesystem gibt es unterschiedliche Vor- und Nachteile, insbesondere in Bezug auf die Trennleistung der stationären Phase und die Empfindlichkeit des Detektors.

Für diese Arbeit wurde für die Analyse von Oligosacchariden, sowohl in den Futtermittelbestandteilen als auch in den Darmproben, die HPAEC-PAD gewählt, da mit dieser Technik Kohlenhydrate ohne Derivatisierung selektiv getrennt und mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden können (Lee, 1990). Ein Nachteil bei der Trennung mittels HPAEC liegt darin, dass aufgrund des hohen pH-Werts des Eluents (s. unten) Esterbindungen hydrolytisch gespalten werden. Dadurch werden beispielsweise Methyl- und Acetylgruppen oder gebundene Ferulasäuren abgespalten, und die native Struktur kann diesbezüglich nicht analysiert werden (Westphal *et al.*, 2010). RFO liegen unverestert vor und auch bei den weiteren, in dieser Arbeit untersuchten Oligosacchariden spielen ester-gebundene Gruppen eine untergeordnete Rolle bzw. lag der Fokus nicht darauf, diese in veresterter Form zu erfassen. Bei der HPAEC handelt es sich um eine spezielle Art der Ionenchromatographie (IC). Das Trennprinzip beruht auf Ionenaustauschprozessen zwischen negativ geladenen Analyten und der stationären Phase, die auf der Oberfläche positiv geladene quartäre Ammonium-Gruppen (NR_3^+) trägt. Als mobile Phase wird verdünnte Natronlauge eingesetzt. Aufgrund des alkalischen Milieus ($\text{pH} = 12,0 - 13,5$)

liegen die zu analysierenden Kohlenhydrate teilweise deprotoniert als Oxyanionen vor und können mit der stationären Phase interagieren. Dies ermöglicht die chromatographische Trennung der Kohlenhydrate (Lee, 1990; Rohrer, 2013). Bei der Detektion mittels PAD werden die Analyten im Alkalischen durch Oxidation an einer Goldelektrode amperometrisch gemessen. Bei diesem Prozess kommt es zu einer stetigen Kontamination der Elektrode, weshalb gepulst gearbeitet wird. Als erster Schritt erfolgt eine kurze Equilibrationsphase, gefolgt von der Oxidation, um das Messsignal zu erzeugen. Anschließend wird die Oberfläche der Goldelektrode durch Anlegen eines höheren Potentials gereinigt und bei einem niedrigeren Potenzial reduziert, bevor der nächste Zyklus beginnt. Diese Abfolge wurde für die Messung von Kohlenhydraten optimiert und wird als *Four-Potential Waveform* (Vier-Potenzial-Wellenform) bezeichnet. Damit ist es möglich Kohlenhydrate in sehr geringen Mengen (bis ca. 10 pmol) zu detektieren (Rohrer, 2013).

Vor der Messung der RFO erfolgte die Extraktion dieser aus den Sojaprobe. Um wasserunlösliche und -lösliche Polysaccharide direkt abzutrennen, wurde eine ethanolische Extraktion gewählt. Die Löslichkeit von RFO ist abhängig vom Ethanolanteil der Extraktionslösung, wobei sich die RFO besser in 50%igem Ethanol lösen als in 80%igem. Temperatur und Extraktionszeit spielen dabei eine untergeordnete Rolle (Ekvall *et al.*, 2007). Die Extraktionsbedingungen für die Bestimmung der RFOs in den Sojaprobe wurden in Anlehnung an die Parameter zur Extraktion der Oligosaccharide aus den Darmproben gewählt (vgl. Kapitel 3.4.1). Extrahiert wurde mit 80%igem Ethanol bei 40 °C für 30 Minuten. Um die Verluste aufgrund der schlechteren Löslichkeit zu minimieren, wurde der Überstand abgetrennt und die Extraktion mit dem Rückstand zweimal für jeweils 10 Minuten wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt und das Ethanol entfernt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels HPAEC-PAD über eine externe Kalibrierung. Die detaillierte Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 8.1.7 aufgeführt (Wagner, 2022).

3.2.2 Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide

Die Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide in den Einzelfuttermitteln erfolgte ebenfalls im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner. Die Analysen wurden aus dem UZM und LZM, welche in dreifachem Ansatz je Probe isoliert wurden (vgl. Kapitel 3.2.1.1), in Dreifachbestimmung durchgeführt, sofern nicht anders vermerkt.

3.2.2.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Aus der Monosaccharidzusammensetzung einer Probe können Erkenntnisse über die enthaltenen Oligo- bzw. Polysaccharide gewonnen werden. Dies ist für eine grundlegende Einordnung sowohl für die Zellwandpolysaccharide der Einzelfuttermittel, als auch für die Oligosaccharide aus den Darmproben hilfreich. Es gibt verschiedene Methoden, die zum Teil unterschiedliche Informationen liefern. Grundsätzlich beruht das Prinzip

darauf, dass enthaltene Oligo- und Polysaccharide in ihre Monomere gespalten und diese im Anschluss analysiert werden (De Ruiter *et al.*, 1992).

Die Spaltung der glykosidischen Bindungen erfolgt häufig durch eine zweistufige saure Hydrolyse mittels Schwefelsäure nach Saeman und Mitarbeitenden (1945). Dies ermöglicht den Aufschluss kristalliner Cellulosestrukturen, wodurch Cellulose und in das Cellulose-Netzwerk eingebundene Hemicellulosen wie Xyloglucane gut erfasst werden können. Allerdings werden mit dieser Methode Uronsäuren und 6-Desoxyzucker wie Fucose und Rhamnose unterbestimmt (Saeman *et al.*, 1945; De Ruiter *et al.*, 1992). Damit eignet sich die Schwefelsäurehydrolyse als Methode für cellulosehaltiges Material wie das UZM. Eine weitere häufig eingesetzte Methode ist die Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure (TFA, engl.: *Trifluoroacetic Acid*) nach Albersheim und Mitarbeitenden (1967), diese ist jedoch ungeeignet zur Bestimmung von Cellulose. Zur besseren Erfassung der Uronsäuren wurde von De Ruiter und Mitarbeitenden (1992) eine vorgeschaltete Methanolyse mit methanolischer Salzsäure vorgeschlagen, um insbesondere galacturonsäurehaltige Polysaccharide zu spalten. Dabei bilden sich Methylglykoside, die bei der folgenden TFA-Behandlung wieder demethyliert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Hydrolysereagenzien durch Evaporation einfach entfernt werden können (De Ruiter *et al.*, 1992; Willför *et al.*, 2009). Da im LZM keine kristalline Cellulose zu erwarten ist, dafür aber, je nach Probenmaterial, vermehrt Pektine vorkommen können, empfiehlt sich für diese Fraktion die Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse. Werden in der Probe keine uronsäurehaltigen Poly- bzw. Oligosaccharide erwartet, ist die TFA-Hydrolyse ohne vorgeschaltete Methanolyse zur Spaltung der glykosidischen Bindungen ausreichend.

Neben den unterschiedlichen Hydrolysevarianten gibt es ebenfalls verschiedene Methoden zur Bestimmung der freigesetzten Monosaccharide. Eine Möglichkeit, die häufig eingesetzt wird, ist die Bestimmung mittels Gaschromatographie (GC) und Flammenionisationsdetektor (FID). Da die Analyten für die Trennung mittels GC zerstörungsfrei verdampfbar sein müssen, ist eine vorherige Derivatisierung, beispielsweise zu Alditolacetaten oder Trimethylsilylethern, erforderlich. Eine weitere Möglichkeit ist die in Kapitel 3.2.1.3 vorgestellte Analyse von Kohlenhydraten mittels HPAEC-PAD. Bei dieser Methode können die freigesetzten Monosaccharide direkt gemessen werden und es sind keine zusätzlichen Arbeitsschritte wie eine Derivatisierung notwendig (De Ruiter *et al.*, 1992).

Zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide in den Mais- und Sojaprobe erfolgte die Freisetzung der Monosaccharide aus den UZM mittels Schwefelsäurehydrolyse und aus den LZM mittels Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse. Analysiert wurden die Monosaccharide mittels HPAEC-PAD. Die Arbeitsvorschriften und Messparameter sind in Kapitel 8.2.1 angegeben (Wagner, 2022).

3.2.2.2 Analyse der Bindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse

Die Monosaccharidzusammensetzung liefert zusammen mit dem allgemeinen Wissen über den Aufbau der pflanzlichen Zellwand (s. Kapitel 1.2.3.1) erste Erkenntnisse dar-

über, welche NSP bzw. Oligosaccharide in welchen Anteilen in der Probe wahrscheinlich vorkommen. Für eine detailliertere Zuordnung der Monosaccharide zu einer NSP- bzw. Oligosaccharidgruppe sind weitere Informationen, wie beispielsweise die Art der glykosidischen Bindungen, erforderlich. Mithilfe der Methylierungsanalyse können die Bindungsverhältnisse über die Identifizierung und Bestimmung der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) analysiert werden.

Die Methylierungsanalyse ist aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten aufgebaut: Methylierung, Säurehydrolyse, Reduktion, Acetylierung und abschließend die Messung mittels GC-FID und GC-MS. Zunächst erfolgt die Methylierung der freien Hydroxygruppen der Saccharide unter stark basischen Bedingungen im aprotischen Milieu (Ciucanu & Kerek, 1984). Ist das Probenmaterial schwer löslich, wie beispielsweise das UZM, kann es hierbei zu einer Untermethylierung kommen. Ein Hinweis dafür ist ein unerwartet hoher Anteil an vollacetylierten PMAAs bei der GC-Analyse. Dies bedeutet, dass in diesem Methylierungsschritt nicht alle freien Hydroxygruppen methyliert wurden und sie dann in einem späteren Schritt acetyliert werden. Zur Minimierung der Untermethylierung empfiehlt sich für schwer lösliches Material eine vorherige Quellung in Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie die Wiederholung des Methylierungsschritts (Pettolino *et al.*, 2012). Uronsäuren können bei der Methylierungsanalyse nur erfasst werden, wenn die Carboxylgruppen vor der Methylierung reduziert werden (Kim & Carpita, 1992). Bei der Analyse der Futtermittelproben sowie bei der Untersuchung der Oligosaccharide in den Darmproben lag der Fokus auf der Charakterisierung der neutralen NSP bzw. Oligosaccharide, weshalb dieser vorangestellte Reduktionsschritt nicht durchgeführt wurde. Nach der Methylierung erfolgt im Hydrolyseschritt eine Spaltung der glykosidischen Bindungen mittels TFA-Hydrolyse. Bei diesem Schritt gehen die Informationen über die anomeren Konfigurationen (α/β) verloren und können demzufolge nicht erfasst werden. Anschließend findet eine Ringöffnung und Reduktion der partiell methylierten Monosaccharide mit Natriumbordeuterid statt. Natriumbordeuterid wird verwendet, um die anomere C1-Position zu markieren. Die Markierung der C1-Position ist für die Identifizierung mittels MS bei manchen PMAAs von Bedeutung, die ansonsten das gleiche Fragmentmuster ergeben würden (Blakeney *et al.*, 1983). Beispielsweise können so anhand des Massenspektrums die (1 \rightarrow 2)- und (1 \rightarrow 4)-gebundene Xylopyranose unterschieden werden. Daraus können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die Xylose aus dem Rückgrat eines Xylans oder einer Seitenkette des Xyloglucans stammt (Pettolino *et al.*, 2012; Steck *et al.*, 2021). Als letzter Schritt der Derivatisierung folgt die Acetylierung aller zu diesem Zeitpunkt freien Hydroxygruppen. Diese waren zum Zeitpunkt der Methylierung entweder Teil einer glykosidischen Bindung oder der Ringbindung. Für die Reaktion werden 1-Methylimidazol als Katalysator und Essigsäureanhydrid als Acetylierungsreagenz genutzt (Blakeney *et al.*, 1983).

Die entstandenen PMAAs weisen eine für die GC-Analyse ausreichende Flüchtigkeit auf. Die Identifizierung der PMAAs erfolgt mittels GC-MS. Bei der GC-MS-Messung wird in der Regel die Elektronenstoßionisation (EI) genutzt, um die Analyten zu ionisieren. Dabei

handelt es sich um eine sogenannte harte Ionisationstechnik, bei der Fragmentionen gebildet werden. Als Beschleunigungspotential für die vom Filament generierten Elektronen wird standardmäßig 70 V eingestellt, um Elektronen mit einer kinetischen Energie von 70 eV zu erzeugen. Dadurch ist es möglich, selbst bei instrumentellen Unterschieden vergleichbare Massenspektren aufzunehmen. Dies wurde bei der Identifizierung der PMAAs ausgenutzt. Die Zuordnung erfolgte anhand der GC-MS-Messung über die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster durch Vergleich mit Literaturquellen, einer *in-house*-Datenbank und Onlinedatenbanken (Jansson *et al.*, 1976; Sasaki *et al.*, 2005; Sims *et al.*, 2018; CCRC, 2007). Mithilfe der GC-FID-Messung konnten die Verhältnisse der PMAAs semiquantitativ bestimmt werden. Hierzu wurden die von Sweet und Mitarbeitenden (1975) ermittelten Responsefaktoren herangezogen. Die Messungen mit GC-FID und GC-MS wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm und der gleichen Säule aufgenommen, sodass die Retentionszeiten übertragbar waren.

Die ausführliche Arbeitsvorschrift für die Methylierungsanalyse ist in Kapitel 8.2.2 niedergeschrieben. Sie wurde für UZM und LZM aller sechs Einzelfuttermittel durchgeführt. Aufgrund der zeitintensiven Aufarbeitung erfolgte diese Analyse in Doppelbestimmung (Wagner, 2022). Üblicherweise werden PMAAs bei der GC-Analyse mit einer DB-225-Säule analysiert, damit können die meisten PMAAs ausreichend voneinander getrennt werden. Jedoch koelutieren die PMAAs, die die 1,2,4- und 1,3,4-verknüpften Xylopyranosen widerspiegeln. Da in den Maisproben beide Verknüpfungstypen zu erwarten waren, wurden diese Proben zusätzlich mit einer DB-5-Säule analysiert, die die Trennung der genannten PMAAs und damit eine Abschätzung ihrer Anteile ermöglichte (Schäfer *et al.*, 2019; Wagner, 2022).

3.2.2.3 Untersuchung der Arabinan-, Galactan- und Xyloglucanstrukturen

Mit der Methylierungsanalyse können Bindungstypen in Polysacchariden und damit beispielsweise die möglichen Positionen von Seitenketten bestimmt werden. Jedoch gehen aus dieser Analyse keine Informationen über das Substitutionsmuster oder die detaillierte Struktur von Seitenketten hervor. Um mehr Erkenntnisse darüber zu erhalten, eignet sich die enzymatische Freisetzung und Identifizierung von Oligosacchariden aus den entsprechenden Polysacchariden.

In der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am KIT wurden von Wefers und Bunzel (2016) entsprechende Profilingmethoden zur Analyse der Feinstrukturen von Arabinanen und Galactanen (neutrale Pektinseitenketten) und von Steck und Mitarbeitenden (2021) eine Profilingmethode zur Untersuchung der Feinstruktur von Xyloglucanen entwickelt und etabliert. Das Prinzip beruht darauf, dass mit einem spezifischen Enzym Oligosaccharide aus den entsprechenden Polysacchariden freigesetzt werden. Diese Oligosaccharide werden anschließend mittels HPAEC-PAD bzw. -PAD/MS analysiert. Die Schwierigkeit liegt dabei in der Identifizierung der Oligosaccharide, da für die Zuordnung entsprechende Standardsubstanzen benötigt werden. Diese wurden für die

genannten Profilingmethoden in vorangegangenen Arbeiten isoliert und charakterisiert und standen für die Analyse zur Verfügung (Wefers & Bunzel, 2016; Steck *et al.*, 2021). Die Strukturen der Arabinan- und Galactanoligosaccharide sind in Abbildung A3 und Abbildung A4 (Kapitel 9.1) gezeigt. Für die enzymatische Spaltung wurden beim Arabinan- bzw. Galactanprofiling eine *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase eingesetzt. Die Trennung der freigesetzten Oligosaccharide erfolgte mittels HPAEC mit einem jeweils angepassten Gradientenprogramm. Es wurde Raffinose als interner Standard zugegeben, dies ermöglichte die Zuordnung mittels relativer Retentionszeiten und die semiquantitative Bestimmung über relative Responsefaktoren. Die einzelnen Oligosaccharide wurden als Anteile aller freigesetzten Oligosaccharide in mol% angegeben (Wefers & Bunzel, 2016). Beim Xyloglucanprofiling wurde für die Freisetzung der Oligosaccharide eine xyloglucanspezifische *endo*- β -1,4-Glucanase verwendet. Die Trennung erfolgte ebenfalls mittels HPAEC. Zur Zuordnung erfolgte neben der Detektion mittels PAD eine zusätzliche Kopplung mit einem MS-Detektor. Der Aufbau des gekoppelten Systems wird in Kapitel 3.3.1 ausführlich erläutert. Über relative Retentionszeiten und MS-Informationen konnten die freigesetzten Xyloglucanoligosaccharide zugeordnet und mittels relativer Responsefaktoren semiquantitativ bestimmt werden. Bei diesem Profiling wurde Isomaltotriose als interner Standard genutzt (Steck *et al.*, 2021).

Die beschriebenen Profilingmethoden wurden nach den in Kapitel 8.2.3 und 8.2.4 aufgeführten Arbeitsvorschriften für das UZM aller sechs Einzelfuttermittel von Lisa Wagner mindestens in Doppel-, zum Teil in Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei Vorversuchen mit dem LZM wurden Störsignale, vermutlich verursacht von Matrixkomponenten, und Retentionszeitverschiebungen, wahrscheinlich hervorgerufen durch eine hohe Salzlast aufgrund mitgefällter Puffersalze, beobachtet. Dies beeinflusst die relativen Responsefaktoren (Wefers & Bunzel, 2016), weshalb die drei beschriebenen Profilings nur für das UZM durchgeführt wurden (Wagner, 2022).

3.2.2.4 Isolierung und Bestimmung der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure

Neben Pektinen und Xyloglucanen sind insbesondere in Getreide Arabinoxylane ein wichtiger Bestandteil der NSP (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Schendel und Mitarbeitende (2016) entwickelten eine Profilingmethode, um die mit Ferulasäure veresterten Seitenketten der Arabinoxylane (FA, FAX und FAXG) zu analysieren. Das Prinzip der Methode beruht auf der Freisetzung der Seitenketten mittels milder TFA-Hydrolyse (50 mM, 2 h, 100 °C). Die Hydrolyse wurde von Saulnier und Mitarbeitenden (1995) so optimiert, dass ein möglichst großer Anteil an Seitenketten freigesetzt und gleichzeitig so wenig Ferulasäure wie möglich von diesen abgespalten wird. Dabei wird ausgenutzt, dass die Arabinose als Furanose vorliegt und das Rückgrat aus Xylose in Pyranoseform aufgebaut ist. Glykosidische Bindungen zwischen Pyranosen sind säurestabiler als Bindungen, an denen eine Furanose beteiligt ist. Dadurch werden bevorzugt die Seitenketten abgespalten, ohne das Rückgrat anzugreifen. Um eine *cis/trans*-Isomerisierung der Ferulasäure zu verhindern,

wurde das Probenmaterial während der gesamten Analyse vor Licht geschützt. Nach der Hydrolyse folgte eine Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE, engl.: *Solid Phase Extraction*) an C18-Material und anschließend eine Reduktion zu Zuckeralkoholen mit Natriumborhydrid. Die Reduktion ist bei dieser Analysenmethode erforderlich, da es sonst bei der chromatographischen Trennung aufgrund von Mutarotation zwischen α - und β -Form zu Doppelpeaks kommt. Die Analyse erfolgte mittels HPLC mit Diodenarray-detektor (DAD) und MS-Detektor. Quantifiziert wurde bei 325 nm (Absorptionsmaximum der Ferulasäure) über eine externe Kalibrierung, für die die Standardsubstanzen vor der Messung analog zur Probe reduziert wurden. Die ausführliche Durchführung ist in Kapitel 8.2.5 beschrieben (Schendel *et al.*, 2016). Im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) wurde die beschriebene Profilingmethode zur Bestimmung der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure für die vier Maisproben (UZM und LZM, $n = 3$) durchgeführt.

Die benötigten Standardsubstanzen FA, FAX und FAXG sind nicht kommerziell erhältlich und wurden daher im Rahmen dieser Arbeit aus Mais isoliert, angelehnt an das Vorgehen von Allardings und Mitarbeitenden (2006) und Schendel und Mitarbeitenden (2016). Dabei diente UZM aus Mais als Ausgangsmaterial. Daraus wurden mittels milder TFA-Hydrolyse, wie oben beschrieben, die Seitenketten der enthaltenen Arabinoxylane freigesetzt. Anschließend folgten mehrere Schritte, um die Seitenketten zu isolieren und aufzureinigen. Zur Abtrennung der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure von anderen löslichen Komponenten wurde als erster Schritt eine präparative Säule mit Amberlite XAD-2-Material verwendet. Die Trennung beruht auf Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial (Styrol-Divinylbenzol-Harz) und dem aromatischen System der Ferulasäure. In einem zweiten Schritt wurden die einzelnen Komponenten in der erhaltenen Fraktion weiter aufgereinigt. Hierzu bot sich die präparative Größenausschlusschromatographie (SEC, engl.: *Size-Exclusion Chromatography*) an. Da Ferulasäure im ultravioletten (UV) Licht ein Absorptionsmaximum aufweist, konnte zur Detektion ein UV-Detektor genutzt werden. Für die SEC können unterschiedliche Säulenmaterialien genutzt werden. Eine Möglichkeit ist das Bio-Gel P2-Material (Appeldoorn *et al.*, 2013), wobei die Trennung auf Größenausschlussmechanismen beruht. Eine Alternative stellt das Sephadex LH-20-Material dar. Dieses ist aus quervernetztem, hydroxypropyliertem Dextran aufgebaut, wodurch es sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften aufweist. Dies kann bei der Trennung von Oligosacchariden mit Ferulasäure ausgenutzt werden, da zusätzlich zur Auftrennung nach Größe noch Adsorptionsmechanismen auftreten. Während der gesamten Standardisolierung wurden die Fraktionen, soweit möglich, vor Licht geschützt, um die Isomerisierung der Ferulasäure zu minimieren. Nach der Auftrennung wurden die einzelnen Fraktionen identifiziert bzw. charakterisiert und gegebenenfalls weiter aufgereinigt (Allardings *et al.*, 2006; Schendel *et al.*, 2016).

In dieser Arbeit wurde zur Gewinnung von Standardsubstanzen (FA, FAX, FAXG sowie weiteren AXOS) ca. 1 kg Futtermais von einem lokalen Händler als Rohmaterial eingesetzt. Die Maiskörner wurden zunächst gemahlen und mit Aceton entfettet. Aus dem ent-

fetteten Mehl wurde, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, nach Stärke- und Proteinverdau die wasserunlösliche Fraktion als UZM im präparativen Maßstab gewonnen. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 8.2.6 beschrieben. Da im gewonnenen UZM mittels Jod-Stärkenachweis noch Stärkereste nachzuweisen waren, erfolgte ein Nachverdau des UZM nach dem gleichen Prinzip (Ausbeute ca. 90 g, 9,4 %). Daraus wurden mittels milder TFA-Hydrolyse (50 mM, 20 min, 95 °C) die Seitenketten freigesetzt und die löslichen Polysaccharide durch Präzipitation mit 80%igem Ethanol abgetrennt. Die Aufreinigung des Überstands erfolgte nach Entfernung des Ethanols mittels Amberlite XAD-2 durch Auftrennung in drei Fraktionen: H₂O-Fraktion (freie Monosaccharide sowie Arabinoxylanseitenketten ohne Ferulasäure), Methanol/H₂O-Fraktion (Seitenketten mit Ferulasäure) und Methanol-Fraktion (z. B. Oligosaccharide mit DFS). Die weitere Fraktionierung der Seitenketten mit Ferulasäure in der Methanol/H₂O-Fraktion erfolgte mit einem präparativen Flüssigchromatographie (LC, engl.: *Liquid Chromatography*)-UV-System mit einer Sephadex LH-20-Säule und einem automatisierten Fraktionensammler (Arbeitsvorschrift s. Kapitel 8.2.6). Ein dabei aufgenommenes Chromatogramm ist in Abbildung A5 (Kapitel 9.1) dargestellt. Die erhaltenen Sephadex-Fractionen wurden entsprechend dem Chromatogramm vereinigt und charakterisiert. Die hier nicht weiter beschriebenen Fraktionen, wie die H₂O-Fraktion nach Amberlite, wurden gesammelt und werden im Rahmen eines anderen Projektes aufgearbeitet. Außerdem wurden aus dem UZM nach milder Säurehydrolyse mittels enzymatischer Hydrolyse AXOS freigesetzt, fraktioniert und mittels präparativer LC aufgetrennt (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.2.8 sowie Abbildung A6 und Abbildung A7 (Kapitel 9.1)). Diese werden ebenfalls im Rahmen des anderen Projekts weiter aufgereinigt und charakterisiert.

Zur Charakterisierung und Identifizierung der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure in den Sephadex-Fractionen wurden verschiedene Methoden herangezogen. Die Einzelheiten sind in der Arbeitsvorschrift in Kapitel 8.2.7 aufgeführt. Zunächst wurde die Monosaccharidzusammensetzung mittels Methanolyse gefolgt von einer TFA-Hydrolyse für ausgewählte Fraktionen bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Außerdem wurden das UV-Spektrum sowie das Molekulargewicht der Komponenten mittels HPLC-DAD/MS ermittelt. Die Erkenntnisse aus diesen Analysen sind in Tabelle A5 (Kapitel 9.2) zusammengefasst. Zur abschließenden Identifizierung wurden Messungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, engl.: *Nuclear Magnetic Resonance*) durchgeführt, hierzu wurden verschiedene 2D NMR-Experimente verwendet. Anhand der *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-, *HSQC/Total Correlated Spectroscopy* (TOCSY)-, *Heteronuclear 2-Bond Correlation* (H2BC)- und *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Spektren war eine eindeutige Identifizierung von FA, FAX und FAXG möglich.

3.2.2.5 Bestimmung der phenolischen Säuren und Oligoferulasäuren

Ein besonderes Strukturmerkmal von Arabinoxylanen sind die Crosslinks, die über die Di- bzw. Oligomerisierung der Ferulasäuren an den Seitenketten ausgebildet werden

können (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Dadurch können die Polysaccharide quervernetzt vorliegen und sind beispielsweise für die Spaltung durch Enzyme schwerer zugänglich. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Maisproben auf den Gehalt an estergebundenen phenolischen Säuren sowie DFS und Triferulasäuren (TriFS) hin untersucht. Dafür wurden diese von den Zellwandkomponenten abgespalten, aufgereinigt und quantifiziert.

Zur Spaltung der Esterbindung kann grundsätzlich eine saure, alkalische oder enzymatische Hydrolyse genutzt werden. Am weitesten verbreitet ist die Verseifung mittels Natronlauge, wobei unterschiedliche Konzentrationen, Temperaturen und Reaktionsdauern beschrieben sind (Barberousse *et al.*, 2008). Bei der Bestimmung der zellwandgebundenen Phenolcarbonsäuren nach Dobberstein und Bunzel (2010) erfolgt die Hydrolyse mit 2 M Natronlauge für 18 Stunden bei Raumtemperatur unter Licht- und Sauerstoffausschluss. Die anschließende Extraktion erfolgt mit Diethylether. Mit dieser Methode werden alle estergebundenen Komponenten erfasst. Für die chromatographische Analyse wird ein HPLC-DAD-System verwendet, wobei die Mono- und Oligomere mit zwei getrennten Gradientenprogrammen analysiert werden.

Im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) wurde diese Analyse mit den vier Maisproben (UZM und LZM, $n = 3$) durchgeführt. Aufgrund einer Koelution mit Matrixkomponenten wurde das Gradientenprogramm für die Di- und Trimere angepasst (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.2.9). Die Zuordnung der Analyten erfolgte über den Abgleich der Retentionszeiten und UV-Spektren entsprechender Standardsubstanzen. Für die 8-8nc-DFS und 8-8-THF-DFS wurde zur eindeutigen Identifizierung eine Aufstockung der Probenlösung mit Standardsubstanzen durchgeführt. Die Quantifizierung der Monomere erfolgte über eine externe Kalibrierung, wohingegen für die Bestimmung der DFS und TriFS die von Dobberstein und Bunzel (2010) ermittelten Korrekturfaktoren mit dem erweiterten Konzentrationsbereich nach Pedersen und Mitarbeitenden (2015) herangezogen wurden. Die Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 8.2.9 aufgeführt.

3.3 Charakterisierung der zugesetzten Komponenten

Zur Charakterisierung der Xylanase und des XOS-haltigen Materials wurde im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Sitter (2022) eine Methode zur Bestimmung von (A)XOS mittels HPAEC-PAD entwickelt und für die Analyse der XOS-haltigen Probe eingesetzt. Die entwickelte HPAEC-PAD-Methode eignet sich ebenfalls zur Charakterisierung von Xylanasen durch die Bestimmung der von der Xylanase freigesetzten Oligosaccharide (Sitter, 2022). Die im Fütterungsversuch eingesetzte Xylanase wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Grundlage dieses Prinzips charakterisiert (vgl. Kapitel 3.3.3).

3.3.1 HPAEC-Methode zur Trennung von (Arabino-)Xylooligosacchariden

Für die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von (A)XOS mittels HPAEC-PAD wurden kommerziell erhältliche Standardsubstanzen von Megazyme verwendet. Zur Ver-

fügung standen lineare XOS mit DP 2 - 6 (X_2 - X_6) und fünf verzweigte AXOS. Die Strukturen sowie deren Bezeichnungen und Abkürzungen sind in Abbildung 10 aufgeführt. Die Benennung der AXOS erfolgte nach dem von Fauré und Mitarbeitenden (2009) vorgeschlagenen System. Dabei steht „X“ für eine β -D-Xylopyranoseeinheit des Xylanrückgrats und „A“ für eine Xyloseeinheit, die eine α -L-Arabinofuranose als Seitenkette trägt. Die hochgestellte Zahl gibt an, über welche Position die Arabinose an die Xyloseeinheit gebunden ist. Handelt es sich um eine disubstituierte Xyloseeinheit, beispielsweise in Position O -2 und O -3, wird dies als „A²⁺³“ angegeben.

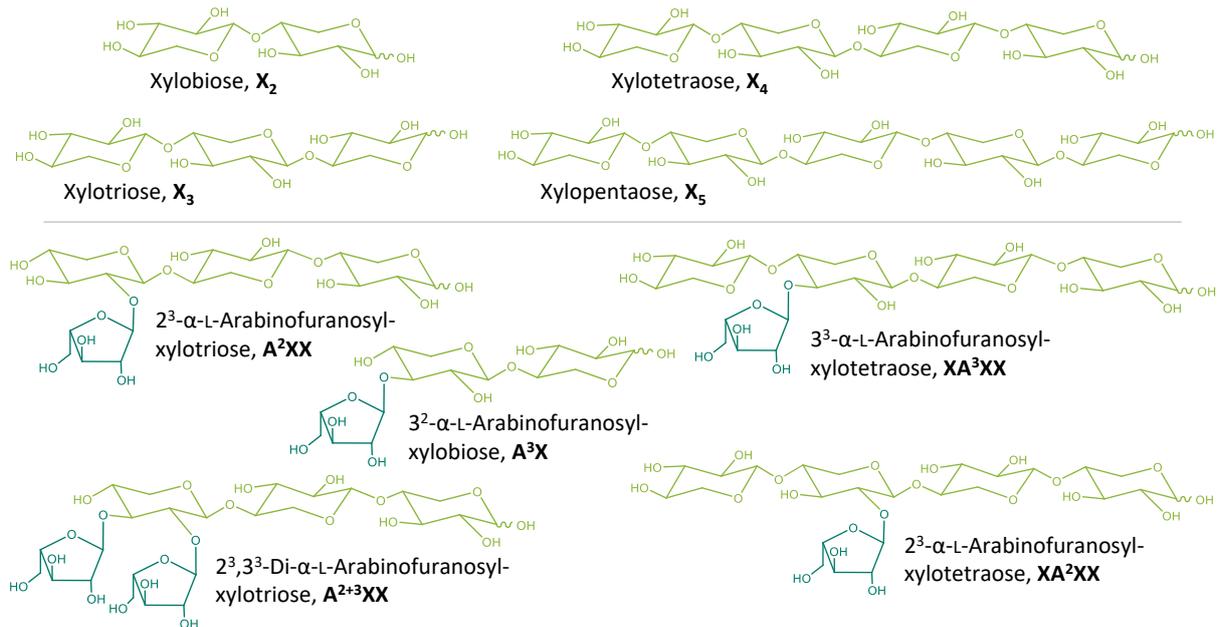


Abbildung 10: Strukturen der kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen der Xylooligosaccharide (XOS, oben) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS, unten). Xylohexaose (X_6) ist nicht gezeigt, Xyloseeinheiten sind hellgrün und Arabinoseeinheiten dunkelgrün hervorgehoben. Die Benennung der AXOS entspricht dem gängigen System nach Fauré und Mitarbeitenden (2009).

Die Standardsubstanzen XA^2XX und XA^3XX lagen als Standardmix vor. Die Elutionsreihenfolge sowie das Verhältnis der beiden Komponenten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Sitter (2022) bestimmt, sodass die Mischung zur Erstellung von Kalibrierkurven genutzt werden konnte. Um die Elutionsreihenfolge festzustellen, wurden die beiden AXOS mittels HPAEC getrennt und fraktioniert. Die Fraktionen wurden mithilfe der Methylierungsanalyse (vgl. Kapitel 3.2.2.2) auf vorkommende Bindungstypen untersucht, wodurch eine eindeutige Zuordnung möglich war (XA^2XX eluiert vor XA^3XX). Das Verhältnis wurde über quantitative 1H -NMR-Spektroskopie ermittelt und XA^2XX : XA^3XX entspricht dem Verhältnis von 47,4:52,6. Ebenfalls überprüft wurden die Reinheiten der anderen (A)XOS-Standardsubstanzen mittels HPAEC-PAD und 1H -NMR-Spektroskopie. Sie entsprachen weitgehend den Herstellerangaben, mit geringen Abweichungen abhängig von der Analysemethode (Sitter, 2022).

Da die Methode zur Untersuchung von Probenmaterial, das möglicherweise neben (A)XOS weitere Oligosaccharide enthält, entwickelt wurde, wurde der HPAEC-Gradient von Lukas Sitter (2022) so optimiert, dass es zu keiner Koelution zwischen (A)XOS und potenziell in der Probe vorhandenen Oligosacchariden kommt. Berücksichtigt wurden dabei Cellooligosaccharide (COS, DP 2 - 6, C₂ - C₆), Maltooligosaccharide (MalOS, DP 2 - 5, Mal₂ - Mal₅) sowie die RFO (DP 3 - 5, Raffinose, Stachyose, Verbascose), da diese in den zu untersuchenden Proben auf Mais- oder Soja-basis vermutet wurden. Zusätzlich wurde sichergestellt, dass es zu keiner Koelution mit für Zellwandpolysaccharide typischen Monosacchariden und Uronsäuren (vgl. Kapitel 1.2) kommt. Für die Trennung wurde eine CarboPac PA200-Säule verwendet sowie wässrige Eluenten mit Natronlauge und Natriumacetat. Als interner Standard wurden mehrere Oligosaccharide getestet und Isomaltotriose (10 µM) ausgewählt, da sie natürlicherweise nicht in den Proben erwartet wird und als isolierter Peak vorlag. Bei Isomaltotriose handelt es sich um ein Trisaccharid, das aus α -(1→6)-verknüpfter D-Glucopyranose aufgebaut ist. Für die XOS und AXOS wurden Kalibrierkurven aufgenommen, die linearen Bereiche ermittelt und relative Responsefaktoren bestimmt. Mit diesen ist eine (semi-)quantitative Bestimmung der (A)XOS ohne erneute Aufnahme einer Kalibrierung möglich. Zusätzlich wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD bzw. LOQ, engl.: *Limit of Detection/Quantification*) ermittelt (Sitter, 2022). Die bestimmten Werte sind in Tabelle A6 (Kapitel 9.2) zusammengefasst. In Abbildung A8 (Kapitel 9.1) sind HPAEC-Chromatogramme der Standardsubstanzen, gemessen mit dem optimierten Gradientenprogramm (HPAEC-Bedingungen s. Kapitel 8.3.1), gezeigt.

Die Zuordnung der Signale einer Probe erfolgte über die Messung eines Standardmixes oder über den Abgleich der relativen Retentionszeiten zu Isomaltotriose. Außerdem wurde ein HPAEC-PAD/MS-System zur weiteren Identifizierung der Oligosaccharide genutzt (Steck *et al.*, 2021). Dieses ermöglicht die Kombination der leistungsfähigen Trennung der Oligosaccharide mittels HPAEC und einer anschließenden empfindlichen Detektion mit dem PAD sowie eine parallele MS-Messung. Die MS-Daten können genutzt werden, um die Zuordnung der Oligosaccharide über deren Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) abzusichern. Diese Kopplung von HPAEC und MS ist eher unkonventionell, da die hohe Salzlast des alkalischen Fließmittels, das für die HPAEC-Trennung benötigt wird (vgl. Kapitel 3.2.1.3), ein Problem für die MS-Detektion darstellt. Bei der hier verwendeten Anlage wurde das Eluat nach der Säule gesplittet. Ein Teil (ca. 1/3) wurde zum PAD geleitet, der andere Teil Richtung MS, wobei zunächst eine Entsalzung des Eluats mit einem elektrolytisch regenerierenden Suppressor erfolgte. Dieser wurde mit Wasser im Gegenfluss betrieben. Dabei wird Wasser elektrolytisch gespalten und durch eine ionensensitive Membran Na⁺ durch H₃O⁺ ausgetauscht. Die Analyten verbleiben im Eluat, wohingegen Na⁺ als Natronlauge sowie bei dem Prozess entstandener Sauerstoff und Wasserstoff mit dem Regenerantenfluss abtransportiert werden. Zur Überwachung der Entsalzung wurde das Eluat anschließend zu einem Leitfähigkeitsdetektor geleitet. Bevor es schlussendlich zur MS gelangte, erfolgte über ein T-Stück mit einer zusätzlichen

Pumpe die Zugabe von geringen Mengen Lithiumchlorid für die Adduktbildung. Dem entsprechend wurden mit diesem System in der Regel die Lithiumaddukte der Oligosaccharide mit dem MS gemessen. Der Aufbau des HPAEC-PAD/MS-Systems ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt. Für die MS-Detektion wurde ein Single-Quadrupol-Spektrometer mit einer Elektrosprayionisation (ESI) verwendet.

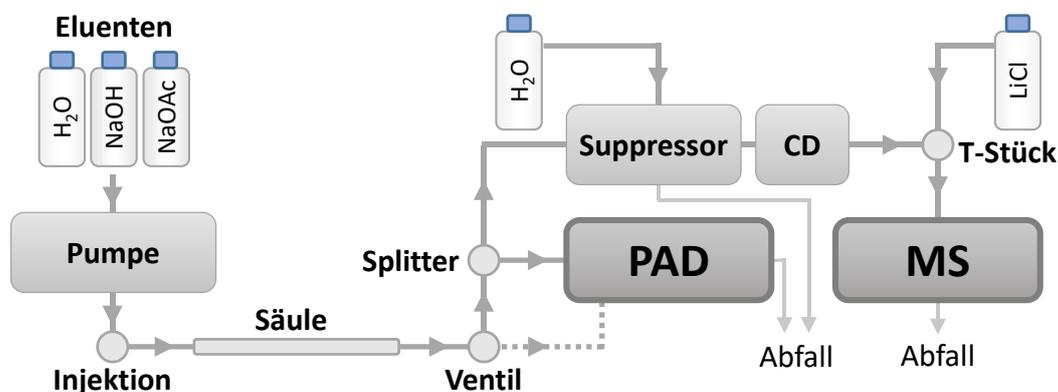


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Kopplung von Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und paralleler massenspektrometrischer Detektion (HPAEC-PAD/MS) (CD: Leitfähigkeitsdetektor)

Die ESI eignet sich als Ionisationstechnik in der Flüssigkeitschromatographie, da sie gleichzeitig die Ionisierung der Analyten und deren Übergang von der gelösten Form in die Gasphase ermöglicht. Das Eluat mit den Analyten gelangt zunächst in eine beheizte und elektrisch geladene Sprühkapillare und wird am Ende dieser mithilfe eines Zerstäubergases zu einem geladenen Aerosol zerstäubt. Die entstandenen geladenen Tröpfchen befinden sich in einem elektrischen Feld, das zwischen Sprühkapillare und Gegenelektrode angelegt ist und werden in Richtung Gegenelektrode beschleunigt. Aufgrund der erhöhten Temperatur und/oder eines Trockengasstroms wird die Größe der Tröpfchen sukzessive reduziert bis die Analytionen in die Gasphase freigesetzt werden. Für die Freisetzung werden verschiedene Theorien diskutiert, wie die Coulomb-Explosion oder die *Droplet Jet Fission*, wobei der genaue Mechanismus nicht abschließend geklärt ist. Die Ionen gelangen durch eine kleine Öffnung in der Gegenelektrode in die Transferkapillare und werden zum Massenanalysator geleitet. Bei der ESI handelt es sich um eine sanfte Ionisationstechnik, bei der überwiegend nicht-fragmentierte Quasimolekülonen erzeugt werden. Die Ionen werden im Massenanalysator, in diesem Fall einem Single-Quadrupol-Spektrometer, nach ihrem m/z aufgetrennt. Der Quadrupol ist aus vier parallel angeordneten Stabelektroden aufgebaut, an denen eine von einer Wechselspannung überlagerte Gleichspannung angelegt wird, wodurch die Flugbahn für Ionen mit einem definierten m/z stabilisiert wird. Anschließend treffen die Ionen mit dem entsprechenden m/z auf einen Sekundärelektronenvervielfacher, welcher durch eine Elektronenkaskade einen messbaren Stromfluss erzeugt. Es können verschiedene Messmodi ausgewählt werden: Im *Full-Scan*-Modus wird ein festgelegter m/z -Bereich gescannt und als *Total Ion*

Chromatogram (TIC) ausgegeben. Beim *Selected Ion Monitoring* (SIM) werden einzelne m/z ausgewählt und dadurch mit höherer Empfindlichkeit erfasst. Der Quadrupol wird dabei so eingestellt, dass nur die entsprechenden Ionen passieren können und detektiert werden. Der SIM-Modus bietet sich insbesondere dann an, wenn die m/z der gesuchten Analyten bekannt sind oder wenn mittels MS quantifiziert werden soll.

3.3.2 Untersuchung des XOS-haltigen Materials

Das im Fütterungsversuch zugesetzte XOS-haltige Material aus Maiskolben sollte charakterisiert werden, um festzustellen, welche XOS in welchen Mengen bzw. Verhältnissen enthalten sind und ob weitere Oligosaccharide, wie AXOS oder andere bei der Herstellung eventuell erzeugte Oligosaccharide, vorkommen. Dies kann unter anderem dazu beitragen, Zusammenhänge zwischen beobachteten Effekten, z. B. auf die Leistung oder das Mikrobiom der Broiler, und der Struktur der eingesetzten (A)XOS herzustellen.

Im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Sitter (2022) wurden zunächst die Oligosaccharide aus der Probe des eingesetzten XOS-haltigen Materials wässrig extrahiert. Anschließend erfolgte eine Präzipitation der löslichen Polysaccharide mittels 80%igem Ethanol. Nach Zentrifugation wurde der oligosaccharidhaltige Überstand evaporiert und wieder in Wasser aufgenommen. Von dieser Fraktion wurde die Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse gefolgt von einer TFA-Hydrolyse mittels HPAEC-PAD bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Außerdem wurden die freien Monosaccharide mittels HPAEC-PAD sowie die enthaltenen Oligosaccharide mittels der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Methode (vgl. Kapitel 3.3.1) analysiert. Es erfolgte eine (semi-)quantitative Bestimmung der XOS mithilfe der ermittelten relativen Responsefaktoren (Sitter, 2022). Die detaillierte Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 8.3.2 aufgeführt.

3.3.3 Charakterisierung der Xylanase

Neben dem XOS-haltigen Material sollte die eingesetzte *endo*-Xylanase hinsichtlich verschiedener Punkte charakterisiert werden. Es sollte festgestellt werden, welche Oligosaccharide das Enzym *in vitro* aus den verwendeten Einzelfuttermitteln freisetzen kann und inwiefern die bekannten Nebenaktivitäten eine Rolle spielen. Dies sollte Aufschluss darüber geben, welche Oligosaccharide an den Effekten der Xylanase beteiligt sind und welche in den Ileum- und Caecumproben vorkommen könnten. Außerdem sollte überprüft werden, wie die Xylanase inaktiviert werden kann. Dies ist insbesondere bei der Extraktion der Oligosaccharide aus den Darmproben von Relevanz, um auszuschließen, dass die Xylanase während oder nach der Extraktion weiter aktiv ist und möglicherweise Oligosaccharide generiert, die nicht in der ursprünglichen Darmprobe enthalten waren.

Um eine geeignete Inaktivierungsmöglichkeit für die Xylanase zu finden, wurden verschiedene Ansätze getestet. Grundsätzlich können Enzyme durch mechanische oder thermische Beanspruchung sowie Zugabe von organischen Lösungsmitteln denaturiert

und damit inaktiviert werden. Außerdem ist eine Inaktivierung durch die Veränderung des pH-Werts möglich, jedoch können dadurch auch die Strukturen der Oligo- und Polysaccharide beeinflusst werden, weshalb dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde. Zur Überprüfung der Effektivität der anderen Möglichkeiten wurde die Xylanase zu einer xylanhaltigen Lösung gegeben, die Inaktivierung mittels einer der genannten Methoden durchgeführt und die Lösung anschließend inkubiert, um zu überprüfen, ob die Inaktivierung erfolgreich war. Da schwer abzuschätzen war, in welchen Mengen die Xylanase schlussendlich in den Darmproben vorliegt, wurden die Versuche mit höheren Enzymaktivitäten als die empfohlene Standarddosis durchgeführt, um eine vollständige Inaktivierung in den Proben sicherzustellen (finaler Test mit 2000-facher Menge der Standarddosis). Die Hydrolyseprodukte wurden mittels HPAEC-PAD detektiert und es wurden stets Negativkontrollen (ohne Xylanasezugabe) und Positivkontrollen (ohne Inaktivierung) zum Vergleich mitgeführt (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.3.3). Die Erkenntnisse der Inaktivierungstests werden in Kapitel 4.3.2.1 ausführlich beschrieben. Als geeignete Methode stellte sich die Inaktivierung mit 80%igem Ethanol, gefolgt von der Abtrennung der denaturierten Enzyme durch Zentrifugation, heraus.

Zur Untersuchung, welche Oligosaccharide aus den Einzelfuttermitteln freigesetzt werden können, wurden das UZM und LZM der Mais- und Sojaprogen aus der Masterarbeit von Lisa Wagner (vgl. Kapitel 3.2.1.1) herangezogen und mit unterschiedlichen Konzentrationen (Negativkontrolle, 2 x und 100 x Standarddosis; vgl. Kapitel 3.1) der eingesetzten *endo*-Xylanase inkubiert. Zur detaillierteren Abklärung der Haupt- und Nebenaktivitäten der Xylanase, wurden außerdem verschiedene Oligosaccharidstandardsubstanzen (XOS, AXOS, COS, MalOS, ManOS und RFO) mit der *endo*-Xylanase inkubiert. Um Temperatur und Inkubationszeit den Bedingungen im Verdauungstrakt der Hühner anzupassen, wurde jeweils bei 40 °C für 4 h in wässriger Lösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Enzym durch Zugabe von Ethanol inaktiviert. Bei diesem Schritt erfolgte gleichzeitig eine Ausfällung der löslichen Polysaccharide. Der Überstand mit den enthaltenen Oligosacchariden wurde eingedampft, wieder in Wasser aufgenommen und mittels HAPEC-PAD/MS analysiert. Dafür wurde das in Kapitel 3.4.3.3 beschriebene erweiterte Oligosaccharidprofiling verwendet. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 8.3.3 beschrieben.

3.4 Analyse der Kohlenhydrate in den Ileum- und Caecumproben

Um Einblicke zu erhalten, welche Oligosaccharide im Verdauungstrakt von Broilern vorkommen, insbesondere nach Zugabe von stimulierenden Komponenten zum Futter, sollten die im Darminhalt enthaltenen Oligosaccharide in den Proben aus Ileum und Caecum analysiert werden. Die Herausforderung bei dieser Art von Proben liegt darin, die Matrix weitgehend abzutrennen, sodass die Analyten ohne störende Matrixeinflüsse chromatographisch getrennt und detektiert werden können. Einen zweiten Faktor stellt die limitierte Probenmenge und die geringe Menge an enthaltenen Oligosacchariden dar.

Ein weiterer Punkt ist die Vielzahl von Oligosacchariden, die potenziell in solchen Proben vorkommen können (vgl. Kapitel 4.4.4).

Aufgrund der oben angeführten Faktoren ist die Analyse von Kohlenhydraten in Proben aus dem Darm komplex und die Entwicklung von geeigneten Aufarbeitungs- und Analysemethoden zeitaufwendig. In der Literatur sind dazu aktuell vereinzelt Methoden beschrieben: Kouzounis und Mitarbeitende (2022a) nutzten HILIC-MSⁿ, wofür die Oligosaccharide reduziert und mittels SPE-Kartuschen mit nicht-porösem Graphit (nPGC, engl.: *Non-Porous Graphitized Carbon*)-Material aufgearbeitet wurden. Dale und Mitarbeitende (2020) nutzten HPAEC-PAD mit einer HPAEC-Methode zur parallelen Bestimmung von XOS und COS, welche von Xu und Mitarbeitenden (2013) entwickelt wurde. Morgan und Mitarbeitende (2020) nutzten HPLC-DAD/MS nach Umsetzung der in der Probe enthaltenen XOS zu 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP)-Derivaten (vgl. Kapitel 4.4). In der vorliegenden Arbeit wurden die niedermolekularen löslichen Kohlenhydrate (NLKH) aus den Ileum- und Caecumproben extrahiert und mittels SPE weiter aufgereinigt. Die Analyse erfolgte mittels HPAEC-PAD/MS. Die HPAEC ermöglicht eine gute Trennung verschiedener Oligosaccharide und durch die Kopplung mit einem MS-Detektor (vgl. Kapitel 3.3.1) ist eine Identifizierung der Oligosaccharide über den Vergleich von Retentionszeit und Massenspektrum mit Standardsubstanzen möglich. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide nach TFA-Hydrolyse. Außerdem wurden mittels HPAEC-PAD die freien Monosaccharide sowie die RFO bestimmt. In den folgenden Kapiteln wird die genaue Vorgehensweise zur Analyse der Darmproben erläutert. Zur Entwicklung der Methoden standen Darmproben aus anderen, ähnlich aufgebauten Fütterungsversuchen (Broiler, Futter auf Mais-Soja-basis, Einsatz von Xylanase und/oder XOS) zur Verfügung, die ebenfalls von AB Vista bereitgestellt wurden. Der Fütterungsversuch zur Gewinnung dieser Ileumproben wurde ebenfalls von Diego Melo-Durán (Autonome Universität Barcelona, Spanien) durchgeführt. Der Versuch, aus dem die Caecumproben für die Methodenentwicklung stammten, wurde von Antonija Šimić (Harper Adams University, UK) durchgeführt. Dieser Caecumprobensatz wurde im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch (2022) hinsichtlich der vorkommenden Oligosaccharide analysiert.

3.4.1 Extraktion der niedermolekularen löslichen Kohlenhydrate

Als Erstes wurden die Oligosaccharide aus dem gefriergetrockneten Probenmaterial extrahiert. Hierfür wurde 80%iges Ethanol als Extraktionsmittel gewählt, um sicherzustellen, dass in der Probe vorhandene Mikroorganismen abgetötet und Enzyme, insbesondere die dem Futter zugegebene Xylanase, inaktiviert werden (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Damit sollte vermieden werden, dass während der Extraktion Veränderungen der Kohlenhydratkomponenten auftreten, beispielsweise durch die enzymatische Freisetzung weiterer, nicht ursprünglich in der Probe vorhandener Oligosaccharide. Gleichzeitig wurde das Probenmaterial bei diesem Schritt sterilisiert, was aus Sicherheitsgründen

erforderlich war, da eventuell pathogene Mikroorganismen wie *Salmonella* und *Campylobacter* vorkommen hätten können. Außerdem wurden gleichzeitig die wasserlöslichen Polysaccharide abgetrennt, da diese in 80%igem Ethanol weitestgehend präzipitieren (vgl. Kapitel 3.2.1.1). Im ethanolischen Extrakt befanden sich demzufolge die NLKH (Mono- und Oligosaccharide) sowie unter diesen Bedingungen lösliche Matrixkomponenten (z. B. Salze und Proteinkomponenten). Zurück blieb der alkoholunlösliche Rückstand, der unter anderem lösliche und unlösliche Polysaccharide enthält. Die Extraktion erfolgte bei 40 °C (ungefähre Körpertemperatur des Huhns) unter mehrfachem bzw. ständigem Schütteln über mehrere Extraktionsschritte. Das beschriebene allgemeine Vorgehen bei der Extraktion wurde für Ileum- und Caecumproben aufgrund der unterschiedlichen Formen (Ileum: gefriergetrocknetes gemahlene Pulver, Caecum: gefriergetrocknet in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, vgl. Kapitel 3.1) nach entsprechenden Vorversuchen leicht angepasst. Die Ileumproben wurden eingewogen und dreifach mit 80%igem Ethanol extrahiert (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.4.1). Die Caecumproben wurden vollständig in Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem Spatel zu Pulver zerdrückt und vierfach extrahiert, um auszugleichen, dass die Probe nicht fein gemahlen vorlag und die Probenmenge zum Teil variierte. Die Bestimmung der Probenmenge erfolgte in diesem Fall durch Wiegen des vollen und leeren Eppendorf-Reaktionsgefäßes vor und nach der Überführung des Probenmaterials in das Zentrifugenröhrchen (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.5.1). Nach der Extraktion wurde der Ethanolanteil des ethanolischen Extrakts evaporiert. Die Entfernung des restlichen Wassers erfolgte durch Gefrier Trocknen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und nochmals zentrifugiert, um Stoffe abzutrennen, die im ethanolischen Extrakt löslich waren, aber nicht in reinem Wasser (s. Arbeitsvorschriften Kapitel 8.4.1 und 8.5.1). Dieser Überstand wird im Folgenden als NLKH-Fraktion bezeichnet.

3.4.2 Aufreinigung mittels Festphasenextraktion

Bei der Analyse der NLKH-Fraktion mittels HPAEC ergaben sich eine Reihe von Problemstellungen, hauptsächlich bedingt durch die komplexe Matrix und die vielen in den Proben enthaltenen Stoffe (vgl. Kapitel 4.4.2). Die Effekte waren bei den Caecumproben deutlich ausgeprägter als bei den Ileumproben, was sich unter anderem durch die hohe Zahl an Mikroorganismen im Caecum erklären lässt. Um Matrixeffekte zu minimieren, stehen verschiedene Aufreinigungsmethoden, wie Dialyse, Ionenaustauscher, SEC, SPE sowie Nano- und Ultrafiltration, zur Auswahl (Packer *et al.*, 1998; Kothari *et al.*, 2014). Es wurden verschiedene Ansätze getestet (unter anderem Ionenaustauscher und Spin-konzentratoren), wobei sich die SPE als am vielversprechendsten und praktikabelsten für die große Anzahl an Proben erwies. Bei der SPE stehen verschiedene Materialien zur Verfügung, die je nach Anforderungen eingesetzt werden können, um verschiedene Stoffe bzw. Stoffgruppen abzutrennen.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Oligosaccharide. Diese sollten unter anderem auf Grundlage der Monosaccharidzusammensetzung nach Säurehydrolyse bestimmt werden. In den Proben kamen frei vorliegende Monosaccharide vor und da nach der Hydrolyse nicht unterschieden werden kann, ob ein Monosaccharid ursprünglich frei oder in einem Oligosaccharid gebunden vorlag, müssen die freien Monosaccharide aus der NLKH-Fraktion zuvor abgetrennt werden. Die Analysen sollten mittels HPAEC-PAD/MS durchgeführt werden. Wie bereits erwähnt, können in der Messlösung enthaltene Salze zu einer Verschiebung der Retentionszeit bei der HPAEC-Trennung führen. Salze können bei den gewählten Extraktionsbedingungen mitextrahiert werden und sollten daher vor der HPAEC-Analyse entfernt werden. Mit einer SPE mit nPGC-Material ist es möglich Oligosaccharide von Monosacchariden, aber auch von Salzen und anderen Komponenten, wie Proteinen, zu trennen. Das Prinzip beruht darauf, dass die verschiedenen Kohlenhydratkomponenten unterschiedliche Affinitäten zur stationären Phase aufweisen und durch verschiedene Elutionsmittel gestaffelt eluiert werden können (Packer *et al.*, 1998; Redmond & Packer, 1999). Dabei spielen Größe, Ladung und die Konfiguration bzw. Planarität der Kohlenhydrate eine entscheidende Rolle. Der genaue Interaktionsmechanismus ist nicht abschließend geklärt. Es wird diskutiert, dass Dipole induziert werden können und es somit zu Dipol-Dipol-Wechselwirkungen kommt. Ein zweiter Erklärungsansatz ist, dass in der Graphitstruktur stark delokalisierte Elektronen an den Kanten der einzelnen Ebenen erzeugt werden, mit denen die Kohlenhydrate über Wasserstoffbrücken interagieren können (Robinson *et al.*, 2018). In der Literatur ausführlich beschrieben ist das Elutionsverhalten verschiedener Saccharide. Nach Aufgabe einer wässrigen Probe können enthaltene Salze und neutrale Monosaccharide, wie Pentosen, Hexosen und Aminozucker, mit Wasser vollständig eluiert werden. Di- und Oligosaccharide sowie geladene Saccharide weisen eine höhere Affinität auf und verbleiben auf der Säule. Zur Elution von neutralen Oligosacchariden, wie (A)XOS, COS, MalOS, RFO etc., wird ein organischer Modifier benötigt. Hierfür wird häufig Acetonitril in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, je nach gewünschter Auftrennung sind Anteile von 4 % bis 80 % beschrieben. Zur Elution von geladenen Mono- und Oligosacchariden, wie beispielsweise Uronsäuren und daraus aufgebaute Oligosaccharide, ist der Zusatz geringer Mengen Säure (0,05 - 0,1 %) erforderlich. Hierzu werden meist TFA oder Ameisensäure verwendet (Packer *et al.*, 1998; Redmond & Packer, 1999; Boulos & Nyström, 2017; Robinson *et al.*, 2018).

Die zur Methodenentwicklung durchgeführten Versuche werden in Kapitel 4.4.2 ausgeführt. Zur Aufreinigung der Ileum- und Caecumproben wurden verschiedene Varianten getestet und unter anderem Elutionsverhalten, Kapazität sowie Wiederfindungen bei der Verwendung von nPGC-Kartuschen überprüft. Außerdem wurde getestet, ob die Kartuschen mehrfach verwendet werden können. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Versuche wurde eine Methode zur Aufreinigung und Fraktionierung der Darmproben mittels nPGC-SPE entwickelt. Wie oben beschrieben, unterschieden sich die Ileum- und Caecumproben in der Komplexität der Matrix, weshalb die Aufreinigungsmethoden

entsprechend angepasst wurden. Die Ileumproben wurden aufgrund der einfacheren Matrix mit einer weniger umfangreichen und arbeitsintensiven Methode aufgereinigt als die Caecumproben, dennoch sind die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar. In Abbildung 12 sind die entwickelten Aufarbeitungsmethoden schematisch dargestellt. Wie die einzelnen Fraktionen analysiert wurden, ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

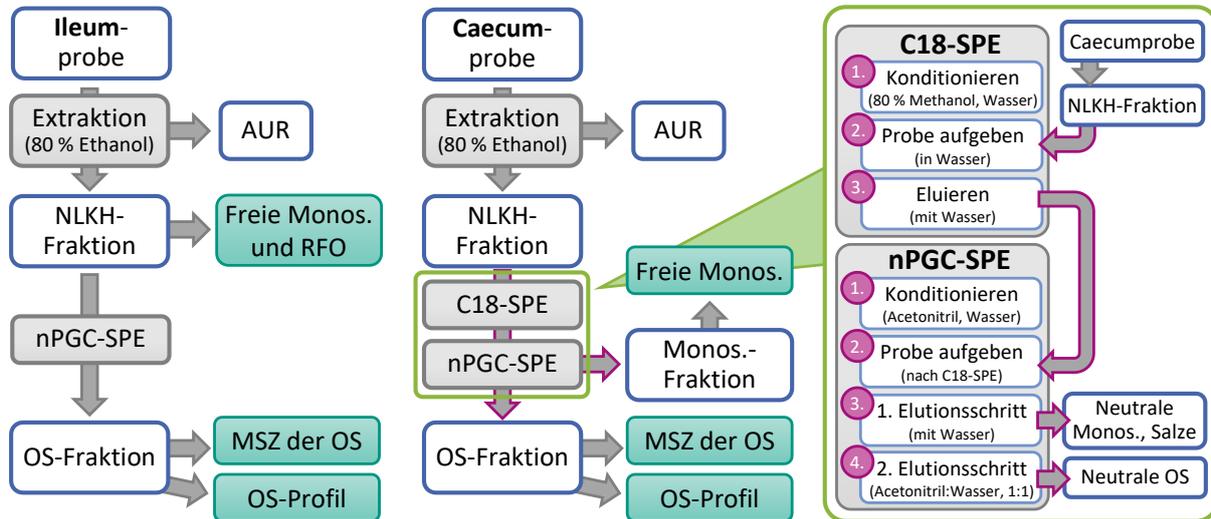


Abbildung 12: Entwickelte Methode zur Aufreinigung der Ileumproben (links) und Caecumproben (mittig). Rechts sind Details zur Kombination der Festphasenextraktion (SPE) mit C18- und nichtporösem Graphit (nPGC)-Material gezeigt (AUR: alkoholunlöslicher Rückstand, NLKH: niedermolekulare lösliche Kohlenhydrate, Monos.: Monosaccharide, RFO: Oligosaccharide der Raffinose-Familie, OS: Oligosaccharide, MSZ: Monosaccharidzusammensetzung).

Bei den Ileumproben war es möglich die freien Monosaccharide sowie die RFO direkt aus der NLKH-Fraktion ohne weitere Aufreinigungsschritte zu bestimmen. Zur Analyse der nicht-RFO Oligosaccharide wurde die NLKH-Fraktion mittels nPGC-SPE aufgereinigt. Nach Konditionierung mit Acetonitril und Wasser wurde die Probe aufgegeben, die neutralen Monosaccharide und Salze durch einen Waschschrift mit Wasser entfernt und anschließend die neutralen und geladenen Oligosaccharide mit Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) mit Ameisensäurezusatz (0,1 %) eluiert. In diesem Elutionsschritt würden auch freie Uronsäuren eluieren, allerdings ergab die Analyse der freien Monosaccharide, dass in den Proben keine freien Uronsäuren in detektierbaren Mengen enthalten waren. Demnach enthielt diese Fraktion ausschließlich Oligosaccharide. Die SPE-Kartusche wurde rekonditioniert und ein zweites Mal verwendet (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.4.3). Das Acetonitril/Wasser/Ameisensäure-Eluat wurde im Evaporator von Acetonitril befreit und anschließend gefriergetrocknet. Zur Entfernung von Ameisensäureresten wurde der Rückstand mehrfach in 80- und 100%igem Ethanol aufgenommen und wieder vollständig eingedampft, da sonst keine zuverlässige Trennung mittels HPAEC möglich war (vgl.

Kapitel 4.4.2). Zum Schluss wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird im Folgenden als Oligosaccharidfraktion bezeichnet.

Bei den Caecumproben war es aufgrund der Matrixzusammensetzung nicht möglich die NLKH-Fraktion direkt zu analysieren. Selbst eine Aufreinigung mittels nPGC-SPE war nicht ausreichend, wie sich im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch (2022) herausstellte. Als geeignet erwies sich die Kombination aus einer SPE mit C18-Material gefolgt von einer SPE-Fraktionierung mittels nPGC-Material (Rausch, 2022). Dieses Vorgehen wurde für die in dieser Arbeit untersuchten Caecumproben getestet und entsprechend angepasst. Einzelheiten zur Methodenentwicklung und zur Überprüfung des gewählten Aufarbeitungsverfahrens sind in Kapitel 4.4.2 und 4.4.3 beschrieben. Die optimierte Methode zur Aufreinigung der Caecumproben ist in Abbildung 12 gezeigt. Details sind der Arbeitsvorschrift in Kapitel 8.5.2 zu entnehmen. Die NLKH-Fraktion wurde auf die C18-SPE aufgegeben und die zu analysierenden Mono- und Oligosaccharide (bis zu einem bestimmten DP) wässrig eluiert, wobei Matrixkomponenten auf der Säule verbleiben. Das Eluat wurde anschließend mittels nPGC-SPE in zwei Fraktionen getrennt. Das wässrige Eluat enthält die neutralen Monosaccharide. Es wurde gefriergetrocknet und wieder in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen, um es aufzukonzentrieren. Die so erhaltene Fraktion wird im Folgenden als Monosaccharidfraktion bezeichnet. Zur Elution der Oligosaccharide wurde in diesem Fall ein Acetonitril/Wasser-Gemisch (50/50) ohne Säurezusatz verwendet, da in Vorversuchen keine freien Uronsäuren oder geladene Oligosaccharide in den Proben festgestellt werden konnten. Damit wurden vermehrt auftretende negative Einflüsse durch Ameisensäurereste auf die Trennung mittels HPAEC eliminiert (vgl. Kapitel 4.4.2). Acetonitril und Wasser wurden durch Evaporation bzw. Gefrierdrying entfernt. Lösungsmittelreste wurden durch Evaporation mit Ethanol entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, analog zur Oligosaccharidfraktion der Ileumproben.

3.4.3 Analysen mittels HPAEC

3.4.3.1 Freie Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie

Bei den Ileumproben konnten die freien Monosaccharide direkt aus der NLKH-Fraktion analysiert werden. Außerdem wurde bei Vorversuchen beobachtet, dass die RFO die dominierenden Oligosaccharide in den Ileumproben sein könnten, weshalb eine Quantifizierung dieser angestrebt wurde. Es war möglich den HPAEC-Gradienten, der zur Analyse der Monosaccharide nach Säurehydrolyse (vgl. Kapitel 3.2.2.1) verwendet wurde, so anzupassen, dass mit einer Messung sowohl die freien Monosaccharide als auch die RFO quantifiziert werden konnten (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.4.2). Da in diesem Fall, anders als bei der Monosaccharidzusammensetzung, nicht die prozentualen Verhältnisse der Zucker, sondern die absoluten Mengen bestimmt werden sollten, wurde ein interner Standard ausgewählt. Dieser wurde in einer definierten Konzentration zu Kalibrier- und Probenlösungen gegeben und die Auswertung erfolgte über die Flächenverhältnisse der

Signale von internem Standard und Analyt. Dadurch können beispielsweise Einflüsse durch die Alterung des Fließmittels oder Veränderungen im PAD-Response durch Ablagerungen auf der Goldelektrode besser ausgeglichen werden. Auch Matrixeffekte können so teilweise berücksichtigt werden. Außerdem ermöglicht dies die Überwachung einer fehlerfreien Injektion sowie systembedingter Veränderungen über die gesamte Messreihe hinweg. Als interner Standard wurden mehrere Mono- und Disaccharide getestet und 2-Desoxy-D-Glucose ausgewählt, da sie nicht natürlicherweise in den Proben zu erwarten ist und als isolierter Peak bei dem verwendeten Gradienten eluiert.

Die freien Monosaccharide in den Caecumproben wurden aufgrund verschiedener Matrixeffekte nicht aus der NLKH-Fraktion, sondern aus der Monosaccharidfraktion nach SPE-Aufreinigung analysiert (vgl. Kapitel 3.4.2). Hierfür wurde der normale HPAEC-Gradient für Monosaccharide verwendet (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.5.3). In den Chromatogrammen traten mehrere nicht zugeordnete Signale auf, eventuell von Zuckern mikrobiellen Ursprungs oder anderen Komponenten. 2-Desoxyglucose wurde als interner Standard mitgeführt, um das System zu überwachen, jedoch wurde in diesem Fall aufgrund koeluerender Matrixkomponenten ohne internen Standard ausgewertet. Die RFO befinden sich nach nPGC-Fraktionierung in der Oligosaccharidfraktion und wurden daher für die Caecumproben nur bei der Bestimmung des Oligosaccharidprofils erfasst und nicht separat quantifiziert.

3.4.3.2 Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion

Um Erkenntnisse über die enthaltenen Oligosaccharide zu sammeln, insbesondere da nicht alle Oligosaccharide identifiziert werden konnten, wurde die Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen von Ileum- und Caecumproben analysiert. Vorversuche ergaben, dass in den Proben keine uronsäurehaltigen Oligosaccharide in relevanten Mengen enthalten waren. Deshalb wurde in Erwägung gezogen, für die Hydrolyse TFA ohne vorgeschaltete Methanolyse zu nutzen (vgl. Kapitel 3.2.2.1). In einem Vorversuch zur Einschätzung der Reproduzierbarkeit der Analyse wurden beide Ansätze getestet und vergleichbare Ergebnisse erzielt, weshalb die weniger arbeitsintensive TFA-Hydrolyse ohne vorherige Methanolyse für die Freisetzung der Monosaccharide aus den Oligosacchariden ausgewählt wurde (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.4.4 und 8.5.4). Ebenfalls überprüft wurde die Wiederfindung von ausgewählten Oligosacchariden nach TFA-Hydrolyse (vgl. Kapitel 4.5.2.1). Während der Methodenentwicklung zeigte sich, dass in den Proben neben den erwarteten Monosacchariden aus Oligosacchariden, die auf Zellwandpolysaccharide oder natürlicherweise vorkommende Oligosaccharide zurückzuführen sind, weitere Signale detektiert werden. Diese konnten den Aminozuckern Galactosamin und Glucosamin sowie der Pentose Ribose zugeordnet werden, wobei Galactosamin mit Rhamnose koeluiert. Ein HPAEC-Chromatogramm zur Illustration der Elutionsreihenfolge der erwarteten und zusätzlich detektierten Monosaccharide ist in Abbildung A9 (Kapitel 9.1) gezeigt. Es wurde ein Gradientenprogramm entwickelt, um

festzustellen, ob in der Probe Galactosamin, Rhamnose oder beide Zucker enthalten sind (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.5.5). Bei Testmessungen wurde beobachtet, dass Glucosamin zur Herabsetzung des PAD-Responses der danach eluierenden Monosaccharide führt. Weitere Tests ergaben, dass es sich dabei um einen zum Teil konzentrationsabhängigen Effekt handelt, der an verschiedenen HPAEC-Systemen unterschiedlich stark ausgeprägt war. Die nach saurer Hydrolyse erhaltenen Monosaccharidproben wurden an dem HPAEC-System gemessen, an dem die Effekte am geringsten waren. Zusätzlich wurde bei den Messungen der Caecumproben eine Aminotrap (vgl. Kapitel 4.4.3) eingesetzt, da dadurch eine Verbesserung der Messergebnisse erzielt werden konnte. Die beobachteten Effekte werden in Kapitel 4.4.3 genauer beschrieben und diskutiert. Um die Effekte besser einschätzen zu können, wurden für ausgewählte Messreihen zusätzlich eine Kalibrierung für Glucosamin aufgenommen, um die Gehalte quantifizieren zu können. Bei allen Messungen zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung wurde 2-Desoxyglucose zugegeben und für die Auswertung herangezogen. Es wurde entschieden, die Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Ileum- und Caecumproben ebenfalls absolut in mg pro g gefriergetrocknetem Darminhalt zu berechnen und nicht, wie üblich, als molare Anteile anzugeben. Dies ermöglichte unter anderem eine Abschätzung der Menge an enthaltenen Oligosacchariden.

3.4.3.3 Erweitertes Oligosaccharidprofiling mittels HPAEC-PAD/MS

Aus der Monosaccharidzusammensetzung können Rückschlüsse auf die enthaltenen Oligosaccharide gezogen werden, jedoch basiert die Zuordnung auf Annahmen, welche Oligosaccharide in der Probe erwartet werden. Um die Oligosaccharide tatsächlich identifizieren und bestimmen zu können, ist eine entsprechende Analysemethode erforderlich. Hierfür eignet sich das in Kapitel 3.3.1 vorgestellte HPAEC-PAD/MS-System. Mittels eines geeigneten Gradienten können die Oligosaccharide mit der HPAEC aufgetrennt werden und die MS-Messung liefert zusätzlich zur Retentionszeit Informationen, die für eine eindeutige Zuordnung genutzt werden können.

Der HPAEC-Gradient wurde ausgehend von der HPAEC-Methode zur Bestimmung von (A)XOS von Lukas Sitter (vgl. Kapitel 3.3.1) erweitert und für diese Fragestellung optimiert. Die Profilingmethode zur Bestimmung der Oligosaccharide in den Darmproben sollte möglichst viele potenziell in den Proben enthaltene Oligosaccharide umfassen. Hierfür wurden Erkenntnisse aus der Untersuchung der Einzelfuttermittel und der zugegebenen Komponenten sowie theoretische Überlegungen herangezogen. Details hierzu werden in Kapitel 4.4.4 beschrieben. In das Oligosaccharidprofiling integriert wurden AXOS, XOS, COS, MalOS, ManOS, RFO sowie die Invertaseabbauprodukte der RFO, Arabinoxylanseitenketten, Galactan- und Arabinanligosaccharide. Angaben zu Herstellern und Reinheit der kommerziell erhältlichen Oligosaccharidstandards sind in Kapitel 7.2 aufgeführt. Die Generierung der Invertaseabbauprodukte und die HPAEC-PAD/MS-

Bedingungen zum entwickelten Profiling sind in Kapitel 8.4.5 beschrieben. Als interner Standard wurde Isomaltotriose genutzt.

Zur Bestimmung des Oligosaccharidprofils wurden die aufgearbeiteten Oligosaccharidfraktionen der Ileum- und Caecumproben mit der entwickelten erweiterten HPAEC-PAD/MS-Methode gemessen (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.4.5 und 8.5.6) und wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben ausgewertet. Zusätzlich wurden einzelne dieser Proben mit dem zuvor beschriebenen Arabinan- und Galactanprofiling analysiert (vgl. Kapitel 3.2.2.3), um die Ergebnisse abzusichern (s. Arbeitsvorschrift Kapitel 8.4.6 und 8.5.7).

3.4.4 Methylierungsanalyse nach Enzymverdau

Mit der erweiterten HPAEC-PAD/MS-Methode zur Erfassung des Oligosaccharidprofils konnten, trotz der großen Anzahl berücksichtigter Oligosaccharide, nur die Oligosaccharide identifiziert werden, für die Standardsubstanzen zur Verfügung standen. Um weiterführende Erkenntnisse über die enthaltenen Oligosaccharide zu erlangen und um Lücken zwischen Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide nach TFA-Hydrolyse und ermitteltem Oligosaccharidprofil zu schließen, wurde die in Kapitel 3.2.2.2 beschriebene Methylierungsanalyse zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse für ausgewählte Darmproben durchgeführt. Im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch (2022) wurden bereits Caecumproben mittels Methylierungsanalyse untersucht. Aus diesem Grund lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Analyse der Bindungsverhältnisse der Oligosaccharide in den Ileumproben. Da einige Ileumproben, insbesondere Proben von Tag 21, große Mengen RFO enthielten und diese bereits eindeutig identifiziert waren, wurde eine Methode entwickelt, um die RFO mittels enzymatischer Hydrolyse selektiv aus den Proben zu entfernen. Dies war erforderlich, da die PMAAs, die aus den RFO gebildet worden wären, die GC-Chromatogramme derart dominiert hätten, dass die Analyse der gesuchten PMAAs, die in wesentlich geringeren Mengen vorkamen, nicht möglich gewesen wäre. Zusätzlich wurden aus Stärke stammende MalOS, die zum Teil ebenfalls in größeren Mengen in den Proben vorkamen, durch enzymatischen Abbau entfernt. Für den enzymatischen Abbau der RFO und MalOS wurde zur NLKH-Fraktion der ausgewählten Ileumproben ein Enzymmix, bestehend aus Invertase, α -Galactosidase und Amyloglucosidase, gegeben. Die Enzymkonzentrationen und Inkubationsbedingungen wurden so gewählt, dass die RFO und MalOS in den Proben vollständig abgebaut werden sollten. Außerdem wurde überprüft, dass die Enzyme bei den gewählten Bedingungen keine Nebenaktivitäten gegenüber anderen Oligosacchariden aufweisen. Hierzu wurden Versuche analog zur Überprüfung der Nebenaktivitäten der eingesetzten Xylanase durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.3). Nach der enzymatischen Hydrolyse der störenden Oligosaccharide wurden die freigesetzten Monosaccharide, zusammen mit den in der Probe vorkommenden freien Monosacchariden, mittels nPGC-SPE von den Oligosacchariden separiert (vgl. Kapitel 3.4.2). Aufgrund der hohen Wechselwirkungen des nPGC-Materials mit Proteinen wurden bei diesem Schritt gleichzeitig die zugegebenen Enzyme abge-

trennt. Das Eluat, welches die Oligosaccharide enthielt, wurde getrocknet und in Wasser aufgenommen. Ein Teil dieser Oligosaccharidfraktion nach Enzymverdau wurde für die Methylierungsanalyse verwendet. Zusätzlich wurde die Monosaccharidzusammensetzung und das Oligosaccharidprofil dieser Fraktion, analog zu den nicht mit Enzymen behandelten Ileumproben, bestimmt (vgl. Kapitel 3.4.3.2 und 3.4.3.3).

Für diesen Analyseansatz wurden zwölf repräsentative Ileumproben aus dem Probensatz Basisfutter Mais 3 ausgewählt. Pro Futtervariante und Alter wurden je zwei zusammenpassende biologische Replikate analysiert. Diese sind in Tabelle A4 (Kapitel 9.2) fett hervorgehoben. Die Durchführung ist in Kapitel 8.4.7 aufgeführt.

3.4.5 Auswahl der Ileum- und Caecumproben für die Analysen

Für die Analyse der Oligosaccharide in Proben aus dem Darm von Broilern standen die in Kapitel 3.1 beschriebenen Ileum- und Caecumproben aus dem ebenfalls in jenem Kapitel beschriebenen Fütterungsversuch zur Verfügung. Aufgrund der hohen Anzahl an Proben und der zeitaufwändigen Analytik wurde entschieden, den Probenumfang auf Proben zweier Basisfuttermittel zu begrenzen. Die Auswahl erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse der Charakterisierung der Einzelfuttermittel (vgl. Kapitel 4.1 und 4.2) sowie der vorläufigen Auswertung der Leistungsparameter des Fütterungsversuchs in Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern. Bei der Analyse der Arabinoxylanseitenketten der vier Maissorten konnten Unterschiede zwischen Maissorte 4 und den anderen drei Maissorten festgestellt werden, daher wurden die Proben von Basisfutter Mais 4 ausgewählt. Die Charakterisierung der Sojaprogenen ergab, dass sich diese in ihrem RFO-Gehalt unterscheiden. Alle Basisfuttermittel enthielten die beiden Sojakomponenten in leicht unterschiedlichen Anteilen, wobei Basisfutter Mais 1 in der Zusammensetzung deutlich abwich (vgl. Tabelle A1, Kapitel 9.2). Um den Einfluss der Sojakomponenten so gering wie möglich zu halten, wurden daher die Proben von Basisfutter Mais 1 ausgeschlossen. Anhand der vorläufigen Leistungsparameter konnte die Auswahl nicht weiter eingegrenzt werden. Aus diesem Grund fiel die Wahl, neben den Proben von Basisfutter Mais 4, willkürlich auf die Proben der Tiere, die mit Basisfutter Mais 3 gefüttert wurden.

Aufgrund verschiedener Faktoren (geringe Probenmenge, Sterblichkeit) waren die Darmproben für die Analyse der Oligosaccharide nicht vollständig. Die fehlenden Proben sind in Tabelle A4 (Kapitel 9.2) dunkelgrau markiert. Insbesondere die Caecumproben von Tag 41 waren unvollständig: Es lagen nur 26 der 48 angedachten Proben vor. Die vorliegenden Proben verteilten sich gleichmäßig auf die sechs Futtervarianten, sodass pro Futtervariante mindestens 4 der ursprünglich geplanten 8 Proben (= biologische Replikate) vorlagen, mit Ausnahme von Mais 3-Xyla (3 Proben). Die Ileumproben von Tag 41 waren nahezu vollständig (41 von 48). Von Tag 21 waren alle Ileum- und Caecumproben vorhanden (jeweils 48 Proben, 8 Proben pro Futtervariante).

Aus allen vorliegenden Ileum- und Caecumproben (Basisfutter Mais 3 und Mais 4) wurden die NLKH-Fractionen extrahiert (vgl. Kapitel 3.4.1). Die freien Monosaccharide wurden

für alle vorliegenden Ileum- und Caecumproben bestimmt, und für alle vorliegenden Ileumproben wurden die Gehalte an RFO ermittelt (vgl. Kapitel 3.4.3.1). In Tabelle 1 ist eine Übersicht der analysierten Parameter, aufgeschlüsselt nach Darmabschnitt und Alter, dargestellt. Die Ileum- und Caecumproben von Tag 21 waren vollständig, weshalb hier die Oligosaccharidfraktionen aller Proben analysiert werden konnten. Aufgrund der unvollständigen Proben von Tag 41 und der zeitaufwendigen Aufarbeitung, wurde beschlossen für die Proben von Tag 41 eine sinnvolle Auswahl für die Analyse der Oligosaccharidfraktionen zu treffen. Dafür wurde herangezogen, dass immer eine Ileum- und eine Caecumprobe ein zusammengehörendes Paar darstellen, da sie denselben Tieren entnommen wurden. Beispielsweise die Proben 1a-41-I und 1a-41-C sind der Ileum- bzw. Caecuminhalt aus denselben Tieren (bei Proben von Tag 41 wurde jeweils der Ileum- und Caecuminhalt zweier Tiere aus demselben Käfig gepoolt, vgl. Kapitel 3.1). Um später mögliche Zusammenhänge zwischen Analyseergebnissen der Oligosaccharide und einzelner Tiere erkennen zu können, wurden die Tag-41-Proben für die Analyse der Oligosaccharide dementsprechend ausgewählt. Als Grundlage wurden die vorhandenen Caecumproben genommen und jeweils die zugehörigen Ileumproben, wenn vorhanden, ausgewählt (23 Probenpaare). Da pro Futtervariante und Darmabschnitt, wenn möglich, mindestens vier biologische Replikate analysiert werden sollten, wurden entsprechend weitere Ileum- und Caecumproben ausgewählt. Die Auswahl ist in Tabelle A4 (Kapitel 9.2) gekennzeichnet.

Tabelle 1: Übersicht der Ileum- und Caecumproben und der jeweils analysierten Parameter (alle: Proben vollständig (8 biologische Replikate pro Futtervariante); alle vorliegenden: Proben unvollständig; ausgewählte: gezielt zu Caecumproben passend ausgewählt, vgl. Tabelle A4; in Klammer: Anzahl der analysierten Proben; RFO: Oligosaccharide der Raffinose-Familie, SPE: Festphasenextraktion)

Proben	Freie Monosaccharide	RFO	Oligosaccharidfraktion nach SPE	
			Monosaccharid-zusammensetzung	Oligosaccharidprofil
Ileum Tag 21	alle (48)	alle (48)	alle (48)	alle (48)
Caecum Tag 21	alle (48)	-	alle (48)	alle (48)
Ileum Tag 41	alle vorliegenden (41)	alle vorliegenden (41)	ausgewählte (28)	ausgewählte (28)
Caecum Tag 41	alle vorliegenden (26)	-	alle vorliegenden (26)	alle vorliegenden (26)

4. Ergebnisse und Diskussion

In den nachfolgenden Kapiteln werden zunächst die Ergebnisse der Charakterisierung der Einzelfuttermittel sowie der zum Futter zugesetzten Komponenten beschrieben. Anschließend werden Details zur Entwicklung der Methode zur Untersuchung der Ileum- und Caecumproben erläutert und danach die Untersuchungsergebnisse ausgeführt.

4.1 Charakterisierung der Einzelfuttermittel - Mais

Die in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse der Maisproben wurden im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) generiert und werden hier nur zusammenfassend aufgeführt. Dabei wird der Fokus auf die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Proben gelegt. Es werden insbesondere Mais 3 und 4 betrachtet, da die Ileum- und Caecumproben dieser Maissorten analysiert wurden (vgl. Kapitel 3.4.5). Detailliertere Betrachtungen und weiterführende Literaturvergleiche sind der Masterarbeit zu entnehmen (Wagner, 2022).

4.1.1 Grundcharakterisierung

Zur grundlegenden Charakterisierung und zur Abschätzung der Anteile der NSP in den Maisproben wurde der Gehalt an UZM und LZM sowie an Klason-Lignin im UZM bestimmt. Die Analyseergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

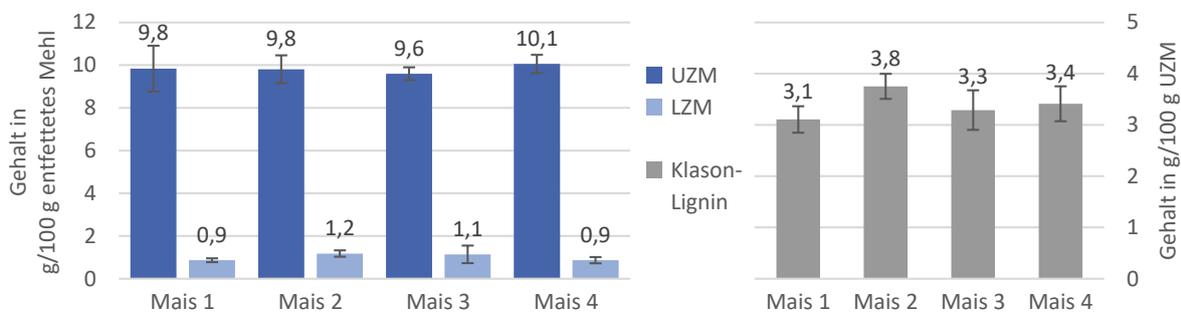


Abbildung 13: Gehalte an unlöslichem und löslichem Zellwandmaterial (UZM, LZM) der Maisproben (links; g/100 g entfettetes Mehl \pm Standardabweichung, n = 3) sowie die Gehalte an Klason-Lignin des UZMs (rechts; g/100 g UZM \pm Standardabweichung, n = 3). Alle Ergebnisse sind um Protein- und Aschegehalt korrigiert (modifiziert nach Wagner, 2022).

Es sind keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Maissorten ersichtlich. Alle vier Proben weisen sehr ähnliche Gehalte an Zellwandmaterialien auf, wobei der Anteil des UZMs etwa um einen Faktor 10 höher ist als der des LZMs. In der Literatur sind Werte in ähnlichen Bereichen beschrieben (Bach Knudsen, 1997; Jaworski *et al.*, 2015), wobei beim Vergleich zu berücksichtigen ist, dass zum Teil abweichende Analysemethoden verwendet wurden. Für den Fütterungsversuch bedeuten diese Ergebnisse, dass es keine quantitativen Unterschiede in den Anteilen der NSP aus der Maiskomponente gibt und

die NSP überwiegend aus unlöslichen Polysacchariden bestehen. Unter der Annahme, dass das Zellwandmaterial (nach Protein- und Aschekorrektur) ausschließlich aus NSP und Lignin besteht, ergeben sich durch die Addition von ligninkorrigiertem UZM und LZM NSP-Gehalte zwischen 10,4 und 10,6 g/100 g entfettetem Mehl.

4.1.2 Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide

Es wurden verschiedene Analysen durchgeführt, um die Zellwandpolysaccharide näher zu charakterisieren. Die Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung und der Methylierungsanalyse der Polysaccharide des LZMs und UZMs der vier Maisproben sind in Abbildung 14 und Tabelle 2 zusammengefasst. Da die verschiedenen Maissorten sehr ähnliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Bindungsverhältnisse aufwiesen, sind exemplarisch die Werte der Probe Mais 3 aufgeführt. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der übrigen Proben können in Tabelle A7 und Tabelle A8 (Kapitel 9.2) eingesehen werden.

Die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide des LZMs (Abbildung 14, oben) ergab, dass die löslichen Polysaccharide der Maisproben sehr ähnlich zusammengesetzt sind. Bei allen vier Proben dominiert die Mannose (durchschnittlich 38,0 mol%), gefolgt von Arabinose (21,5 mol%). In mittleren Anteilen kommen Xylose (13,2 mol%), Glucose (11,7 mol%) und Galactose (9,7 mol%) vor. Rhamnose (1,6 mol%), Galacturonsäure (2,7 mol%) und Glucuronsäure (1,6 mol%) konnten lediglich in kleinen Anteilen bestimmt werden.

Die Methylierungsanalyse (Tabelle 2) ergab, dass die Mannose in den Polysacchariden des LZMs überwiegend terminal gebunden vorliegt (9,6 mol%), was auf Verzweigungen und/oder kurzkettige Strukturen hindeutet. Außerdem konnten größere Anteile an 1,2-verknüpfter Mannopyranose festgestellt werden (5,1 mol%). Diese Verknüpfung ist für pflanzliche Polysaccharide ungewöhnlich, da Mannose hauptsächlich in Mannanen vorkommt und diese in der Regel β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpft vorliegen (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Dieser Bindungstyp konnte auch nachgewiesen werden, allerdings nur in geringen Mengen (0,6 mol%). Zusätzlich wiesen die festgestellten Mannoseanteile eine starke Differenz zwischen Monosaccharidzusammensetzung (36,4 mol%) und Methylierungsanalyse (15,3 mol%) auf. Der Ursprung der Mannose im LZM konnte nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Arabinose- und Xyloseeinheiten können mithilfe der Methylierungsanalysedaten überwiegend Arabinoxylanen zugeordnet werden. Wie in Kapitel 1.2.3.3 im Detail beschrieben, trägt das β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Xylanrückgrat der Arabinoxylane über die *O*-2- und/oder *O*-3-Position Seitenketten, die hauptsächlich aus Arabinose oder kurzen Oligosacchariden bestehen und mit Ferulasäure verknüpft vorliegen können. Die Daten der Methylierungsanalyse zeigen, dass die Seitenketten des Arabinoxylans im LZM überwiegend über die *O*-3-Position gebunden vorliegen (8,7 mol% 1,3,4-verknüpfte Xylopyranose), aber auch Verknüpfungen über die *O*-2-Position vorkommen (1,2 mol% 1,2,4-verknüpfte

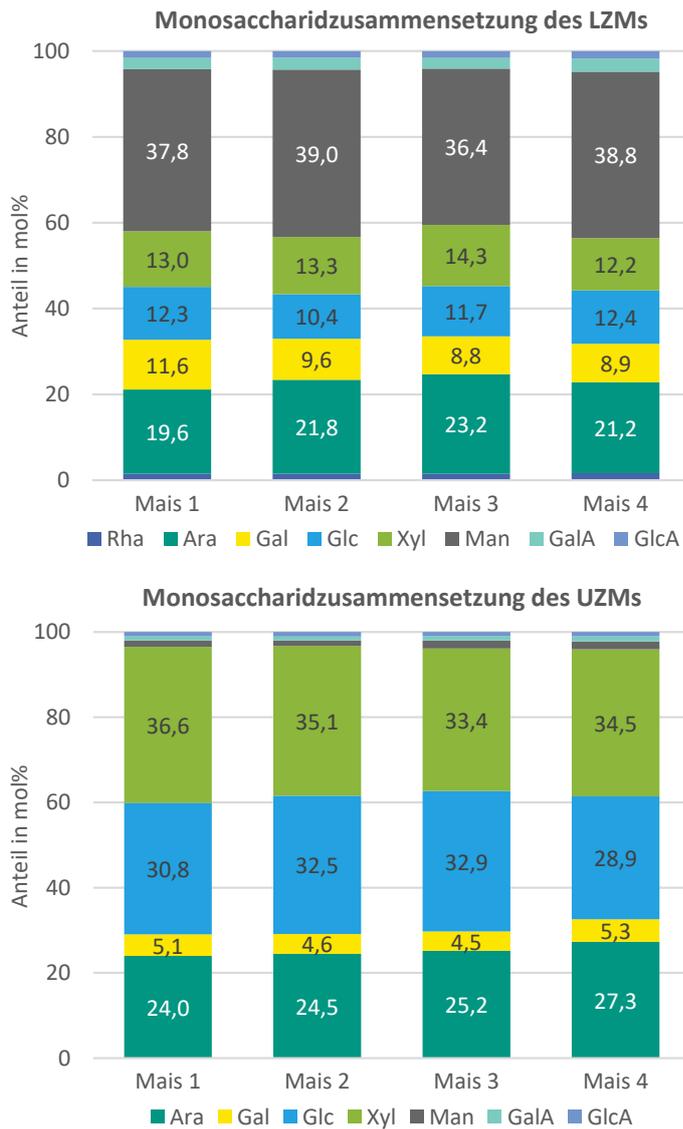


Abbildung 14: Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Maisproben (mol%, n = 3). Oben: Lösliches Zellwandmaterial (LZM) nach Methanolyse; unten: Unlösliches Zellwandmaterial (UZM) nach Schwefelsäurehydrolyse (Rha: Rhamnose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure; modifiziert nach Wagner, 2022)

Tabelle 2: Ergebnisse der Bindungstypen nach Methylierungsanalyse (mol% ± Range/2, n = 2) des löslichen bzw. unlöslichen Zellwandmaterials (LZM bzw. UZM) am Beispiel von Mais 3 (PMAA: partiell methylierte Alditolacetate, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose; Wagner, 2022)

Mais 3	LZM	UZM
PMAA	in mol%	in mol%
t-Glcp	4,3 ± 0,4	1,6 ± 0,0
1,3-Glcp	-	2,6 ± 0,1
1,4-Glcp	19,7 ± 2,6	32,5 ± 1,4
1,3,6-Glcp	0,7 ± 0,2	-
1,4,6-Glcp	1,8 ± 0,4	2,1 ± 0,0
Summe	26,5 ± 3,6	38,8 ± 1,6
t-Xylp	1,8 ± 0,0	2,3 ± 0,1
1,4-Xylp	4,6 ± 0,0	4,9 ± 0,2
1,2,4-Xylp	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1
1,3,4-Xylp	8,7 ± 0,5	9,4 ± 0,1
1,2,3,4-Xylp	7,0 ± 0,0	13,3 ± 1,7
Summe	23,3 ± 0,7	31,3 ± 2,2
t-Araf	20,0 ± 1,1	14,7 ± 0,5
1,2-Araf	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0
1,3-Araf	2,9 ± 0,3	1,4 ± 0,0
1,5-Araf	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,0
1,2,5-Araf	-	0,6 ± 0,0
1,3,5-Araf	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,0
1,2,3,5-Araf	-	4,3 ± 0,9
Summe	28,0 ± 1,7	25,3 ± 1,5
t-Galp	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
1,3-Galp	0,7 ± 0,1	-
1,4-Galp	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1
1,3,6-Galp	3,7 ± 0,5	-
Summe	7,0 ± 0,8	2,9 ± 0,2
t-Manp	9,6 ± 1,5	0,2 ± 0,0
1,2-Manp	5,1 ± 0,1	-
1,4-Manp	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Summe	15,3 ± 1,7	1,2 ± 0,1
1,2,4-Rhap	-	0,5 ± 0,0
Summe	-	0,5 ± 0,0

Xylopyranose). Die 1,2,3,4-verknüpfte Xylopyranose deutet auf disubstituierte Einheiten hin, wobei zu beachten ist, dass das entsprechende PMAA auch durch Untermethylierung während der Aufarbeitung entstehen kann (vgl. Kapitel 3.2.2.2). Die terminalen Arabinoseeinheiten können durch die einfachen, aus Arabinose bestehenden Seitenketten erklärt werden. Bei den bekannten komplexeren Seitenketten liegt die Arabinose 1,2-glykosidisch verknüpft vor. Da noch weitere Bindungstypen für die Arabinose festgestellt wurden, ist davon auszugehen, dass die Arabinose nicht vollständig den Arabinoxylenen

zugeordnet werden kann. Dies verdeutlicht, warum das Verhältnis von Arabinose zu Xylose nur als Orientierung zur Einschätzung des Substitutionsgrads herangezogen werden sollte. Für die löslichen Polysaccharide in diesen Proben liegt das A/X zwischen 1,5 und 1,7. Dies legt nahe, dass es sich um hochsubstituierte Arabinoxylane handelt.

Die Monosaccharidzusammensetzung der UZM (Abbildung 14, unten) zeigt, dass die unlöslichen Polysaccharide aller vier Proben ebenfalls eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen. Sie sind hauptsächlich aus Xylose (durchschnittlich 34,9 mol%), Glucose (31,3 mol%) und Arabinose (25,2 mol%) aufgebaut. Außerdem konnte ein Anteil von durchschnittlich 4,9 mol% Galactose sowie kleine Anteile an Mannose (1,6 mol%), Galacturonsäure (1,0 mol%) und Glucuronsäure (1,0 mol%) nachgewiesen werden. Dies entspricht der Erwartung, da die Zellwände von Gräsern überwiegend aus Arabinoxylanen und Cellulose (1,4-verknüpfte Glucopyranose) aufgebaut sind (vgl. Kapitel 1.2.3.1). Die Daten der Methylierungsanalyse des UZMs (s. Tabelle 2) zeigen, dass die Seitenketten auch bei den unlöslichen Arabinoxylanen häufiger über die *O*-3-Position gebunden sind als über die *O*-2-Position (9,4 mol% 1,3,4- und 1,5 mol% 1,2,4-verknüpfte Xylopyranose). Der hohe Anteil an 1,2,3,4-verknüpfter Xylopyranose (13,3 mol%) spricht für eine bei unlöslichem Material häufiger auftretende Untermethylierung, da bei einem A/X zwischen 0,7 und 0,8 disubstituierte Einheiten (bei entsprechendem Vorkommen von monosubstituierten Xyloseeinheiten) nicht in den bestimmten Anteilen erwartet werden. Das A/X der unlöslichen Polysaccharide ist damit deutlich niedriger als das der löslichen, dennoch kann bei diesem Wert im Vergleich zu anderen Getreidesorten von einem hochsubstituierten Arabinoxylan ausgegangen werden (vgl. Kapitel 1.2.3.3).

Um die Arabinoxylane weiter zu charakterisieren, wurde das Vorkommen von mit Ferulasäure veresterten Seitenketten analysiert sowie die Gehalte von estergebundenen phenolischen Säuren und Oligoferulasäuren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 gezeigt. Im linken Diagramm dieser Abbildung ist zu sehen, dass wie erwartet die Seitenkette FA dominiert, gefolgt von FAX und FAXG (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Diese Ergebnisse werden, unter anderem durch einen hohen Anteil terminaler Arabinose, bei der Methylierungsanalyse bestätigt. Auffällig ist, dass Mais 4 einen geringeren Gehalt an FA aufweist als die anderen untersuchten Maisproben. Dies kann in zwei Richtungen interpretiert werden: Entweder besitzen die Arabinoxylane dieser Probe weniger Seitenketten mit Ferulasäure, was unter anderem dazu führen könnte, dass weniger Crosslinks ausgebildet werden können und die Arabinoxylane weniger vernetzt vorliegen oder die Seitenketten mit Ferulasäure sind beispielsweise über die Ausbildung von DFS vermehrt in Crosslinks eingebunden, weshalb weniger FA bei der Analysenaufarbeitung freigesetzt und detektiert wird. Bei der ersten Variante wäre in der Probe ein geringerer Anteil an gebundener Ferulasäure und ihrer Oligomeren zu erwarten. Trifft die zweite Variante zu, müsste der Gehalt an DFS und TriFS erhöht sein im Vergleich zu den anderen Proben. Im rechten Diagramm der Abbildung 15 ist zu erkennen, dass weder das eine noch das andere zutrifft. Mais 4 weist zwar etwas geringere Gehalte an *trans*-Ferulasäure auf als Mais 1 und 3, aber vergleichbare Gehalte wie Mais 2. Die Gehalte an DFS und TriFS sind

für alle vier Maisproben sehr ähnlich und auch die Anteile der vorkommenden DFS und TriFS weisen eine sehr hohe Übereinstimmung auf (s. Abbildung A10, Kapitel 9.1). Dies deutet darauf hin, dass der niedrigere Gehalt an FA in Maisprobe 4 vermutlich nicht in Zusammenhang mit dem Vernetzungsgrad über Crosslinks steht und somit keine niedrigere oder höhere Verdaubarkeit aufgrund dessen zu erwarten ist. Die Analyse der Arabinoxylanseitenketten wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Proben zeitgleich aufgearbeitet, weshalb Fehler bei der Analyse unwahrscheinlich erscheinen. Die detaillierten Ergebnisse der Analyse der Oligoferulasäuren sind in Abbildung A10 (Kapitel 9.1) aufgeführt. Es dominieren die 8-5c-DFS und 5-5-DFS gefolgt von der 8-O-4-DFS.

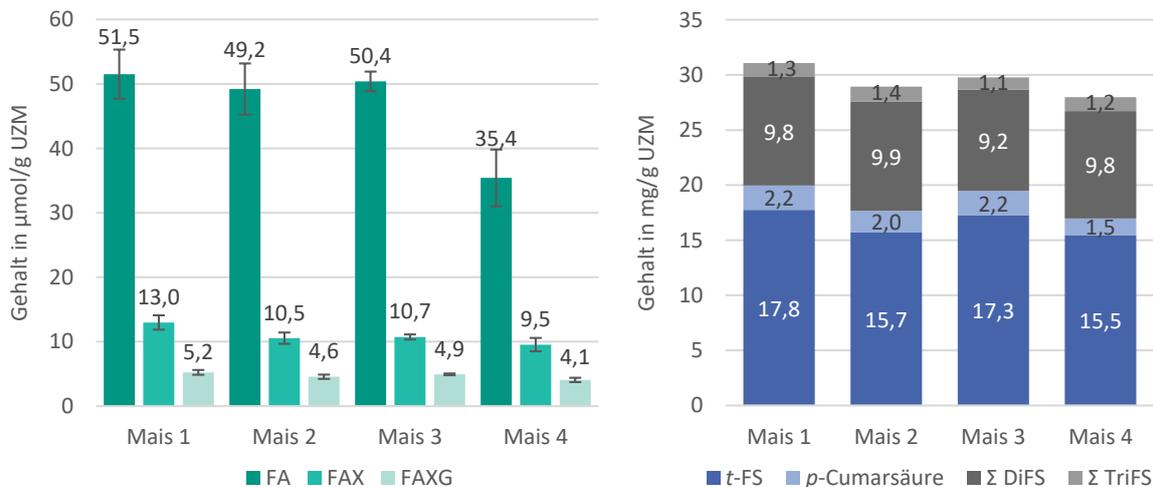


Abbildung 15: Gehalt der mit Ferulasäure (FS) verknüpften Arabinoxylanseitenketten (links; µmol/g UZM ± Standardabweichung, n = 3) und der an Zellwandkomponenten gebundenen phenolischen Säuren sowie Di- und TriFS (rechts; mg/g UZM g, n = 3) im unlöslichen Zellwandmaterial (UZM) der Maisproben (FA: 5-O-trans-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAX: β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAXG: α-L-Galactopyranosyl-(1→2)-β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-Feruloyl-L-Arabinofuranose, t: trans, p: para; modifiziert nach Wagner, 2022)

Neben Xylose, Arabinose und Glucose wurden bei der Monosaccharidzusammensetzung des UZMs (s. Abbildung 14) kleine Mengen Galactose und Galacturonsäure detektiert, die auf Pektine hindeuten. Außerdem legt der Nachweis von 1,4,6-verknüpfter Glucopyranose bei der Methylierungsanalyse nahe, dass in der Probe Xyloglucane vorkommen. Bei der Untersuchung der Feinstruktur der neutralen Pektinseitenketten mit dem Arabinan- und Galactanprofiling (vgl. Kapitel 3.2.2.3) zeigte sich, dass bei allen vier Maisproben die gleichen Oligosaccharide freigesetzt werden, jedoch konnten diese aufgrund der geringen Menge nicht quantifiziert werden. Die Ergebnisse des Xyloglucanprofilings sind in Abbildung A11 (Kapitel 9.1) dargestellt. Es wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Proben festgestellt und mit mehr als 80 % überwiegend unsubstituierte Glucan-oligosaccharide (GG, GGG, GGGG) detektiert. Der aus den Ergebnissen errechnete Substitutionsgrad liegt bei 6 % und ist damit sehr niedrig.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vier Maisproben einen NSP-Gehalt von ungefähr 10 % aufweisen, wovon etwa 90 % der Polysaccharide wasserunlöslich und 10 % wasserlöslich sind. Die Hauptpolysaccharide sind Arabinoxylane mit hohem Substitutionsgrad sowie Cellulose. Nach ausführlicher Charakterisierung konnten nahezu keine Unterschiede in den Strukturen der Zellwandpolysaccharide zwischen den vier Maisproben festgestellt werden. Daraus ist zu schließen, dass die beobachteten Unterschiede im Fütterungsversuch wahrscheinlich auf andere Parameter und nicht auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandkomponenten der Maissorten zurückzuführen sind.

4.2 Charakterisierung der Einzelfuttermittel - Soja

Die Untersuchungen der Sojaprobe wurden ebenfalls im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Wagner (2022) durchgeführt und die detaillierten Ausführungen der Analyseergebnisse sind der Masterarbeit zu entnehmen. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse wie bei den Maisproben nur zusammengefasst dargestellt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei ebenfalls auf den Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen den beiden Proben, da sie in leicht unterschiedlichen Anteilen in den Basisfuttermischungen enthalten waren. Im Starterbasisfutter Mais 3 waren 18,2 % Soja 1 und 13,5 % Soja 2 enthalten. Im Starterbasisfutter Mais 4 waren es 17,7 % Soja 1 und 14,3 % Soja 2. Der Gesamtanteil an Soja war vergleichbar mit 31,7 bzw. 32,0 %. Im Mastbasisfutter war der Gesamtanteil an Soja etwas geringer (27,4 bzw. 27,6 %) mit 4,1 % Soja 1 und 23,3 % Soja 2 im Mastbasisfutter Mais 3 und 3,5 % Soja 1 und 24,1 % Soja 2 im Mastbasisfutter Mais 4 (vgl. Kapitel 3.1 und Tabelle A1 in Kapitel 9.2).

4.2.1 Grundcharakterisierung

Für die beiden Sojaprobe wurde ebenfalls der Gehalt an UZM und LZM bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 (links) aufgeführt. Zu erkennen ist, dass der UZM-Gehalt der Probe Soja 2 mit 20,1 g/100 g entfettetem Mehl etwas niedriger ist als der von Soja 1 (22,1 g/100 g), wobei die Werte in einem ähnlichen Bereich liegen. Im Vergleich zu den Maisproben (UZM ca. 10,0 g/100 g; LZM ca. 1,0 g/100 g) weisen die Sojaprobe höhere Gehalte an Zellwandmaterial auf, wovon etwa 80 % wasserunlöslich sind.

In Abbildung 16 (rechts) sind die Ergebnisse der RFO-Bestimmung abgebildet. Hier fallen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proben auf. Soja 1 enthält mit in Summe 2,9 mg RFO/g Mehl bedeutend weniger RFO als Soja 2 mit 36,4 mg/g. Bei Soja 2 dominiert, wie erwartet (vgl. Kapitel 1.2.1), Stachyose gefolgt von Raffinose; Verbascose weist den kleinsten Gehalt auf. Bei Soja 1 dominiert ebenfalls die Stachyose. Die unterschiedlichen Mengen an RFO sind wahrscheinlich auf die Art der Probe und deren Herstellung zurückzuführen. Bei Soja 1 handelt es sich um ein kommerziell erhältliches mikronisiertes Sojaproteinkonzentrat, Soja 2 ist ein grob gemahltes Sojabohnenmehl (vgl. Kapitel 3.1).

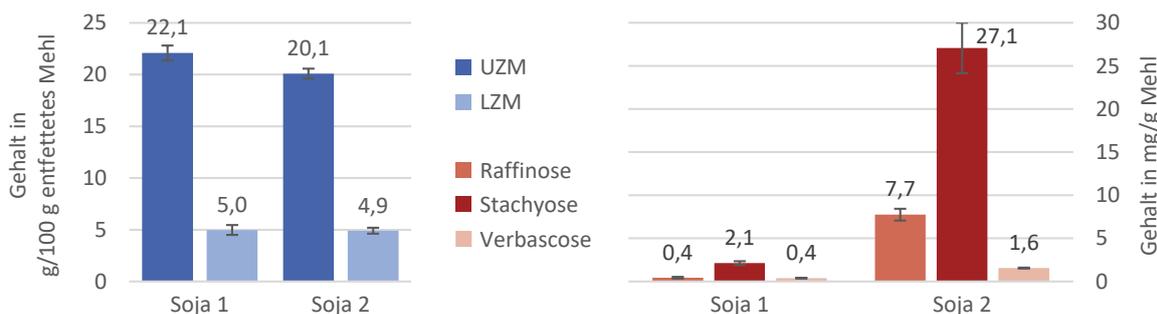


Abbildung 16: Gehalte an unlöslichem und löslichem Zellwandmaterial (UZM, LZM) der Sojabproben (links; g/100 g entfettetes Mehl \pm Standardabweichung, $n = 3$) sowie die Gehalte an Oligosacchariden der Raffinose-Familie (rechts; mg/g Mehl \pm Range/2, $n = 2$). Die UZM- und LZM-Gehalte sind um Protein- und Aschegehalt korrigiert (modifiziert nach Wagner, 2022).

4.2.2 Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide

Zur Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide wurden verschiedene Analysen durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide sowie des Arabinan- und Galactanprofilings zusammengefasst. In Tabelle 3 sind die Daten der Methylierungsanalyse am Beispiel der Probe Soja 1 angegeben. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse von Soja 2 sind ähnlich und werden in Tabelle A9 (Kapitel 9.2) aufgeführt.

Der Monosaccharidzusammensetzung der LZM-Polysaccharide der Sojabproben (s. Abbildung 17, oben) ist zu entnehmen, dass die löslichen Polysaccharide beider Sojabproben ähnlich zusammengesetzt sind. Die Hauptmonosaccharide sind Galactose (ca. 31 mol%) und Arabinose (25 mol%), gefolgt von Mannose (21 mol%) und Galacturonsäure (12 mol%). Außerdem konnten kleinere Mengen an Xylose (5 mol%), Rhamnose (3 mol%), Glucose (2 mol%) und Glucuronsäure (1 mol%) festgestellt werden.

Da Soja zu den dikotylen Pflanzen gehört und diese Primärzellwände des Typ I aufweisen, werden hauptsächlich Pektine, Xyloglucane und Cellulose sowie kleinere Mengen Xylane und (Gluco-)Mannane erwartet, wobei Cellulose in der unlöslichen Fraktion vorzufinden ist (vgl. Kapitel 1.2.3.1). Wie in Kapitel 1.2.3.4 beschrieben, sind Pektine hochkomplexe Polysaccharide, die aus verschiedenen Strukturelementen aufgebaut sind. Das Homogalacturonan besteht aus Galacturonsäure, das Rückgrat des Rhamnogalacturonan Typ I aus Galacturonsäure und Rhamnose und das Xylogalacturonan aus einem Galacturonsäurerückgrat, das mit Xyloseeinheiten substituiert vorliegt. Die neutralen Seitenketten sind aufgebaut aus Arabinose und Galactose. Dementsprechend können die in den LZM vorkommenden Galacturonsäure und Rhamnose den zuerst genannten Strukturelementen zugeordnet werden. Die ermittelten Anteile an Galactose und Arabinose zeigen, dass Arabinane und Galactane in ähnlicher Menge vorkommen, wobei die Galactane leicht überwiegen. Entsprechende Bindungstypen konnten mit der Methylierungsanalyse (s. Tabelle 3) nachgewiesen werden.

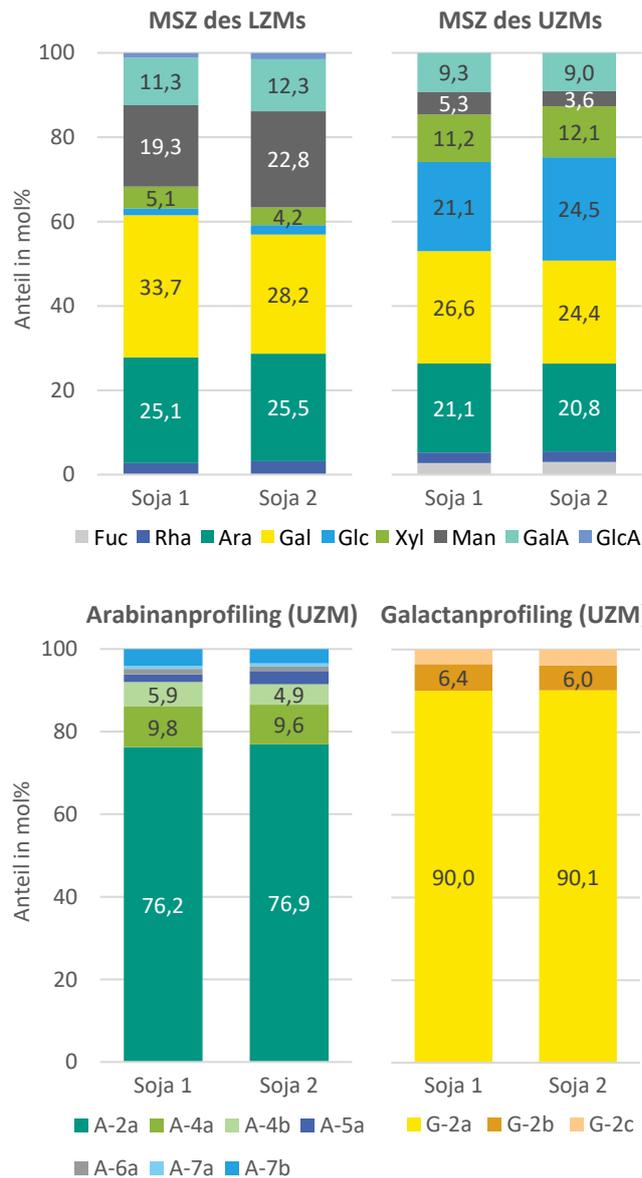


Abbildung 17: Ergebnisse zur Untersuchung der Zellwandpolysaccharide der Sojaprobe. Oben: Monosaccharidzusammensetzung (MSZ) des löslichen Zellwandmaterials (LZM) nach Methanololyse und des unlöslichen Zellwandmaterials (UZM) nach Schwefelsäurehydrolyse (mol%, n = 3); unten: Arabinan- und Galactanprofiling des UZMs (mol%, n = 2; Strukturen der Oligosaccharide s. Abbildung A3 und A4, Kapitel 9.1) (Fuc: Fucose, Rha: Rhamnose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, GalA: Galacturonsäure, GlcA: Glucuronsäure; modifiziert nach Wagner, 2022)

Tabelle 3: Ergebnisse der Methylierungsanalyse (mol% ± Range/2, n = 2) des löslichen bzw. unlöslichen Zellwandmaterials (LZM bzw. UZM) am Beispiel von Soja 1 (PMAA: partiell methylierte Alditolacetate, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Fuc: Fucose, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose; Wagner, 2022)

Soja 1	LZM	UZM
PMAA	in mol%	in mol%
t-Glcp	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
1,3-Glcp	0,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2
1,4-Glcp	9,0 ± 0,4	25,6 ± 1,6
1,3,6-Glcp	1,9 ± 0,3	-
1,4,6-Glcp	1,9 ± 0,0	3,7 ± 0,3
Summe	15,5 ± 0,9	33,5 ± 2,1
t-Xylp	1,8 ± 0,1	4,6 ± 0,6
1,4-Xylp + 1,2-Xylp	2,4 ± 0,1	5,6 ± 0,5
1,2,4-Xylp	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,1
1,3,4-Xylp	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
1,2,3,4-Xylp	1,8 ± 0,0	0,5 ± 0,2
Summe	7,4 ± 0,3	12,8 ± 1,3
t-Araf	11,3 ± 0,1	11,8 ± 0,6
1,2-Araf	1,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1
1,3-Araf	1,0 ± 0,0	-
1,5-Araf, 1,4-Arap	8,7 ± 0,1	11,2 ± 0,6
1,2,5-Araf	-	2,5 ± 0,2
1,3,5-Araf	2,6 ± 0,1	3,9 ± 0,3
1,2,3,5-Araf	2,7 ± 0,1	4,6 ± 0,4
Summe	27,5 ± 0,5	34,7 ± 2,1
t-Galp	7,6 ± 0,6	4,1 ± 0,3
1,3-Galp	2,8 ± 0,1	-
1,4-Galp	7,7 ± 1,0	8,0 ± 0,0
1,6-Galp	5,9 ± 0,4	-
1,3,6-Galp	5,5 ± 1,1	-
Summe	29,5 ± 3,2	12,0 ± 0,4
t-Manp	7,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1
1,2-Manp	6,8 ± 0,6	-
1,4-Manp	4,0 ± 0,1	2,7 ± 0,3
Summe	17,9 ± 0,9	4,3 ± 0,4
1,2-Rhap	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1
1,2,4-Rhap	-	0,8 ± 0,0
Summe	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
t-Fucp	1,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0
Summe	1,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0

Xyloglucane bestehen aus einem β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Glucoserückgrat, das über die *O*-6-Position mit Xylose substituiert vorliegt. Die Xyloseeinheiten können wiederum über die *O*-2-Position mit weiteren Monosacchariden verknüpft sein. Daher werden in der Methylierungsanalyse PMAAs für 1,4- und 1,4,6-verknüpfter Glucopyranose sowie terminale und 1,2-verknüpfte Xylopyranose erwartet, wenn die Probe Xyloglucane aufweist. Die entsprechenden PMAAs konnten im LZM der Sojaprobe nachgewiesen werden. Demnach können die in der Monosaccharidzusammensetzung festgestellte Glucose und Xylose zumindest zum Teil auf Xyloglucane zurückgeführt werden. Da sowohl 1,2- als auch 1,4-verknüpfte Xylopyranose detektiert wurde (PMAAs koeluierten, vgl. Kapitel 3.2.2.2), wird vermutet, dass außerdem ein Teil der bestimmten Xylose aus Xylanen stammt. Dies konnte durch Versuche mit der zum Futter zugesetzten Xylanase und anschließender Analyse der freigesetzten Oligosaccharide bestätigt werden (vgl. Kapitel 4.3.2.3). Xylane in dikotylen Pflanzen kommen häufig mit Glucuronsäure substituiert als Glucuronoxylane vor (vgl. Kapitel 1.2.3.3). Darüber kann der bei der Monosaccharidzusammensetzung festgestellte kleine Anteil an Glucuronsäure erklärt werden. Außerdem wurde bei der Monosaccharidzusammensetzung ein größerer Anteil an Mannose bestimmt. Es konnte, wie beim LZM der Maisproben, neben 1,4-verknüpfter Mannopyranose auch die für Pflanzenzellwände untypische 1,2-verknüpfte Mannopyranose in höheren Anteilen nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der UZM-Polysaccharide der beiden Sojaprobe (s. Abbildung 17) ergab Galactose (ca. 26 mol%), Glucose (23 mol%), Arabinose (21 mol%), Xylose (12 mol%), Galacturonsäure (9 mol%) und kleinere Anteile an Mannose (4 mol%), Fucose (3 mol%) und Rhamnose (3 mol%). Die Glucose stammt in diesem Fall zumindest teilweise aus Cellulose (1,4-verknüpfte Glucopyranose). Fucose kommt in Rhamnogalacturonan Typ II vor (vgl. Kapitel 1.2.3.4) und stammt vermutlich aus dieser Pektinstruktur. Die restlichen Monosaccharide können wie beim LZM erläutert Pektinen, Xyloglucanen, Xylanen und Mannanen zugeordnet werden, wobei die Mannose im UZM nur in der für Mannane erwarteten Bindungsform (1,4-verknüpfte Mannopyranose) nachgewiesen wurde. Das Vorkommen von Xylanen konnte wie beim LZM durch Spaltung mit einer Xylanase bestätigt werden (vgl. Kapitel 4.3.2.3).

Zur genaueren Charakterisierung der Arabinan- und Galactanstrukturen wurden die in Kapitel 3.2.2.3 beschriebenen Profilingmethoden durchgeführt. Die Ergebnisse sind im unteren Teil der Abbildung 17 dargestellt. Das Arabinanprofiling ergab für beide Proben vergleichbare Verteilungen mit einem hohen Anteil des Dimers A-2a (ca. 77 %) sowie kleinere Anteile an verzweigten Tetrameren (A-4a ca. 10 % und A-4b ca. 5 %; Strukturen s. Abbildung A3, Kapitel 9.1). Ebenfalls nachgewiesen wurden kleine Mengen an höheren, verzweigten Arabinan-oligosacchariden. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse (s. Tabelle 3) zeigen für das UZM hohe Anteile an 1,5-verknüpfter Arabinofuranose bzw. 1,4-verknüpfter Arabinopyranose (diese können aufgrund identischer PMAAs nicht unterschieden werden). Die Ergebnisse beider Analysen zusammen lassen darauf schließen, dass die Arabinane im unlöslichen Anteil des Pektins überwiegend als lineare Ketten

vorliegen. Die Ergebnisse des Galactanprofilings sind ebenfalls für beide Proben nahezu identisch. Detektiert wurden ausschließlich Dimere: G-2a mit 90 %, G-2b mit 6 % und G-2c mit 4 %. G-2a ist aus zwei β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactoseeinheiten aufgebaut, G-2b und G-2c sind jeweils aus einer Galactose- und einer Arabinoseeinheit zusammengesetzt (s. Abbildung A4, Kapitel 9.1). Bei der Methylierungsanalyse wurden die entsprechend erwarteten PMAAs detektiert.

Um die Feinstruktur der enthaltenen Xyloglucane zu charakterisieren, wurden die Proben mit dem in Kapitel 3.2.2.3 beschriebenen Xyloglucanprofiling analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung A11 (Kapitel 9.1) abgebildet. Beide Proben zeigen erneut eine sehr ähnliche Verteilung. Es dominieren XXFG (ca. 29 %) und XLFG (25 %), gefolgt von XX (16 %) und XG (16 %). In kleinen Mengen wurden X, XXG, XXXG, GG und XFG nachgewiesen. Der daraus errechnete Substitutionsgrad der Xyloglucane im UZM der Sojaprobe liegt bei 74 % und damit in einem für dikotyle Pflanzen typischen Bereich.

Es kann zusammengefasst werden, dass die beiden Sojaprobe 27 g bzw. 25 g Zellwandmaterial pro 100 g entfettetem Mehl aufweisen, wovon ca. 80 % wasserunlöslich sind. Die Analysen der Zellwandpolysaccharide ergaben, dass beide Proben diesbezüglich sehr ähnlich aufgebaut sind. Ermittelt wurden weitgehend die erwarteten Polysaccharide inklusive Xylanen. Größere Unterschiede konnten im Gehalt der RFO festgestellt werden (Soja 1: 2,9 mg und Soja 2: 36,4 mg/g Mehl). Dies bedeutet für die Fütterungsversuche, dass die NSP im Soja ähnlich aufgebaut zu sein scheinen, jedoch je nach verwendetem Produkt unterschiedliche Mengen an RFO im Futter enthalten sein können. Studien weisen darauf hin, dass auch RFO das Mikrobiom von Broilern beeinflussen können (Liu *et al.*, 2021; Chang *et al.*, 2022; Morgan, 2023).

4.3 Analyse der zum Futter zugesetzten Komponenten

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wurden pro Basisfuttermittel drei Varianten verfüttert: Kon, Xyla und X+X. Um Anhaltspunkte für die Methodenentwicklung zur Untersuchung der Oligosaccharide in den Ileum- und Caecumproben zu gewinnen und um die Analyseergebnisse der Darmproben besser einordnen zu können, wurden die zugegebenen Komponenten untersucht und charakterisiert.

4.3.1 Bestimmung der Oligosaccharide im XOS-haltigen Material

Im Allgemeinen werden (A)XOS aus lignocellulosehaltiger Biomasse, die als Nebenströme der Landwirtschaft anfallen, wie Gerstenspelz, Weizenkleie, Maiskolben, Stroh oder Bierschrot, gewonnen. Bei der Gewinnung können verschiedene chemische und/oder enzymatische Verfahren angewendet werden (Jahan *et al.*, 2022). Ein übliches Vorgehen ist die alkalische Extraktion der (Arabino-)Xylane gefolgt von einer sauren oder enzymatischen Hydrolyse (Mussatto & Mancilha, 2007; Samanta *et al.*, 2015a). Der Vorteil einer enzymatischen Hydrolyse ist, dass weniger unerwünschte Nebenprodukte entstehen

und die Art der freigesetzten Oligosaccharide gezielter beeinflusst werden kann. Dennoch können, je nach Ausgangsmaterial und gewählten Bedingungen, unterschiedliche Oligosaccharide in verschiedenen Anteilen generiert werden (Samanta *et al.*, 2015a; Jahan *et al.*, 2022). Aus diesem Grund ist es von Interesse die erhältlichen XOS-Quellen vor dem Einsatz, z. B. in Fütterungsversuchen, zu charakterisieren, um so mögliche Zusammenhänge zwischen der Struktur der (A)XOS und den beobachteten Effekten in Fütterungsversuchen herstellen zu können (Morgan, 2023).

In der Literatur werden die in den Fütterungsversuchen verwendeten XOS-Materialien selten genauer beschrieben oder vor dem Einsatz analysiert. Dem entgegen veröffentlichten Samanta und Mitarbeitende (2015b) ein enzymatisches Verfahren zur Herstellung von XOS und eine Möglichkeit zur qualitativen Bestimmung der DP der freigesetzten XOS mittels Dünnschichtchromatographie (TLC, engl.: *Thin Layer Chromatography*) sowie eine Quantifizierungsmethode von X_1 - X_3 mittels HPLC-RID mit einer *Carbohydrate-Analysis*-Säule (Agilent Technologies). Ribeiro und Mitarbeitende (2018) haben einen Fütterungsversuch mit Broilern durchgeführt, bei dem unter anderem XOS zum Futter zugesetzt wurden. Die im XOS-haltigen Material vorkommenden freien Monosaccharide und XOS wurden zu Alditolacetaten umgesetzt und mittels GC-FID bzw. GC-MS analysiert. Zusätzlich wurde die Monosaccharidzusammensetzung des Materials nach Schwefelsäurehydrolyse als Alditolacetate mittels GC-FID bestimmt. Außerdem wurde das XOS-haltige Material mit Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen fraktioniert und Messungen mittels *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) mit Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS, engl.: *Time of Flight Mass Spectrometer*) durchgeführt. Die Monosaccharidzusammensetzung zeigte, dass 85 % der enthaltenen Saccharide aus Xylose aufgebaut waren, davon wurden 5 % monomerer Xylose zugeordnet. Das dominierende XOS war X_2 (55 - 58 %), gefolgt von X_3 und X_4 . Insgesamt wurden XOS bis DP 12 nachgewiesen. Außerdem wurden aus Hexosen bestehende Oligosaccharide sowie aus Pentosen und Hexosen aufgebaute Oligosaccharide detektiert. Die Autoren verwendeten eine α -Amylase, um Stärkeabbauprodukte zu eliminieren, konnten damit jedoch den ursprünglichen Glucosegehalt lediglich um 24 % senken. Dies führt zu dem Schluss, dass neben XOS noch kleine Mengen MalOS und anderer Oligosaccharide enthalten waren.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte XOS-haltige Material, das in der X+X-Futtervariante die XOS-Quelle darstellte, wurde im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Sitter (2022) analysiert. Laut Hersteller enthält es lineare XOS (DP 2 - 6) in einer Reinheit von 35 % und wurde aus Maiskolben gewonnen. Über den Herstellungsprozess sind keine Einzelheiten bekannt (vgl. Kapitel 3.1).

Nach Extraktion der niedermolekularen Kohlenhydrate aus der Probe des XOS-haltigen Materials, wurden diese mit der HPAEC-PAD/MS-Methode zur Bestimmung von (A)XOS neben anderen Oligosacchariden analysiert (vgl. Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse aufgeführt. Es dominiert X_2 mit 146,3 mg/g gefolgt von X_3 mit 75,3 mg/g. Mit zunehmendem DP nimmt der Gehalt der XOS ab. In Summe wurden 253,8 mg XOS

(DP 2 - 6) pro g XOS-Material ermittelt. Der XOS-Gehalt liegt damit bei ca. 25 % und nicht wie vom Hersteller angegeben bei 35 %. In der Probe wurden keine COS, MalOS und, wie erwartet, keine RFO nachgewiesen. Das aufgenommene HPAEC-Chromatogramm ist in Abbildung A12 (Kapitel 9.1) gezeigt. Die Analyse der freien Monosaccharide ergab nennenswerte Mengen an freier Xylose (47,2 mg/g), freier Glucose (37,9 mg/g) und freier Arabinose (18,4 mg/g). Die Monosaccharidzusammensetzung der extrahierten Fraktion setzte sich aus Xylose (76,4 mol%), Glucose (15,9 mol%), Arabinose (4,2 mol%) und Galactose (3,5 mol %) zusammen und bestätigt damit weitgehend die beschriebenen Ergebnisse der Analyse der Oligosaccharide. Damit entspricht das Material zumindest in der Zusammensetzung den Herstellerangaben und neben XOS mit DP 2 - 6 konnten keine weiteren Oligosaccharide nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Analyse der Xylooligosaccharide (XOS) im eingesetzten XOS-haltigen Material (mg/g \pm Standardabweichung, n = 3; modifiziert nach Sitter, 2022)

XOS	Xylobiose	Xylotriose	Xylotetraose	Xylopentaose	Xylohexaose
Gehalt in mg/g	146,3 \pm 4,2	75,3 \pm 2,1	21,7 \pm 0,6	7,0 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1

4.3.2 Charakterisierung der Eigenschaften der Xylanase

endo-Xylanasen setzen, je nachdem zu welcher GH-Familie sie gehören, bevorzugt unterschiedliche (A)XOS aus verschiedenen (Arabino-)Xylanstrukturen frei (vgl. Kapitel 1.4.2). Außerdem hat jedes Enzym optimale Bedingungen, bei denen es am effektivsten arbeitet. Dazu zählen pH-Wert, Temperatur und Enzymaktivität, aber beispielsweise auch das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis (Wu *et al.*, 2022). In der Literatur sind verschiedene Studien beschrieben, bei denen die Bedingungen im Verdauungstrakt des Huhns nachgestellt wurden, um dadurch die Enzymaktivitäten in den verschiedenen Abschnitten des Verdauungstrakts festzustellen. Ziel ist es, Anhaltspunkte zu erhalten, welche (A)XOS in welchen Mengen *in vivo* freigesetzt werden können und demnach dem Mikrobiom des Huhns zur Verfügung stehen.

Morgan und Mitarbeitende (2020) beschreiben beispielsweise ein *in-vitro*-Modell zur Simulation des Magens (pepsinhaltige Lösung, pH 3,5, 42 °C, 20 min) und Dünndarmabschnitts (pancreatinhaltige Lösung, pH 6,0, 42 °C, 60 min). Nach der Inkubationszeit wurden die Proben neutralisiert und ohne weitere Inaktivierungsschritte zentrifugiert. Die anschließende Analyse der freigesetzten XOS (DP 1 - 5) erfolgte als PMP-Derivate mittels HPLC-MS/MS (C18-Säule) mit einer vorgeschalteten *on-line clean-up trapping column* (Aufreinigungssäule) ebenfalls aus C18-Material. Untersucht wurden Futtermittelmischungen sowie verschiedene Weizen- und Gerstensorten mit und ohne Zugabe einer Xylanase (Econase XT 25, AB Vista, 16000 BXU/g). Bei nahezu allen in der Publikation beschriebenen Inkubationstests mit Xylanasezugabe wurde X₅ als dominierendes XOS detektiert, wobei große Unterschiede in der Menge der durch die Xylanase freigesetzten XOS in Abhängigkeit der Getreidesorte sowie des Darmabschnitts zu beobachten

waren. Eine Freisetzung von Xylose und X₂ - X₄ wurde ebenfalls beobachtet. Auch in den Proben ohne Xylanasezusatz wurden zum Teil XOS detektiert, jedoch in deutlich geringeren Mengen als mit Xylanasezusatz.

Dale und Mitarbeitende (2022; 2023) führten *in-vitro*-Enzymversuche mit verschiedenen Getreidearten (Gerste, Mais, Hafer und Weizen) sowie sechs verschiedenen Weizensorten durch. Getestet wurden drei verschiedene Enzympräparate: eine Xylanase (Econase XT, AB Vista, 16000 BXU/kg Futter) und zwei Enzymmischungen jeweils bei pH 5,2 (als mittlerer pH-Wert im Verdauungstrakt) und 41 °C für 24 bzw. 72 h, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, zu 10 mM Natronlauge gegeben und zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die XOS (DP 1 - 4) mittels HPAEC-PAD nach der Methode von Xu und Mitarbeitenden (2013) analysiert. Für Mais wurde beobachtet, dass von den eingesetzten Enzymen unter den verwendeten Bedingungen keine XOS freigesetzt werden konnten (Dale *et al.*, 2022). Aus den verschiedenen Weizensorten wurden Xylose, X₂ und X₃ in unterschiedlichen Mengen, abhängig von Inkubationszeit und Weizensorte, freigesetzt, wobei größere Mengen X₂ als X₃ detektiert wurden. Eine Freisetzung von X₄ wurde nicht beobachtet (Dale *et al.*, 2023). Damit unterscheiden sich diese Ergebnisse von den oben beschriebenen Ergebnissen von Morgan und Mitarbeitenden (Morgan *et al.*, 2020).

Wu und Mitarbeitende (2022) haben verschiedene Futterausgangsstoffe, darunter Mais und Sojamehl, mit verschiedenen NSPasen, unter anderem zwei unterschiedliche Xylanasen (aus *Aspergillus niger* und *Trichoderma*), untersucht. Inkubiert wurden die einzelnen Getreidekomponenten und Mischungen aus Getreide und Soja. Hierbei wurden ebenfalls Magen (pepsinhaltige Pufferlösung, pH 2,8, 41 °C, 4 h) und anschließend Dünndarm (trypsinhaltige Pufferlösung, pH 6,9, 41 °C, 15 h) simuliert. Zum Stoppen des Enzymverdaus wurden die Proben in ein Eisbad gestellt. Die entstandenen Hydrolyseprodukte wurden über den Gehalt an reduzierenden Zuckern im Überstand bestimmt. Evident wurde, dass beide Xylanasen die Polysaccharide (vermutlich Arabinoxylane) aus Weizen besser abbauen können als die aus Mais.

Bei den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Charakterisierung von Xylanasen, die in Fütterungsversuchen mit Broilern eingesetzt werden, werden die aus den Futtermitteln freigesetzten Oligosaccharide nicht vollständig analysiert. Auch wird in der Regel davon ausgegangen, dass ausschließlich Polysaccharide aus der Getreidekomponente und nicht auch aus der Sojakomponente abgebaut werden können, obwohl beispielsweise auch in Soja Xylane vorkommen (vgl. Kapitel 4.2.2). Ebenfalls wird häufig angenommen, dass ausschließlich (A)XOS freigesetzt werden. Je nachdem wie die Enzyme gewonnen wurden, können sie jedoch Nebenaktivitäten gegenüber anderen Polysaccharidgruppen aufweisen. Dies kann die Freisetzung weiterer Oligosaccharide zur Folge haben, die wiederum Einfluss auf die im Fütterungsversuch beobachteten Effekte haben können (Bedford, 2018). Ein weiterer Punkt, der in der Literatur nicht erwähnt wird, ist, ob sichergestellt wurde, dass die gewählte Inaktivierungsmethode geeignet ist, um die enzymatische Reaktion tatsächlich zu stoppen und beispielsweise nicht nur zu verlangsamen. Um

diese Lücken zu schließen und mehr Informationen über die hier eingesetzte Xylanase zu erhalten, werden die Ergebnisse entsprechender Enzymtests im Folgenden beschrieben.

4.3.2.1 Inaktivierung der Xylanase

Bei der *endo*-Xylanase, die den Futtervarianten Xyla und X+X zugesetzt wurde, handelt es sich um ein Enzym, das speziell für den Einsatz in Futtermitteln entwickelt wurde. Solche Enzyme sind in der Regel sehr robust, da sie während der Futterherstellung und -lagerung nicht inaktiviert werden sollen und auf ihrem Weg durch den Verdauungstrakt unter anderem verschiedenen pH-Werten sowie mechanischer Beanspruchung ausgesetzt sind. Die verwendete Xylanase ist zusätzlich thermostabil, was insbesondere bei der Herstellung von pelletiertem Futter von Bedeutung ist. Laut Hersteller treten bei Temperaturen bis 95 °C keine Aktivitätsverluste auf.

Aufgrund der hohen Stabilität solcher Enzyme ist es wichtig sicherzustellen, dass die Inaktivierungsmethode geeignet ist. Wird die enzymatische Reaktion nicht vollständig unterbunden, kann das Enzym in der Probenlösung, beispielsweise während der Extraktion, der Lagerung oder der Zeit im Autosampler bis zur Probeninjektion, weiterarbeiten und die Zusammensetzung der Probe verändern. Ein Vorversuch mit den gefriergetrockneten Ileum- und Caecumproben konnte zeigen, dass die zugegebene Xylanase wieder aktiv ist, wenn eine entsprechende Xylanase-enthaltende Darmprobe in Wasser aufgenommen und ein Xylan als Substrat zugegeben wird. Demnach übersteht die Xylanase, wie vermutet, den Gefrier Trocknungsprozess. Zusätzlich ist zu beachten, dass Enzyme auch von Mikroorganismen gebildet werden und folglich in den Darmproben zu erwarten sind. Auch diese müssen inaktiviert werden, wobei anzunehmen ist, dass sie weniger stabil sind als die zugegebene Xylanase.

Häufig werden Enzyme durch Erhitzen auf 95 °C bzw. kurzes Aufkochen der Probenlösung inaktiviert (Wefers & Bunzel, 2016; Van Hoeck *et al.*, 2021). Da es sich bei der eingesetzten Xylanase um ein thermostabiles Enzym handelt, ist dieses Vorgehen nicht zielführend. Auch die Inaktivierung durch eine Veränderung des pH-Werts wurde ausgeschlossen, da die Xylanase darauf ausgelegt ist, in einem großen pH-Bereich stabil zu sein, um möglichst in allen Teilen des Verdauungstrakts wirken zu können. Demnach wären zur Inaktivierung extreme pH-Werte notwendig, mit denen unerwünschte Veränderungen der Kohlenhydratstrukturen einhergehen könnten. Übrig bleiben mechanische Verfahren und die Denaturierung durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels, welche entsprechend getestet wurden (vgl. Kapitel 3.3.3). Durch mechanische Beanspruchung wie zentrifugieren, vortexen oder Behandlung im Ultraschallbad konnte keine zufriedenstellende Inaktivierung erzielt werden. Daher wurde die Inaktivierung durch Zugabe von Ethanol detaillierter betrachtet. Die Oligosaccharide in den Darmproben sollten mittels HPAEC analysiert werden, weshalb die Entfernung des Lösungsmittels für die Messung erforderlich war. Demnach wurde ein Verfahren gesucht, bei dem die Xylanase sowohl während der Extraktion als auch in der wässrigen Messlösung inaktiv ist. Bei Inakti-

vierungstests mit 50- bis 80%igem Ethanol, bei denen die ethanolische Enzym-Substrat-Lösung bis zur Trockene eingedampft, der Rückstand wieder in Wasser aufgenommen und diese Lösung anschließend inkubiert wurde, konnte eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Denaturierung der Xylanase reversibel ist. Jedoch konnte festgestellt werden, dass die Xylanase in einer 80%igen Ethanolösung nicht in der Lage war, XOS aus Buchenholzxytan freizusetzen, demzufolge eignet sich 80%iges Ethanol als Extraktionsmittel. Weitere Tests zeigten, dass die denaturierte Xylanase abgetrennt werden kann, wenn die ethanolische Enzym-Substrat-Lösung zentrifugiert und nur der Überstand eingedampft und wieder in Wasser aufgenommen wird. Bei Verwendung von 80%igem Ethanol enthält dieser Überstand die NLKH und damit die Mono- und Oligosaccharide, die analysiert werden sollten. Um zu überprüfen, ob diese Vorgehensweise auf die Darmproben übertragbar ist, wurden entsprechende Versuche durchgeführt. Dafür wurden Ileumproben von Tieren, die Futter mit Xylanase erhielten ausgewählt. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben mit 80%igem Ethanol extrahiert, der Überstand getrocknet und wieder in Wasser aufgenommen (NLKH-Fraktion). Zu dieser Probenlösung wurde ein XOS-Mix (DP 1 - 6) als Substrat für die Xylanase zugegeben, inkubiert und die Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD analysiert. Es konnten keine Veränderungen der XOS-Gehalte im Vergleich zur Messung des XOS-Standardmixes festgestellt werden, demnach wurde die enthaltene Xylanase erfolgreich inaktiviert. Als Positivkontrolle wurde zu dieser Lösung (NLKH-Fraktion plus XOS-Mix) die im Futter eingesetzte Xylanase zugegeben und die Lösung inkubiert. Bei der Positivkontrolle war, wie erwartet (vgl. Kapitel 4.3.2.2), ein eindeutiger Abbau von X_4 - X_6 zu beobachten. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass das gewählte Verfahren geeignet ist, um die eingesetzte Xylanase in den Darmproben zu inaktivieren und sicherzustellen, dass nur die ursprünglich in der Probe enthaltenen Oligosaccharide analysiert werden.

4.3.2.2 Haupt- und Nebenaktivitäten der Xylanase

Im Folgenden wird beschrieben, welche Oligosaccharide die eingesetzte Xylanase grundsätzlich aus pflanzlichem Material freisetzen kann. Hierfür wurde diese im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch (2022) mit Weizenarabinoxylan (mittlere Viskosität, Megazyme) inkubiert und die Hydrolyseprodukte mittels HPAEC-PAD bestimmt. Außerdem wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Inkubationsversuche mit verschiedenen Mischungen aus Oligosaccharidstandardsubstanzen durchgeführt, um die Aktivität gegenüber (A)XOS sowie mögliche Nebenaktivitäten einschätzen zu können. Die Tests wurden mit den kommerziell erhältlichen Oligosacchariden (XOS, AXOS, COS, MalOS, ManOS und RFO; vgl. Kapitel 7.2) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte jeweils in wässriger Lösung ohne Pufferzugabe (pH-Optimum Xylanase: 6,2) bei 40 °C für 2 - 4 h mit einem zwei- bis zehnfachen der empfohlenen Standarddosis (16000 BXU/kg). Die Messungen wurden lediglich qualitativ ausgewertet.

Bei Hydrolyse von Weizenarabinoxylan mit der Xylanase wurde die Freisetzung von $X_2 - X_6$ und XA^3XX beobachtet (Rausch, 2022). Dies deckt sich mit den erwarteten Hydrolyseprodukten einer GH11-Xylanase (vgl. Kapitel 1.4.2). Die Inkubation von XOS (DP 1 - 6) mit der Xylanase zeigte, dass die Xylanase in der Lage ist X_4 , X_5 und X_6 zu X_2 und X_3 abzubauen, wobei auch der Gehalt an Xylose leicht anstieg. Die fünf eingesetzten AXOS (DP 3 - 5) wurden unter den verwendeten Bedingungen von der Xylanase nicht abgebaut. Diese Ergebnisse entsprechen ebenfalls den Erwartungen an eine GH11-Xylanase. Bei Inkubation von RFO (DP 3 - 5) und MalOS (DP 2 - 5) mit der Xylanase wurde kein Abbau dieser Oligosaccharide beobachtet. Der Hydrolyseversuch mit COS (DP 2 - 6) zeigte eine deutliche Cellulasenebenaktivität der Xylanase: C_4 , C_5 und C_6 wurden durch Zugabe der Xylanase zu Glucose, C_2 und C_3 abgebaut. Die Inkubation von ManOS (DP 2 - 6) ergab bei niedrigen Enzymaktivitäten (zweifache Standarddosis) keine Veränderungen, bei der zehnfachen Menge der empfohlenen Dosis wurde jedoch ein minimaler Abbau von Man_6 beobachtet. Daraufhin wurden Tests mit höheren Enzymmengen durchgeführt und es stellte sich heraus, dass die Xylanase eine Mannanasenebenaktivität aufweist, allerdings nicht in den Mengen, in denen sie in Fütterungsversuchen eingesetzt wird, vorausgesetzt die empfohlene Dosierung wird eingehalten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchte Xylanase die erwarteten Hydrolyseeigenschaften einer GH11-Xylanase aufweist. Zusätzlich wurde eine Cellulasenebenaktivität sowie eine geringe Mannanasenebenaktivität festgestellt. Der Hersteller gibt an, dass die Xylanase verschiedene Nebenaktivitäten aufweisen kann, die nicht weiter standardisiert sind und von Charge zu Charge variieren können. Dementsprechend ist es möglich, dass sich die Xylanase, die dem Futter im Fütterungsversuch zugesetzt wurde, leicht von der im Labor untersuchten Xylanase unterscheidet, da es sich um unterschiedliche Chargen handelt.

4.3.2.3 *in-vitro*-Inkubation der Einzelfuttermittel mit der Xylanase

Um festzustellen, welche Oligosaccharide aus den einzelnen Einzelfuttermitteln von der im Fütterungsversuch eingesetzten Xylanase freigesetzt werden können, wurden entsprechende Inkubationsversuche durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es unter anderem festzustellen, welche Oligosaccharide potenziell in den Ileum- und Caecumproben aufgrund einer möglichen Freisetzung zu erwarten sind, deshalb wurden die Einzelfuttermittelproben Mais 3 und 4 sowie Soja 1 und 2 untersucht. Hierbei lag der Fokus auf einer grundsätzlichen Einschätzung und weniger auf der exakten Nachstellung der Bedingungen im Verdauungstrakt, weshalb nicht mehrstufig bei verschiedenen pH-Werten gearbeitet wurde, wie es in der Literatur zum Teil beschrieben ist (vgl. Kapitel 4.3.2). Die Inkubation erfolgte in wässriger Lösung ohne Pufferzugabe bei 40 °C für 4 h (ungefähre Körpertemperatur und Verweildauer im Verdauungstrakt von Broilern). Da im Verdauungstrakt die im Futter enthaltene Stärke abgebaut wird und die Xylanase mit NSP interagiert, wurde für die Versuche das isolierte Zellwandmaterial (UZM, LZM) aus der

Masterarbeit von Lisa Wagner (vgl. Kapitel 3.2.1.1) als Substrat verwendet. Außerdem können so die in Kapitel 4.1.2 und 4.2.2 beschriebenen Erkenntnisse über die enthaltenen NSP herangezogen werden. Für die Analyse wurde die in Kapitel 4.4.4 beschriebene erweiterte HPAEC-PAD/MS-Methode zur Bestimmung des Oligosaccharidprofils verwendet. Die Abschätzung der Oligosaccharidmengen erfolgte durch einen Vergleich der Peakhöhen mit mitgemessenen Standardsubstanzen (0: nicht detektierbar, 1: \leq LOD, 2: Peak Probe < Peak Standardsubstanz (5 μ M), 3: Peak Probe > Peak Standardsubstanz (5 μ M); vgl. Kapitel 4.4.4). Die Xylanase wurde in zwei unterschiedlichen Enzym-zu-Substrat-Verhältnissen zugegeben, da aus folgenden Gründen schwer abzuschätzen ist, in welchem Verhältnis die Xylanase zu den NSP im Darminhalt der verschiedenen Abschnitte vorliegt: Die Xylanase wird dem Futter in einer bestimmten Menge pro kg zugegeben. Das Huhn nimmt das Futter auf, danach wird es mit Trinkwasser und Sekreten vermengt. Im Dünndarm finden vermehrt Stoffwechselprozesse statt und die freigesetzten Stoffe werden durch Resorption aus dem System entfernt. Dadurch konzentrieren sich nicht-verdaubare Bestandteile wie NSP auf.

Um einen Überblick über die Eigenschaften der Xylanase zu erhalten, wurden für die Inkubationsversuche die 2-fache und 100-fache Menge der Standarddosis (16000 BXU/kg Futter bzw. Substrat) getestet. Zusätzlich wurden Blindproben ohne Enzymzugabe mitgeführt sowie ein Blindwert der Enzymlösung ohne Substratzugabe aufgenommen. Bei den Maisproben konnten in den Blindproben keine Oligosaccharide nachgewiesen werden. Bei den Sojaprobe wurden in den Blindproben des LZMs Peaks bei der Retentionszeit und dem m/z von M₄ und G-2a detektiert und die Ergebnisse der Messungen der Hydrolysate entsprechend korrigiert. Die korrigierten Ergebnisse sind in Abbildung 18 gezeigt.

Bei Einsatz der 2-fachen Standarddosis der Xylanase wurde bei den Maisproben nur eine minimale Freisetzung von Oligosacchariden beobachtet. Detektiert wurden sehr geringe Mengen an X₂ in beiden LZM- und einer UZM-Probe (Mais 4). In dieser UZM-Probe wurden ebenfalls sehr geringe Mengen Mal₂ festgestellt. Dahingegen wurden bei dieser Enzymaktivität XOS aus dem UZM der Sojaprobe, insbesondere bei Soja 2, freigesetzt. Wie in Kapitel 4.2.2 erläutert, kommen Xylane in den Sojaprobe vor und werden, wie die Ergebnisse zeigen, von der Xylanase hydrolysiert. Die Xylane im Soja liegen weniger substituiert vor als die im Mais, wodurch die erhöhte XOS-Freisetzung trotz eines geringeren Anteils an Xylanen im Ausgangsmaterial erklärt werden kann. Nach enzymatischer Hydrolyse des LZMs aus Soja wurden keine Oligosaccharide detektiert. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde der Versuch für eine Mais- und eine Sojaprobe (Mais 1 und Soja 2; je LZM und UZM) von Anna Rausch im Rahmen ihrer Masterarbeit wiederholt. Sie führte zusätzlich einen Inkubationsversuch mit diesen Proben mit derselben Enzymmenge bei 80 °C (Temperaturoptimum der Xylanase) für 24 h durch (Rausch, 2022). Die Untersuchungen bestätigten die oben beschriebenen Ergebnisse: Bei dieser Enzymaktivität ist die eingesetzte Xylanase unter den verwendeten Bedingungen nicht in der Lage XOS in

OS-Gruppe			Xylo-OS					Arabinoxylo-OS					Cello-OS			Malto-OS			Manno-OS						Arabinan-OS				Galactan-OS					
Enzymaktivität und Substrat			X2	X3	X4	X5	X6	A ² XX	A ³ X	XA ² XX	XA ³ XX	A ²⁺³ XX	C2	C3	C4	Mal2	Mal3	Mal4	Man2	Man3	Man4	Man5	Man6	A-2b	A-2a	A-3a	A-3b	G-2c	G-2b	G-2a	G-3c	G-3b	G-4a	
2-fache Enzymaktivität	M3	UZM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		M4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	M3	LZM	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		M4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S1	UZM	S1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			S2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		LZM	S1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			S2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100-fache Enzymaktivität	M3	UZM	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
		M4	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	M3	LZM	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		M4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	S1	UZM	S1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			S2	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		LZM	S1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			S2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 18: Ermittelte Oligosaccharid (OS)-Profile der im *in-vitro*-Versuch freigesetzten OS aus den Einzelfuttermittel durch die im Fütterungsversuch eingesetzte *endo*-Xylanase, bestimmt mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Substrat: Unlösliches und lösliches Zellwandmaterial (UZM, LZM) der Maisproben 3 und 4 (M3, M4) sowie der Sojaprobe 1 und 2 (S1, S2); Inkubationsbedingungen: 40 °C, 4 h, wässrig, Enzymaktivität entspricht Vielfachem der Standarddosis (16000 BXU/kg Substrat); 0 - 3: zunehmende Menge an OS (0: nicht detektierbar bis 3: Signal der Probe höher als Vergleichssignal der Standardsubstanzmessung (5 µM)), nicht aufgeführte OS wurden nicht detektiert, C3 und G-3a koeluiieren: hier als C3 angegeben

bedeutenden Mengen aus Mais-NSP freizusetzen, jedoch werden XOS aus den Soja-komponenten generiert.

Bei Verwendung der 100-fachen Standarddosis wurden sowohl aus dem UZM als auch dem LZM der Maisproben XOS in größeren Mengen freigesetzt, wobei nur kleinere XOS bis DP 4 nachgewiesen werden konnten. Bei der LZM-Probe von Mais 3 wurde außerdem das AXOS XA³XX in geringen Mengen detektiert. Da im Mais die Arabinoseseitenketten überwiegend über die *O*-3-Position gebunden sind (vgl. Kapitel 4.1.2) und GH11-Xylanasen bevorzugt AXOS mit mindestens vier Xyloseeinheiten freisetzen, ist XA³XX das bei dieser Kombination erwartete Hydrolyseprodukt. Zusätzlich wurden C₂ und C₃ zum Teil in höheren Mengen als die XOS nach Inkubation von UZM als auch LZM detektiert. Die COS sind auf die in Kapitel 4.3.2.2 beschriebene Cellulasenebenaktivität der Xylanase zurückzuführen. Anders als im UZM ist im LZM keine Cellulose zu erwarten. Dennoch konnten im LZM der Maisproben nach Methylierungsanalyse größere Anteile 1,4-verknüpfter Glucose nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.1.2). Es ist anzunehmen, dass diese zumindest teilweise aus dem im Mais wenig substituierten Xyloglucan stammt, das in diesem Fall als Substrat für die Cellulase dienen könnte. Ebenfalls denkbar wäre eine unvollständige Abtrennung des UZMs vom LZM. Neben den bisher beschriebenen Oligosacchariden wurden nach Inkubation auch MalOS, insbesondere Mal₄, in UZM sowie LZM

detektiert. Diese sind vermutlich auf Stärke zurückzuführen, die in Zellwandstrukturen eingeschlossen war und durch den Abbau der Arabinoxylane und anderer Zellwandpolysaccharide freigesetzt wurde. Für die Isolierung der Zellwandmaterialien wurde eine thermostabile α -Amylase eingesetzt (vgl. Kapitel 3.2.1.1), die möglicherweise nicht vollständig inaktiviert bzw. entfernt wurde, wodurch sie für den Abbau der freigesetzten Stärke zu MalOS verantwortlich sein könnte. Mais enthält nur geringe Mengen an Pektin, weshalb keine Freisetzung von Arabinan- und Galactanoligosacchariden erwartet wurde. Die Sojaprobe enthält hingegen bedeutend höhere Mengen an Pektinstrukturen (vgl. Kapitel 4.2.2), jedoch wurden in diesem Versuch von der Xylanase keine Arabinan- oder Galactanoligosaccharide freigesetzt. Daher wird angenommen, dass das eingesetzte Enzym keine Nebenaktivitäten gegenüber diesen Strukturelementen aufweist.

Bei der Inkubation des UZMs der Sojaprobe mit der 100-fachen Standarddosis wurden bedeutende Mengen an XOS detektiert, wobei die freigesetzten Mengen wieder bei Soja 2 höher waren als bei Soja 1. Bei dieser Enzymaktivität wurden auch XOS aus dem LZM der Sojaprobe freigesetzt. Ebenfalls wurden COS aufgrund der Cellulasenebenaktivität aus UZM, aber auch aus LZM freigesetzt. Die Freisetzung dieser aus dem LZM ist weniger schlüssig zu erklären als bei den Maisproben, da die Xyloglucane im Soja einen höheren Substitutionsgrad aufweisen, dennoch wurde auch bei diesen Proben ein höherer Anteil an 1,4-verknüpfter Glucose bei der Methylierungsanalyse festgestellt (vgl. Kapitel 4.2.2). In diesem Fall scheint die unvollständige Abtrennung von UZM und LZM die schlüssigste Erklärung zu sein.

Es kann festgehalten werden, dass bei der 2-fachen Enzymaktivität der im Fütterungsversuch eingesetzten Standarddosis kaum Oligosaccharide aus den Mais-NSP freigesetzt werden. Dies bestätigt Literaturdaten, dass aus Mais durch die Hydrolyse mit einer Xylanase weniger XOS freigesetzt werden als aus anderen Getreidesorten wie beispielsweise Weizen (Dale *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2022). Dies wird mit der komplexeren Struktur der Arabinoxylane in Mais begründet. Unerwartet war die beobachtete Freisetzung von XOS aus den Sojakomponenten bei dieser Enzymaktivitäten. Hierzu wurden keine Literaturdaten gefunden, da in der Regel die Getreidekomponenten oder die fertigen Futtermischungen untersucht werden. Die Ergebnisse bedeuten jedoch im Rückschluss, dass nicht nur die gewählte Getreidesorte Einfluss auf die Freisetzung der Oligosaccharide hat, sondern zusätzlich auch die eingesetzte Sojakomponente. Außerdem liefern die Ergebnisse Hinweise darauf, dass aus verschiedenen Sojaprodukten unterschiedliche Mengen an XOS freigesetzt werden können. Dies kann insbesondere dann von Bedeutung sein, wenn ausschließlich Getreidesorten mit schwer hydrolysierbaren Arabinoxylanen wie Mais im Futtermittel eingesetzt werden, da dann das Xylan aus der Sojakomponente das primäre Substrat für die Xylanase darstellt. Die Versuche mit der 100-fachen Standarddosis zeigen, dass die Xylanase grundsätzlich in der Lage ist XOS aus Mais freizusetzen. Dies führt zurück zu der zu Beginn dieses Kapitels angeführten Problematik bezüglich der Einschätzung des Enzym-zu-Substrat-Verhältnisses im Darminhalt. Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten darauf hin, dass der Vergleich und die Interpretation

der ohnehin komplexen Daten aus Fütterungsversuchen durch diese Punkte zusätzlich erschwert wird. Andererseits könnten diese Erkenntnisse möglicherweise dazu beitragen, aufzuklären, warum die beobachteten Effekte in Fütterungsversuchen mit Xylanasen teilweise voneinander abweichen (vgl. Kapitel 1.4.4). Hierfür ist es erforderlich weitere Untersuchungen durchzuführen, z. B. Enzymversuche mit Sojaprogen unter realistischeren Bedingungen in einem geeigneten *in-vitro*-Modell.

Ein ebenfalls zu beachtender Punkt bei der Bewertung von Effekten im Fütterungsversuch ist die Feststellung, dass die getestete Xylanase eine ausgeprägte Cellulasenebenaktivität aufweist und sowohl aus den Mais- als auch aus Sojaprogen COS in größeren Mengen freisetzen kann. Diese Oligosaccharide können potenziell auch im Verdauungstrakt der Hühner generiert werden und unter Umständen einen Einfluss auf das Mikrobiom haben.

4.4 Methodenentwicklung zur Analyse der Ileum- und Caecumproben

Es wurden mehrere Studien veröffentlicht, in denen die Untersuchung von Oligosacchariden in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel beschrieben ist, jedoch wurde selten die Struktur der extrahierten Oligosaccharide analysiert. In Tabelle 5 ist eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Literaturstellen mit wichtigen Eckdaten, wie eingesetztes Futter, untersuchte Proben und verwendete Analysetechniken, zusammengestellt.

4.4.1 Extraktion der niedermolekularen Kohlenhydrate

Für die Extraktion der Oligosaccharide sind in der Literatur verschiedene Vorgehensweisen, unter anderem die Extraktion mit Wasser bei 99 °C für 30 Minuten (Kouzounis *et al.*, 2021) oder mit Pufferlösung (pH 5,4) bei 42 °C für 8 Stunden ohne vorgeschalteter Inaktivierung der Enzyme und Mikroorganismen (Morgan *et al.*, 2020), beschrieben. Diese beiden Extraktionsmethoden sind für die in dieser Arbeit zu analysierenden Proben ungeeignet, da anzunehmen ist, dass unter diesen Bedingungen die in manchen Darmproben aufgrund der Supplementierung enthaltene thermostabile Xylanase während der Extraktion aktiv wäre (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Außerdem können ohne vorherige Inaktivierung weitere Oligosaccharide durch mikrobielle Fermentation generiert werden, insbesondere wenn für 8 h bei 42 °C extrahiert wird. Durch die Erhitzung auf 99 °C werden zwar Mikroorganismen und nahezu alle, nicht thermostabilen Enzyme inaktiviert, jedoch kann es (je nach pH-Wert der Extraktionslösung) zu Veränderungen der Kohlenhydratkomponenten durch saure Hydrolyse kommen. Dies hat insbesondere dann einen Einfluss auf die Analyseergebnisse, wenn nicht alle Proben den gleichen pH-Wert aufweisen. Für die extrahierten Lösungen der hier vorliegenden Proben wurde der pH-Wert für eine grobe Einordnung stichpunktartig überprüft: Ileumproben Tag 21 pH 5,0 - 5,5; Ileumproben Tag 41 pH schwankend zwischen 4,5 und 6,5; Caecumproben Tag 21 pH ca. 6,0 und

Tabelle 5: Literaturübersicht zur Untersuchung von Oligosacchariden (OS) und Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern ((A)XOS: (Arabino-)Xylooligosaccharide, Xyla: Xylanase, AX: Arabinoxylan, KH: Kohlenhydrate, Monos.: Monosaccharide, MSZ: Monosaccharidzusammensetzung, SPE: Festphasenextraktion)

Quelle	Futterbasis (Zugaben)	Untersucht (Tag der Probennahme)	Extraktion	Analysemethode (Derivatisierung) ¹
Bautil <i>et al.</i> , 2020	Weizen, Soja (AXOS)	KH und AX in Ileum, Caecum, Exkrementen (5,10,15,21,28,35)	1. 80 % Ethanol, 2. Puffer (pH 3,0)	GC (Alditolacetate) nach Englyst & Cummings (1984)
Bautil <i>et al.</i> , 2021	Weizen, Soja (2 versch. Xyla)	KH und AX in Ileum, Caeca, Exkrementen (11,36)	1. 80 % Ethanol, 2. Puffer (pH 3,0)	GC (Alditolacetate) nach Englyst & Cummings (1984)
Dale <i>et al.</i> , 2020	Weizen, Soja (Xyla)	XOS und freie Monos. in Jejunum, Ileum, Colon, Caecum (26)	nicht beschrieben	HPAEC-PAD nach Xu <i>et al.</i> (2013)
Kim <i>et al.</i> , 2022	Mais oder Weizen, Soja	NSP und OS in Kropf, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caeca, Exkrementen (12, 35)	nicht beschrieben	GC (Alditolacetate) nach Englyst & Cummings (1984) und Morgan <i>et al.</i> (2019)
Kouzounis <i>et al.</i> , 2021	Mais oder Weizen, Soja (Xyla ab Tag 20)	OS im Ileum und NSP (MSZ) in Magen, Ileum, Caecum, Exkrementen (28)	OS: Wasser, 99 °C, 30 min	OS: MALDI-TOF, NSP: GC (Alditolacetate) nach Englyst & Cummings (1984)
Kouzounis <i>et al.</i> , 2022a	Weizen, Soja (Xyla ab Tag 20)	NSP und (A)XOS in Magen, Ileum, Caecum, Exkrementen (28)	Wasser, 99 °C, 20 min, (3 Extraktionsschritte + SPE)	NSP: GC (Alditolacetate), SEC-RID, freie Monos. und OS: HPAEC-PAD, MALDI-TOF-MS, HILIC-MS ⁿ nach Kouzounis <i>et al.</i> (2022b)
Lee <i>et al.</i> , 2017	Weizen, Soja (Xyla)	Lösliche KH in Ileum und Caecum (11,21,42)	Überstand verwendet	GC-MS (Alditolacetate)
Morgan <i>et al.</i> , 2019	Weizen, Soja (AX, AXOS, AX+Xyla)	NSP und XOS im Futter	Puffer (pH 5,4), 42 °C, 8 h	NSP: GC (Alditolacetate), XOS: HPLC-DAD/MS (PMP)
Morgan <i>et al.</i> , 2020	Weizen, Sorghum, Soja, Canola (versch. NSP-Anteile, Xyla)	NSP und XOS in Magen, Ileum (21, 28, 35)	Puffer (pH 5,4), 42 °C, 8 h	NSP: GC (Alditolacetate), XOS: HPLC-DAD/MS (PMP)
Morgan <i>et al.</i> , 2021a	Weizen, Mais, Sorghum, Soja, Canola (versch. NSP-Anteile)	NSP und OS (MSZ) in Exkrementen (23, 31)	OS: 80 % Ethanol	GC (Alditolacetate) nach Englyst & Cummings (1984)
Morgan <i>et al.</i> , 2022	Sorghum, Weizen, Soja (Xyla, XOS)	XOS in Ileum (35)	Mehrstufige SPE (nicht genau beschrieben)	HPLC-MS (PMP) nach Morgan <i>et al.</i> (2020)
Nguyen <i>et al.</i> , 2022	Mais oder Weizen, Soja (versch. NSP-Anteile)	NSP (MSZ) und OS-Gehalt in Ileum und Exkrementen (14, 35)	80 % Ethanol, Clean-up nicht beschrieben	GC (Alditolacetate) nach Englyst & Cummings (1984) und Morgan <i>et al.</i> (2019)
Wu <i>et al.</i> , 2023	Mais, Weizen, Soja (Xyla)	XOS in Ileum und Caeca (21)	Wasser im Ultraschallbad, Clean-up unklar	Unklar (HPAEC-PAD, evtl. als PMP-Derivate nach Morgan <i>et al.</i> (2020))
Zhang <i>et al.</i> , 2014	Weizen, Mais, Soja (Xyla ab Tag 7)	Freie Monos. und OS in Kropf, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caeca, Exkrementen (21)	80 % Ethanol, 40 °C, 1h	NSP: nach Englyst & Cummings (1984), freie Monos.: GC-FID, OS: GC-MS (silyliert)

¹ DAD: Diodenarraydetektor, FID: Flammenionisationsdetektor, GC: Gaschromatographie, HILIC: hydrophile Interaktionschromatographie, HPAEC-PAD: Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion, HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, MALDI-TOF-MS: Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitmassenspektrometer, MS: Massenspektrometrie, PMP: 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon, SEC-RID: Größenausschlusschromatographie mit Brechungsindexdetektor, TLC: Dünnschichtchromatographie

Caecumproben Tag 41 pH leicht schwankend zwischen 5,5 und 6,5. Nguyen und Mitarbeitende (2022) beschreiben für die Extraktion von Oligosacchariden aus Ileum- und Exkretproben die Verwendung von 80%igem Ethanol bei 80 °C. Wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben, ist die für die hier vorliegenden Proben eingesetzte Xylanase in 80%igem Ethanol inaktiv, deshalb wurde in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls 80%iges Ethanol als Extraktionsmittel gewählt. Die Extraktion erfolgte, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, mit 80%igem Ethanol bei 40 °C in mehreren Extraktionsschritten, um einen möglichst hohen

Anteil der NLKH zu extrahieren. Dies wurde in Vorversuchen überprüft, bei denen die Überstände der einzelnen Extraktionsschritte mittels HPAEC-PAD analysiert wurden. Hierfür wurden Proben aus den Probensätzen für die Methodenentwicklung (vgl. Kapitel 3.4) herangezogen. Die Messungen ergaben für die Ileumproben, dass im 3. Extraktionsschritt weniger als 15 % der im 1. Extraktionsschritt enthaltenen Zucker nachzuweisen waren. Bei den Caecumproben waren im 3. Extraktionsschritt noch über 35 % nachweisbar (vgl. Tabelle A10, Kapitel 9.2). Deshalb wurde entschieden die Ileumproben dreifach und die Caecumproben vierfach zu extrahieren.

4.4.2 Aufreinigung der Extrakte mittels Festphasenextraktion

Zur Aufreinigung und Fraktionierung der extrahierten NLKH-Fractionen in Mono- und Oligosaccharidfraktionen wurde, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, eine SPE mit nPGC-Material verwendet. Die Fraktionierung durch verschiedene Elutionsmittel wurde für die in den Proben vorkommenden Mono- und Oligosaccharide ausführlich überprüft. Zunächst wurde die gestaffelte Elution mit Wasser, Wasser/Acetonitril (50/50) und Wasser/Acetonitril mit TFA (50/50 + 0,1 %) getestet. Es zeigte sich, dass die Fraktion mit TFA vermehrt Probleme bei der anschließenden Trennung mittels HPAEC verursacht. Es wurden starke Retentionszeitverschiebungen (mehrere Minuten) und Peakformveränderungen beobachtet, die sich auch negativ auf nachfolgende Messungen auswirkten und erst durch mehrstündiges, intensives Spülen der Säule mit Fließmittel mit hohem Elutionsvermögen behoben werden konnten. Aufgrund dessen wurden die Tests mit Ameisensäure statt TFA fortgeführt. Hier war es möglich die betroffene Fraktion mit der HPAEC zu messen, jedoch musste vor der Analyse sichergestellt sein, dass jegliche Ameisensäurereste (oder andere für die Probleme verantwortliche Substanzen) aus der Probe entfernt wurden, beispielsweise durch mehrfaches Koevaporieren mit Ethanol. Andernfalls traten bei der Analyse mittels HPAEC die gleichen Probleme auf wie nach Elution mit TFA. Auch wenn sich die anschließende Chromatographie als problembehaftet erwies, so konnte die in der Literatur beschriebene Fraktionierung für die getesteten Saccharide bestätigt werden. Die Kapazität, Oligosaccharide zurückzuhalten, lag bei den verwendeten nPGC-Kartuschen (250 mg stationäre Phase) bei ca. 4,9 mg (getestet mit Raffinose). Für die Darmproben wurde überprüft, ob die Ladekapazität ausreichend für die Menge enthaltener Oligosaccharide ist, sodass die Oligosaccharide vollständig zurückgehalten werden und nicht teilweise in der ersten Fraktion mit den Monosacchariden eluieren. Es wurden erfolgreiche Versuche zur Regeneration der Kartuschen durchgeführt, um diese mehrfach nutzen zu können. Hierfür wurde das Säulenmaterial nach Elution aller Fraktionen nacheinander mit 100 % Acetonitril und 100 % Wasser gespült und regeneriert. Anschließend folgte die Konditionierung wie vor der ersten Probenaufgabe (vgl. Kapitel 8.4.3). Es konnten bei einer erneuten Verwendung der selben Kartusche keine Verschleppungen oder Beeinträchtigungen der Trennleistung beobachtet werden. Getestet wurden drei Zyklen, bei den Proben wurde mit zwei Zyklen

gearbeitet. Die Wiederfindungen der Mono- und Oligosaccharide in Standardmischungen sowie Proben lagen nach nPGC-SPE bei über 90 % und es konnten keine Unterschiede zwischen erstem und zweitem Durchlauf festgestellt werden. Für die Ileumproben war die Aufreinigung mittels nPGC-SPE zufriedenstellend und ermöglichte die anschließende Analyse der Oligosaccharide.

Im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch (2022) stellte sich heraus, dass für die Caecumproben eine Aufreinigung mittels nPGC-SPE nicht ausreichend ist, um die Matrixeffekte so weit zu minimieren, dass die enthaltenen Saccharide zuverlässig mittels HPAEC analysiert werden können. Es wurde eine Aufarbeitungsmethode entwickelt, bei der die Aufreinigung mit einer C18-SPE gefolgt von einer nPGC-SPE zur weiteren Aufreinigung und Fraktionierung der Zucker erfolgt (Rausch, 2022). C18-Material wird häufig in der RP-Chromatographie eingesetzt und zeigt eine hohe Affinität gegenüber hydrophoben Substanzen, jedoch kaum gegenüber hydrophilen Substanzen. Deshalb kann dieses Material unter anderem eingesetzt werden, um hydrophobe Matrixkomponenten von hydrophilen Kohlenhydraten abzutrennen (Packer *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2018). Die Elutionsreihenfolge wurde für die im HPAEC-Profilintegrierten, kommerziell erhältlichen Oligosaccharide (vgl. Kapitel 4.4.4) überprüft. Es wurde beobachtet, dass C₅, C₆ und A²⁺³XX bei wässriger Elution als letztes eluieren. Die Wiederfindung aller anderen getesteten Oligosaccharide lag bei über 95 %, wenn 6 mL Wasser für die Elution verwendet wurden. Vorversuche ergaben, dass die drei genannten Oligosaccharide nicht in den Proben erwartet werden, weshalb aus praktischen Gründen auf eine Elution mit einem höheren Volumen verzichtet wurde.

Für die Methodenentwicklung zur Probenaufarbeitung im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch wurden die in Kapitel 3.4 beschriebenen, extra für diese Zwecke zur Verfügung gestellten Caecumproben aus einem anderen Fütterungsversuch verwendet. Bei Testmessungen mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben mit der von Anna Rausch (2022) entwickelten Methode zur Analyse von Caecumproben wurde jedoch beobachtet, dass sich die Caecumproben aus den beiden Fütterungsversuchen nicht gleich verhalten und zum Teil unterschiedlich zusammengesetzt sind. Bei dem Caecumprobensatz für die Methodenentwicklung konnten von Anna Rausch keine freien Monosaccharide nachgewiesen werden. Die Analyse der Oligosaccharide war mittels HPAEC-PAD/MS möglich, jedoch konnte die Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion nicht mittels HPAEC-PAD analysiert werden, da unter anderem zu große Mengen störender Komponenten, insbesondere Galactosamin (vgl. Kapitel 4.4.3), auftraten. Die Monosaccharidzusammensetzung wurde daher nach Derivatisierung zu Alditolacetaten mittels GC-FID bestimmt (Rausch, 2022). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Caecumproben konnten dahingegen freie Monosaccharide nachgewiesen und mittels HPAEC-PAD quantifiziert werden. Auch der Gehalt an Galactosamin war bedeutend niedriger, weshalb eine Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD möglich war (vgl. Kapitel 4.4.3). Dies zeigt wie unterschiedlich die Matrix und die enthaltenen Kohlenhydrate in Proben sind, von denen

anzunehmen war, dass sie sich ähnlich verhalten. Im Umkehrschluss folgt daraus, dass schon entwickelte Methoden nochmals überprüft werden müssen, wenn ein neuer Probenatz untersucht werden soll.

In der Literatur sind die Aufarbeitungs- bzw. Aufreinigungsmethoden häufig nicht ausführlich beschrieben, was den Vergleich der verwendeten Methoden sowie der Analyseergebnisse erschwert oder unmöglich macht. Beispielsweise heißt es bei Morgan und Mitarbeitenden (2022), dass für die Extraktion eine mehrstufige SPE verwendet wurde, ohne Details zu den verwendeten SPE-Materialien oder Elutionsmitteln zu nennen. In anderen Veröffentlichungen wird anstelle der Methodenbeschreibung auf eine Quelle verwiesen, jedoch nicht die dort beschriebene Analysentechnik verwendet oder anderes Probenmaterial analysiert: Beispielsweise schreiben Wu und Mitarbeitende (2023), dass sie XOS mittels HPAEC-PAD analysiert haben und die Aufarbeitung nach Morgan und Mitarbeitenden (2020) durchgeführt wurde. Morgan und Mitarbeitende (2020) beschreiben jedoch eine Derivatisierung zu PMP-Derivaten mit anschließender Messung mittels HPLC-MS. Für die Messung von Oligosacchariden mittels HPAEC-PAD ist keine Derivatisierung erforderlich. Ein anderes Beispiel ist die Studie von Dale und Mitarbeitenden (2020), in der Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern auf das Vorkommen von XOS nach der Methode von Xu und Mitarbeitenden (2013) analysiert wurden. Die Methode von Xu und Mitarbeitenden (2013) wurde entwickelt, um XOS in lignocellulosehaltiger Biomasse (z. B. gemahlene Maiskolben) zu bestimmen. Diese Methode ist daher wahrscheinlich ungeeignet um Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern zu analysieren, da solche Proben eine deutlich komplexere Matrix aufweisen, und wurde möglicherweise modifiziert. Kouzounis und Mitarbeitende (2022a) hingegen beschreiben ihr Vorgehen ausführlich. Dort wurde zur Aufreinigung von Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern, ähnlich wie bei der in dieser Arbeit beschriebenen Aufarbeitungsmethode, C18- und nPGC-SPE verwendet. Jedoch lag der Fokus dieser Studie auf der Analyse der Arabinoxylane und der höheren (A)XOS ($DP \geq 4$) und nicht, wie hier, auf der Analyse aller vorkommenden Oligosaccharide.

4.4.3 Analyse der Monosaccharide mittels HPAEC-PAD

Bei der Analyse der Monosaccharide in den Darmproben mittels HPAEC-PAD traten verschiedene Probleme auf. So konnte Anna Rausch (2022) während ihrer Masterarbeit beobachten, dass die Empfindlichkeit des PADs bedeutend herabgesetzt wird, wenn Caecumproben nach der Extraktion ohne weitere Aufreinigungsschritte gemessen wurden. Dies betraf die Analyse der freien Monosaccharide, aber auch die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung nach Methanolyse und anschließender TFA-Hydrolyse. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung A13 (Kapitel 9.1) beispielhaft ein HPAEC-Chromatogramm gezeigt. Außerdem konnte Anna Rausch zeigen, dass bei den von ihr untersuchten Caecumproben ohne weitere Aufreinigungsschritte selektiv das Signal der Glucose durch Matrixkomponenten unterdrückt wird. Es wurden verschiedene Versuche

durchgeführt, um dieses Phänomen aufzuklären, jedoch konnte keine zufriedenstellende Erklärung gefunden werden (Rausch, 2022). Durch die Aufreinigung mittels zweistufiger SPE (C18-nPGC) sowie den Einsatz eines internen Standards (2-Desoxyglucose) konnten die beschriebenen Effekte auf die Detektion für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben ausreichend minimiert werden.

Bei den Proben zur Methodenentwicklung wurden zusätzlich hohe Anteile an Galactosamin festgestellt, weshalb die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung mittels GC-FID erfolgte. Galactosamin stellt insofern ein Problem bei der HPAEC-PAD-Messung dar, dass es beim etablierten Gradientenprogramm mit Rhamnose koeluiert. Der Gradient konnte zwar so optimiert werden, dass es mit einer zusätzlichen Messung möglich ist Rhamnose, Galactosamin und Arabinose, die kurz nach der Rhamnose eluiert, zu trennen, jedoch nur bei niedrigen Konzentrationen (bis 25 μM), da es ansonsten zu einer Überlagerung der Peaks kommt. Sind die Konzentrationsunterschiede dieser drei Zucker in der Probe zu hoch, kann es aufgrund der für das dominierende Monosaccharid nötigen Verdünnung passieren, dass die anderen beiden geringer konzentrierten Monosaccharide nicht mehr quantifiziert bzw. identifiziert werden können. Darum ist es erforderlich, dass die Konzentrationen dieser Zucker in einem ähnlichen Bereich liegen. Für die in dieser Arbeit untersuchten Caecumproben war dies gegeben, weshalb die Analyse mittels HPAEC-PAD möglich war. In den untersuchten Proben war der Gehalt an Galactosamin bzw. Rhamnose im Vergleich zu den anderen Zuckern gering. Die Proben wurden mit dem etablierten Gradientenprogramm für Monosaccharide gemessen. Für jede Probengruppe wurden zusätzlich Stichproben mit dem Gradienten zur Trennung von Rhamnose und Galactosamin analysiert, um diese richtig zuzuordnen zu können. Waren beide Zucker in quantifizierbaren Mengen enthalten, wurden alle Proben dieser Gruppe mit diesem Gradienten ebenfalls gemessen und beide Monosaccharide auf diese Weise quantifiziert. Dies war bei den Caecumproben von Tag 41 nach TFA-Hydrolyse der Fall.

Neben Galactosamin konnte Glucosamin in vielen der analysierten Proben, insbesondere bei der Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen, detektiert werden. Es stellte sich heraus, dass die Anwesenheit von Glucosamin unter bestimmten Gegebenheiten dazu führt, dass der PAD-Response für die danach eluierenden Zucker herabgesetzt wird und diese damit nicht zuverlässig quantifiziert werden können. Dies wurde bei Messungen mit Standardlösungen beobachtet, sodass Interaktionen mit der Matrix ausgeschlossen werden können. Testmessungen ergaben, dass dieser Effekt bis zu einer bestimmten Glucosaminmenge konzentrationsabhängig ist. Außerdem stellte sich heraus, dass das Phänomen bei unterschiedlichen Messsystemen unterschiedlich ausgeprägt ist. Hierfür wurden vergleichende Tests an drei verschiedenen HPAEC-PAD-Systemen durchgeführt. Interessanterweise zeigte Galactosamin, ebenfalls ein Aminozucker mit ähnlicher Struktur, keinen vergleichbaren Einfluss auf den PAD-Response. In der Literatur sind solche Effekte nur für freie Aminosäuren und kleine Peptide beschrieben. Diese werden bei der verwendeten HPAEC-Trennung ebenfalls aufgetrennt und vom PAD detektiert. Zu Messschwierigkeiten führt dabei, dass bei der PAD-Detektion zwar

gepulst gearbeitet wird (vgl. Kapitel 3.2.1.3), die Wellenform aber für Kohlenhydrate optimiert ist und die Oxidationsprodukte der Aminosäuren länger auf der Oberfläche der Goldelektrode verbleiben (Weitzhandler *et al.*, 1996). Dadurch blockieren sie diese für eine bestimmte Zeit, sodass der PAD-Response für nachfolgende Analyten herabgesetzt wird. Dies ist insbesondere für Lysin problematisch, da diese Aminosäure im selben Zeitfenster eluiert wie die Monosaccharide. Ist Lysin in der Probe enthalten, werden die Monosaccharide, die vor Lysin eluieren, normal erfasst, wohingegen die Signale der Monosaccharide, die nach Lysin eluieren, unterschiedlich stark unterdrückt werden, abhängig von der Lysinkonzentration und dem betroffenen Zucker. Weitzhandler und Mitarbeitende (1996) beschreiben beispielsweise für Mannose eine Unterdrückung des Signals von bis zu 45 %, bei einem Lysin-zu-Monosaccharid-Verhältnis von 100:1. Die Autoren konnten jedoch auch zeigen, dass eine vom Hersteller speziell für diese Zwecke entwickelte Vorsäule, die sogenannte AminoTrap, das Problem behebt, indem die Retention der freien Aminosäuren soweit verzögert wird, dass sie nach den Monosacchariden eluieren und somit die Messung nicht beeinflussen.

Um die beobachteten Effekte der Signalunterdrückung von Glucosamin weiter einzugrenzen, wurde Lysin mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gradientenprogramm gemessen, um beispielsweise eine Verunreinigung der Standardsubstanzen oder eine Kontamination des HPAEC-Systems auszuschließen. Es zeigte sich, dass Lysin nach Glucosamin eluiert (zusammen mit Mannose) und demnach nicht die Ursache sein kann. Auch der Einsatz einer AminoTrap wurde getestet, jedoch konnte keine Veränderung der Retentionszeiten der Aminosäuren oder eine Aufhebung der Signalunterdrückung beobachtet werden. Dem entgegen zeigte sich bei Testmessungen mit den Caecumproben nach TFA-Hydrolyse eine Verbesserung der Messergebnisse, weshalb die AminoTrap für diese Proben eingesetzt wurde. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass Proteine sowie Peptide und freie Aminosäuren durch die Aufreinigung mittels nPGC-SPE nahezu vollständig aus den Proben entfernt wurden (Packer *et al.*, 1998). Trotzdem scheinen bestimmte Matrixeinflüsse durch die AminoTrap reduziert zu werden. Die Hintergründe der beobachteten Effekte von Glucosamin konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Da das Problem nicht bei allen HPAEC-Systemen im gleichen Ausmaß auftrat, wurden die Proben, wie in Kapitel 3.4.3.2 beschrieben, an dem System gemessen, an dem diese Effekte nicht bzw. minimal zu beobachten waren. Um dennoch einen Einfluss auf die Messergebnisse auszuschließen, wurde Glucosamin für einzelne Probensätze quantifiziert und die Ergebnisse auf Trends hin überprüft.

4.4.4 Erweitertes Oligosaccharidprofiling mittels HPAEC-PAD/MS

Zur Analyse des Oligosaccharidprofils der Proben aus dem Verdauungstrakt wurde eine Profilingmethode mittels HPAEC-PAD/MS entwickelt. Die entwickelte Methode sollte möglichst viele, potenziell in den Proben enthaltene Oligosaccharide umfassen, um ein detailliertes Bild über die Freisetzung bzw. den Abbau von Oligosacchariden zu erhalten.

Hierbei wurden die bereits beschriebenen Erkenntnisse über die Einzelfuttermittel (vgl. Kapitel 4.1 und 4.2) sowie der zugegebenen Komponenten Xylanase und XOS-haltiges Material (vgl. Kapitel 4.3) berücksichtigt. Es wurde in Betracht gezogen, dass Oligosaccharide bei der Futterherstellung, z. B. durch das Pelletieren (vgl. Kapitel 3.1), und bei der Passage des Verdauungstrakts aus den im Futter enthaltenen Polysacchariden generiert werden können. Im Verdauungstrakt sind die Polysaccharide im Muskelmagen zunächst sauren Bedingungen ausgesetzt, wodurch es zur sauren Hydrolyse kommen kann, zusätzlich werden sie mechanisch beansprucht. Im Dünndarm findet der Verdau von Kohlenhydraten, hauptsächlich der Stärke, durch körpereigene Enzyme statt. Im Caecum befindet sich der Großteil des Mikrobioms, weshalb es hauptsächlich dort zur mikrobiellen Fermentation der Polysaccharide kommt.

Aufgrund des Aufbaus des Fütterungsversuchs lag der Fokus insbesondere auf der Analyse der (A)XOS. Diese können aus (Arabino-)Xylanen durch die zum Futter zugegebene Xylanase und im Caecum zusätzlich durch Enzyme des Mikrobioms freigesetzt werden. Außerdem ist es denkbar, dass Seitenketten des Arabinoxylans im Magen der Broiler aufgrund der säurelabilen Bindung zwischen Arabinose und Xylose des Rückgrats abgespalten werden (vgl. Kapitel 3.2.2.4). Da die im Futtermittel eingesetzte Xylanase eine Cellulasenebenaktivität aufweist (vgl. Kapitel 4.3.2.2), wurden auch COS berücksichtigt. Durch den enzymatischen Abbau von Stärke im Verdauungstrakt entstehen MalOS, die ebenfalls in den Darmproben vorkommen können. Die Analyse der Sojaproben zeigte, dass wie erwartet RFO enthalten sind. Diese können von körpereigenen Enzymen nicht vollständig abgebaut werden und sind demnach zumindest in den Ileumproben zu erwarten. Unter den Hauptpolysacchariden in Soja sind Pektine, welche unter anderem Arabinane und Galactane beinhalten (vgl. Kapitel 1.2.3.4). Jene können ebenfalls nicht von körpereigenen Enzymen abgebaut werden, jedoch von Enzymen des Mikrobioms (Bender *et al.*, 2023). Demzufolge könnten entsprechende Arabinan- und Galactanoligosaccharide in den Caecumproben vorkommen. Bei der Untersuchung der Einzelfuttermittel wurden insbesondere bei den LZM von Mais und Soja höhere Anteile an Mannose in der Monosaccharidzusammensetzung festgestellt. Die Untersuchung der Bindungsverhältnisse ergab neben 1,4-glykosidisch verknüpfter Mannose höhere Mengen an, für pflanzliches Zellwandmaterial untypischer, 1,2-glykosidisch verknüpfter Mannose (vgl. Kapitel 4.1.2 und 4.2.2). Lineare β -1,4-verknüpfte ManOS wurden im Oligosaccharidprofiling berücksichtigt, auch aufgrund der geringfügigen Mannanasenebenaktivität, die für die eingesetzte Xylanase beobachtet wurde (vgl. Kapitel 4.3.2.2). Standardsubstanzen für Oligosaccharide, aufgebaut aus 1,2-verknüpften Mannoseeinheiten, standen nicht zur Verfügung.

Für das entwickelte HPAEC-PAD/MS-Oligosaccharidprofiling wurden kommerziell erhältliche Oligosaccharidstandardsubstanzen und in der Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie am KIT vorhandene, isolierte Oligosaccharidstandardsubstanzen sowie enzymatisch generierte Oligosaccharide herangezogen. Folgende kommerziell erhältliche Oligosacchariden wurden in das Profiling integriert: Lineare XOS (DP 2 - 6, X₂ - X₆), verzweigte AXOS (DP 3 - 5, s. Abbildung 10, Kapitel 3.3.1), COS (DP 2 - 6,

C₂ - C₆), MalOS (DP 2 - 5, Mal₂ - Mal₅), ManOS (DP 2 - 6, Man₂ - Man₆) und RFO inklusive Saccharose (DP 2 - 5, Saccharose - Verbascose). Die Reinheit und Hersteller sind in Kapitel 7.2 aufgeführt. Von den isolierten Oligosacchariden wurden die beiden Arabinoxylanseitenketten AX (generiert aus FAX durch enzymatische Abspaltung der Ferulasäure) und XA (s. Abbildung 4, Kapitel 1.2.3.3, Schendel, 2016) sowie die Arabinanoligosaccharide (DP 2 - 3, s. Abbildung A3, Kapitel 9.1) und Galactanoligosaccharide (DP 2 - 4, s. Abbildung A4, Kapitel 9.1) aus dem Arabinan- bzw. Galactanprofiling (vgl. Kapitel 3.2.2.3, Wefers & Bunzel, 2016) in das Oligosaccharidprofiling aufgenommen. Bei Vorversuchen zur Identifizierung von Oligosacchariden in Ileumproben konnten außerdem Oligosaccharide, die den Invertaseabbauprodukten der RFO entsprechen, identifiziert werden. RFO kommen über die Sojakomponenten ins Futter und Invertase ist als körpereigenes Enzym im Verdauungstrakt von Hühnern anzutreffen (vgl. Kapitel 1.3.2). Invertase spaltet Saccharose in Fructose und Glucose. Im Falle der RFO wird ebenfalls die Fructose abgespalten und es entstehen die entsprechenden Oligosaccharide aus Glucose mit einer oder mehreren α -(1→6)-glykosidisch gebundenen Galactoseeinheiten. Diese Oligosaccharide wurden als Standardsubstanzen gewonnen, indem eine Invertase zu Raffinose, Stachyose und Verbascose gegeben wurde. Die so generierten Oligosaccharide werden im Folgenden als Gal+Glc (Melibiose), 2Gal+Glc und 3Gal+Glc entsprechend den Abbauprodukten von Raffinose, Stachyose und Verbascose benannt. Diese Invertaseabbauprodukte der RFO wurden ebenfalls in das Profiling aufgenommen. Damit umfasst das entwickelte Oligosaccharidprofiling 44 potenziell in den Darmproben enthaltene Oligosaccharide mit DP 2 - 6, die mit dem entsprechend optimierten HPAEC-Gradienten innerhalb von 65 Minuten getrennt und mittels MS identifiziert werden können (s. Abbildung 19). Als interner Standard, zum Ausgleich von Retentionszeitverschiebungen und zur Überprüfung, ob das System fehlerfrei arbeitet, wurde Isomaltotriose ausgewählt, da sie in den Proben natürlicherweise nicht erwartet wird und ein stabiles sowie isoliertes MS-Signal aufweist. Die HPAEC-PAD/MS-Bedingungen sowie das optimierte Gradientenprogramm sind Kapitel 8.4.5 zu entnehmen.

In Abbildung 19 ist eine Übersicht des entwickelten Oligosaccharidprofiling gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung sind die Chromatogramme (PAD) von Standardsubstanzmischungen der integrierten Oligosaccharide, gemessen mit dem entwickelten HPAEC-Gradienten, abgebildet. Im unteren Teil sind die SIM-Spuren mit den zugehörigen m/z der dominierenden Lithiumaddukte der einzelnen Oligosaccharide aufgetragen. Es wurde im positiven Modus gemessen. Bei der entwickelten Analysemethode stellt die Tatsache, dass neutrale Oligosaccharide hauptsächlich aus Pentosen und Hexosen aufgebaut sind, zugleich Vor- und Nachteil dar. Der Nachteil liegt darin, dass unterschiedlich aufgebaute Oligosaccharide die gleiche Masse haben können. So weisen beispielsweise X₅ und XA³XX (je aufgebaut aus fünf Pentosen) oder Raffinose und C₃ (je aufgebaut aus drei Hexosen) jeweils einen Molekülpeak mit dem gleichen m/z auf und müssen für eine eindeutige Identifizierung chromatographisch getrennt werden. Da mit einem ESI-MS gemessen

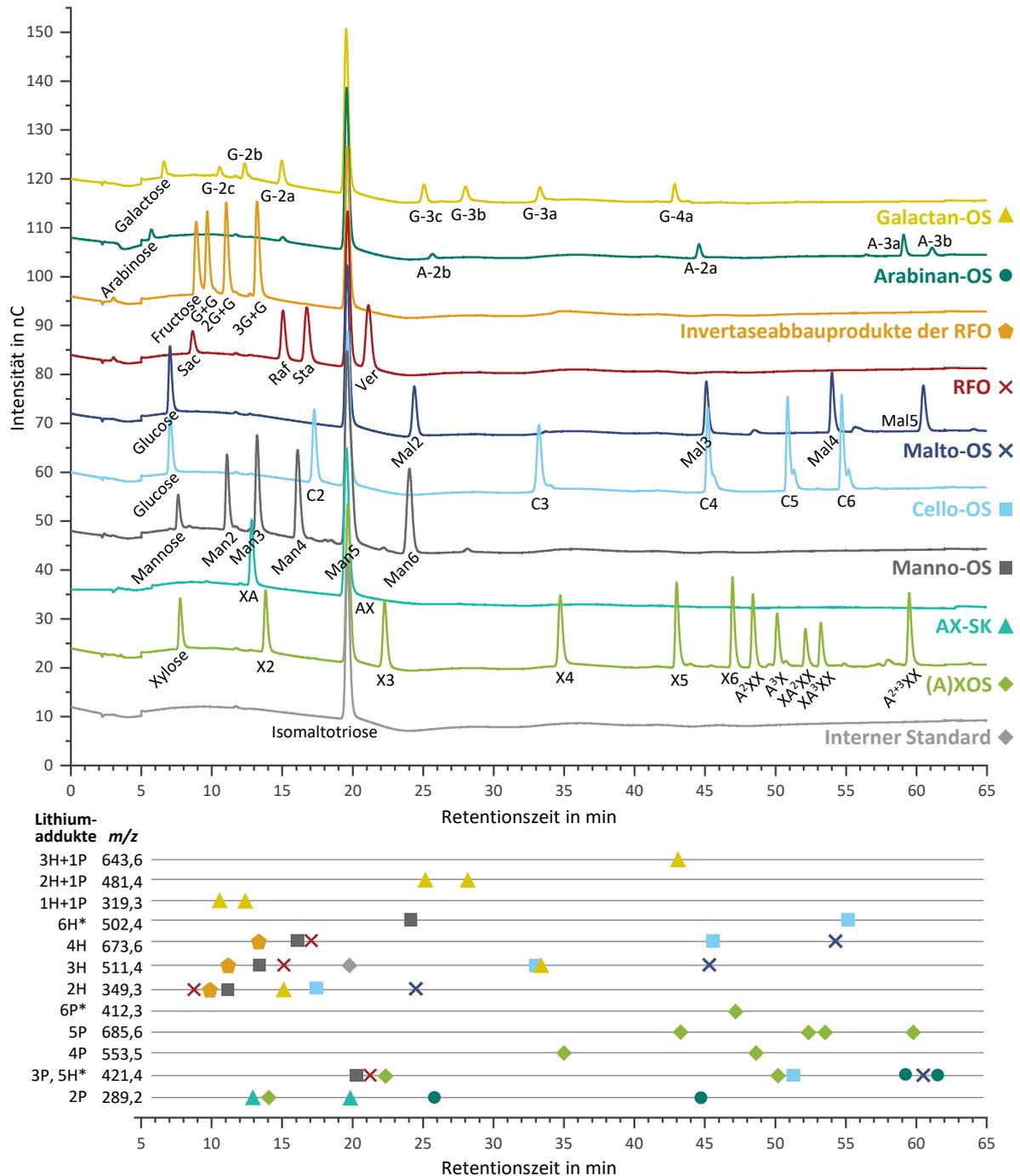


Abbildung 19: Entwickelte Profilingmethode zur Analyse von 44 Oligosacchariden (OS) nebeneinander mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion (HPAEC-PAD/MS). Oben: HPAEC-Chromatogramme (PAD) der OS-Standardsubstanzen sortiert nach OS-Gruppen (Zahlen geben Polymerisationsgrade an); unten: Übersicht der MS-Spuren mit den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) der dominierenden Lithiumaddukte der OS (Zahlen geben Anzahl der Pentosen (P) bzw. Hexosen (H) an, * dominierendes Addukt zweifach geladen, gemessen im positiven Modus), Symbole kennzeichnen die Retentionszeiten der OS (RFO: OS der Raffinose-Familie; Raf: Raffinose, Sta: Stachyose, Ver: Verbascose; G+G, 2G+G, 3G+G: Invertaseabbauprodukte von Raf, Sta, Ver; AX-SK: Arabinoxyloseketten, XA: α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-L-Arabinose, AX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-L-Arabinose; (A)XOS: (Arabino-)Xylo-OS; AXOS benannt nach Fauré und Mitarbeitenden (2009); Galactan- und Arabinan-OS benannt nach Wefers und Bunzel (2016))

wird, weisen die Massenspektren keine spezifischen Fragmentierungsmuster auf, die eine Identifizierung ermöglichen könnten. Der Vorteil liegt darin, dass die Anzahl möglicher m/z begrenzt ist. Dies erleichtert die Suche nach vorkommenden Oligosacchariden und ermöglicht unter anderem die Aufnahme aller relevanten SIM-Spuren mit einer hohen Empfindlichkeit über die gesamte Elutionszeit der Oligosaccharide. Zu berücksichtigen ist, dass manche Oligosaccharide, insbesondere mit höherem DP, nach der Ionisierung bevorzugt als zweifach geladene Ionen vorliegen. Dies ist unter anderem bei der Ermittlung des m/z für die Einstellung der SIM-Spuren zu beachten. Außerdem führt dies beispielsweise dazu, dass Oligosaccharide aus drei Pentosen und fünf Hexosen (zweifach geladen) Ionen mit demselben m/z von 421 bilden. Außerdem ist zu beachten, dass die Analytionen nicht ausschließlich als Lithiumaddukte ($[M+7]^+$) vorliegen. Ebenfalls beobachtet werden beispielsweise kleine Mengen an Natriumaddukten ($[M+23]^+$) sowie m/z mit $M+42$. Für weiteres konnte bisher kein passendes Addukt oder eine andere plausible Erklärung gefunden werden, jedoch ist dieser Peak mit geringer Intensität in fast allen mittels HPAEC-MS aufgenommenen Massenspektren von Oligosacchariden zu sehen. Dies ist insbesondere bei der Auswertung der SIM-Spur für Oligosaccharide aus vier Pentosen (m/z von 553) zu beachten, da die Lithiumaddukte von Oligosacchariden aus drei Hexosen ein m/z von 511 aufweisen. Werden dazu 42 addiert, ergibt sich ein m/z von ebenfalls 553. Somit werden Oligosaccharide, die aus drei Hexosen bestehen, sowohl in der SIM-Spur mit m/z 511 (Oligosaccharid aus drei Hexosen) als auch in der SIM-Spur mit m/z 553 (Oligosaccharid aus vier Pentosen) detektiert. Daher musste und konnte der HPAEC-Gradient so angepasst werden, dass es zu keiner Koelution von Oligosacchariden aufgebaut aus drei Hexosen bzw. vier Pentosen kommt und somit eine eindeutige Zuordnung der im Profiling berücksichtigten Oligosaccharide über die Retentionszeit möglich ist (s. Abbildung 19 unten). Jedoch ist es nicht auszuschließen, dass die Probe weitere, nicht identifizierte Oligosaccharide enthält. Demnach ist für unbekannte oder unerwartete Signale mit einem m/z von 553 (Oligosaccharid aus vier Pentosen) zu prüfen, ob bei derselben Retentionszeit ein Signal in der SIM-Spur mit m/z von 511 detektiert wurde, um sicherzustellen, dass es sich nicht um ein aus drei Hexosen aufgebautes Oligosaccharid handelt.

Die Elutionsreihenfolge der Oligosaccharide ist Abbildung 19 zu entnehmen. Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass die Oligosaccharide innerhalb einer Oligosaccharidgruppe bei der Trennung mittels HPAEC nach aufsteigendem DP eluieren, abgesehen von den AXOS. Diese eluieren nach X_6 und es scheinen sowohl der DP als auch die Position der Seitenkette einen Einfluss auf die Retentionszeit zu haben, da beispielsweise A^3X (DP 3) nach A^2XX (DP 4) eluiert. Bei den COS ist auffällig, dass insbesondere die Signale der höheren Oligosaccharide eine Schulter aufweisen. Dieses Phänomen konnte nicht abschließend geklärt werden, wobei eine Verunreinigung der Standardsubstanzen ausgeschlossen wurde. Interessant zu beobachten ist, dass die RFO vergleichsweise früh eluieren und ihre Invertaseabbauprodukte sogar noch früher. Zusammen mit den ManOS führt dies zu einer großen Anzahl an aus Hexosen aufgebauten Oligosacchariden, die im

Zeitfenster zwischen 7 und 20 Minuten eluieren. Dennoch war es möglich den HPAEC-Gradienten so anzupassen, dass die Oligosaccharide in diesem Zeitfenster ausreichend getrennt werden und keine Oligosaccharide mit dem gleichen m/z koeluieren (s. Abbildung 19 unten). Dies gilt ebenfalls für den Rest der berücksichtigten Oligosaccharide mit einer Ausnahme: C₃ und G-3a, beide aufgebaut aus drei Hexosen (m/z 511), eluieren nahezu zeitgleich und waren chromatographisch nicht zu trennen. Wurde bei der Auswertung der Proben zu dieser Retentionszeit ein Signal mit dem entsprechenden m/z detektiert, so wurde überprüft, ob es auf Grundlage der anderen detektierten Oligosaccharide möglich ist zu entscheiden, welches Oligosaccharid wahrscheinlich in der Probe enthalten ist. Konnten in der Probe beispielsweise weder C₂ noch C₄ nachgewiesen werden, jedoch andere Galactanligosaccharide, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem betroffenen Oligosaccharid mit einem m/z von 511 um G-3a und nicht um C₃ handelt.

Die Auswertung der Messungen zur Bestimmung des Oligosaccharidprofils von Ileum- und Caecumproben erfolgte vorrangig über die aufgenommenen SIM-Spuren durch Abgleich der Retentionszeiten mit ebenfalls gemessenen Standardsubstanzmischungen bzw. durch den Abgleich relativer Retentionszeiten zu Isomaltotriose (aufgeführt in Tabelle A11, Kapitel 9.2). Die mittels PAD aufgenommenen Chromatogramme dieser Proben sind aufgrund vieler Peaks, verursacht durch Matrixkomponenten, nicht aussagekräftig (Beispielchromatogramme in Abbildung A14 und Abbildung A15, Kapitel 9.1). Die Auswertung erfolgte qualitativ, wobei zusätzlich die relativen Mengen der enthaltenen Oligosaccharide im Vergleich zur Peakhöhe (Signal SIM-Spur) von mitgemessenen Standardsubstanzen (5 μ M) abgeschätzt wurden. Dabei wurden 5 Stufen definiert: 0 für kein Signal, 1 für Signale größer als Signal-Rauschverhältnis 3:1 (LOD), 2 für Signale größer als Signal-Rauschverhältnis 6:1, 3 für Signale gleich oder höher als Signal der entsprechenden Standardsubstanz und 4 für Signale, die mindestens die doppelte Höhe des Signals der entsprechenden Standardsubstanz aufwiesen. Um sicherzustellen, dass keine messtechnischen Fehler auftraten, wurde die Signalthöhe des internen Standards für jede Messung überprüft. Zu beachten ist, dass bei der Abschätzung der Signalthöhen keine Verdünnungsfaktoren oder Einwaagen einbezogen werden können, weshalb diese bei der Interpretation der erhaltenen Oligosaccharidprofile berücksichtigt werden müssen. Details hierzu werden bei der Diskussion der Ergebnisse erläutert (vgl. Kapitel 4.5.2.2 und 4.6.2.2).

In der Literatur sind Studien beschrieben, in denen die Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern untersucht wurden (Morgan *et al.*, 2021a; Kim *et al.*, 2022). Ebenfalls beschrieben sind Untersuchungen, bei denen gezielt die (A)XOS in solchen Proben analysiert wurden (Dale *et al.*, 2020; Morgan *et al.*, 2020; Kouzounis *et al.*, 2022a; Morgan *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2023; vgl. Tabelle 5, Kapitel 4.4). Es konnte jedoch keine Studie gefunden werden, in der die Oligosaccharide in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel so umfassend analysiert wurden, wie es mit der hier beschriebenen HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode zur parallelen Erfassung von 44 Oligosacchariden möglich ist.

4.5 Untersuchung der Ileumproben

Die Ileumproben wurden extrahiert und aufgereinigt wie in Kapitel 3.4 und den darauffolgenden Unterkapiteln beschrieben. Eine Übersicht des Vorgehens bei der Aufarbeitung der Proben sowie den erhaltenen Fraktionen und den durchgeführten Analysen ist in Abbildung 12 (Kapitel 3.4.2) und Tabelle 1 (Kapitel 3.4.5) dargestellt. Grundsätzlich wurden die Proben (biologische Replikate) in Einfachbestimmung analysiert und gegebenenfalls bei Auffälligkeiten durch Wiederholung der Analyse abgesichert. Vorversuche ergaben, dass die Reproduzierbarkeit der HPAEC-Messungen hoch ist (Standardabweichungen kleiner 5 %, $n = 3$) und das Mitführen von internen Standards ermöglicht es, bei entsprechender Auswertung fehlerhafte Messungen zu erkennen und systembedingte Messungenauigkeiten auszugleichen.

4.5.1 Freie Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie

Die Ergebnisse der Analyse der freien Monosaccharide und RFO in den Ileumproben von Tag 21 sind in Abbildung 20 gezeigt. Im oberen Diagramm sind die Daten der Proben des Basisfutters Mais 3 abgebildet, im unteren die zu Basisfutter Mais 4. Von links nach rechts sind die Proben der Futtervarianten Kon, Xyla und X+X aufgeführt.

Die Proben enthalten die freien Monosaccharide Glucose, Galactose und kleine Mengen Arabinose. Bei der Einordnung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine Momentaufnahme eines dynamischen Systems handelt. Im Ileum findet zeitgleich der enzymatische Abbau der Kohlenhydrate und die Resorption der freigesetzten Monosaccharide statt. Freie Glucose wurde in allen Proben mit durchschnittlich $5,3 \pm 1,5$ mg/g gefriergetrocknetem Ileuminhalt (Durchschnitt aller Mais-3- und Mais-4-Proben) bestimmt. Freie Galactose konnte in allen Proben nachgewiesen werden, wobei die Mengen zwischen den Proben schwanken. Im Durchschnitt wurden $1,0 \pm 1,1$ mg/g freie Galactose ermittelt. Die Werte der freien Arabinose lagen durchschnittlich bei $0,1 \pm 0,0$ mg/g. Es sind keine Unterschiede zwischen den beiden Basisfuttersorten Mais 3 und Mais 4 oder den Futtervarianten in Bezug auf die vorkommenden freien Monosaccharide ersichtlich.

In allen Ileumproben von Tag 21 konnten die drei analysierten RFO nachgewiesen werden. In den höchsten Mengen mit durchschnittlich $17,1 \pm 4,1$ mg/g wurde Stachyose bestimmt, gefolgt von Raffinose ($7,6 \pm 1,8$ mg/g) und Verbascose mit den geringsten Gehalten ($1,3 \pm 0,2$ mg/g). Dies entspricht der Reihenfolge, in denen diese RFO in Soja vorkommen. Die Stachyosegehalte sind bei den Ileumproben von Mais 3 (Durchschnitt $17,7 \pm 4,5$ mg/g) etwas höher als die der Mais-4-Proben (Durchschnitt $16,5 \pm 3,7$ mg/g), wobei die Unterschiede nicht signifikant ($\alpha = 0,05$) sind und nicht mit den geringfügig unterschiedlichen RFO-Mengen in den Basisfuttermitteln korrelieren. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, enthielten die Basisfuttermischungen unterschiedliche Anteile der Sojakomponenten und wie in Kapitel 4.2.1 erläutert, wurden für die Sojaprobe unterschiedliche Mengen an RFO festgestellt. Wird beides berücksichtigt, enthielt Basisfutter Mais 3 geringfügig

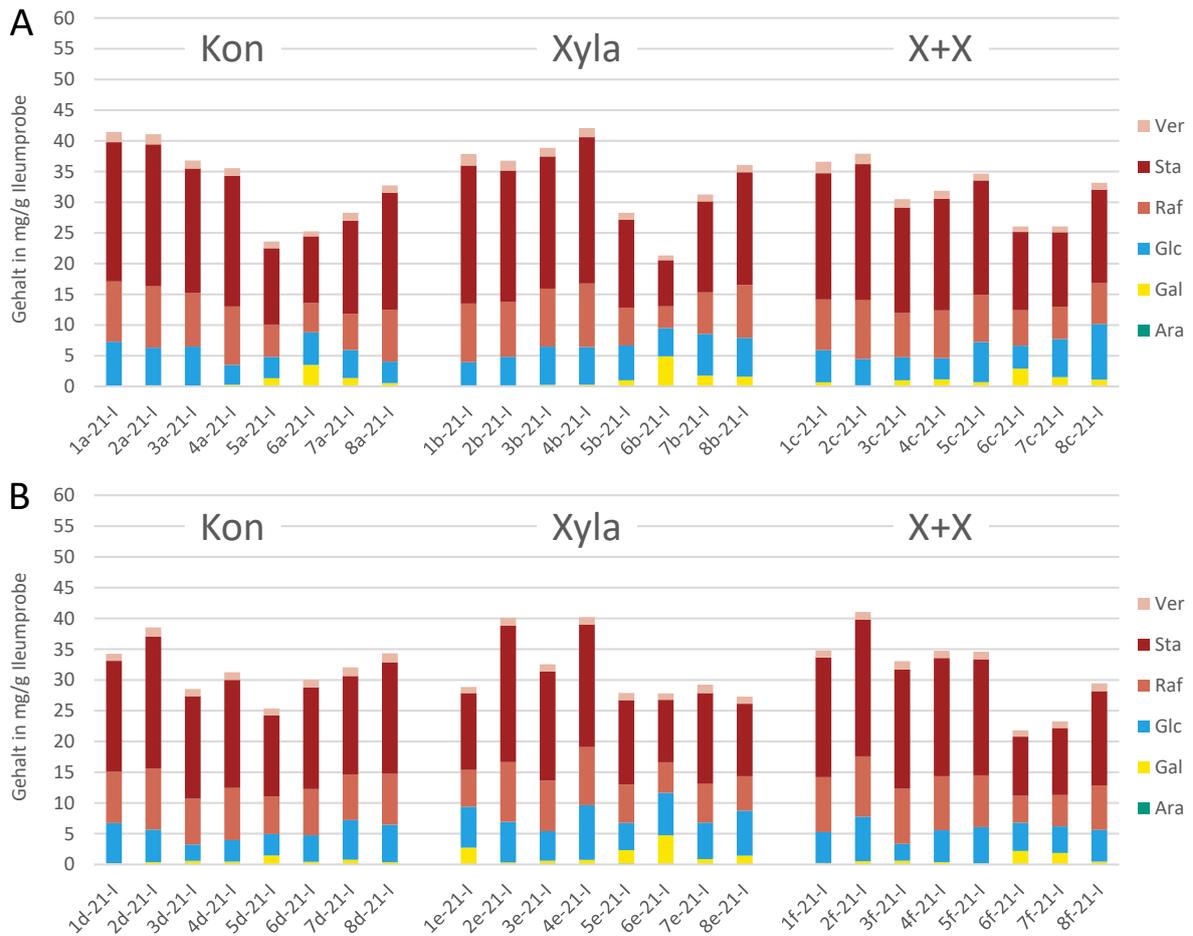


Abbildung 20: Gehalte der freien Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie in den Ileumproben nach 21 Tagen Fütterung (mg/g Ileumprobe, n = 1). Proben Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); jeweils drei Futtermittelsvarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X) (Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Raf: Raffinose, Sta: Stachyose, Ver: Verbascose)

weniger RFO als Basisfutter Mais 4 und nicht mehr, was die Ergebnisse der Ileumproben stützen würde. Weitere Unterschiede zwischen den Futtermittelsorten oder -varianten konnten nicht beobachtet werden.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Ileumproben nach 41 Tagen veranschaulicht. Es ist zu erkennen, dass sich die Zusammensetzung dieser Proben hinsichtlich der freien Monosaccharide und RFO von denen von Tag 21 in den meisten Fällen unterscheidet, wobei es einzelne Proben gibt, die die gleiche Zusammensetzung aufweisen wie die Proben von Tag 21 (markiert mit *). Außerdem gibt es eine Probe (8e-41-I, markiert mit °), die in ihrer Zusammensetzung Merkmale beider dieser Gruppen aufweist.

In den meisten der Ileumproben von Tag 41 konnten überwiegend freie Monosaccharide und kaum RFO detektiert werden. Bei diesen Proben dominiert die freie Glucose mit durchschnittlich $18,6 \pm 7,3$ mg/g (berechnet ohne auffällige Proben, s. Abbildung 21),

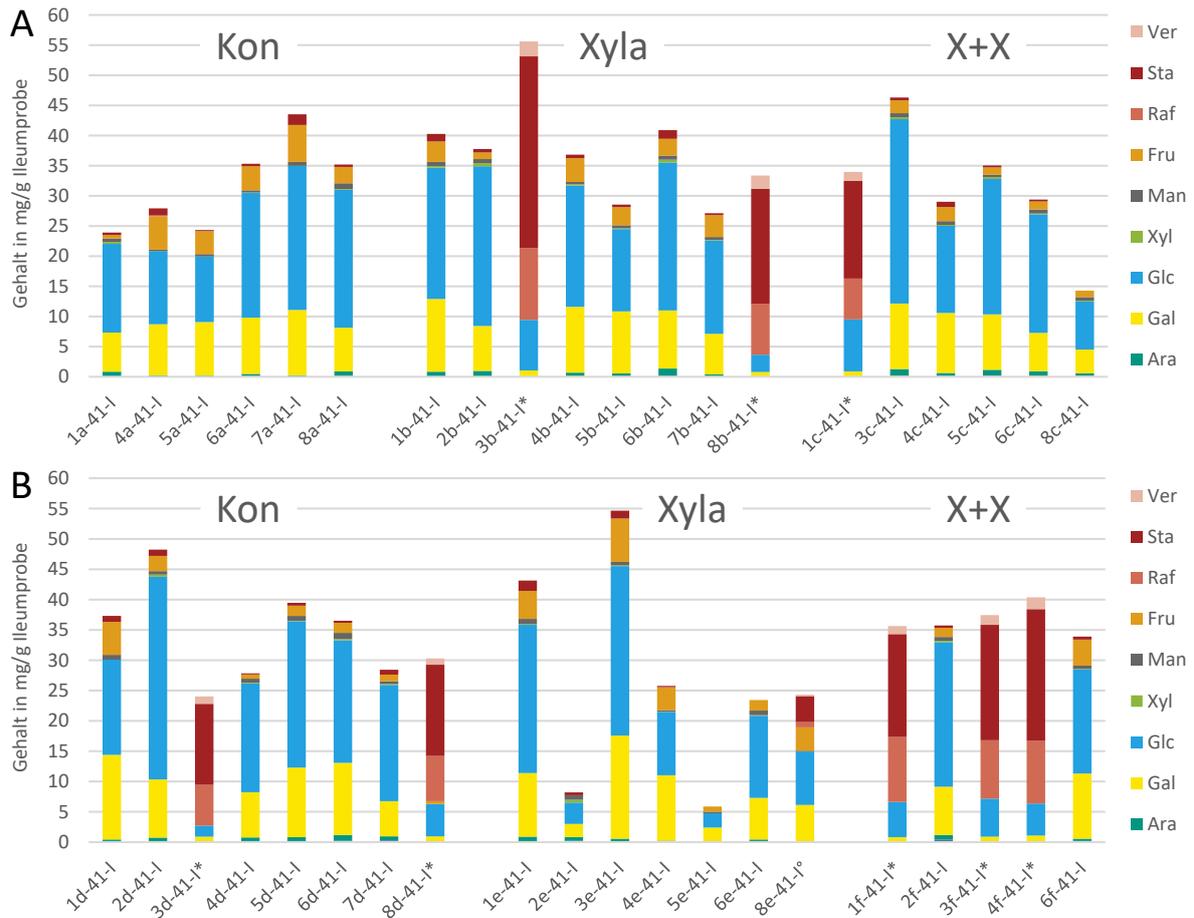


Abbildung 21: Gehalte der freien Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie in den Ileumproben nach 41 Tagen Fütterung (mg/g Ileumprobe, n = 1). Proben Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); jeweils drei Futtermittelsvarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X) (*^o auffällige Proben; Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, Fru: Fructose, Raf: Raffinose, Sta: Stachyose, Ver: Verbascose)

gefolgt von freier Galactose ($8,9 \pm 3,1$ mg/g) und freier Fructose ($2,8 \pm 1,8$ mg/g). Außerdem wurden in den meisten dieser Proben kleinere Mengen freier Arabinose ($0,6 \pm 0,3$ mg/g), Xylose ($0,2 \pm 0,1$ mg/g) und Mannose ($0,6 \pm 0,2$ mg/g) bestimmt. An RFO konnten in diesen Proben nur Stachyose in vergleichsweise kleinen Mengen ($0,6 \pm 0,5$ mg/g) nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt Probe 8e-41-I dar, es dominieren die freien Monosaccharide, jedoch wurden höhere Mengen Stachyose ($4,3$ mg/g) sowie kleine Mengen Raffinose ($0,9$ mg/g) und Verbascose ($0,2$ mg/g) festgestellt. Bei den verbleibenden, als auffällig gekennzeichneten Proben wurden mehr RFO als freie Monosaccharide ermittelt. Sie ähneln in ihrer Zusammensetzung den Ileumproben von Tag 21. Neben den RFO konnten an freien Monosacchariden nur freie Glucose in größeren Mengen sowie freie Galactose und Arabinose in kleineren Mengen bestimmt werden. Die restlichen Monosaccharide waren nicht bestimmbar. Es konnten auch bei den Tag-41-Proben keine Unterschiede hinsichtlich der Futtersorten oder -varianten festgestellt werden und die auffälligen Proben weisen eine zufällige Verteilung über den gesamten Probensatz auf.

Kouzounis und Mitarbeitende (2022a) haben die freien Monosaccharide in Proben aus den einzelnen Abschnitten des gesamten Verdauungstrakts von Broilern, die mit Weizen-Soja-basiertem Futter und Xylanasezusatz gefüttert wurden, analysiert. Sie konnten nach 28 Tagen im Ileuminhalt geringe Mengen freier Arabinose sowie größere Anteile an freier Glucose, Galactose und Fructose, den monomeren Bausteinen der RFO, feststellen. Freie Xylose, Mannose, Fucose und Rhamnose wurden weder in der Kontrollgruppe noch in der Gruppe mit Xylanasezusatz detektiert. Zhang und Mitarbeitende (2014) haben ebenfalls die frei vorliegenden Monosaccharide im Verdauungstrakt von Broilern untersucht. In dieser Studie wurden die Broiler mit Futter auf Weizen-Mais-Soja-basis mit Xylanasezusatz gefüttert. In den Ileumproben nach 21 Tagen konnten in dieser Studie Glucose und Mannose als dominierende freie Monosaccharide festgestellt werden, gefolgt von freier Arabinose in kleinen Mengen und freier Galactose sowie Ribose in sehr geringen Mengen. Außerdem waren in dieser Veröffentlichung Unterschiede im Gehalt der freien Monosaccharide zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Xylanasezusatz zu beobachten. In der Kontrollgruppe waren geringere Mengen an freier Arabinose, Xylose und Glucose festzustellen als in der Gruppe mit Enzymzusatz. Dies deutet auf einen Abbau von Arabinoxylanen durch die zugegebene Xylanase hin. Die beiden vorgestellten Studien waren ähnlich aufgebaut, unter anderem mit Weizen als Hauptbestandteil des Futters, und dennoch wurden verschiedene freie Monosaccharide nachgewiesen und unterschiedliche Einflüsse der zugegebenen Xylanase festgestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die Proben von Tag 21 decken sich mit keiner der beiden Studien. Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten unter anderem die verschiedenen Aufarbeitungs- und Analysemethoden sein (vgl. Tabelle 5, Kapitel 4.4). Für den späteren Zeitpunkt wurden in der Literatur keine Daten für einen Vergleich gefunden. Ebenfalls bisher nicht beschrieben ist die Analyse von RFO in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern. In einer Studie wurde der Gesamtgehalt an Oligosacchariden im Ileum von Broilern (Mais-Soja-basiertes Futter) bestimmt (nach Hydrolyse mit GC). Die Gehalte lagen bei 24,4 mg/g Trockenmasse für Tag 12 und bei 24,5 mg/g für Tag 35 (Kim *et al.*, 2022). Werden die in dieser Arbeit ermittelten durchschnittlichen Gehalte der RFO der Tag-21-Ileumproben aufsummiert, liegt der RFO-Gehalt dieser bei 26,0 mg/g. Die RFO sind zwar eine der dominierenden Oligosaccharidgruppen in diesen Proben, allerdings wurden noch weitere Oligosaccharide in größeren Mengen nachgewiesen (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Demnach sind die Oligosaccharidgehalte der hier untersuchten Proben von Tag 21 höher als die in der Literaturstelle angegebenen Werte.

Die Beobachtung, dass bei einem Großteil der hier untersuchten Ileumproben von Tag 41 kaum RFO und dafür große Mengen der monomeren Abbauprodukte bestimmt wurden, legt nahe, dass entsprechende Enzyme zu diesem Zeitpunkt im Ileum der meisten Tiere vorhanden waren. Im Verdauungstrakt von Hühnern kommt lediglich Invertase vor, aber keine körpereigenen Enzyme mit einer α -Galactosidaseaktivität (vgl. Kapitel 1.3.2). Für den vollständigen Abbau von RFO zu Galactose, Glucose und Fructose werden jedoch beide Enzyme benötigt. Die Ergebnisse der Proben von Tag 21 zeigen, dass die RFO zu

diesem früheren Zeitpunkt noch in den Proben vorhanden sind und demnach nicht abgebaut werden konnten. Die Analyse des Oligosaccharidprofils mit der HPAEC-PAD/MS-Methode ergab, dass in diesen Proben ebenfalls große Mengen der Invertase-abbauprodukte der RFO nachgewiesen werden konnten, was durch die Anwesenheit der körpereigenen Invertase erklärt werden kann (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Unter der Annahme, dass im Ileum nur körpereigene Enzyme vorkommen, entsprechen die RFO-Analyseergebnisse der Tag-21-Proben den erwarteten Ergebnissen. Es ist anzunehmen, dass die freie Glucose in diesen Proben unter anderem aus dem Abbau der Stärke stammt und noch nicht vollständig resorbiert wurde. Die freie Galactose kann mehrere Ursprünge haben und die freie Arabinose wurde möglicherweise im Magen durch saure Hydrolyse aus Arabinoxylanen oder Arabinanen freigesetzt.

Die Ergebnisse der Proben von Tag 41 weisen darauf hin, dass zu diesem späteren Zeitpunkt bei den meisten dieser Broiler Mikroorganismen im Ileum vorkamen, die α -Galactosidasen produzieren können. Eine plausible Erklärung dafür wäre der in der Literatur diskutierte *Reflux* (Rücktransport von Darminhalt aus dem Enddarm in den Dünndarm, vgl. Kapitel 1.3.1). Dadurch könnten Mikroorganismen aus den Caeca in das Ileum gelangen. Wie in Kapitel 1.3.3 und den zugehörigen Unterkapiteln ausführlich beschrieben, weisen die Mikroorganismen in den Caeca andere Eigenschaften auf als die im Ileum und sind durch die Produktion unterschiedlicher Enzyme in der Lage verschiedenste glykosidische Bindungen zu spalten. Dadurch könnte auch erklärt werden, warum die Ileumproben, die kaum RFO enthalten, eine höhere Anzahl verschiedener freier Monosaccharide aufweisen als die Proben, die größere Mengen an RFO aufweisen. Die Mikroorganismen in diesen Proben waren nicht nur in der Lage durch entsprechende Enzyme RFO zu spalten, sondern produzierten ebenfalls Enzyme zum Abbau verschiedener Polysaccharidstrukturen. Demnach legen die Analyseergebnisse nahe, dass sich das Mikrobiom im Ileum zwischen Tag 21 und Tag 41 verändert, wobei die Veränderung bei manchen Tieren an Tag 41 noch nicht eingetreten war, weshalb diese Proben in der Zusammensetzung der freien Monosaccharide und RFO mit den Proben von Tag 21 vergleichbar sind. Damit wären diese Beobachtungen tierindividuelle Effekte.

Nicht schlüssig an dieser Theorie ist, dass es sich bei den einzelnen Proben von Tag 41 um gepoolte Proben zweier Tiere aus demselben Käfig handelt (vgl. Kapitel 3.1). Rein statistisch ist es unwahrscheinlich, dass immer zufällig zwei Tiere mit einem vergleichbaren „Mikrobiomstatus“ gepoolt wurden. Es wäre zu erwarten, dass es mehr Proben gibt, die auf eine Mischung beider Varianten hindeuten, also sowohl freie Monosaccharide als auch RFO aufweisen, wie es bei Probe 8e-41-I der Fall ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich die Zusammensetzung der Proben nach der Probennahme verändert hat. Angenommen eine Probe mit ursprünglichem Ileummikrobiom (keine Enzyme z. B. zum Abbau von RFO) und eine Probe mit verändertem Mikrobiom (mit entsprechenden mikrobiellen Enzymen) werden nach der Probennahme zusammengegeben und durchmischt, dann könnten die Enzyme aus der einen Probe die RFO in der anderen Probe zu Monosacchariden abbauen und in der Probe wären überwiegend Monosaccharide nachweisbar, obwohl

ursprünglich nur in einer der beiden Proben die entsprechenden Enzyme bzw. Mikroorganismen vorhanden waren. Werden zwei Proben mit ursprünglichem Mikrobiom (ohne die entsprechenden Enzyme) zusammengegeben, dann würde sich die Zusammensetzung nicht verändern. Dadurch könnten die Ergebnisse erklärt werden, jedoch wäre, neben entsprechenden Enzymaktivität und ausreichender Homogenisierung der Probe, eine Voraussetzung, dass die Zeitspanne zwischen Probennahme bzw. -durchmischung und vollständigem Gefrieren der Probe ausreichend war für diese Prozesse. Die Proben wurden nach der Entnahme durchmischt und direkt auf Trockeneis gelagert (vgl. Kapitel 3.1). Demnach wurde die kritische Zeitspanne bei der Probennahme so kurz wie möglich gehalten. Anschließend wurden die Proben bis zum Gefriertrocknungsprozess gefroren gelagert und beim ersten Schritt der Extraktion der Oligosaccharide eine Inaktivierung der Enzyme sichergestellt (vgl. Kapitel 4.3.2.1). Zur Aufklärung, ob dieser Erklärungsansatz zutrifft, wären Versuche mit frisch entnommenem Darminhalt notwendig. Um solche Effekte von vornherein auszuschließen, wäre es bei zukünftigen Untersuchungen dieser Art empfehlenswert nicht-gepoolte Proben für die Analyse heranzuziehen.

4.5.2 Analyse der Oligosaccharide

4.5.2.1 Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion

Die Oligosaccharidfraktion der Ileumproben wurde nach Abtrennung der freien Monosaccharide mittels nPGC-SPE mit TFA hydrolysiert und die freigesetzten Monosaccharide mittels HPAEC-PAD analysiert (vgl. Kapitel 3.4.3.2). Die Ergebnisse der Ileumproben von Tag 21 sind in Abbildung 22 in mg/g gefriergetrocknetem Ileuminhalt dargestellt. Sowohl bei den Proben von Basisfutter Mais 3 als auch Mais 4 wurden kleinere Mengen an Arabinose, Xylose und Mannose (jeweils im oberen Diagramm) sowie größere Mengen an Galactose und Glucose (jeweils im unteren Diagramm) ermittelt.

Bei Betrachtung der ermittelten Xylosegehalte fällt folgender Trend auf: Innerhalb der Proben einer Futtermittelvariante sind die Xylosegehalte ähnlich, aber zwischen den verschiedenen Futtermittelvarianten gibt es Unterschiede, die sowohl bei den Proben von Mais 3 als auch von Mais 4 auftreten. Die Kon-Gruppe weist die niedrigsten Xylosegehalte auf (Mais 3a im Durchschnitt: $0,12 \pm 0,01$ mg/g; Mais 4d: $0,12 \pm 0,02$ mg/g). In der Xyla-Gruppe sind die Mengen mehr als doppelt so hoch (Mais 3b: $0,28 \pm 0,03$ mg/g; Mais 4e: $0,32 \pm 0,05$ mg/g) und in der X+X-Gruppe liegen sie noch etwas höher als in der Xyla-Gruppe (Mais 3c: $0,35 \pm 0,03$ mg/g; Mais 4f: $0,35 \pm 0,04$ mg/g). Die statistische Auswertung (zweifaktorielle Varianzanalyse, ANOVA $\alpha = 0,05$, post-hoc Tukey-Test) der Xylosegehalte der Ileumproben von Tag 21 ergab für Mais 3 einen signifikanten Unterschied zwischen allen drei Futtermittelvariantengruppen (Kon, Xyla und X+X). Für Mais 4 sind die Unterschiede zwischen der Kon-Gruppe und den beiden Gruppen mit Xylanase (Xyla und X+X) signifikant, wobei sich die Xylosegehalte der Gruppen Xyla und X+X nicht signifikant voneinander unterscheiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Menge an aus Xylose aufgebauten Oligosacchariden im Ileuminhalt der 21-Tage-alten Broilern steigt, wenn im

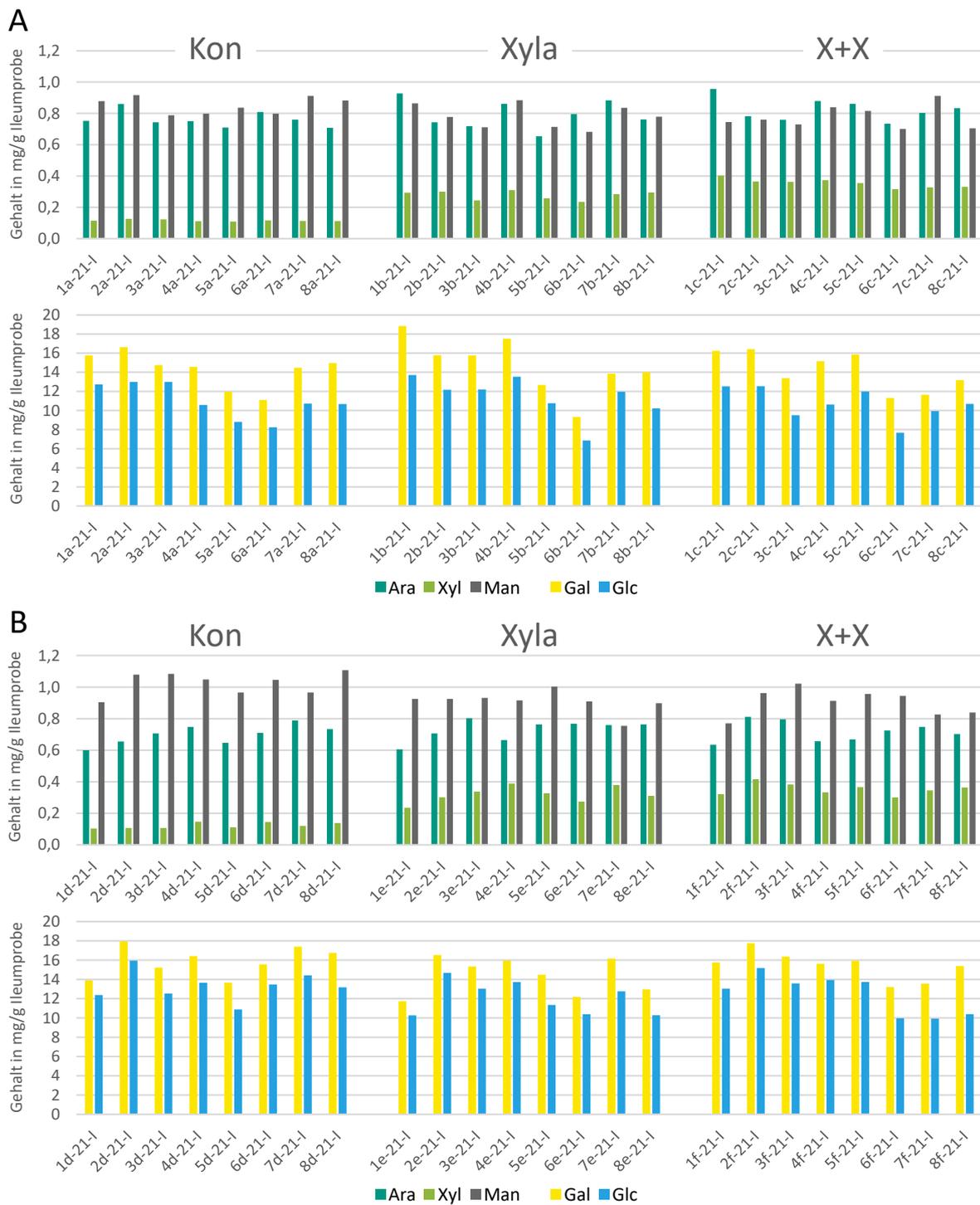


Abbildung 22: Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion der Ileumproben nach 21 Tagen Fütterung nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (mg/g Ileumprobe, n = 1). Proben Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); jeweils drei Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X); oben: Arabinose (Ara), Xylose (Xyl), Mannose (Man), unten: Galactose (Gal), Glucose (Glc)

Futter Xylanase bzw. Xylanase und XOS eingesetzt wurden. Der bedeutendere Faktor scheint die Xylanase zu sein. Die Zugabe von XOS führt lediglich zu einer kleineren Erhöhung der Xylosegehalte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die zugegebenen XOS-Mengen sehr gering waren und als Präbiotika bzw. Stimbiotika erst im Caecum wirken (vgl. Kapitel 1.4.4). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Maissorte einen Einfluss auf den Effekt der Xylanase haben könnte, wobei der grundsätzliche Trend der gleiche ist, unabhängig von der Maissorte, und sich die Xylosegehalte der Gruppen mit dem größten Unterschied (Xyla-Mais 3 (b) und Xyla-Mais 4 (e)) nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Bei allen anderen bestimmten Monosacchariden ist kein Zusammenhang zwischen den ermittelten Gehalten der Monosaccharide und den Futtermitteln zu beobachten. Zwischen den Futtermitteln treten unabhängig von der Futtermittelvariante kleinere Unterschiede auf: Arabinose kommt in den Mais-3-Proben im Durchschnitt in etwas größeren Mengen vor als bei Mais-4-Proben. Mannose, Galactose und Glucose kommen hingegen in Proben zu Mais 4 in geringfügig höheren Mengen vor. Hinsichtlich der Gehalte an Arabinose, Glucose und Mannose sind diese Unterschiede statistisch signifikant, bei Galactose nicht ($\alpha = 0,05$). Die durchschnittlichen Gehalte sind in Tabelle A12 (Kapitel 9.2) aufgeführt. Da die Arabinose mit durchschnittlich $0,75 \pm 0,08$ mg/g (Proben Mais 3 und Mais 4) in deutlich höheren Mengen als die Xylose vorkommt und kein Zusammenhang in Bezug auf die Futtermittelvarianten mit Xylanasezugaben festgestellt wurde, wird vermutet, dass sie nicht oder nur zum Teil als Seitenkette von AXOS vorliegt und zusätzlich aus einer anderen Oligosaccharidgruppe stammt. Die vergleichsweise hohen Gehalte an Glucose ($11,8 \pm 2,0$ mg/g) und Galactose ($14,8 \pm 2,0$ mg/g) können auf die bereits identifizierten RFO und deren Invertaseabbauprodukte zurückgeführt werden, außerdem könnten sie beispielsweise aus COS, MalOS oder Galactan oligosacchariden freigesetzt worden sein. Weitere Details hierzu werden nach Vorstellung der Ergebnisse des Oligosaccharidprofils in Kapitel 4.5.2.2 diskutiert. Fructose, neben Galactose und Glucose der dritte monomere Baustein der RFO, ist säurelabil und wird während der TFA-Hydrolyse zerstört, weshalb sie mit dieser Methode nicht bestimmt werden kann.

Bei der TFA-Hydrolyse besteht grundsätzlich ein Gleichgewicht zwischen Spaltung der glykosidischen Bindung zur Freisetzung der Monosaccharide und Zerstörung bzw. Abbau der freigesetzten Monosaccharide. Demnach ist der ermittelte absolute Gehalt der Monosaccharide nach saurer Hydrolyse grundsätzlich niedriger als der Gehalt an tatsächlich in der Probe vorhandenen monomeren Bausteinen. Diese sind entweder noch glykosidisch gebunden oder wurden weiter abgebaut. In beiden Fällen werden sie nicht als Monosaccharide detektiert. Um diese Verluste während der Hydrolyse besser einschätzen zu können und so den Gehalt der in den Proben tatsächlich enthaltenen Oligosaccharide einordnen zu können, wurden Versuche mit Standardsubstanzen durchgeführt, bei denen die Wiederfindung der monomeren Bestandteile der Oligosaccharide nach TFA-Hydrolyse bestimmt wurde. Diese lag für alle getesteten Oligosaccharide (X₃, X₆, C₄, Raffinose und Stachyose) bei ca. 80 %. Demnach kann für eine grobe Abschätzung der Oligosaccharid-

gehalte auf Grundlage der Monosaccharidbestimmung angenommen werden, dass durch die TFA-Hydrolyse etwa 20 % der in der Probe enthaltenen gebundenen Monosaccharide nicht erfasst wurden. Bei der Abschätzung der Oligosaccharidgehalte ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass bei der Hydrolyse formal ein Wassermolekül addiert wird, so weisen beispielsweise zwei Xylosemoleküle eine molare Masse von 300 g/mol (2×150 g/mol) auf, wohingegen die molare Masse von X_2 bei 282 g/mol liegt. Für die Berechnung des ungefähren XOS-Gehalts in den Ileumproben von Tag 21 wurden folgende Annahmen getroffen: Die gesamte Menge der in der Monosaccharidanalyse bestimmten Xylose stammt aus XOS; der Verlust durch die Hydrolyse liegt bei 20 %; der Verlust durch die SPE wird nicht berücksichtigt; X_2 , X_3 und X_4 sind die dominierenden XOS und kommen in ähnlichen Anteilen vor (vgl. Kapitel 4.5.2.2), weshalb die XOS-Gehalte als X_3 abgeschätzt werden (Faktor 0,92). Damit ergeben sich für die Proben von Mais 3 bzw. Mais 4 ein ungefährender XOS-Gehalt von 0,14 mg/g gefriergetrocknete Ileumprobe für die Kon-Gruppen, 0,32 bzw. 0,37 mg/g für die Xyla-Gruppen und 0,41 mg/g für die X+X-Gruppen.

Dale und Mitarbeitende (2020) haben den Gehalt an XOS (DP 2 - 4) im Verdauungstrakt von Broilern (Futter auf Weizen-Soja-basis, Tag 26) analysiert (HPAEC-PAD). Sie fanden in Ileumproben der Kontrollgruppe einen XOS-Gehalt von etwa 3,4 mg/g Trockenmasse, in der Gruppe mit Xylanasezusatz etwa 4,0 mg/g. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren damit weniger markant, als bei den hier ermittelten Ergebnissen. Jedoch sind die Mengen im Vergleich deutlich höher. Eine Erklärung hierfür ist, dass Weizen und nicht Mais als Futtermittel eingesetzt wurde und anzunehmen ist, dass die Arabinoxylane aus Weizen besser für den enzymatischen Abbau zugänglich sind (Kouzounis *et al.*, 2021; Dale *et al.*, 2023), allerdings wäre dann eine größere Differenz zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Xylanase zu erwarten. Ebenfalls anzumerken ist, dass nicht überprüft wurde, ob weitere potenziell in der Probe vorkommenden Oligosaccharide mit den XOS koeluieren und somit eine Überbestimmung denkbar wäre. Auch Wu und Mitarbeitende (2023) haben die in Ileumproben von Broilern (Mais-Weizen-Soja-basiertes Futter, Tag 21) vorkommende XOS analysiert (DP 2 - 6, HPAEC-PAD). Für die Kontrollgruppe wurden ungefähr 0,17 mg/g und für die Gruppe mit Xylanasezusatz ungefähr 0,22 mg/g Darminhalt bestimmt, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren ($\alpha = 0,05$). Auch hier ist anzumerken, dass nicht auf koeluierende Oligosaccharide geprüft wurde. Da die XOS-Gehalte nicht auf die Trockenmasse bezogen sind, ist ein Vergleich zu den in dieser Arbeit ermittelten Gehalten nicht direkt möglich. Da die XOS durch den Trocknungsprozess aufkonzentriert werden, ist jedoch davon auszugehen, dass die in der Veröffentlichung gemessenen Gehalte im Vergleich höher sind als die in dieser Arbeit ermittelten. Morgan und Mitarbeitende (2020; 2022) haben ebenfalls XOS in Ileumproben bestimmt (HPLC als PMP-Derivate), allerdings sind die angegebenen Werte auf einen zum Futter zugegebenen Marker (TiO_2) bezogen, weshalb ein Vergleich der absoluten XOS-Gehalte nicht möglich ist.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Ileumproben von Tag 41 gezeigt. Gekenn-

zeichnet (*^o) sind die Proben, die bei der Analyse der freien Monosaccharide und RFO auffällig waren (vgl. Kapitel 4.5.1), weil sie vergleichsweise hohe Gehalte an RFO enthielten und damit eine ähnliche Zusammensetzung wie die Proben von Tag 21 aufwiesen. Wie erwartet, fallen diese Proben auch bei der monomeren Zusammensetzung der Oligosaccharide auf, da sie entsprechend höhere Gehalte an Galactose ($13,9 \pm 2,1$ mg/g Ileumprobe) und Glucose ($12,0 \pm 2,0$ mg/g) im Vergleich zu den anderen Proben enthalten. Bei den restlichen Proben liegt der Gehalt an Galactose im Mittel bei $2,8 \pm 1,3$ mg/g Ileumprobe und an Glucose bei $3,4 \pm 1,2$ mg/g.

Bei den Proben von Tag 41 sind keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen Futtervariante und den bestimmten Mengen der aus Oligosacchariden stammenden Monosacchariden zu erkennen. Werden nur die als auffällig gekennzeichneten Proben des Proben-satzes von Basisfutter Mais 4 betrachtet (3d-, 8d-, 1f-, 3f- und 4f-41-I*), weisen die Xylosegehalte den gleichen Trend auf, der bei den Tag-21-Proben beobachtet wurde: Die Probe 3d und 8d aus der Kon-Gruppe weisen einen niedrigen Gehalt an Xylose auf ($0,10 \pm 0,00$ mg/g) und die Proben 1f, 3f und 4f aus der X+X-Gruppe einen fast dreifach so hohen Gehalt ($0,29 \pm 0,05$ mg/g).

Bei den nicht als auffällig markierten Tag-41-Proben ist ein solcher Zusammenhang nicht zu beobachten (Mittelwerte s. Tabelle A13, Kapitel 9.2). Die Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide deuten, wie bei der Analyse der freien Monosaccharide und RFO bereits erläutert, darauf hin, dass in diesen Ileumproben eine andere Zusammensetzung der Mikroorganismen vorliegt und diese in der Lage sind Enzyme zum Abbau von RFO und NSP zu produzieren. Bei den nicht markierten Ileumproben von Tag 41 wurden höhere Gehalte an Arabinose (durchschnittlich $1,43 \pm 0,43$ mg/g), Xylose ($0,41 \pm 0,20$ mg/g) und Mannose ($1,15 \pm 0,17$ mg/g) festgestellt als bei den Proben von Tag 21 sowie geringe Mengen an Fucose ($0,10 \pm 0,04$ mg/g, nicht im Diagramm gezeigt). Dies lässt darauf schließen, dass die Mengen an Oligosacchariden, aufgebaut aus den zuvor genannten Monosacchariden, in den Proben höher sind als in denen von Tag 21. Dies kann durch die Anwesenheit von mikrobiellen NSPasen erklärt werden, die die entsprechenden Polysaccharide aus dem Futter zu Oligosacchariden abgebaut haben. Fucose kann zudem Teil bakterieller Oligosaccharide sein. Damit kann auch erklärt werden, warum die Ergebnisse dieser Proben eine höhere Streuung aufweisen. Wie in Kapitel 1.3.3.1 beschrieben, kann die Zusammensetzung des Mikrobioms, insbesondere im Caecum, von Tier zu Tier sehr variieren, weshalb anzunehmen ist, dass in jeder Probe unterschiedliche Enzyme in unterschiedlichen Mengen vorkommen. Zusätzlich werden die Oligosaccharide von den Mikroorganismen verstoffwechselt, weshalb es sich um ein dynamisches System handelt, in dem gleichzeitig Oligosaccharide freigesetzt und abgebaut werden. Eine Erklärung dafür, warum bei diesen Ileumproben keine Unterschiede zwischen den Futtervarianten zu beobachten sind, ist, dass die Mikroorganismen selbst Xylanasen produzieren können und somit die Anwesenheit der exogenen Xylanase eine

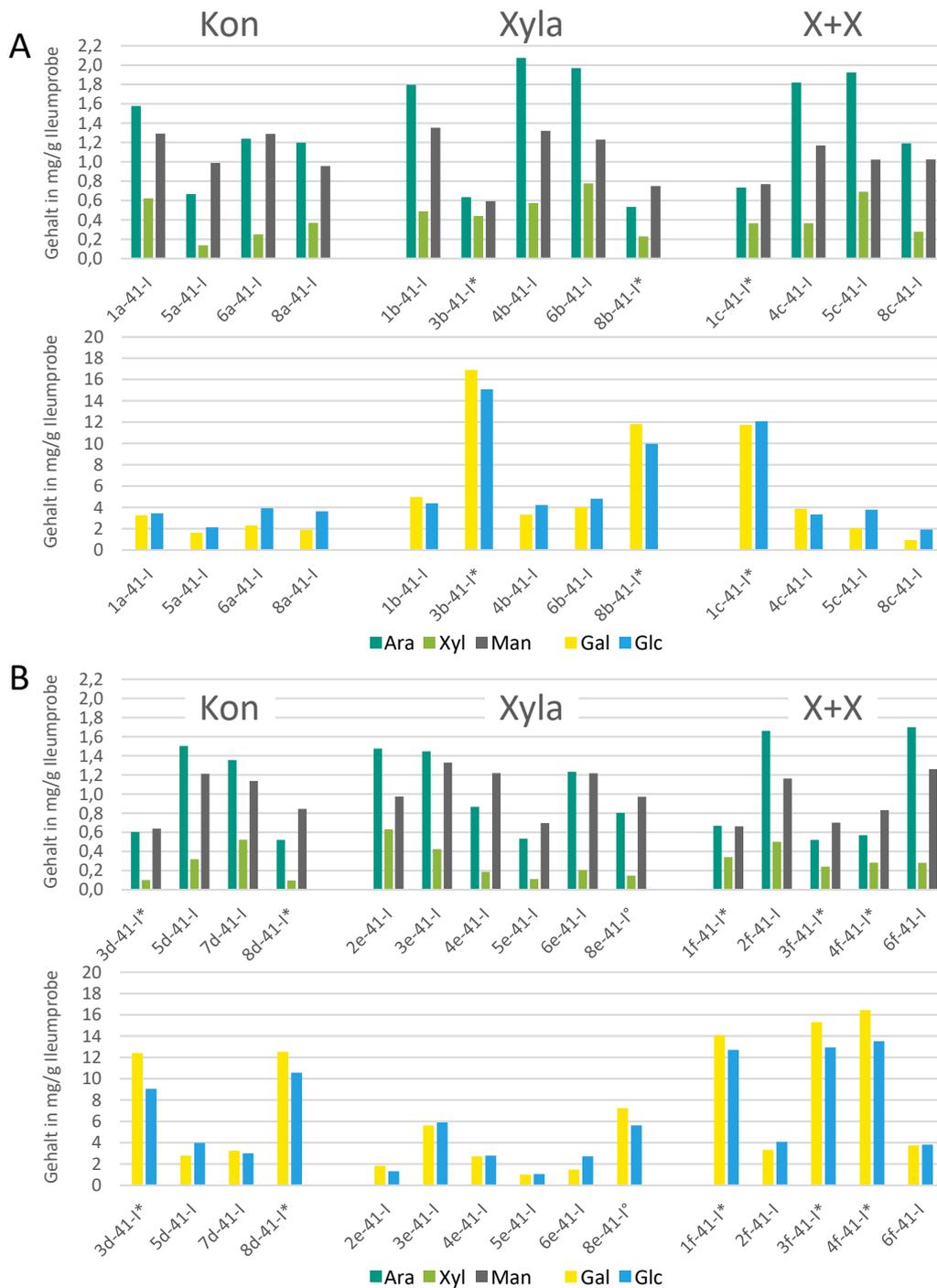


Abbildung 23: Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Ileumproben nach 41 Tagen Fütterung nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (mg/g Ileumprobe, n = 1). Proben Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); jeweils drei Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X); oben: Arabinose (Ara), Xylose (Xyl), Mannose (Man), unten: Galactose (Gal), Glucose (Glc) (*^o: auffällige Proben, vgl. Abbildung 21)

untergeordnete Rolle spielt. Diese Zusammenhänge werden anhand des bestimmten Oligosaccharidprofils noch deutlicher und werden daher im nächsten Kapitel weiter ausgeführt.

4.5.2.2 Oligosaccharidprofile der Ileumproben

Die Oligosaccharidprofile der Oligosaccharidfraktionen der Ileumproben wurden nach Abtrennung der freien Monosaccharide mittels nPGC-SPE mit der in Kapitel 3.4.3.3 beschriebenen HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode bestimmt. Die Ergebnisse der Ileumproben nach 21 Tagen der Mais-3-Proben sind in Abbildung 24 gezeigt. Die Ergebnisse der Proben von Basisfutter Mais 4 weisen große Ähnlichkeit zu denen von Mais 3 auf und sind in Abbildung A16 (Kapitel 9.1) einzusehen. Die Auswertung ist in Kapitel 4.4.4 ausführlich erläutert. Die Einwaage (100 ± 5 mg) und der Verdünnungsfaktor (1:20) waren für alle Tag-21-Ileumproben gleich und müssen daher bei der Interpretation dieser Daten nicht weiter berücksichtigt werden.

Ileum Mais 3 Tag 21 (x-21-l)	Xylo-OS					Arabinoxylo-OS					AX-SK		RFO & RFO- Abbauprodukte			Cello-OS			Malto-OS			Manno-OS					Arabinan-OS					Galactan-OS																			
	X2	X3	X4	X5	X6	A ² XX	A ³ X	XA ² XX	XA ³ XX	A ²⁺³ XX	XA	AX	Sac	Raf	Sta	Gal+Glc	2Gal+Glc	3Gal+Glc	C2	C3	C4	Mal2	Mal3	Mal4	Man2	Man3	Man4	Man5	A-2b	A-2a	A-3a	A-3b	G-2c	G-2b	G-2a	G-3c	G-3b	G-4a													
Kontrolle	1a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0						
	2a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	3	4	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
	3a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	2	1	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
	4a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
	5a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	3	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
	6a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
	7a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
	8a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	4	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
Xylanase	1b	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	4	2	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0				
	2b	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	2	4	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
	3b	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
	4b	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	3	4	2	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
	5b	2	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
	6b	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	3	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
	7b	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	4	4	3	4	2	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0			
	8b	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	4	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Xylanase + Xylo-OS	1c	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
	2c	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	2	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	3c	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	4c	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	3	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	5c	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	6c	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	7c	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	8c	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	3	4	4	3	4	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0

Abbildung 24: Ermittelte Oligosaccharid (OS)-Profile der Ileumproben nach 21 Tagen Fütterung (Basisfutter Mais 3) bestimmt mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. 0 - 4: zunehmende Menge an OS (0: nicht detektierbar bis 4: Signal der Probe mindestens 2-mal höher als Vergleichssignal der Standardsubstanzmessung (5 μM)), nicht aufgeführte OS wurden nicht detektiert, C3 und G-3a koeluiieren: hier als C3 angegeben (AX-SK: Arabinoxy-lanseitenketten, RFO: OS der Raffinose-Familie)

Die Ergebnisse der Oligosaccharidprofile bestätigen die bisherigen Erkenntnisse und liefern Details zur Identität der vorhandenen Oligosaccharide. Wie schon bei der Monosaccharidanalyse der Oligosaccharidfraktionen der Ileumproben von Tag 21 beobachtet, weisen die Proben der Xyla- und X+X-Gruppen höhere Gehalte an aus Xylose aufgebauten Oligosacchariden auf als die der Kon-Gruppe. Die Ergebnisse in Abbildung 24 (Mais 3) und auch in Abbildung A16 (Kapitel 9.1, Mais 4) zeigen, dass überwiegend X₂, X₃ und X₄ in diesen Proben vorkommen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die bei der Charakterisierung der eingesetzten Xylanase gemacht wurden (vgl. Kapitel 4.3.2.3). Längere XOS und erwartete AXOS (z. B. XA³XX) wurden nicht detektiert. Ebenfalls nicht detektiert wurden Arabinoxylanseitenketten aus zwei Monosacchariden. Bei der Bestimmung der freien Monosaccharide (vgl. Kapitel 4.5.1) konnten geringe Mengen freier Arabinose festgestellt werden, die möglicherweise aus den Seitenketten des Arabinoxylans stammen und durch die sauren Bedingungen im Magen abgespalten wurden. Dadurch könnte die Zugänglichkeit des Xylanrückgrats für die Xylanase erhöht worden sein. Die Charakterisierung der Maissorten ergab, dass im UZM FA in etwa fünffach höheren Mengen vorkommt als FAX (vgl. Kapitel 4.1.2). Demzufolge wäre es denkbar, dass die Mengen an (F)AX in den Proben zu gering waren, um analytisch erfasst werden zu können. Die Proben wurden zusätzlich stichpunktartig mittels HPLC-DAD/MS auf FA analysiert, jedoch waren die Ergebnisse aufgrund zu hoher Einflüsse der Matrix nicht aussagekräftig. Mit den vorliegenden Daten kann nicht abschließend geklärt werden, ob Seitenketten des Arabinoxylans im Magen abgespalten werden. Zur Aufklärung dieser Fragestellung sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die in der Literatur beschriebenen XOS-Profile in Ileumproben aus dem Verdauungstrakt von Broilern zeigen unterschiedliche Zusammensetzungen bezüglich der vorkommenden XOS auf. Bei den von Dale und Mitarbeitenden (2020) bestimmten XOS dominierte X₃ vor X₂, X₄ kamen in deutlich geringere Mengen vor. Die größten Anteile der bestimmten XOS in der Veröffentlichung von Wu und Mitarbeitenden (2023) wiesen X₄ und X₆ auf, X₂ und X₅ wurden in kleineren Mengen festgestellt und X₃ wurde nur in sehr geringen Mengen detektiert. Bei den beiden Studien von Morgan und Mitarbeitenden (2020; 2022) wurden jeweils ein erhöhter Gehalt an XOS festgestellt, wenn eine Xylanase zum Futter zugegeben wurde, jedoch ergaben sich unterschiedliche Muster. In der Studie von 2020 (Futter aus verschiedenen Getreidesorten mit unterschiedlichen NSP-Anteilen) stieg der Anteil des XOS mit steigendem DP und X₅ stellte das dominierende XOS dar, wobei X₃ und X₄ in ähnlichen Mengen vorlagen. In der Studie von 2022 (Futter auf Sorghum-Weizen-Soja-basis) zeigte sich ein genau umgekehrter Trend: Je kleiner der DP, desto höher der Anteil des XOS mit X₂ als dominierendem XOS. In der Studie von 2020 wurde wässrig extrahiert (8 h, 42 °C) und kein vorgeschalteter Inaktivierungsschritt erwähnt, weshalb es zu einer nachträglichen Freisetzung von XOS während der Extraktion gekommen sein könnte. Bei der Studie von 2022 wird das genaue Extraktions- und Aufbereitungsverfahren nicht erläutert, jedoch auf (Morgan *et al.*, 2020) verwiesen. Festzuhalten ist, dass verschiedene Untersuchungen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Dies

wird mit den vielen in Kapitel 1.4.4 vorgestellten Einflussfaktoren auf die Freisetzung von XOS im Verdauungstrakt zusammenhängen (Futter, Xylanaseaktivität etc.), aber auch teilweise auf die unterschiedlichen Analyseverfahren zurückzuführen sein.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Oligosaccharidprofile der Ileumproben von Tag 21 (s. Abbildung 24) bestätigen, dass, wie bereits angenommen, die RFO sowie deren Invertaseabbauprodukte die mengenmäßig dominierenden Oligosaccharide in diesen Proben sind. Die Analyse der RFO ergab Stachyosegehalte von 17,1 mg/g gefriergetrockneter Ileumprobe (vgl. Kapitel 4.5.1), die Hochrechnung der XOS-Gehalte ergab für die Proben der X+X-Gruppe mit dem höchsten Gehalt 0,4 mg/g Ileumprobe (vgl. Kapitel 4.5.2.1). Ebenfalls nachgewiesen wurden bei der Bestimmung der Oligosaccharidprofile die MalOS Mal₂ und Mal₃ zum Teil in größeren Mengen. Demzufolge stammt die bei der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen festgestellte Glucose nicht ausschließlich aus den RFO, sondern auch zum Teil aus MalOS. COS wurden in allen Gruppen nur vereinzelt in sehr kleinen Mengen detektiert, was darauf schließen lässt, dass die Cellulasenebenaktivität der zugegebenen Xylanase (vgl. Kapitel 4.3.2.2) unter den Bedingungen im Verdauungstrakt nicht ausgeprägt ist und nicht dazu führt, dass größere Mengen COS in den Gruppen mit Xylanase freigesetzt werden. Nicht nachweisbar waren lineare ManOS sowie Arabinan oligosaccharide (DP 2 - 3). Ungeklärt bleibt damit, aus welchen Oligosacchariden die bei der Monosaccharidzusammensetzung festgestellten Anteile an Mannose und Arabinose stammen (vgl. Kapitel 4.5.2.1). Die Gehalte der beiden Monosaccharide lagen deutlich über denen der Xylose und da die XOS detektierbar waren, ist davon auszugehen, dass die Menge ausreichend für eine Detektion wäre. Dieser Argumentation folgend stammen sie aus Oligosacchariden, die nicht mit dem Profiling erfasst werden. Weiterführende Anhaltspunkte hierzu liefern die in Kapitel 4.5.2.3 ausgeführten Ergebnisse der Analyse der Bindungstypen der Oligosaccharide in den Ileumproben.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Oligosaccharidprofile der Ileumproben von Tag 41 gezeigt. Die Proben mit einer abweichenden, den Tag-21-Proben ähnelnden Zusammensetzung hinsichtlich der Analyse der freien Monosaccharide und RFO sind wieder markiert (*^o, vgl. Kapitel 4.5.1). Die Einwaage aller Proben war gleich (100 ± 5 mg); markierte Proben wurden 1:20 verdünnt, wie die Proben von Tag 21, nicht markierte wurden 1:10 verdünnt, um niederkonzentrierte Oligosaccharide besser erfassen zu können. Dies ist bei der Betrachtung der Oligosaccharidprofile zu berücksichtigen.

Die markierten Proben ähneln auch in ihren Oligosaccharidprofilen den Tag-21-Proben. Die dominierenden Oligosaccharide sind RFO und ihre Invertaseabbauprodukte, und je nach Futtervariante kommen XOS vor. Außerdem sind, neben höheren Mengen MalOS, keine oder nur geringe Mengen weiterer Oligosaccharide detektierbar. Die restlichen Ileumproben von Tag 41 weisen hingegen deutlich veränderte Oligosaccharidprofile auf im Vergleich zu den Proben von Tag 21. Es wurden bei diesen Proben mehr verschiedene Oligosaccharide detektiert, insbesondere Galactan oligosaccharide. Die Gehalte an RFO

Ileum Tag 41 (x-41-l)	Xylo-OS					Arabinoxylo-OS					AX-SK		RFO & RFO-Abbauprodukte			Cello-OS			Malto-OS			Manno-OS					Arabinan-OS				Galactan-OS															
	X2	X3	X4	X5	X6	A ² XX	A ³ X	XA ² XX	XA ³ XX	A ²⁺³ XX	XA	AX	Sac	Raf	Sta	Gal+Glc	2Gal+Glc	3Gal+Glc	C2	C3	C4	Mal2	Mal3	Mal4	Man2	Man3	Man4	Man5	A-2b	A-2a	A-3a	A-3b	G-2c	G-2b	G-2a	G-3c	G-3b	G-4a								
Kontrolle	1a	2	2	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	3	3	0	2	0	0								
	5a	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	3	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0								
	6a	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	2	0	2	2	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
	8a	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Xylanase	1b	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	3	1	0	3	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3	4	0	1	0					
	3b*	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	2	0	2	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	4b	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	3	2	0	3	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	4	0	1	0				
	6b	2	2	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	3	0	0	4	1	0	3	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	2	3	0	2	0				
	8b*	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	2	2	2	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
X+X	1c*	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	2	2	0	1	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0				
	4c	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	2	3	2	0	2	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	4	0	1	0			
	5c	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3	1	0	3	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	3	3	0	1	0			
	8c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0	2	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Kontrolle	3d*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	2	2	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0			
	5d	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	7d	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	4	0	2	0		
	8d*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	2	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Xylanase	2e	2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	3e	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	3	2	0	2	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	4e	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5e	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6e	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0	2	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8e°	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	4	2	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X+X	1f*	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	2	1	0	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2f	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3f*	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	2	1	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4f*	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	3	1	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6f	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	3	2	0	2	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbildung 25: Ermittelte Oligosaccharid (OS)-Profile der Ileumproben nach 41 Tagen Fütterung bestimmt mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Oberer Teil: Basisfutter Mais 3 (a - c); unterer Teil: Basisfutter Mais 4 (d - f), 0 - 4: zunehmende Menge an OS (0: nicht detektierbar bis 4: Signal der Probe mindestens 2-mal höher als Vergleichssignal der Standardsubstanzmessung (5 µM)), nicht aufgeführte OS wurden nicht detektiert, C3 und G-3a koeluiieren: hier als C3 angegeben (* / ° auffällige Proben, vgl. Abbildung 21; AX-SK: Arabinoxylanseitenketten, RFO: OS der Raffinose-Familie, X+X: Xylanase + Xylo-OS)

und ihren Abbauprodukten sind deutlich niedriger, außerdem sind keine Unterschiede zwischen den Futtervarianten zu erkennen. Diese Beobachtungen passen zu den Erkenntnissen aus der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide dieser Proben (vgl. Kapitel 4.5.2.1) und unterstreichen die Theorie, dass in diesen Proben Mikroorganismen vorkommen, die Enzyme zum Abbau von NSP produzieren.

Die Ergebnisse der Kon-Gruppe von Tag 21 zeigen, dass im Ileum ohne die Anwesenheit einer exogenen Xylanase keine XOS in detektierbaren Mengen freigesetzt werden. In den Kon-Gruppen beider Maissorten wurden bei den nicht markierten Ileumproben von Tag 41 XOS detektiert. Dies lässt, wie in Kapitel 4.5.2.1 vermutet, auf die Anwesenheit einer Xylanase schließen. Da dem Futtermittel dieser Gruppe keine Xylanase zugesetzt wurde, liegt es nahe, dass sie mikrobiellen Ursprungs ist und in allen nicht markierten Tag-41-Proben vorkommt, weshalb keine Zusammenhänge mehr zwischen den Futtervarianten

und dem XOS-Vorkommen in den Ileumproben beobachtet werden können. Ebenfalls auf den Abbau durch mikrobielle Enzyme zurückzuführen sind die detektierten Galactan-oligosaccharide, da keine galactanspaltenden körpereigenen Enzyme vom Huhn produziert werden können und ausgeschlossen wurde, dass die zugegebene Xylanase in der Lage ist diese Oligosaccharide aus den eingesetzten Einzelfuttermitteln freizusetzen (vgl. Kapitel 4.3.2.3). Da die Maisproben kaum Pektine enthielten (vgl. Kapitel 3.2), wird angenommen, dass diese aus den NSP der Sojakomponenten freigesetzt wurden. Außerdem kommen in diesen Ileumproben größere Mengen C₂ und C₃ vor im Vergleich zu den Proben von Tag 21, in denen nur vereinzelt kleine Mengen kurzer COS (DP 2 - 3) festgestellt wurden. Wieder ungeklärt bleibt der Ursprung der Arabinose und Mannose aus der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharide, da in den Ileumproben von Tag 41 nur vereinzelt Arabinan-oligosaccharide und keine linearen ManOS nachweisbar waren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in einem Großteil der Ileumproben von Tag 41 sehr wahrscheinlich Mikroorganismen vorkommen, die durch die Bildung entsprechender Enzyme die Oligosaccharidprofile in diesen Proben maßgeblich beeinflussen. Bei diesen Proben konnte kein Zusammenhang mehr zwischen Xylanasezugabe zum Futter und XOS-Gehalt festgestellt werden, wie es bei den Ileumproben von Tag 21 der Fall war. Anzumerken ist, dass aufgrund der geringeren Anzahl untersuchter Tag-41-Proben und der Tatsache, dass sich diese Proben in zwei Gruppen (ähnlich Tag 21 und typisch Tag 41) aufteilen, zum Teil nur zwei für Tag 41 typische Replikate pro Futtervariante untersucht wurden. Zur Absicherung der Ergebnisse sollte die Analyse mit einem umfangreicheren Probensatz wiederholt werden.

4.5.2.3 Bindungstypen nach enzymatischem Abbau der Malto- und Raffinose-Familie-Oligosaccharide

Um Informationen zu bisher noch nicht identifizierten Oligosacchariden zu erhalten, wurden bei ausgewählten Ileumproben (je zwei repräsentative Proben pro Futtervariante für Tag 21 und Tag 41, Basisfutter Mais 3) die Bindungstypen der Oligosaccharide bestimmt. Wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, wurden hierfür vor der Methylierungsanalyse die Oligosaccharide, die eindeutig identifiziert waren und in großen Mengen vorkamen (RFO und MalOS), enzymatisch abgebaut und anschließend alle freien und freigesetzten Monosaccharide mittels nPGC-SPE entfernt. Zur Vollständigkeit und um zu überprüfen, ob der enzymatische Verdau der RFO und MalOS vollständig war, wurden ebenfalls die Monosaccharidzusammensetzung und die Oligosaccharidprofile der für die Methylierungsanalyse eingesetzten Proben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle A14 (Kapitel 9.2) und Abbildung A17 (Kapitel 9.1) aufgeführt. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Ileumproben sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Da beispielsweise bei Probe 4b-21-I nach dem Verdau noch leicht erhöhte Restmengen an RFO festgestellt wurden und deshalb in dieser Probe höhere Anteile der entsprechenden PMAAs enthalten sind, wurden für die Berechnung der prozentualen Verhältnisse die PMAAs, die auf RFO

und MaOS zurückzuführen sind (terminale und 1,6-verknüpfte Galactopyranose sowie 1,6-verknüpfte Glucopyranose; terminale und 1,4-verknüpfte Glucopyranose), nicht einbezogen. Dadurch können die prozentualen Verhältnisse der verbleibenden PMAAs einfacher miteinander verglichen werden. Die Auflistung aller in diesen Proben bestimmten PMAAs ist in Tabelle A15 (Kapitel 9.2) zu finden.

Tabelle 6: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Oligosaccharidfraktionen ausgewählter Ileumproben nach enzymatischem Verdau mit α -Galactosidase, Invertase und Amyloglucosidase und Abtrennung der freigesetzten Monosaccharide (mol%, n = 1, zwei Proben pro Futtermvariante). Bei der prozentualen Verteilung nicht mit einbezogen: t-Glcp, 1,4-Glcp, 1,6-Glcp, t-Galp, 1,6-Galp (PMAA: partiell methylierte Alditolacetate; Xyla: Xylanase, X+X: Xylanase und Xylooligosaccharide; Glc: Glucose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Rib: Ribose, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose)

Ileumproben Futtermvariante PMAA in mol%	Tag 21 (x-21-I)						Tag 41 (x-41-I)					
	Kontrolle		Xyla		X+X		Kontrolle		Xyla		X+X	
	5a	6a	4b	6b	4c	5c	5a	6a	4b	6b	4c	5c
1,2-Glcp	4,8	4,2	5,1	5,1	4,0	4,5	4,2	4,1	4,2	2,9	3,3	3,6
1,2,6-Glcp	2,7	2,2	2,5	2,0	1,9	1,9	1,7	0,7	1,4	1,4	1,4	0,9
1,3,6-Glcp	0,8	0,4	0,7	0,4	0,7	0,5	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2
1,3-Galp + 1,2,5-Araf	6,1	4,2	7,2	3,8	4,3	4,7	2,8	3,2	2,9	2,7	2,9	2,4
1,4-Galp	3,7	3,3	2,3	4,2	3,3	3,0	2,6	2,2	7,0	6,1	7,1	2,2
1,3,6-Galp	9,6	9,2	8,0	7,5	7,7	8,2	9,8	8,3	7,4	4,6	5,2	4,1
t-Manp	14,7	15,0	11,8	13,2	12,8	10,3	14,7	14,4	11,4	8,0	12,2	7,7
1,2-Manp	12,9	12,6	10,3	10,4	11,1	9,8	7,7	7,3	5,9	5,3	6,3	4,6
1,3-Manp	1,1	1,1	1,2	1,3	1,0	1,3	2,5	2,9	1,6	1,6	2,0	2,2
1,4-Manp	1,1	1,1	1,0	1,0	1,2	0,9	1,1	0,8	0,9	1,3	0,9	1,5
1,6-Manp	2,7	3,2	2,5	2,9	3,8	3,0	8,7	6,7	6,1	10,2	7,2	8,4
1,3,6-Manp	3,4	1,8	3,3	1,4	2,0	2,4	2,3	2,0	1,1	1,4	1,6	1,9
t-Xylp	2,6	2,8	3,9	4,5	5,7	5,4	3,2	3,5	4,8	4,8	3,7	6,3
1,4-Xylp	2,4	2,5	7,5	7,5	10,5	9,8	2,5	3,5	5,1	10,0	3,6	12,3
1,2,4- + 1,3,4-Xylp	1,5	1,1	2,8	1,0	1,4	1,5	1,2	1,2	1,3	1,4	0,9	1,8
1,2,3,4-Xylp	0,6	0,5	0,3	0,5	1,0	0,5	5,5	0,8	0,9	5,9	0,6	1,4
t-Araf	10,3	12,2	9,9	10,0	8,7	10,1	10,4	15,4	14,4	12,2	15,6	14,6
1,2-Araf	1,4	1,2	1,3	1,3	1,6	1,5	1,4	1,3	1,3	1,1	1,3	1,2
1,3-Araf	-	-	-	-	-	-	2,3	2,6	2,2	2,3	2,4	2,6
1,5-Araf/1,4-Arap	12,9	14,9	13,8	16,0	12,5	15,2	10,0	12,5	15,0	12,0	15,7	15,4
1,3,5-Araf	1,6	2,2	1,7	2,3	1,6	2,3	2,0	3,1	2,5	2,0	2,7	2,5
1,2,3,5-Araf	1,8	2,2	1,8	2,5	1,8	2,0	2,8	2,9	1,9	2,2	2,6	1,7
t-Ribf	1,4	2,2	1,1	1,2	1,3	1,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	0,5

Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse bestätigen die bisher beschriebenen Beobachtungen, wie beispielsweise die bei den Tag-21-Proben festgestellten Zusammenhänge zwischen XOS-Gehalt und Xylanase im Futter (1,4-verknüpfte Xylopyranose). Zu sehen ist, dass auch in den Proben der Kon-Gruppe (5a- und 6a-21-I) kleine Anteile 1,4-verknüpfter Xylopyranose nachgewiesen wurden. Demzufolge sind auch in diesen Proben XOS enthalten, obwohl diese mit der HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode nicht detektiert werden konnten. Es ist denkbar, dass die Mengen in diesen Proben unterhalb des LOD der Profilingmethode liegen oder es sich um Oligosaccharide handelt, die nicht in der Profilingmethode erfasst werden (z. B. höhere DP oder nicht berücksichtigte AXOS). Interessant zu beobachten ist, dass auch 1,2,4- und 1,3,4-verknüpfte Xylopyranosen in

allen Proben in kleinen jedoch ähnlichen Anteilen auftreten. Dies lässt auf kleine Mengen verzweigter AXOS in den Proben schließen. Die dazu gehörige terminale Arabinofuranose wurde ebenfalls gefunden, wobei die Anteile dieser deutlich höher sind als die der monosubstituierten Xyloseeinheiten und sie demzufolge noch aus weiteren Oligosacchariden stammt.

Bei der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen konnten sowohl bei den Ileumproben von Tag 21 als auch bei denen von Tag 41 Arabinose und Mannose in größeren Mengen bestimmt werden, jedoch konnten keine entsprechenden Oligosaccharide mit der HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode in den Proben detektiert werden (vgl. Kapitel 4.5.2.1 und 4.5.2.2). Die Profilierungsmethode ermöglicht die Identifikation von linearen β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften ManOS (DP 2 - 6) sowie vier verschiedener Arabinan oligosaccharide (DP 2 - 3, s. Abbildung A3, Kapitel 9.1).

Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse zeigen, dass die Mannose in den Oligosacchariden der Proben von Tag 21 überwiegend terminal (durchschnittlich $13,0 \pm 1,8$ mol%) und 1,2-verknüpft ($11,2 \pm 1,3$ mol%) vorliegt. Bei den Tag-41-Proben dominiert ebenfalls die terminale Form ($11,4 \pm 3,0$ mol%), gefolgt von der 1,6-verknüpften ($7,9 \pm 1,5$ mol%) und 1,2-verknüpften Form ($6,2 \pm 1,2$ mol%). Sowohl bei Proben von Tag 21 als auch von Tag 41 wurden in kleineren Anteilen auch 1,3-, 1,4- und 1,3,6-verknüpfte Mannopyranose bestimmt. Der hohe Anteil an terminalen Einheiten bestärkt, dass es sich um Oligosaccharide handelt. Der mittels Methylierungsanalyse bestimmte Anteil an 1,4-verknüpfter Mannopyranose ist geringer als der der 1,4-verknüpften Xylopyranose in den Proben der Tag-21-Kon-Gruppe. Demnach ist anzunehmen, dass der Gehalt der 1,4-verknüpften ManOS unter dem LOD der HPAEC-PAD/MS-Oligosaccharidprofilierungsmethode liegt, weshalb diese Oligosaccharide bei der Bestimmung des Oligosaccharidprofils nicht nachweisbar waren. Die 1,2-verknüpfte Form wurde auch bei der Charakterisierung der Einzelfuttermittel zum Teil in höheren Anteilen detektiert (vgl. Kapitel 4.1.2 und 4.2.2). Wie dort bereits beschrieben, kommt Mannose in der Pflanze für gewöhnlich in Mannanen in der 1,4-verknüpften Form vor. Andere Bindungstypen sind beispielsweise für verschiedene Hefearten beschrieben (Moreira & Filho, 2008; Yamabhai *et al.*, 2016). Somit ist festzuhalten, dass die aus Mannose aufgebauten Oligosaccharide in den Ileumproben nicht abschließend identifiziert werden konnten, wobei vermutet wird, dass die Mannose weitgehend aus nicht für pflanzliches Material typischen Mannanen stammt.

Die Arabinose in den Ileumproben liegt der Methylierungsanalyse zufolge hauptsächlich terminal in Furanoseform (Tag 21: $10,2 \pm 1,2$ mol%; Tag 41: $13,8 \pm 2,0$ mol%) und als 1,5-verknüpfte Arabinofuranose bzw. 1,4-verknüpfte Arabinopyranose vor (PMAAs identisch; Tag 21: $14,2 \pm 1,4$ mol%; Tag 41: $13,4 \pm 2,3$ mol%). Außerdem wurden kleinere Anteile 1,2-, 1,3- (nur Tag 41), 1,2,5-, 1,3,5 und 1,2,3,5-verknüpfte Arabinofuranose detektiert. Das Rückgrat der Arabinane in Pektinen ist aus α -(1 \rightarrow 5)-glykosidisch verknüpften Arabinofuranoseeinheiten aufgebaut und trägt über die O-2- und/oder O-3-Position Arabinofuranoseeinheiten oder kurze Seitenketten aus Arabinose als Substituenten (vgl. Kapitel

1.2.3.4). Damit stimmen die in den Proben nachgewiesenen Bindungstypen mit den aus Arabinanen erwarteten Bindungstypen überein. Denkbar wäre, dass es sich um Arabinan-oligosaccharide mit höherem DP (> 3) handelt, die mit dem HPAEC-PAD/MS-Profilings nicht erfasst werden. Im Verdauungstrakt von Geflügel werden keine körpereigenen Enzyme zum Abbau von Arabinanen produziert. Daher wäre eine Freisetzung im Magen durch saure Hydrolyse denkbar, da es sich um α -glykosidische Bindungen zwischen Monosacchariden in Furanoseform handelt und dieser Bindungstyp vergleichsweise säurelabil ist. Dies würde das Vorkommen dieser Oligosaccharide insbesondere in den Ileumproben von Tag 21 erklären, da in diesen Proben weder körpereigene noch mikrobielle Enzyme zum Abbau von Arabinanstrukturen vermutet werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass verschiedene Analysemethoden erforderlich sind, um ein umfassendes Bild der in den Proben vorkommenden Oligosaccharide zu erhalten. In der Literatur konnten zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichbar umfangreichen Charakterisierungen der Oligosaccharide in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel gefunden werden.

4.6 Untersuchung der Caecumproben

Wie bei den Ileumproben wurden die freien Monosaccharide und Oligosaccharide aus den Caecumproben extrahiert und aufgereinigt. In diesem Fall erfolgte die Aufreinigung mit einem zweistufigen SPE-Verfahren, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben. Die Auswahl der Proben ist in Kapitel 3.4.5 erläutert. Die Caecumproben von Tag 21 lagen vollständig vor, jedoch mussten zwei dieser Proben aufgrund eines undichten Gefäßes bei der Aufarbeitung verworfen werden (1a-21-C und 1b-21-C). Eine Übersicht der durchgeführten Analysen ist in Tabelle 1 (Kapitel 3.4.5) aufgeführt. Die Analysen erfolgten, wie bei den Ileumproben, in Einfachbestimmung unter Mitführung entsprechender interner Standards und Absicherung auffälliger Messungen durch eine Wiederholung der entsprechenden Analyse (vgl. Kapitel 4.5).

4.6.1 Freie Monosaccharide

In den HPAEC-Chromatogrammen der Messungen der freien Monosaccharide aus den Caecumproben wurden neben den Signalen der Monosaccharide, aus denen pflanzliche Polysaccharide üblicherweise aufgebaut sind, weitere Signale zunächst nicht identifizierter Substanzen detektiert. Drei dieser Signale konnten durch den Vergleich mit weiteren Standardsubstanzen Galactosamin, Glucosamin und Ribose zugeordnet werden. Daher ist es möglich, dass einige der nicht identifizierten Substanzen weitere Monosaccharide oder Derivate sind, die als Teil des bakteriellen Stoffwechsels vorkommen. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der bestimmten freien Monosaccharide der Caecumproben von Basisfutter Mais 3 und 4 von Tag 21 und 41 in mg/g gefriergetrockneter Caecumprobe als Box-Plot-Diagramme dargestellt (Mittelwerte nicht gezeigt). Beim Vergleich der Gehalte der

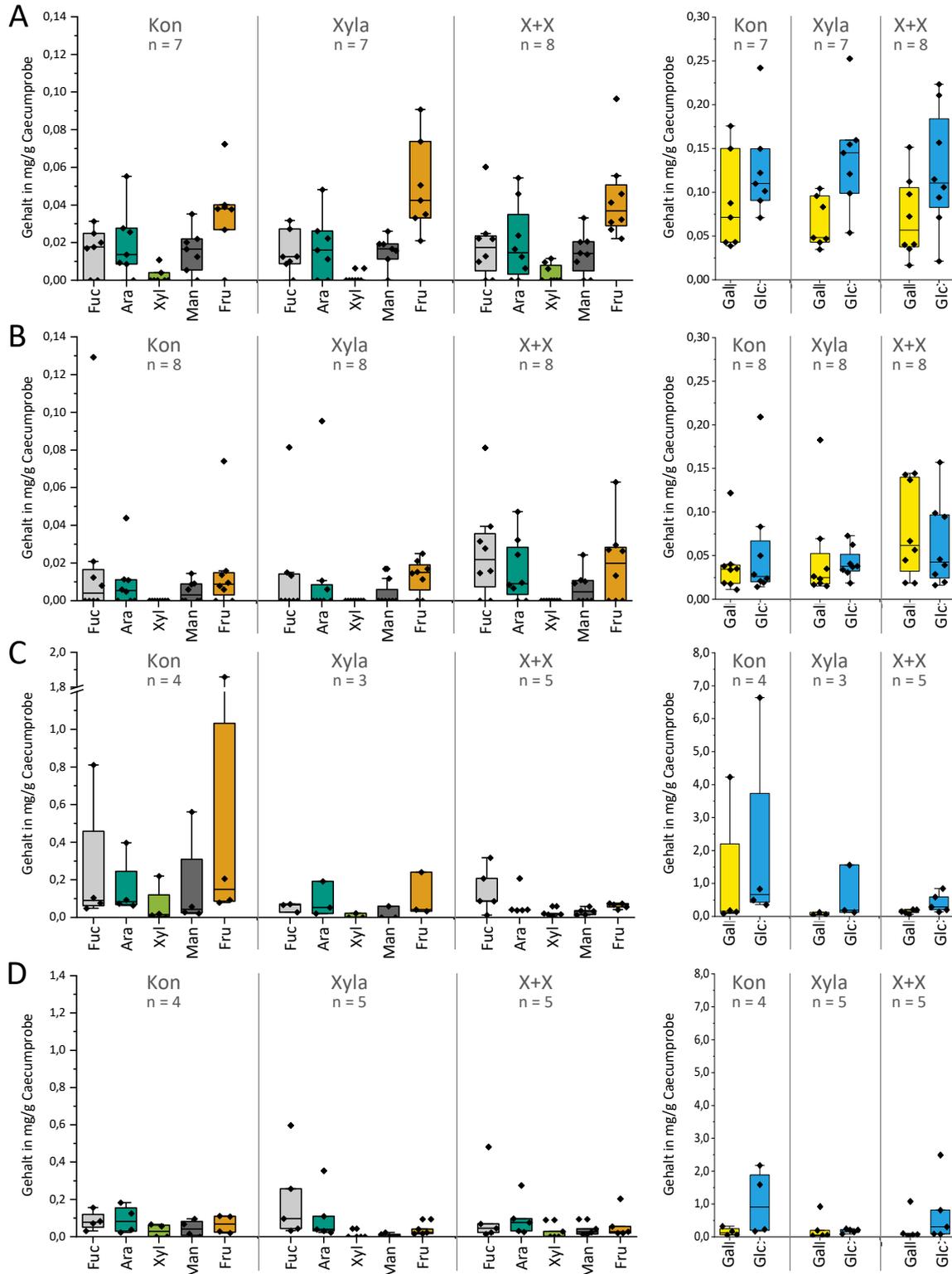


Abbildung 26: Gehalte der freien Monosaccharide in den Caecumproben (mg/g Caecumprobe, n = Anzahl analysierter biologischer Replikate). Proben nach 21 Tagen Fütterung mit Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); Proben nach 41 Tagen Fütterung mit Basisfutter Mais 3 (C) und Mais 4 (D); jeweils drei Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X) (Fuc: Fucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, Fru: Fructose, Gal: Galactose, Glc: Glucose)

einzelnen Monosaccharide ist zu beachten, dass die y-Achsen zum Teil unterschiedlich skaliert sind. Die zugehörigen Messwerte sind in Tabelle A16 (Kapitel 9.2) aufgeführt.

Es fällt auf, dass in nahezu allen untersuchten Caecumproben Galactose und Glucose die dominierenden freien Monosaccharide sind, wie es auch schon bei den Ileumproben der Fall war. Im Gegensatz zu den Ileumproben wurden bei den Caecumproben in allen Gruppen, unabhängig von Alter und Futtervariante, die gleichen freien Monosaccharide festgestellt, wenn auch in unterschiedlichen Mengen. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Caeca Hauptort der mikrobiellen Fermentation sind und deshalb vermehrt Mikroorganismen vorkommen, die entsprechende Enzyme bilden. Die Zusammensetzung des Mikrobioms verändert sich mit dem Alter der Tiere (vgl. Kapitel 1.3.3). Dies könnte die mengenmäßigen Unterschiede der freien Monosaccharide zwischen den Proben von Tag 21 und Tag 41 erklären. Ebenfalls auffällig ist, dass die Streuung der Messwerte zum Teil sehr hoch ist. Dies kann einerseits daran liegen, dass die freien Monosaccharide von den Mikroorganismen freigesetzt, aber auch zeitgleich verstoffwechselt werden, weshalb es sich bei den bestimmten Mengen um eine Momentaufnahme handelt. Andererseits ist beschrieben, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms sehr tierindividuell sein kann (Stanley *et al.*, 2013; Elling-Staats *et al.*, 2022), wodurch ebenfalls Unterschiede auftreten können. Zusätzlich zur hohen Streuung der einzelnen Monosaccharidgehalte sind vermehrt Ausreißer im Box-Plot-Diagramm zu erkennen. In den meisten Fällen betrifft dies die Werte einer Probe in der Gruppe, bei der die Gehalte mehrerer Monosaccharide nach oben abweichen. So sind beispielsweise alle im Box-Plot-Diagramm sichtbaren Ausreißer in der Gruppe Tag 41 Mais 4 (D) Variante X+X Werte der Probe 5f-41-C. Auch die sehr hohen Werte in Gruppe Tag 41 Mais 3 (C) Variante Kon gehören alle zu einer Probe (6a-41-C). Bei den Proben von Tag 21 fallen die Proben 6d- und 3e-21-C durch Ausreißer auf. Warum einzelne Proben zum Teil bis zu zehnfach höhere Gehalte aufweisen, ist nicht abschließend geklärt. Die Analyseergebnisse wurden durch entsprechende Wiederholungen der Messungen abgesichert. Anzumerken ist, dass es sich bei den Proben um biologische Replikate handelt, die aus mehreren Tieren gepoolt wurden (Tag 21 vier Tiere, Tag 41 zwei Tiere; vgl. Kapitel 3.1).

Es konnten keine Zusammenhänge zwischen den Gehalten an freien Monosacchariden und der Futtervariante festgestellt werden. Für die Caecumproben von Tag 41 wurde ebenfalls überprüft, ob es einen Zusammenhang zu den Tag-41-Ileumproben mit den auffallend hohen Mengen an RFO gibt (vgl. Kapitel 4.5.1), wobei keine Zusammenhänge festgestellt werden konnten. Beim Vergleich der beiden Basisfuttersorten fällt ein Trend dahingehend auf, dass die Mengen der nachgewiesenen freien Monosaccharide bei den Proben von Mais 3, insbesondere bei den Proben von Tag 21, im Median höher sind als die der Mais-4-Proben.

Bei den in der Literatur angegebenen Werten zu freien Monosacchariden in Caecumproben aus Broilern wird, wie bei den Analysen hier, die Glucose mit den höchsten Gehalten aufgeführt. Bei 28 Tage alten Tieren wurden außerdem Galactose sowie kleinere Mengen

Arabinose, Fructose und Xylose gefunden; Fucose trat in sehr geringen Mengen auf und Rhamnose war nicht detektierbar (Kouzounis *et al.*, 2022a). In einer anderen Studie (Broiler, 21 Tage) wurde ebenfalls Glucose in höheren Mengen bestimmt, gefolgt von Arabinose, Xylose und Mannose. Zusätzlich wurden kleine Mengen an Galactose und Ribose detektiert. In jener Studie wurde, wie in der vorliegenden Untersuchung, beobachtet, dass die Menge an freien Monosacchariden in Proben aus dem Caecum geringer sind als in Ileumproben. Außerdem wurden ebenfalls keine Unterschiede in den freien Monosacchariden in den Caecumproben zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Xylanasezusatz festgestellt (Zhang *et al.*, 2014).

4.6.2 Analyse der Oligosaccharide

4.6.2.1 Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion

Die Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben wurde nach Aufreinigung mittels C-18-SPE und Abtrennung der freien Monosaccharide mittels nPGC-SPE nach Hydrolyse mit TFA bestimmt. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Monosaccharide, die typischerweise aus Oligosacchariden mit pflanzlichem Ursprung erwartet werden, für die Proben von Tag 21 und 41 der Basisfutter Mais 3 und Mais 4 in mg/g gefriergetrocknete Caecumprobe als Box-Plot-Diagramme dargestellt (Mittelwerte nicht gezeigt). Zusätzlich wurden in diesen Proben quantifizierbare Mengen an Galactosamin (Durchschnitt aller Proben: $0,06 \pm 0,02$ mg/g), Glucosamin ($0,31 \pm 0,15$ mg/g) und Ribose ($0,04 \pm 0,02$ mg/g) detektiert. Diese Ergebnisse sind in Abbildung A18 (Kapitel 9.1) veranschaulicht. Die einzelnen Messwerte aller quantifizierten Monosaccharide sind in Tabelle A17 (Kapitel 9.2) aufgeführt.

Zunächst werden die Ergebnisse der Tag-21-Proben betrachtet (Abbildung 27, A und B). Wie auch bei den freien Monosacchariden festgestellt, weisen die Messwerte teilweise eine hohe Streuung auf und im Box-Plot-Diagramm werden mehrere Ausreißer sichtbar. Die Ausreißer bei Galactose und Glucose sind jeweils Werte der gleichen Probe (Mais 3: 7a-21-C, 4c-21-C; Mais 4: 6d-21-C, 3e-21-C) und auch in der Gruppe Mais 4 Variante X+X können die drei hohen Werte drei Proben zugeordnet werden (3f-, 4f- und 5f-21-C). Da RFO aus Glucose und Galactose aufgebaut sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese Proben vergleichsweise hohe Mengen RFO aufweisen, was durch die Bestimmung der Oligosaccharidprofile bestätigt werden konnte (vgl. Kapitel 4.6.2.2). Die weitere Zuordnung, welche Monosaccharide auf welche Oligosaccharide zurückzuführen sind, wird im nächsten Kapitel nach Vorstellung der Ergebnisse der Oligosaccharidprofile erläutert. In der Gruppe Mais 4-Kon fallen Messwerte auf, die extrem nach oben ausreißern, dabei handelt es sich um die Werte der Probe 6d-21-C. Diese Probe ist bereits bei den freien Monosacchariden durch hohe Gehalte herausgestochen.

Die Verteilung der Monosaccharide, aus denen die Oligosaccharide in den Caecumproben von Tag 21 aufgebaut sind, ähnelt der Verteilung der Ileumproben von Tag 41, wobei die

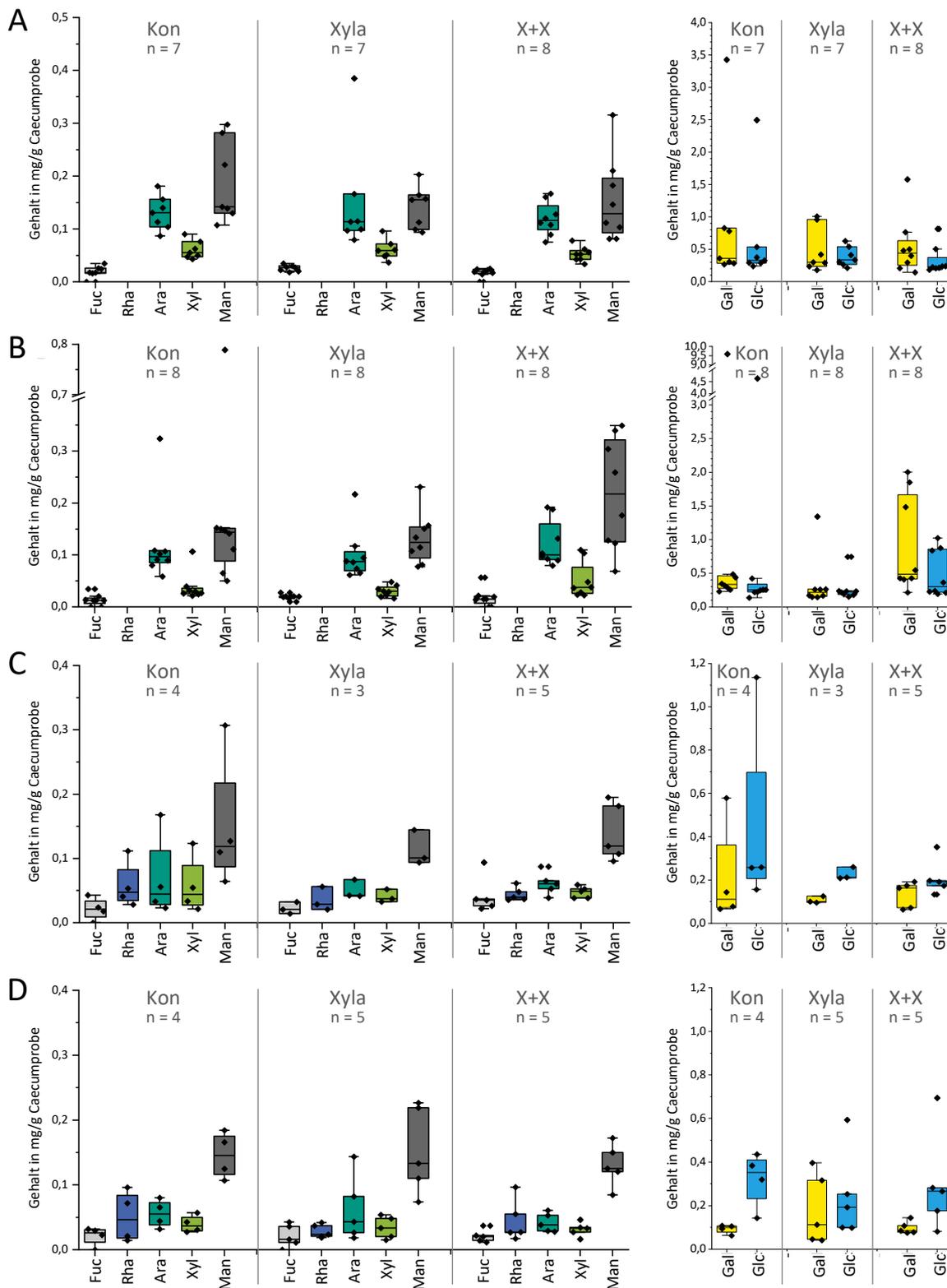


Abbildung 27: Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (mg/g Caecumprobe, n = Anzahl analysierter biologischer Replikate). Proben nach 21 Tagen Fütterung mit Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); Proben nach 41 Tagen Fütterung mit Basisfutter Mais 3 (C) und Mais 4 (D); jeweils drei Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X) (Fuc: Fucose, Rha: Rhamnose (bei Tag-21-Proben nicht quantifizierbar), Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, Gal: Galactose, Glc: Glucose)

Mengen in den Caecumproben geringer sind (Durchschnitt typischer Ileumproben Tag 41: Fucose: 0,10 mg/g, Rhamnose: nicht quantifizierbar, Arabinose: 1,43 mg/g, Xylose: 0,41 mg/g, Mannose: 1,15 mg/g, Galactose: 2,84 mg/g, Glucose: 3,38 mg/g, vgl. Kapitel 4.5.2.1). Bei den Caecumproben werden aufgrund der hohen Streuung und der Ausreißer die Mediane anstelle der Mittelwerte zum Vergleich herangezogen. In den Caecumproben von Tag 21 dominieren, wie in den Ileumproben, Oligosaccharide aufgebaut aus Galactose (Median Proben Mais 3: 0,38 mg/g; Mais 4: 0,33 mg/g) und Glucose (Mais 3: 0,30 mg/g; Mais 4: 0,24 mg/g), gefolgt von Mannose (Mais 3: 0,14 mg/g; Mais 4: 0,14 mg/g) und Arabinose (Mais 3: 0,11 mg/g; Mais 4: 0,09 mg/g) in ähnlichen Mengen. Oligosaccharide aus Xylose (Mais 3: 0,05 mg/g; Mais 4: 0,03 mg/g) und Fucose (Mais 3: 0,02 mg/g; Mais 4: 0,02 mg/g) kommen in geringeren Mengen vor. Dabei fällt auf, dass jeweils die Monosaccharidgehalte der Mais-3-Proben geringfügig höher sind als die der Mais-4-Proben. Diese Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant ($\alpha = 0,05$), mit Ausnahme der Xylosegehalte, die bei Mais-3-Proben signifikant höher sind als bei den Proben von Mais 4. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Mikrobiom im Caecum in der Lage ist, größere Mengen XOS aus Mais 3 freizusetzen als aus Mais 4. Alternativ wäre möglich, dass das Mikrobiom der Tiere aus der Mais-4-Gruppe in der Lage ist, XOS besser zu verstoffwechseln, weshalb die Xylosegehalte niedriger sind. Wird der Gehalt an XOS mit den in Kapitel 4.5.2.1 erläuterten Annahmen (Verlust durch TFA-Hydrolyse 20 %) und unter Berücksichtigung, dass in den Caecumproben X_2 und nicht X_3 das dominierende XOS ist (vgl. Kapitel 4.6.2.2; Faktor 0,94), berechnet, ergibt sich ein XOS-Gehalt von ungefähr 0,06 mg/g Caecumprobe (Mais 3) bzw. 0,04 mg/g (Mais 4). Zwischen den Futtervarianten und den Monosaccharidgehalten der Oligosaccharidfraktion nach TFA-Hydrolyse konnten keine Zusammenhänge festgestellt werden (zweifaktorielle Varianzanalyse, ANOVA $\alpha = 0,05$, post-hoc Tukey-Test). Dies ist insbesondere bei den Xylosegehalten eher unerwartet, da bei den Ileumproben von Tag 21 gezeigt werden konnte, dass es durch Zugabe einer exogenen Xylanase zum Futter zu erhöhten XOS-Gehalten im Ileum kommt (vgl. Kapitel 4.5.2). Dies scheint jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit des Mikrobioms im Caecum zur Freisetzung von XOS bei 21-Tage-alten Tieren zu haben. Es sei denn, es wird angenommen, dass mit steigender Xylanaseaktivität auch die Fähigkeit zum Abbau und zur Verstoffwechslung von XOS zunimmt, dann würde sich ein Gleichgewicht zwischen XOS-Freisetzung und XOS-Abbau einstellen und es wären keine erhöhten Gehalte an XOS festzustellen.

Bei den Caecumproben von Tag 41 (Abbildung 27, C und D) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Caecumproben von Tag 21 mit dem Unterschied, dass Rhamnose in quantifizierbaren Mengen vorlag. Demzufolge kamen in diesen Proben Oligosaccharide vor, die Rhamnose enthielten. Bei Polysacchariden aus der pflanzlichen Zellwand kommt Rhamnose hauptsächlich in Pektinen im Rhamnogalacturonan Typ I in bedeutsamen Mengen vor. Daraus freigesetzte Oligosaccharide sind aus Rhamnose und Galacturonsäure aufgebaut. Da Vorversuche ergaben, dass in den Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben nach TFA-Hydrolyse keine quantifizierbaren Mengen an Uronsäuren enthalten

sind, wurde bei der Aufreinigung mittels nPGC-SPE darauf verzichtet, die Fraktion der geladenen Mono- und Oligosaccharide durch Säurezusatz zu eluieren (vgl. Kapitel 3.4.2). Demnach kann die in den Proben nachgewiesene Rhamnose nicht aus Oligosacchariden aus dem Rhamnogalacturonan Typ I stammen. Denkbar wären hingegen Oligosaccharide mikrobiellen Ursprungs. Dazu passt der Nachweis von Galactosamin, Glucosamin, Ribose (s. Abbildung A18, Kapitel 9.1) sowie Fucose, die in den ermittelten Mengen ebenfalls untypisch für pflanzliche Oligosaccharide sind. Die Monosaccharidanalyse der Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben von Tag 41 ergab, wie bei den Proben von Tag 21, keine Zusammenhänge zwischen Futtervariante und enthaltenen Oligosacchariden. Bei diesen Proben waren, anders als bei den Proben von Tag 21, keine Trends oder signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,05$) zwischen den beiden Basisfuttersorten Mais 3 und Mais 4 festzustellen. Die Ergebnisse dieser Analyse deuten darauf hin, dass bei 41-Tagealten Broilern weder die verwendete Maissorte noch die Zugabe von Xylanase oder XOS einen Einfluss auf die in den Caeca vorkommenden Oligosaccharide haben.

4.6.2.2 Oligosaccharidprofile der Caecumproben

Zur Analyse der Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben wurde das Oligosaccharidprofiling nach SPE-Aufreinigung mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Methode (vgl. Kapitel 4.4.4) verwendet. Die Ergebnisse der Proben von Tag 21 Basisfutter Mais 3 sind in Abbildung 28 gezeigt. Die Ergebnisse der Tag-21-Proben von Basisfutter Mais 4 sind in Abbildung A19 (Kapitel 9.1) aufgeführt. Bei den Oligosaccharidprofilen der Caecumproben ist zu beachten, dass, wie in Kapitel 4.4.4 erläutert, bei der Auswertung Verdünnungsfaktoren und Einwaagen nicht einbezogen werden können, weshalb bei der Betrachtung der Ergebnisse die Einwaagen (3. Spalte der Abbildungen) mit berücksichtigt werden müssen. Für die Extraktion der Caecumproben wurde keine festgelegte Menge eingewogen, wie bei den Ileumproben, sondern die gesamte Probenmenge verwendet (vgl. Kapitel 3.4.1). Die Aufarbeitung erfolgte für alle Caecumproben gleich und für die HPAEC-PAD/MS-Messung wurden alle Caecumproben 1:2 verdünnt. Als Anhaltspunkt für den Vergleich der Oligosaccharidprofile der Ileum- und Caecumproben sei folgendes erwähnt: Bei den Ileumproben wurden 100 ± 5 mg Probe eingewogen, vergleichbar aufgearbeitet und die Oligosaccharidfraktionen für die HPAEC-Messung 1:10 bzw. 1:20 verdünnt. Demnach entspricht die gleiche Stufe im Oligosaccharidprofil der Caecumproben grob einer ungefähr fünf- bis zehnfach geringeren Menge des Oligosaccharids im Vergleich zu den Ileumproben. Daraus folgt, wie im Kapitel zuvor bereits dargestellt, dass die Caecumproben deutlich geringere Mengen an Oligosacchariden enthalten als die Ileumproben.

Den Oligosaccharidprofilen der Caecumproben von Tag 21 ist zu entnehmen, dass die RFO, ihre Invertaseabbauprodukte und die MalOS Mal₂ und Mal₃ die dominierenden Oligosaccharide sind. Außerdem wurden größere Mengen des Galactanoligosaccharids G-2a detektiert. Da in den Caecumproben Mikroorganismen erwartet werden, die NSPasen bilden, erscheint dieses Ergebnis plausibel. Die Mengen dieser Oligosaccharide

Caecum Tag 21 (x-21-C)	Einwaage in mg	Xylo-OS					Arabinoxylo-OS				AX-SK		RFO & RFO-Abbauprodukte			Cello-OS			Malto-OS			Manno-OS			Arabinan-OS				Galactan-OS									
		X2	X3	X4	X5	X6	A ³ XX	A ³ X	XA ³ XX	XA ³ XX	A ²⁺³ XX	XA	AX	Sac	Raf	Sta	Gal+Glc	2Gal+Glc	3Gal+Glc	C2	C4	Mal2	Mal3	Mal4	Man2	Man3	Man4	A-2b	A-2a	A-3a	A-3b	G-2c	G-2b	G-2a	G-3c	G-3b	G-3a	G-4a
Kontrolle	2a	345	2	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3	4	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	3	0	1	1	0	
	3a	228	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	
	4a	135	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3	4	4	3	3	2	0	0	4	4	0	0	0	0	1	0	0	1	1	3	0	1	1	0
	5a	154	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	2	2	2	2	0	0	0	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	6a	117	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	2	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
	7a	301	2	2	2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	4	4	4	4	4	4	0	0	3	3	0	0	0	0	2	2	0	3	1	4	0	1	2	0
	8a	162	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	3	2	2	2	0	1	0	3	3	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	Xylanase	2b	161	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	2	1	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
3b		170	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	3	3	3	2	1	0	0	3	3	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	
4b		205	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	2	2	3	3	1	0	0	4	4	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	
5b		124	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	1	0	0	3	3	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	
6b		145	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	3	3	3	3	2	1	0	3	3	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	1	0	
7b		124	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	2	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
8b		255	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	3	2	3	3	0	0	0	4	4	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	1	0	
Xylanase + Xylo-OS		1c	251	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	3	3	3	2	0	1	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0		
	2c	296	2	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	1	0	0	4	3	0	0	0	0	1	1	0	0	1	4	0	1	2	0
	3c	133	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	2	4	4	2	0	0	3	2	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	2	0	
	4c	128	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4	4	2	0	0	4	3	2	0	0	0	2	0	0	0	4	0	0	1	0	
	5c	141	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	3	3	3	2	1	0	0	4	4	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	
	6c	207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	3	2	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0		
	7c	161	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	2	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
	8c	205	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	2	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	

Abbildung 28: Ermittelte Oligosaccharid (OS)-Profile der Caecumproben nach 21 Tagen Fütterung (Basisfutter Mais 3) bestimmt mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. 0 - 4: zunehmende Menge an OS (0: nicht detektierbar bis 4: Signal der Probe mindestens 2-mal höher als Vergleichssignal der Standardsubstanzmessung (5 µM)), nicht aufgeführte OS wurden nicht detektiert, C3 und G-3a koeluiieren: hier als G-3a angegeben (AX-SK: Arabinoxylanseitenketten, RFO: OS der Raffinose-Familie)

schwanken zwischen den Proben, wobei dies nur zum Teil auf die unterschiedlichen Einwaagen zurückzuführen ist. XOS wurden in geringen Mengen in fast allen Proben nachgewiesen. Anhand der Oligosaccharidprofile kann bestätigt werden, dass es, wie bei der Monosaccharidanalyse der Oligosaccharidfraktion schon festgestellt wurde (vgl. Kapitel 4.6.2.1), nach 21 Tagen keine Zusammenhänge zwischen XOS-Gehalt oder dem Gehalt eines anderen Oligosaccharids und der Futtervariante gibt. Die Oligosaccharidprofile der Tag-21-Proben der Gruppe Mais 3 (Abbildung 28) und Mais 4 (Abbildung A19, Kapitel 9.1) sind vergleichbar hinsichtlich der vorkommenden und der dominierenden Oligosaccharide sowie der relativ hohen Streuung der Ergebnisse. Ein auffälliger Unterschied ist, dass die in den Oligosaccharidprofilen ermittelten XOS-Mengen bei Mais-4-Proben geringer sind als die bei den Proben von Mais 3. Diese Beobachtung stimmt ebenfalls mit den bei der Monosaccharidanalyse der Oligosaccharidfraktionen ermittelten signifikanten Unterschieden hinsichtlich des Xylosegehalts zwischen den beiden Basisfutttermittelgruppen überein (vgl. Kapitel 4.6.2.1).

Bei der Monosaccharidanalyse der Oligosaccharidfraktion wurden neben Galactose, Glucose und Xylose, die die monomeren Bausteine der bisher besprochenen Oligosaccha-

ride darstellen, noch Arabinose und Mannose sowie Fucose bestimmt. In den Caecumproben konnten im Vergleich zu den Ileumproben kleine Mengen Arabinanoligosaccharide, AXOS sowie Arabinoxylanseitenketten detektiert werden. Die Bildung dieser Oligosaccharide kann durch Enzyme mikrobiellen Ursprungs erklärt werden (vgl. Kapitel 1.3.3.2), jedoch sind die Mengen der detektierten Oligosaccharide zu gering, um den gesamten Arabinosegehalt zu erklären. Nicht detektiert wurden lineare ManOS, weshalb davon auszugehen ist, dass die Mannose, wie in den Ileumproben, nicht oder nur in geringen Anteilen β -(1 \rightarrow 4)-verknüpft vorliegt (vgl. Kapitel 4.5.2.3). Diese Annahme wird durch die im Rahmen der Masterarbeit von Anna Rausch (2022) durchgeführten Methylierungsanalyse der Caecumproben aus dem Probensatz zur Methodenentwicklung (Tag 35, vgl. Kapitel 3.4) unterstützt, bei der ebenfalls nur geringe Anteile 1,4-verknüpfter Mannose und größere Anteile terminaler, 1,2- und 1,6-verknüpfter Mannose gefunden wurden. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind in Tabelle A18 (Kapitel 9.2) gezeigt.

Bei der Bestimmung der Oligosaccharidprofile der Caecumproben mittels HPAEC-PAD/MS traten neben den im Profiling integrierten Oligosacchariden noch weitere Signale auf, deren m/z vermuten lassen, dass es sich um Oligosaccharide, aufgebaut aus Pentosen und/oder Hexosen, handelt. Da im Caecum von Broilern eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen vorkommen, die in der Lage sind verschiedenste NSPasen zu bilden, ist davon auszugehen, dass weitere Oligosaccharide entstehen, die nicht mit dem entwickelten Oligosaccharidprofiling identifiziert werden können.

In Abbildung 29 sind die ermittelten Oligosaccharidprofile der Caecumproben von Tag 41 für Basisfutter Mais 3 und 4 aufgeführt, auch hier sind die Einwaagen, wie oben beschrieben, zu berücksichtigen. Es zeigt sich ein ähnliches Muster wie bei den Caecumproben von Tag 21, wobei die Mengen der detektierten Oligosaccharide geringer sind. Es dominieren wieder MalOS mit DP 2 - 3 gefolgt von RFO und deren Invertaseabbauprodukten. XOS, AXOS und Arabinoxylanseitenketten sowie Galactanoligosaccharide konnten bei einigen Proben in geringen Mengen nachgewiesen werden. Dabei hat die Probenmenge nur bedingt einen Einfluss, wie beispielsweise die Proben 5a- und 6a-41-C mit ähnlicher Einwaage, aber deutlich unterschiedlichen Oligosaccharidmengen zeigen. Die bestimmten Mengen an Monosacchariden nach TFA-Hydrolyse in den Oligosaccharidfraktionen unterscheiden sich zwischen den Caecumproben von Tag 21 und Tag 41 kaum (vgl. Kapitel 4.6.2.1). Da jedoch bei den Tag-41-Proben weniger Oligosaccharide mit der HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode erfasst wurden als bei den Proben von Tag 21, besteht die Vermutung, dass zwar eine vergleichbare Menge an Oligosacchariden in den Proben vorhanden ist, es sich aber vermehrt um andere, nicht im Profiling berücksichtigte Oligosaccharide handelt. Dies deutet auf eine Veränderung des Mikrobioms im Caecum zwischen Tag 21 und Tag 41 hin.

Wie bei den Tag-21-Proben sind in den Oligosaccharidprofilen der Proben von Tag 41 keine Unterschiede zwischen den Futtervarianten zu beobachten. Demzufolge konnte kein

Caecum Tag 41 (X-41-C)	Einwaage in mg	Xylo- OS					Arabinoxylo- OS				AX- SK		RFO & RFO- Abbauprodukte			Cello- OS			Malto- OS			Manno- OS			Arabinan- OS				Galactan- OS																					
		X2	X3	X4	X5	X6	A ³ XX	A ² X	XA ² XX	XA ³ XX	A ²⁺³ XX	XA	AX	Sac	Raf	Sta	Gal+Glc	2Gal+Glc	3Gal+Glc	C2	C4	Mal2	Mal3	Mal4	Man2	Man3	Man4	A-2b	A-2a	A-3a	A-3b	G-2c	G-2b	G-2a	G-3c	G-3b	G-3a	G-4a												
Kontrolle	1a	106	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	3a	149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
	5a	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	6a	108	2	2	1	0	0	1	2	0	0	0	1	2	3	2	2	4	3	2	2	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
Xyla	1b	170	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	4b	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	6b	80	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Xyla + Xylo-OS	1c	184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	3	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	2c	159	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	4c	85	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	5c	114	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2	2	2	2	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	8c	106	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	2	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrolle	3d	73	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	1	0	2	1	0	0	4	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	5d	119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7d	85	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8d	69	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Xyla	2e	127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4e	71	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2	0	2	2	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5e	71	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6e	230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8e	250	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0	1	2	4	2	2	4	4	3	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Xyla + Xylo-OS	1f	324	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	3f	282	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4f	123	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5f	204	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	2	0	3	2	0	1	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6f	129	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	1	0	2	2	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Abbildung 29: Ermittelte Oligosaccharid (OS)-Profile der Caecumproben nach 41 Tagen Fütterung bestimmt mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Oberer Teil: Basisfutter Mais 3 (a - c); unterer Teil: Basisfutter Mais 4 (d - f), 0 - 4: zunehmende Menge an OS (0: nicht detektierbar bis 4: Signal der Probe mindestens 2-mal höher als Vergleichssignal der Standardsubstanzmessung (5 µM)), nicht aufgeführte OS wurden nicht detektiert, C3 und G-3a koeluiieren: hier als G-3a angegeben (AX-SK: Arabinoxylanseitenketten, RFO: OS der Raffinose-Familie, Xyla: Xylanase)

Einfluss der zum Futter zugegebenen Komponenten (Xylanase und XOS) auf den Gehalt der im Caecum vorkommenden XOS festgestellt werden. Bei den Caecumproben von Tag 21 konnte beobachtet werden, dass in Proben der Gruppe Mais 3 höhere Mengen an XOS vorkommen als in der Gruppe von Mais 4. Dieser Zusammenhang wurde für die Caecumproben von Tag 41 nicht festgestellt, wobei anzumerken ist, dass sich die Gehalte der XOS in den Proben nahe der Nachweisgrenze der Profilingmethode befinden und daher möglicherweise Trends nicht zu erkennen sind. Außerdem wurden bei den Proben von Tag 41 weniger Replikate pro Futtervariante untersucht als bei den Tag-21-Proben.

In der Literatur wurden Oligosaccharide in Caecumproben seltener analysiert als in Ileumproben. Kim und Mitarbeitende (2022) haben, wie für den Ileuminhalt (vgl. Kapitel 4.5.1), die Gesamtmenge an Oligosacchariden im Caecuminhalt ermittelt. Diese beträgt 7,5 mg/g Trockenmasse für Tag 12 und 5,2 mg/g für Tag 35. Damit liegen die Mengen der Oligosaccharide der Caecumproben in der Studie um einen Faktor 3 bzw. 5 unterhalb der Oligosaccharidmengen in den Ileumproben (ca. 24,5 mg/g). Dies entspricht prinzipiell den

Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. In zwei Veröffentlichungen wurden die XOS in Caecumproben aus Broilern detaillierter analysiert. Wu und Mitarbeitende (2023) fanden nach Fütterung mit Mais-Weizen-Soja-basiertem Futter nach 21 Tagen in der Kontrollgruppe einen XOS-Gehalt (DP 2 - 6) von etwa 0,8 mg/g Darminhalt und für die Gruppe mit Xylanasezusatz etwa 1,5 mg/g. Die in der hier vorliegenden Arbeit berechneten XOS-Gehalte für Tag-21-Caecumproben liegen bei etwa 0,05 mg/g Trockenmasse (für Kon-, Xyla- und X+X-Gruppe), also deutlich niedriger. Die von Dale und Mitarbeitenden (2020) ermittelten XOS-Gehalte (DP 2 - 4) in den Caecumproben von ca. 0,03 mg/g Trockenmasse in der Kontrollgruppe und ca. 0,08 mg/g in der Gruppe mit Xylanasezusatz (Tag 26, Weizen-Soja-basiertes Futter) entsprechen hingegen der Größenordnung der hier gefundenen Mengen. Die Anteile der bestimmten XOS unterscheiden sich, wie bei den Ileumproben, von der hier ermittelten Verteilung und zwischen den genannten Studien. In der vorliegenden Untersuchung wurden in den Caecumproben größere Mengen von X₂ nachgewiesen als von X₃, während X₄ nur vereinzelt und X₅ und X₆ nicht detektiert wurden. Bei Wu und Mitarbeitenden (2023) dominierte X₅ deutlich vor X₃. X₂ war nur in kleinen Mengen nachweisbar und X₄ und X₆ wurden nicht detektiert. Bei Dale und Mitarbeitenden (2020) wurden größere Mengen X₃ als X₂ bestimmt, X₄ war nicht detektierbar.

4.7 Zusammenfassende Diskussion

Durch die Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Analyse von Oligosacchariden in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Oligosaccharide im Verdauungstrakt von Broilern vorkommen und wie die Zusammensetzung dieser Oligosaccharide von zum Futter zugegebenen Komponenten wie *endo*-Xylanasen und XOS beeinflusst wird. Außerdem wurde untersucht, ob sich Unterschiede ergeben, wenn für die Herstellung des Futtermittels verschiedene Maissorten verwendet werden. Für diese Zwecke wurden Proben aus einem entsprechenden Fütterungsversuch mit Broilern analysiert.

Um festzustellen, ob sich die NSP in verschiedenen Maissorten unterscheiden, wurden die Zellwandkomponenten der vier im Fütterungsversuch eingesetzten Maissorten umfassend charakterisiert. Die Untersuchungen ergaben, dass die Zellwände aller vier Maisproben sehr ähnlich zusammengesetzt sind und deren Strukturen größtenteils mit in der Literatur beschriebenen Strukturen übereinstimmen. Ein Unterschied konnte zwischen der Maisprobe 4 und den restlichen drei Maisproben festgestellt werden: In Maisprobe 4 wurden geringere Gehalte der Arabinoxylanseitenkette FA nachgewiesen. Dies kann entweder bedeuten, dass die Arabinoxylane in dieser Maissorte weniger mit Ferulasäure verknüpfte Seitenketten aufweisen, wodurch sie besser für Xylanasen zugänglich sein könnten, oder dass mehr ferulasäurehaltige Seitenketten an Crosslinks beteiligt sind und die Ferulasäuren der Seitenketten verknüpft als Di- oder Oligoferulasäuren vorliegen, weshalb diese Seitenketten bei der Analyse nicht als FA erfasst werden. Im zweiten Fall wäre die Enzymzugänglichkeit der Arabinoxylane aufgrund der Vernetzung und der

damit einhergehenden sterischen Hinderung tendenziell herabgesetzt. Daraus kann gefolgert werden, dass sich die Maissorte 4 in Bezug auf die Xylanaseverdaubarkeit möglicherweise von den anderen drei Maissorten unterscheidet. Jedoch wäre auch zu erwarten, dass sich Unterschiede bei der Bestimmung des Gehalts an Ferulasäure bzw. der Oligoferulasäuren zeigen. Dies konnte nicht beobachtet werden.

Um Einblicke in die Zusammensetzung der Oligosaccharide und NSP in der Sojekomponente zu erhalten, wurden die zwei im Fütterungsversuch verwendeten Sojaprodukte ebenfalls umfassend charakterisiert. Die Struktur und Zusammensetzung der NSP dieser Proben war sehr ähnlich, jedoch wurden große Unterschiede im RFO-Gehalt festgestellt (Sojaprobe 1: 2,9 mg/g Mehl, Sojaprobe 2: 36,4 mg/g). Daraus folgt, dass je nach verwendetem Sojaprodukt unterschiedliche Mengen RFO im Futter enthalten sein können. Dies ist von Bedeutung, da es Studien gibt, in denen eine Veränderung der Mikrobiomzusammensetzung sowie der produzierten SCFA durch Supplementation von RFO zu Geflügelfuttermittel festgestellt werden konnte (Liu *et al.*, 2021; Chang *et al.*, 2022; Morgan, 2023).

Neben der Charakterisierung der Einzelfuttermittel ist es ebenso notwendig detaillierte Informationen über die zum Futter zugesetzten Komponenten vorliegen zu haben. Dies ermöglicht es, Zusammenhänge zwischen den Beobachtungen im Fütterungsversuch und beispielsweise der Struktur der zugegebenen XOS oder den Eigenschaften der eingesetzten Xylanase herstellen zu können. Außerdem liefern diese Informationen wichtige Anhaltspunkte für die Analytik, beispielsweise welche Oligosaccharide in den Präparaten enthalten sind bzw. welche Oligosaccharide vom eingesetzten Enzym freigesetzt werden können oder wie das Enzym erfolgreich inaktiviert werden kann. Deshalb wurden die im Fütterungsversuch eingesetzte Xylanase sowie das verwendete XOS-haltige Material im Detail charakterisiert. Das XOS-haltige Material besteht zu 25 % aus XOS (DP 2 - 6), wobei X₂ dominiert (58 %), gefolgt von X₃ (30 %) und weiter sinkenden Anteilen von X₄ bis X₆. Laut Hersteller sollte das Material 35 % XOS (DP 2 - 6) enthalten. Dadurch wird deutlich, dass eine Überprüfung der Angaben zwingend notwendig ist, um sicherzustellen, dass die gewünschte Menge tatsächlich zum Futter zugegeben wird. Neben XOS wurden in dem untersuchten XOS-haltigen Material keine weiteren Oligosaccharide (COS, MalOS, RFO) festgestellt.

Die Charakterisierung der Xylanase ergab neben der *endo*- β -1,4-Xylanaseaktivität (GH11) eine Cellulasenebenaktivität bei für den Verdauungstrakt relevanten Bedingungen. Dadurch könnte es im Verdauungstrakt neben der XOS-Bildung auch zur Freisetzung von COS kommen, was wiederum Einfluss auf das Mikrobiom haben könnte (Bedford, 2018). Des Weiteren wurden *in-vitro*-Versuche mit der Xylanase und den einzelnen Einzelfuttermitteln durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Xylanase bei den getesteten Proben (Maisprobe 3 und 4 sowie Sojaprobe 1 und 2) aus Sojaprobe 2 die größten Mengen XOS freisetzt. Dies steht im Widerspruch zu der allgemeinen Auffassung, dass ausschließlich die Getreidekomponente des Futters relevant für die XOS-Freisetzung

ist. Erklärt werden kann die Freisetzung der XOS durch in Soja vorkommende Xylane, die aufgrund eines geringen Substitutionsgrads besser für die Xylanase zugänglich sind als hochsubstituierte Arabinoxylane aus Mais. Die Ergebnisse deuten jedoch auch darauf hin, dass aus unterschiedlich prozessierten Sojakomponenten unterschiedliche Mengen XOS freigesetzt werden können. Zwischen den beiden getesteten Maissorten konnten keine Unterschiede bezüglich einer vermehrten oder verringerten (A)XOS-Freisetzung festgestellt werden, obwohl dies aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse erklärbar gewesen wäre. Für die Fütterungsversuche und die potentiellen Wirkmechanismen der Xylanase bedeuten diese Erkenntnisse, dass nicht nur die verwendete Getreideart bzw. -sorte und die darin enthaltenen NSP relevant sind, sondern auch die verwendete Sojakomponente. Diese wurde bisher in Studien zur Charakterisierung von in Futter eingesetzten Xylanasen nicht berücksichtigt (Morgan *et al.*, 2020; Dale *et al.*, 2022; Dale *et al.*, 2023). Auch wäre dies ein zu prüfender Punkt bei der Fragestellung, warum bei manchen Fütterungsversuchen durch den Einsatz einer Xylanase keine positiven Effekte auf die Leistung bzw. Gesundheit der Tiere beobachtet wurden (Jahan *et al.*, 2022; Morgan, 2023). Womöglich konnten in diesen Fällen durch die Xylanase keine präbiotisch wirkenden XOS freigesetzt werden, aber nicht nur aufgrund der verwendeten Getreidekomponente, sondern auch weil die eingesetzte Sojakomponente weniger oder keine Xylane enthielt. Diese Zusammenhänge sind insbesondere dann von Interesse, wenn die Getreidekomponente hochsubstituierte und/oder stark vernetzte Arabinoxylane enthält, die für die Xylanase schwer zugänglich sind. Die Xylanase kann dann weder aus der Getreide- noch aus der Sojakomponente XOS in größeren Mengen freisetzen, wodurch deren positive Effekte ausbleiben. Eine Möglichkeit zur Überprüfung, ob die Xylanase (bevorzugt) Xylane oder Arabinoxylane abbaut, ist der Nachweis von AXOS. Diese stammen aus Arabinoxylanen der Getreidekomponente, da Xylane aus dikotylen Pflanzen in der Regel keine nennenswerte Substitution mit Arabinoseeinheiten aufweisen. Hierzu eignen sich die hier durchgeführten *in-vitro*-Versuche, bei denen die im Fütterungsversuch eingesetzte Xylanase mit dem verwendeten Futtermittel inkubiert wird. Idealerweise werden auch die verschiedenen Einzelfuttermittel getrennt voneinander untersucht. Wird die Freisetzung von AXOS nachgewiesen, ist die Xylanase in der Lage die Arabinoxylane abzubauen. Dieser Ansatz kann auch auf Proben aus *in-vivo*-Versuchen (Fütterungsversuche) übertragen werden. Voraussetzung dafür ist eine geeignete Analysemethode, die es ermöglicht XOS und AXOS in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel nachzuweisen.

Proben dieser Art bringen verschiedene Herausforderungen mit sich, da sie z. B. hochkomplexe Matrices aufweisen, die vor der Analyse weitestgehend entfernt werden müssen. Außerdem können in den Proben verschiedenste Oligosaccharide vorkommen, die beispielsweise von tierereigenen, zugesetzten oder mikrobiellen Enzymen freigesetzt werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode ermöglicht den simultanen Nachweis von 44 Oligosacchariden, die in pflanzlichen Materialien vorkommen bzw. aus Polysacchariden der pflanzlichen Zellwände

freigesetzt werden können (vgl. Kapitel 4.4.4). Mit dieser Methode kann, nach Abtrennung störender Matrixbestandteile durch geeignete Extraktion und Aufarbeitung, das Oligosaccharidprofil von Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern bestimmt werden. Bei der Entwicklung der Methode zeigte sich, dass Proben aus verschiedenen Abschnitten des Verdauungstrakts (Ileum und Caecum) unterschiedlich komplexe Matrizes aufweisen und dementsprechend unterschiedlich aufgearbeitet werden müssen, beispielsweise war bei Ileumproben eine Aufreinigung mittels nPGC-SPE ausreichend, wohingegen bei Caecumproben eine Kombination aus C18- und nPGC-SPE erforderlich war. Außerdem stellte sich heraus, dass Proben aus dem gleichen Abschnitt des Verdauungstrakts aus verschiedenen Fütterungsversuchen eine unterschiedliche Zusammensetzung hinsichtlich vorkommender niedermolekularer Kohlenhydrate und unterschiedliche Matrixeffekte aufweisen können. Dies macht eine Überprüfung der Eignung der gewählten Aufarbeitungs- und Analysemethoden erforderlich, wenn Proben aus einem neuen Fütterungsversuch mit einer bestehenden Methode analysiert werden sollen.

Die Analyse der für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Proben aus dem Ileum und Caecum von Broilern, die mit unterschiedlichen Futtermitteln gefüttert wurden, zeigte, dass in den Proben Oligosaccharide verschiedener Oligosaccharidgruppen vorkommen. In der Literatur sind vereinzelt Methoden zur Bestimmung der XOS in solchen Proben beschrieben (Dale *et al.*, 2020; Morgan *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). Jedoch wird in diesen Veröffentlichungen nicht darauf eingegangen, ob überprüft wurde, dass ausschließlich XOS und nicht auch andere Oligosaccharide fälschlicherweise als XOS erfasst werden. Bei der Methode nach Morgan und Mitarbeitenden (2020) wird nach Derivatisierung mit einem selektiven Detektor (MS) gearbeitet, der die Unterscheidung zwischen aus Pentosen und aus Hexosen aufgebauten Oligosaccharide ermöglicht. Bei den beiden anderen genannten Methoden wird mittels HPAEC-PAD analysiert (Dale *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). Mit dem PAD können Kohlenhydrate vergleichsweise selektiv erfasst werden, jedoch erfolgt die Zuordnung ausschließlich über die Retentionszeit. Dementsprechend ist es erforderlich zu überprüfen, dass keine vom PAD detektierbaren Matrixkomponenten oder andere Kohlenhydrate mit den Analyten koeluiieren. Eine weitere Forschungsgruppe beschäftigt sich ebenfalls mit der Analyse von Oligosacchariden in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern (Kouzounis *et al.*, 2021; 2022a). Bei diesen Studien wurden mehrere verschiedene, zum Teil aufwendige Analysetechniken herangezogen, um Informationen über die NSP und (A)XOS in den Proben zu sammeln. Dabei lag der Fokus jedoch eher auf der Analyse der enthaltenen Arabinoxylane und der höheren (A)XOS (ab DP 4).

In der vorliegenden Arbeit konnten anhand der Bestimmung der Oligosaccharidprofile mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Methode sowie weiterer Analysen die in Proben aus dem Ileum und Caecum von Broilern vorkommenden Oligosaccharide identifiziert und zum Teil quantifiziert werden. Ebenfalls quantifiziert wurden die in diesen Proben frei vorliegenden Monosaccharide. Es wurde beobachtet, dass sowohl in den Ileum- als auch in den Caecumproben von Tag 21 die RFO und ihre Invertaseabbauprodukte sowie die

MalOS die mengenmäßig dominierenden Oligosaccharidgruppen darstellen. Da vom Huhn keine körpereigenen Enzyme zum Abbau von NSP gebildet werden, scheint dies für die Ileumproben naheliegend. Die RFO stammen aus den Sojakomponenten im Futter und können ebenfalls von körpereigenen Enzymen nicht vollständig abgebaut werden. In den Caecumproben von Tag 21 konnten vereinzelt Arabinan- und Galactanligosaccharide detektiert werden. Diese lassen, wie erwartet, auf mikrobielle Enzyme zum Abbau von NSP, in diesem Fall Pektinstrukturen, schließen. Bei den Ileumproben von Tag 21 konnte ein Zusammenhang zwischen Proben von den Tieren, welche Xylanase im Futter hatten, und dem Vorkommen von XOS im Ileum festgestellt werden: Bei den Ileumproben von den Tieren aus den Gruppen mit Xylanase wurden erhöhte Mengen an X₂, X₃ und X₄ im Vergleich zur Kon-Gruppe ohne Xylanase detektiert. Demzufolge ist die zum Futter zugeetzte Xylanase in der Lage, den XOS-Gehalt im Verdauungstrakt von Broilern, die mit Mais-Soja-basiertem Futter gefüttert wurden, zu erhöhen. AXOS wurden in den untersuchten Tag-21-Ileumproben nicht detektiert. Demnach kann nicht abschließend gesagt werden, ob die XOS aus den Arabinoxylanen im Mais oder den Xylanen im Soja oder beiden freigesetzt wurden. In Kombination mit den Ergebnissen der *in-vitro*-Versuche mit der verwendeten Xylanase lässt sich jedoch vermuten, dass ein Großteil der XOS aus Sojaxylenen freigesetzt wurde. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen Futter mit Xylanase und einer erhöhten Freisetzung von COS festgestellt werden, die auf die Cellulasenebenaktivität der verwendeten Xylanase zurückzuführen wäre. Die Zugabe von XOS zusätzlich zur Xylanase zum Futter erhöhte den XOS-Gehalt in den Ileumproben geringfügig weiter, wobei der Zusammenhang nur bei den Proben der Tiere, die Futter auf Basis von Maissorte 3 erhielten, statistisch signifikant ($\alpha = 0,05$) war, bei den Proben der Tiere, die Futter auf Basis von Maissorte 4 bekamen, nicht.

Im Gegensatz zu den Ileumproben konnten bei den Caecumproben von Tag 21 keine Zusammenhänge zwischen Futtervariante und XOS-Gehalten festgestellt werden. Sowohl in den Proben der Kon-Gruppen als auch in denen der anderen Gruppen wurden XOS in kleinen, aber ähnlichen Mengen festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass das Mikrobiom in der Lage ist, eine ähnliche Menge an Xylanasen zu produzieren, unabhängig davon, ob der in die Caeca gelangende Darminhalt erhöhte XOS-Gehalte aufwies oder nicht. Diese Beobachtung passt nicht zur Stimbiotika-Theorie, die annimmt, dass ein erhöhter XOS-Gehalt das Caecummikrobiom darauf „trainiert“, vermehrt Xylanasen zu produzieren (Bedford & Apajalahti, 2022; Morgan, 2023). Ebenfalls denkbar wäre, dass es tatsächlich zu einer erhöhten XOS-Freisetzung kam, aber gleichzeitig auch XOS vermehrt abgebaut und verstoffwechselt wurden, wodurch sich ein Gleichgewicht eingestellt hat und deshalb keine erhöhten XOS-Gehalte festgestellt werden konnten. Der Literaturvergleich ergab, dass bei anderen Studien mit Proben aus Broilern im ähnlichen Alter höhere XOS-Gehalte im Ileum und Caecum ermittelt wurden. Diese Studien haben gemeinsam, dass immer mindestens ein Teil des Getreideanteils des Futtermittels aus Weizen bestand. Sowohl in *in-vitro*- als auch in *in-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass entsprechende Xylanasen aus Weizen deutlich mehr XOS freisetzen können als aus Mais (Kouzounis *et al.*,

2021; Dale *et al.*, 2022). Demnach ist denkbar, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete xylanasevermittelte Anstieg der XOS-Gehalte nicht ausreichend war, um Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms hervorzurufen.

Die Analyse der freien Mono- und Oligosaccharide in den Ileum- und Caecumproben von 41-Tage-alten Broilern, die die gleichen Futtermittlervarianten gefüttert bekamen wie die Tiere der Tag-21-Proben, führten zu folgenden Erkenntnissen: Weder für die Ileum- noch für die Caecumproben konnte ein Zusammenhang zwischen Futtermittlervariante und XOS-Gehalten festgestellt werden. Bei den Ileumproben von Tag 41 wurde eine auffällige Veränderung der frei vorliegenden Monosaccharide sowie eine Verschiebung in den Oligosaccharidprofilen beobachtet. Bei den meisten dieser Ileumproben wurden im Vergleich zu den Ileumproben von Tag 21 deutlich geringere Mengen RFO und deren Abbauprodukte festgestellt, wobei es jedoch einzelne Tag-41-Ileumproben gab, die eine für Tag-21-Ileumproben typische Verteilung aufwiesen. Da Broiler keine körpereigenen Enzyme zum vollständigen Abbau von RFO produzieren, wird vermutet, dass in den Ileumproben von Tag 41 mit geringen RFO-Gehalten Enzyme mikrobiellen Ursprungs vorkamen. Dies würde auf eine Veränderung des Ileummikrobioms hindeuten und kann beispielsweise durch den in der Literatur diskutierten *Reflux* erklärt werden (Sacranie *et al.*, 2012; Svihus *et al.*, 2013; Morgan, 2023). Auch die weiteren, in diesen Tag-41-Ileumproben nachgewiesenen Oligosaccharide liefern Hinweise auf das Vorkommen von Enzymen mikrobiellen Ursprungs, wie beispielsweise der Nachweis von XOS in Proben aus der Kon-Gruppe ohne Xylanasezusatz. Es scheint, dass die Anwesenheit von Xylanasen, die vom Mikrobiom generiert wurden, den Effekt der exogenen Xylanase „überschreibt“ bzw. kompensiert, weshalb bei diesen Tag-41-Proben keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen der verschiedenen Futtermittlervarianten festgestellt werden konnten. Zu beachten ist, dass Mikroorganismen neben Xylanasen auch beispielsweise Enzyme zur Abspaltung von Seitenketten der Arabinoxylane (z. B. Arabinofuranosidasen oder Esterasen) bilden können, wodurch die Verdaubarkeit von Maisarabinoxylanen verbessert werden kann (Ward, 2021). Dies reduziert die Bedeutung der Anwesenheit der exogenen Xylanase neben den vom Mikrobiom gebildeten Enzymen. Für die Caecumproben von Tag 41 konnten, wie bei den Caecumproben von Tag 21, keine Zusammenhänge zwischen XOS-Gehalten und Xylanasezusatz im Futter hergestellt werden. Es wurden keine Literaturstellen gefunden, in denen XOS-Gehalte oder XOS-Profile in Darmproben aus Broilern, die älter als 28 Tage waren, analysiert wurden. Ebenfalls wurden keine Studien gefunden, die den RFO-Gehalt in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern beschreiben.

Einige Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, erfordern weitere Untersuchungen. Dazu gehört, dass die XOS im Verdauungstrakt möglicherweise nicht ausschließlich aus den Arabinoxylanen der Getreidekomponenten, sondern auch bzw. überwiegend aus der Sojakomponente freigesetzt werden können. Ebenfalls bisher weitgehend unbeachtet ist, dass je nach verwendeter Sojaquelle unterschiedliche Gehalte an RFO im Futter enthalten sein können und diese, ausgehend von den hier untersuchten Proben, zumindest bei jungen Tieren in größeren Mengen bis in die Caeca gelangen und

dort potenziell das Mikrobiom beeinflussen. Außerdem liefern die hier erhobenen Daten Hinweise darauf, dass sich das Mikrobiom im Ileum der Broiler zwischen Tag 21 und Tag 41 verändert, was eine Veränderung der Oligosaccharidprofile im Ileum und damit der in die Caeca gelangenden Oligosaccharide zur Folge hat. Zu welchem Zeitpunkt und warum sich das Mikrobiom im Ileum verändert hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Hierzu wäre die Untersuchung von Proben zu mehr als zwei Zeitpunkten erforderlich. Die Auswertung der Leistungsparameter des zugrundeliegenden Fütterungsversuchs lag zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit nicht vor und konnte daher nicht mit einbezogen werden.

5. Zusammenfassung

Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) sind Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand und kommen in allen pflanzlichen Materialien vor. In Geflügelfuttermitteln werden ihnen antinutritive Effekte zugeschrieben, weshalb dem Futter NSP-spaltende Enzyme wie *endo*-Xylanasen zugesetzt werden. Letztere spalten potenziell die in Getreide enthaltenen Arabinoxylane, abhängig von deren Komplexität. Dadurch kann nachweislich, jedoch abhängig von der Futtermittelzusammensetzung, die Futterumsetzung gesteigert und die Gesundheit der Tiere gefördert werden. Dem zugrunde liegt ein komplexer Wirkmechanismus, der nicht abschließend aufgeklärt ist. Dabei stellen die von der Xylanase im Verdauungstrakt freigesetzten (Arabino-)Xylooligosaccharide ((A)XOS) vermutlich eine Schlüsselkomponente dar, da sie sich durch ihre präbiotischen Eigenschaften positiv auf das Darmmikrobiom der Tiere auswirken können. An der *in-vivo*-Freisetzung der (A)XOS sind eine Reihe verschiedener Faktoren, wie die Struktur der NSP im verwendeten Futter und die Eigenschaften der eingesetzten Xylanase, beteiligt. Um sicherzustellen, dass dem Mikrobiom (A)XOS zur Verfügung stehen, gibt es zusätzlich den Ansatz, das Geflügelfuttermittel mit kleinen Mengen (A)XOS anzureichern. Es wurde jedoch beobachtet, dass der Zusatz von Xylanasen und/oder (A)XOS zum Futter in Fütterungsversuchen mit Broilern nicht in allen Fällen zu einer Verbesserung der Resultate führt. Mögliche Gründe dafür sind derzeit unbekannt. Ein Ansatzpunkt, um diese Beobachtungen aufzuklären, ist die bisher selten durchgeführte Analyse der NSP im Futtermittel, die Charakterisierung der zugesetzten Xylanase und (A)XOS sowie insbesondere die Bestimmung der im Verdauungstrakt vorkommenden Oligosaccharide.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eben diese Parameter für einen Fütterungsversuch mit Broilern detailliert untersucht. Die verschiedenen Broilergruppen wurden mit Mais-Soja-basiertem Futter gefüttert, wobei vier verschiedene Mais-basierte Einzelfuttermittel, zwei Soja-basierte Einzelfuttermittel sowie der Zusatz von einer Xylanase und einer Kombination aus Xylanase und XOS im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zusätze betrachtet wurden. Die NSP in den Einzelfuttermitteln wurden umfassend charakterisiert. Die Analyse der Maisproben bestätigte, dass hochsubstituierte Arabinoxylane vorliegen, zeigte aber nur geringfügige Unterschiede in den NSP-Strukturen der Mais-basierten Rohstoffe. Auch die NSP der Sojaprobe wiesen einen vergleichbaren strukturellen Aufbau auf. Jedoch wurden Unterschiede im Gehalt an Oligosacchariden der Raffinose-Familie (RFO) zwischen den beiden Proben festgestellt (2,9 mg bzw. 36,4 mg/g Mehl). Außerdem wurden die beiden zum Futter zugegebenen Komponenten charakterisiert. Die Analyse des zur Anreicherung des Futters eingesetzten XOS-haltigen Materials ergab, dass dieses lediglich zu 25 % aus XOS mit einem Polymerisationsgrad (DP) von zwei bis sechs besteht. Dabei macht Xylobiose den höchsten Anteil (58 %) aus, gefolgt von Xylotriose (30 %). In einem *in-vitro*-Versuch wurde untersucht, welche Oligosaccharide die zum Futter zugegebene *endo*-Xylanase aus den einzelnen Einzelfuttermitteln freisetzen kann. Dabei wurde festgestellt, dass die Xylanase in den zum Futter

zugegebenen Aktivitäten kaum (A)XOS aus Mais freisetzt. Jedoch wurde eine XOS-Freisetzung aus den Sojaprodukten beobachtet. Dies bedeutet, dass nicht nur - wie bisher angenommen - die Arabinoxylane in der Getreidekomponente des Futters zu einer XOS-Freisetzung im Verdauungstrakt von Geflügel beitragen, sondern möglicherweise auch bzw., je nach Futtermittelzusammensetzung, überwiegend XOS aus dem Xylan der Sojekomponente freigesetzt werden.

Zur Analyse der Oligosaccharide in Proben aus dem Verdauungstrakt von Broilern wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Profilingmethode mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer und massenspektrometrischer Detektion (HPAEC-PAD/MS) entwickelt, die die simultane Identifizierung von 44 potenziell in den Proben enthaltener Oligosaccharide (DP 2 - 6) aus neun verschiedenen Oligosaccharidgruppen ermöglicht. Ebenfalls entwickelt wurde eine geeignete Extraktions- und Aufreinigungsmethode. Die entwickelte Aufarbeitungs- und HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode wurde zur Untersuchung der Proben des Ileum- und Caecuminhalts von 21- und 41-Tagealten Broilern nach Fütterung der verschiedenen Futtervarianten eingesetzt. Daneben wurden weitere Methoden der analytischen Kohlenhydratchemie zur Untersuchung der Oligosaccharide in diesen Proben herangezogen.

Grundsätzlich war es mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Methode möglich, Oligosaccharide in diesen Proben zu identifizieren. Dabei wurde festgestellt, dass im Ileuminhalt größere Mengen an Oligosacchariden vorkommen als im Caecuminhalt. In den Ileumproben von 21-Tagealten Broilern stellten die RFO die dominierende Oligosaccharidgruppe dar. Außerdem konnte bei diesen Proben ein Zusammenhang zwischen XOS-Gehalt und Xylanasezugabe festgestellt werden. Wurde Xylanase im Futter verwendet, waren erhöhte Mengen XOS (DP 2 - 4) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Faktor 2 - 3) nachweisbar. Dieser Zusammenhang war bei Ileumproben von 41-Tagealten Broilern nicht mehr festzustellen. In diesen Ileumproben wurden Oligosaccharide identifiziert, die darauf hinweisen, dass es zu einer Veränderung des Mikrobioms im Ileum über die Zeit kommt. In den Caecumproben konnten Oligosaccharide detektiert werden, die vermutlich durch mikrobielle Fermentation aus den im Futtermittel enthaltenen NSP freigesetzt wurden. Weder bei Caecumproben von 21- noch von 41-Tagealten Broilern konnten Zusammenhänge zwischen den ermittelten Oligosaccharidprofilen und den Futtervarianten festgestellt werden. Der Zusatz von Xylanase oder Xylanase und XOS zum Futter führte nicht zu einer Erhöhung des XOS-Gehalts im Caecum, wie es in der Literatur, aufgrund der präbiotischen Wirkung von XOS und einer folgenden Anpassung des Mikrobioms, vermutet wird. Grund hierfür könnte die hochsubstituierte Struktur der Maisarabinoxylane sein, wodurch es zu einer geringeren und vermutlich überwiegend auf Sojaxylane zurückzuführenden XOS-Freisetzung durch die zum Futter zugegebenen Xylanase kommt. Andererseits konnten die Analysen der Ileumproben von 21-Tagealten Broilern zeigen, dass die Xylanase grundsätzlich in der Lage ist, den XOS-Gehalt im Verdauungstrakt von Broilern zu erhöhen. Möglicherweise waren die freigesetzten XOS-Mengen nicht ausreichend, um eine Anpassung des Mikrobioms im Caecum hervorzurufen. Um diesen

Fragestellungen weiter nachzugehen, sind zusätzliche Studien erforderlich, zu denen die hier entwickelten und beschriebenen Aufarbeitungs- und Analysemethoden einen wesentlichen Beitrag leisten können.

6. Literaturverzeichnis

- Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D. & Karr, A. (1967):** A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate research*, 5: 340–345.
- Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H. & Bunzel, M. (2006):** Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry*, 67: 1276–1286.
- Appeldoorn, M.M., de Waard, P., Kabel, M.A., Gruppen, H. & Schols, H.A. (2013):** Enzyme resistant feruloylated xylooligomer analogues from thermochemically treated corn fiber contain large side chains, ethyl glycosides and novel sites of acetylation. *Carbohydrate research*, 381: 33–42.
- Bach Knudsen, K.E. (1997):** Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal feed science and technology*, 67: 319–338.
- Bach Knudsen, K.E. (2014):** Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry science*, 93: 2380–2393.
- Baker, J.T., Duarte, M.E., Holanda, D.M. & Kim, S.W. (2021):** Friend or foe? Impacts of dietary xylans, xylooligosaccharides, and xylanases on intestinal health and growth performance of monogastric animals. *Animals*, 11: 609 (25 Seiten).
- Barberousse, H., Roiseux, O., Robert, C., Paquot, M., Deroanne, C. & Blecker, C. (2008):** Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *Journal of the science of food and agriculture*, 88: 1494–1511.
- Bautil, A., Buyse, J., Goos, P., Bedford, M.R. & Courtin, C.M. (2021):** Feed endoxylanase type and dose affect arabinoxylan hydrolysis and fermentation in ageing broilers. *Animal nutrition*, 7: 787–800.
- Bautil, A., Verspreet, J., Buyse, J., Goos, P., Bedford, M.R. & Courtin, C.M. (2019):** Age-related arabinoxylan hydrolysis and fermentation in the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. *Poultry science*, 98: 4606–4621.
- Bautil, A., Verspreet, J., Buyse, J., Goos, P., Bedford, M.R. & Courtin, C.M. (2020):** Arabinoxylan-oligosaccharides kick-start arabinoxylan digestion in the aging broiler. *Poultry science*, 99: 2555–2565.
- Bedford, M.R. (2018):** The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. *British poultry science*, 59: 486–493.
- Bedford, M.R. & Apajalahti, J.H. (2022):** The role of feed enzymes in maintaining poultry intestinal health. *Journal of the science of food and agriculture*, 102: 1759–1770.
- Bender, C., Stoll, D., Huch, M., Weinert, C., Dötsch, A., Dräger, H., Keller, J., Kulling, S. & Bunzel, M. (2023):** Time-dependent fermentation of different structural units of commercial pectins with intestinal bacteria. *Carbohydrate polymers*, 308: 120642 (11 Seiten).

- Bhardwaj, N., Kumar, B. & Verma, P. (2019):** A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and bioprocessing*, 6: 40 (36 Seiten).
- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J. & Leschine, S. (2013):** Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5: 627–640.
- Biely, P., Singh, S. & Puchart, V. (2016):** Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnology advances*, 34: 1260–1274.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. & Stone, B.A. (1983):** A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate research*, 113: 291–299.
- Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003):** Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54: 519–546.
- Borda-Molina, D., Seifert, J. & Camarinha-Silva, A. (2018):** Current perspectives of the chicken gastrointestinal tract and its microbiome. *Computational and structural biotechnology journal*, 16: 131–139.
- Boulos, S. & Nyström, L. (2017):** Complementary sample preparation strategies for analysis of cereal β -glucan oxidation products by UPLC-MS/MS. *Frontiers in chemistry*, 5: 90 (24 Seiten).
- Bunzel, M. (2010):** Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry reviews*, 9: 47–64.
- Bunzel, M., Schüssler, A. & Tchetsebu Saha, G. (2011):** Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: 12506–12513.
- Caffall, K.H. & Mohnen, D. (2009):** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research*, 344: 1879–1900.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M. (1993):** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The plant journal*, 3: 1–30.
- CCRC, Complex Carbohydrate Research Center (2007):** The CCRC spectral database for PMAA's. *University of Georgia, Athens, GA, USA*.
- Chang, L., Ding, Y., Wang, Y., Song, Z., Li, F., He, X. & Zhang, H. (2022):** Effects of different oligosaccharides on growth performance and intestinal function in broilers. *Frontiers in veterinary science*, 9: 852545 (12 Seiten).
- Choct, M., Dersjant-Li, Y., McLeish, J. & Peisker, M. (2010):** Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 23: 1386–1398.
- Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984):** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate research*, 131: 209–217.

- Courtin, C.M., Broekaert, W.F., Swennen, K., Lescroart, O., Onagbesan, O., Buyse, J., Decuyper, E., van de Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., Huyghebaert, G. & Delcour, J.A. (2008): Dietary inclusion of wheat bran arabinoxyloligosaccharides induces beneficial nutritional effects in chickens. *Cereal chemistry*, 85: 607–613.
- Craig, A.D., Khattak, F., Hastie, P., Bedford, M.R. & Olukosi, O.A. (2020): Xylanase and xylo-oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. *British poultry science*, 61: 70–78.
- Dale, T., Bedford, M.R., King, J., Tucker, G.A., Brameld, J.M. & Parr, T. (2023): The effects of exogenous fibrolytic enzymes on the *in vitro* release of xylooligosaccharides and monosaccharides varies across six varieties of wheat. *Animal feed science and technology*, 295: 115526 (10 Seiten).
- Dale, T., Bedford, M.R., Tucker, G.A., Brameld, J.M. & Parr, T. (2022): The effects of exogenous fibrolytic enzymes on the *in vitro* generation of xylooligosaccharides and monosaccharides is dependent upon cereal type. *Animal feed science and technology*, 292: 115406 (12 Seiten).
- Dale, T., Hannay, I., Bedford, M.R., Tucker, G.A., Brameld, J.M. & Parr, T. (2020): The effects of exogenous xylanase supplementation on the *in vivo* generation of xylooligosaccharides and monosaccharides in broilers fed a wheat-based diet. *British poultry science*, 61: 471–481.
- De Maesschalck, C., Eeckhaut, V., Maertens, L., De Lange, L., Marchal, L., Nezer, C., De Baere, S., Croubels, S., Daube, G., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Taminiau, B. & Van Immerseel, F. (2015): Effects of xylo-oligosaccharides on broiler chicken performance and microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 81: 5880–5888.
- De Ruiter, G.A., Schols, H.A., Voragen, A.G. & Rombouts, F.M. (1992): Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical biochemistry*, 207: 176–185.
- de Verdal, H., Mignon-Grasteau, S., Jeulin, C., Le Bihan-Duval, E., Leconte, M., Mallet, S., Martin, C. & Narcy, A. (2010): Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines divergently selected for digestive efficiency. *Poultry science*, 89: 1955–1961.
- Dobberstein, D. & Bunzel, M. (2010): Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58: 8927–8935.
- Ebringerová, A. (2006): Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular symposia*, 232: 1–12.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Alföldi, J. & Berth, G. (1992): Structural and solution properties of corn cob heteroxylans. *Carbohydrate polymers*, 19: 99–105.

- Ekvall, J., Stegmark, R. & Nyman, M. (2007): Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. *Journal of food composition and analysis*, 20: 13–18.
- Elling-Staats, M.L., Gilbert, M.S., Smidt, H. & Kwakkel, R.P. (2022): Caecal protein fermentation in broilers: a review. *World's poultry science journal*, 78: 103–123.
- Englyst, H.N. & Cummings, J.H. (1984): Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *The analyst*, 109: 937–942.
- Englyst, H.N., Quigley, M.E. & Hudson, G.J. (1994): Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *The analyst*, 119: 1497–1509.
- Fauré, R., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Dumon, C., Faulds, C.B., Fincher, G.B., Fort, S., Fry, S.C., Halila, S., Kabel, M.A., Pouvreau, L., Quemener, B., Rivet, A., Saulnier, L., Schols, H.A., Driguez, H. & O'Donohue, M.J. (2009): A brief and informationally rich naming system for oligosaccharide motifs of heteroxylans found in plant cell walls. *Australian journal of chemistry*, 62: 533–537.
- Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.-P., Kato, Y., Lorences, E.P., Maclachlan, G.A., McNeil, M., Mort, A.J., Grant Reid, J.S., Seitz, H.U., Selvendran, R.R., Voragen, A.G.J. & White, A.R. (1993): An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia plantarum*, 89: 1–3.
- Glendinning, L., Stewart, R.D., Pallen, M.J., Watson, K.A. & Watson, M. (2020): Assembly of hundreds of novel bacterial genomes from the chicken caecum. *Genome biology*, 21: 34 (16 Seiten).
- González-Ortiz, G., Dos Santos, T.T. & Bedford, M.R. (2021): Evaluation of xylanase and a fermentable xylo-oligosaccharide on performance and ileal digestibility of broiler chickens fed energy and amino acid deficient diets. *Animal nutrition*, 7: 488–495.
- Harris, P.J. & Smith, B.G. (2006): Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International journal of food science and technology*, 41: 129–143.
- Hatfield, R. & Fukushima, R.S. (2005): Can lignin be accurately measured? *Crop science*, 45: 832–839.
- Hemström, P. & Irgum, K. (2006): Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science*, 29: 1784–1821.
- Huisman, M., Schols, H. & Voragen, A. (2000): Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls. *Carbohydrate polymers*, 43: 269–279.
- Ijaz, U.Z., Sivaloganathan, L., McKenna, A., Richmond, A., Kelly, C., Linton, M., Stratakos, A.C., Lavery, U., Elmi, A., Wren, B.W., Dorrell, N., Corcionivoschi, N. &

- Gundogdu, O. (2018):** Comprehensive longitudinal microbiome analysis of the chicken cecum reveals a shift from competitive to environmental drivers and a window of opportunity for *Campylobacter*. *Frontiers in microbiology*, 9: 2452 (14 Seiten).
- Ishii, T. (1997):** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant science*, 127: 111–127.
- IUPAC (1995):** Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*, 67: 1307–1375.
- Jahan, A.A., González Ortiz, G., Moss, A.F., Bhuiyan, M.M. & Morgan, N.K. (2022):** Role of supplemental oligosaccharides in poultry diets. *World's poultry science journal*, 78: 615–639.
- Jansson, P.E., Kenne, L., Liedgren, H. & Lindberg, B.: Lönngrén, J. (1976):** A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chemical communications*, 8: 1–85.
- Jaworski, N.W., Lærke, H.N., Bach Knudsen, K.E. & Stein, H.H. (2015):** Carbohydrate composition and *in vitro* digestibility of dry matter and nonstarch polysaccharides in corn, sorghum, and wheat and coproducts from these grains. *Journal of animal science*, 93: 1103–1113.
- Jeroch, H., Simon, A. & Zentek, J. (Hrsg.) (2019):** Geflügelernährung. Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels. 2. Auflage, *Eugen Ulmer Verlag*, Stuttgart.
- Jeziorny, D., Mosenthin, R. & Bauer, E. (2010):** The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: a review. *Animal feed science and technology*, 157: 111–128.
- Jilek, M.L. & Bunzel, M. (2013):** Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal flours. *Cereal chemistry*, 90: 507–514.
- Kaczmarska, A., Pieczywek, P.M., Cybulska, J. & Zdunek, A. (2022):** Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: a review. *Carbohydrate polymers*, 278: 118909 (10 Seiten).
- Khan, S., Moore, R.J., Stanley, D. & Chousalkar, K.K. (2020):** The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety. *Applied and environmental microbiology*, 86: e00600-20 (18 Seiten).
- Kiarie, E., Romero, L.F. & Ravindran, V. (2014):** Growth performance, nutrient utilization, and digesta characteristics in broiler chickens fed corn or wheat diets without or with supplemental xylanase. *Poultry science*, 93: 1186–1196.
- Kim, E., Morgan, N.K., Moss, A.F., Li, L., Ader, P. & Choct, M. (2022):** Characterisation of undigested components throughout the gastrointestinal tract of broiler chickens fed either a wheat- or maize-based diet. *Animal nutrition*, 8: 153–159.
- Kim, J.B. & Carpita, N.C. (1992):** Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant physiology*, 98: 646–653.

- Kothari, D., Patel, S. & Goyal, A. (2014): Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: overview of current state and prospect. *Journal of food science*, 79: 1491-1498.
- Kouzounis, D., Hageman, J.A., Soares, N., Michiels, J. & Schols, H.A. (2021): Impact of xylanase and glucanase on oligosaccharide formation, carbohydrate fermentation patterns, and nutrient utilization in the gastrointestinal tract of broilers. *Animals*, 11: 1285 (25 Seiten).
- Kouzounis, D., Jonathan, M.C., Soares, N., Kabel, M.A. & Schols, H.A. (2022a): *In vivo* formation of arabinoxylo-oligosaccharides by dietary endo-xylanase alters arabinoxylan utilization in broilers. *Carbohydrate polymers*, 291: 119527 (10 Seiten).
- Kouzounis, D., Sun, P., Bakx, E.J., Schols, H.A. & Kabel, M.A. (2022b): Strategy to identify reduced arabinoxylo-oligosaccharides by HILIC-MSⁿ. *Carbohydrate polymers*, 289: 119415 (13 Seiten).
- Lee, S.A., Apajalahti, J., Vienola, K., González-Ortiz, G., Fontes, C. & Bedford, M.R. (2017): Age and dietary xylanase supplementation affects ileal sugar residues and short chain fatty acid concentration in the ileum and caecum of broiler chickens. *Animal feed science and technology*, 234: 29–42.
- Lee, Y.C. (1990): High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Analytical biochemistry*, 189: 151–162.
- Lin, S., Agger, J.W., Wilkens, C. & Meyer, A.S. (2021): Feruloylated arabinoxylan and oligosaccharides: chemistry, nutritional functions, and options for enzymatic modification. *Annual review of food science and technology*, 12: 331–354.
- Liu, H.Y., Li, X., Zhu, X., Dong, W.G. & Yang, G.Q. (2021): Soybean oligosaccharides attenuate odour compounds in excreta by modulating the caecal microbiota in broilers. *Animal*, 15: 100159 (8 Seiten).
- Liu, Q., Le Luo & Zheng, L. (2018): Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *International journal of molecular sciences*, 19: 335 (16 Seiten).
- Mabelebele, M., Norris, D., Brown, D., Ginindza, M.M. & Ngambi, J.W. (2017): Breed and sex differences in the gross anatomy, digesta pH and histomorphology of the gastrointestinal tract of *Gallus Gallus Domesticus*. *Brazilian journal of poultry science*, 19: 339–346.
- Mahmood, T. & Guo, Y. (2020): Dietary fiber and chicken microbiome interaction: Where will it lead to? *Animal nutrition*, 6: 1–8.
- Masey O'Neill, H.V., Smith, J.A. & Bedford, M.R. (2014): Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27: 290–301.
- McCleary, B.V., de Vries, J.W., Rader, J.I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D.C., Champ, M., Okuma, K., Abercrombie, L., Ames, N., Bajoras, T., Bhandari, S., Burkhardt, G., Camire, M., Cohen, G., Cui, S., Dougherty, M.P., Erhardt, S., Evans, A., Grutters, M., Hutton-Okpalaeke, M., Illaens, S., Kanaya, K., Kohn, A., Konings, E., Lai, G., Lee, T., Marshak, M., Neese, U., Nishibata, T., Santi, A., Saylor, D., Steegmans, M., Themeier, H., Thomsen, A., Tervila-Wilo, A., Walker, R. & Wang, C. (2010): Determination of

- total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 93: 221–233.
- McCleary, B.V., Sloane, N. & Draga, A. (2015):** Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: a rapid integrated procedure that simulates *in vivo* digestion. *Structural chemistry*, 67: 860–883.
- McCleary, B.V., Sloane, N., Draga, A. & Lazewska, I. (2013):** Measurement of total dietary fiber using AOAC method 2009.01 (AACC international approved method 32-45.01): evaluation and updates. *Cereal chemistry*, 90: 396–414.
- McDougall, G.J., Morrison, I.M., Stewart, D. & Hillman, J.R. (1996):** Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal of the science of food and agriculture*, 70: 133–150.
- Mohnen, D. (2008):** Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11: 266–277.
- Moreira, L.R.S. & Filho, E.X.F. (2008):** An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 79: 165–178.
- Morgan, A.J., Bedford, M.R., Tervila-Wilo, A., Autio, K., Hopekoski-Nurminen, M., Poutanen, K. & Parkkonen, T. (1995):** How enzymes improve the nutritional value of wheat. *Zootecnica international*, 4: 44–48.
- Morgan, N.K. (2023):** Advances in prebiotics for poultry: role of the caeca and oligosaccharides. *Animal production science*, 0: 1–15.
- Morgan, N.K., Bhuiyan, M.M., Nguyen, T.N.A., Middlebrook, T. & Hopcroft, R. (2021a):** Dietary soluble non-starch polysaccharide level and composition influences grower and finisher phase performance, excreta moisture content and total tract nutrient digestibility in broilers. *British poultry science*, 62: 759–770.
- Morgan, N.K., Gomes, G.A. & Kim, J.C. (2021b):** Comparing the efficacy of stimbiotic and a combination of xylanase and beta-glucanase, in broilers fed wheat-barley based diets with high or low AME. *Poultry science*, 100: 101383 (8 Seiten).
- Morgan, N.K., Keerqin, C., Wallace, A., Wu, S.-B. & Choct, M. (2019):** Effect of arabinoxyloligosaccharides and arabinoxylans on net energy and nutrient utilization in broilers. *Animal nutrition*, 5: 56–62.
- Morgan, N.K., Wallace, A. & Bedford, M.R. (2022):** Improving sorghum digestion in broilers by targeting fermentation of xylan. *Animal nutrition*, 10: 198–206.
- Morgan, N.K., Wallace, A., Bedford, M.R., Hawking, K.L., Rodrigues, I., Hilliar, M. & Choct, M. (2020):** *In vitro* versus *in situ* evaluation of xylan hydrolysis into xylo-oligosaccharides in broiler chicken gastrointestinal tract. *Carbohydrate polymers*, 230: 115645 (7 Seiten).
- Mussatto, S.I. & Mancilha, I.M. (2007):** Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate polymers*, 68: 587–597.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Takao, T. & Nagamatsu, Y. (2002):** Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66: 1155–1158.

- Nguyen, H.T., Bedford, M.R. & Morgan, N.K. (2021): Importance of considering non-starch polysaccharide content of poultry diets. *World's poultry science journal*, 77: 619–637.
- Nguyen, H.T., Bedford, M.R., Wu, S.-B. & Morgan, N.K. (2022): Dietary soluble non-starch polysaccharide level influences performance, nutrient utilisation and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. *Animals*, 12: 547 (17 Seiten).
- Nordberg Karlsson, E., Schmitz, E., Linares-Pastén, J.A. & Adlercreutz, P. (2018): Endoxylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 102: 9081–9088.
- Olukosi, O.A., Walker, R.L. & Houdijk, J.G.M. (2019): Evaluation of the nutritive value of legume alternatives to soybean meal for broiler chickens. *Poultry science*, 98: 5778–5788.
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R. & Redmond, J.W. (1998): A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconjugate journal*, 15: 737–747.
- 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. *Carbohydrate research*, 344: 2480–2488.
- Pedersen, M.B., Bunzel, M., Schäfer, J., Knudsen, K.E.B., Sørensen, J.F., Yu, S. & Lærke, H.N. (2015): Ferulic acid dehydrodimer and dehydrotrimer profiles of distiller's dried grains with solubles from different cereal species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63: 2006–2012.
- Peterbauer, T. & Richter, A. (2001): Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed science research*, 11: 185–197.
- Pettolino, F.A., Walsh, C., Fincher, G.B. & Bacic, A. (2012): Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature protocols*, 7: 1590–1607.
- Pourabedin, M., Chen, Q., Yang, M. & Zhao, X. (2017): Mannan- and xylooligosaccharides modulate caecal microbiota and expression of inflammatory-related cytokines and reduce caecal *Salmonella enteritidis* colonisation in young chickens. *FEMS microbiology ecology*, 93: 1–11.
- Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., Devins, D.J., Schweizer, T.F. & Harland, B.F. (1985): Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 68: 677–679.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P. & Garcia-Casal, M.N. (2014): Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York academy of sciences*, 1312: 105–112.
- Rausch, A. (2022): Entwicklung einer Methode zur Analyse der Oligosaccharide in Darmproben von Geflügel. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Schäfer, D.S. & Bunzel, M.

- Redmond, J.W. & Packer, N.H. (1999):** The use of solid-phase extraction with graphitised carbon for the fractionation and purification of sugars. *Carbohydrate research*, 319: 74–79.
- Rehman, H.U., Vahjen, W., Awad, W.A. & Zentek, J. (2007):** Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Archives of animal nutrition*, 61: 319–335.
- Ribeiro, T., Cardoso, V., Ferreira, L.M.A., Lordelo, M.M.S., Coelho, E., Moreira, A.S.P., Domingues, M.R.M., Coimbra, M.A., Bedford, M.R. & Fontes, C.M.G.A. (2018):** Xylooligosaccharides display a prebiotic activity when used to supplement wheat or corn-based diets for broilers. *Poultry science*, 97: 4330–4341.
- Robinson, R.C., Colet, E., Tian, T., Poulsen, N.A. & Barile, D. (2018):** An improved method for the purification of milk oligosaccharides by graphitised carbon-solid phase extraction. *International dairy journal*, 80: 62–68.
- Rohrer, J. (2013):** Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Technical Note 20. *Thermo Fisher Scientific, CA, USA*, 20: 1–12.
- Sacranie, A., Svihus, B., Denstadli, V., Moen, B., Iji, P.A. & Choct, M. (2012):** The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. *Poultry science*, 91: 693–700.
- Saeman, J.F., Bubl, J.L. & Harris, E.E. (1945):** Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial & engineering chemistry analytical edition*, 17: 35–37.
- Samanta, A.K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A.P., Senani, S. & Sridhar, M. (2015a):** Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: production and applications. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 5: 62–71.
- Samanta, A.K., Jayapal, N., Kolte, A.P., Senani, S., Sridhar, M., Dhali, A., Suresh, K.P., Jayaram, C. & Prasad, C.S. (2015b):** Process for enzymatic production of xylooligosaccharides from the xylan of corn cobs. *Journal of food processing and preservation*, 39: 729–736.
- Samanya, M. & Yamauchi, K. (2002):** Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. *Comparative biochemistry and physiology part A*, 133: 95–104.
- Santiago, R. & Malvar, R.A. (2010):** Role of dehydrodiferulates in maize resistance to pests and diseases. *International journal of molecular sciences*, 11: 691–703.
- Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Souza, L.M., Czelusniak, P.A. & Iacomini, M. (2005):** Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on purdie methylation. *Carbohydrate research*, 340: 731–739.
- Saulnier, L., Mestres, C., Doublier, J.-L., Roger, P. & Thibault, J.-F. (1993):** Studies of polysaccharides solubilized during alkaline cooking of maize kernels. *Journal of cereal science*, 17: 267–276.

- Saulnier, L., Vigouroux, J. & Thibault, J.F. (1995):** Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydrate research*, 272: 241–253.
- Schäfer, J., Sattler, M., Iqbal, Y., Lewandowski, I. & Bunzel, M. (2019):** Characterization of *Miscanthus* cell wall polymers. *Global change biology bioenergy*, 11: 191–205.
- Scheller, H.V. & Ulvskov, P. (2010):** Hemicelluloses. *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 (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*.
- Schendel, R.R., Meyer, M.R. & Bunzel, M. (2016):** Quantitative profiling of feruloylated arabinoxylan side-chains from graminaceous cell walls. *Frontiers in plant science*, 6: 1249 (11 Seiten).
- Schultink, A., Liu, L., Zhu, L. & Pauly, M. (2014):** Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents. *Plants*, 3: 526–542.
- Sergeant, M.J., Constantinidou, C., Cogan, T.A., Bedford, M.R., Penn, C.W. & Pallen, M.J. (2014):** Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PloS ONE*, 9: e91941 (13 Seiten).
- Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B. & Kim, W.K. (2018):** Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Frontiers in veterinary science*, 5: 254 (11 Seiten).
- Sims, I.M., Carnachan, S.M., Bell, T.J. & Hinkley, S.F.R. (2018):** Methylation analysis of polysaccharides: technical advice. *Carbohydrate polymers*, 188: 1–7.
- Sitter, L. (2022):** Entwicklung eines Screenings für (Arabino-)Xylan-Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Schäfer, D.S., Schmidt, R. & Bunzel, M.
- Stanley, D., Geier, M.S., Hughes, R.J., Denman, S.E. & Moore, R.J. (2013):** Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. *PloS ONE*, 8: e84290 (7 Seiten).
- 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. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69: 8838–8849.
- Suo, H., Lu, L., Xu, G., Xiao, L., Chen, X., Xia, R., Zhang, L. & Luo, X. (2015):** Effectiveness of dietary xylo-oligosaccharides for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Journal of integrative agriculture*, 14: 2050–2057.
- Svihus, B. (2014):** Function of the digestive system. *Journal of applied poultry research*, 23: 306–314.
- Svihus, B., Choct, M. & Classen, H.L. (2013):** Function and nutritional roles of the avian caeca: a review. *World's poultry science journal*, 69: 249–264.

- 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. *Carbohydrate research*, 40: 217–225.
- Tejeda, O.J. & Kim, W.K. (2021):** Role of dietary fiber in poultry nutrition. *Animals*, 11: 461 (16 Seiten).
- Tuomivaara, S.T., Yaoi, K., O'Neill, M.A. & York, W.S. (2015):** Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature. *Carbohydrate research*, 402: 56–66.
- Van Hoeck, V., Wu, D., Somers, I., Wealleans, A., Vasanthakumari, B.L., Gonzalez Sanchez, A.L. & Morisset, D. (2021):** Xylanase impact beyond performance: a prebiotic approach in broiler chickens. *Journal of applied poultry research*, 30: 100193 (13 Seiten).
- Van Soest, P.J. (1963):** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of AOAC international*, 46: 829–835.
- Vogel, J. (2008):** Unique aspects of the grass cell wall. *Current opinion in plant biology*, 11: 301–307.
- Voragen, A.G.J., Coenen, G.-J., Verhoef, R.P. & Schols, H.A. (2009):** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural chemistry*, 20: 263–275.
- Vries, J.A. de, Rombouts, F.M., Voragen, A. & Pilnik, W. (1982):** Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate polymers*, 2: 25–33.
- Wagner, L. (2022):** Charakterisierung zellwandbasierter Polymere in verschiedenen Futtermittelrohstoffen. Masterarbeit: *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie*, Schäfer, D.S. & Bunzel, M.
- Ward, N.E. (2021):** Debranching enzymes in corn/soybean meal-based poultry feeds: a review. *Poultry science*, 100: 765–775.
- Wefers, D. & Bunzel, M. (2016):** Arabinan and galactan oligosaccharide profiling by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of agricultural and food chemistry*, 64: 4656–4664.
- Wefers, D., Tyl, C.E. & Bunzel, M. (2014):** Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Frontiers in chemistry*, 2: 100 (9 Seiten).
- Weitzhandler, M., Pohl, C., Rohrer, J., Narayanan, L., Slingsby, R. & Avdalovic, N. (1996):** Eliminating amino acid and peptide interference in high-performance anion-exchange pulsed amperometric detection glycoprotein monosaccharide analysis. *Analytical biochemistry*, 241: 128–134.
- Westphal, Y., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. & Gruppen, H. (2010):** Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. *Journal of chromatography A*, 1217: 689–695.

- Weurding, R.E., Veldman, A., Veen, W.A., van der Aar, P.J. & Verstegen, M.W. (2001): Starch digestion rate in the small intestine of broiler chickens differs among feedstuffs. *The journal of nutrition*, 131: 2329–2335.
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H., Hemming, J. & Holmbom, B. (2009): Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial crops and products*, 29: 571–580.
- Wu, W., Zhou, H., Chen, Y., Guo, Y. & Yuan, J. (2023): Debranching enzymes decomposed corn arabinoxylan into xylooligosaccharides and achieved prebiotic regulation of gut microbiota in broiler chickens. *Journal of animal science and biotechnology*, 14: 34 (16 Seiten).
- Wu, W., Zhou, H., Chen, Y., Li, C., Guo, Y. & Yuan, J. (2022): Optimization of compound ratio of exogenous xylanase and debranching enzymes supplemented in corn-based broiler diets using *in vitro* simulated gastrointestinal digestion and response surface methodology. *Animals*, 12: 2641 (14 Seiten).
- Xu, Y., Fan, L., Wang, X., Yong, Q. & Yu, S.-Y. (2013): Simultaneous separation and quantification of linear xylo- and cello-oligosaccharides mixtures in lignocellulosics processing products on high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. *Bioresources*, 8: 3247–3259.
- Yamabhai, M., Sak-Ubol, S., Srila, W. & Haltrich, D. (2016): Mannan biotechnology: from biofuels to health. *Critical reviews in biotechnology*, 36: 32–42.
- Zamil, M.S. & Geitmann, A. (2017): The middle lamella—more than a glue. *Physical biology*, 14: 15004 (11 Seiten).
- Zampiga, M., Calini, F. & Sirri, F. (2021): Importance of feed efficiency for sustainable intensification of chicken meat production: implications and role for amino acids, feed enzymes and organic trace minerals. *World's poultry science journal*, 77: 639–659.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L. & Zhou, Y. (2021): The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions. *Journal of integrative plant biology*, 63: 251–272.
- Zhang, L., Xu, J., Lei, L., Jiang, Y., Gao, F. & Zhou, G.H. (2014): Effects of xylanase supplementation on growth performance, nutrient digestibility and non-starch polysaccharide degradation in different sections of the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27: 855–861.

7. Chemikalien und Instrumente

7.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Reinheit	GHS- Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	VRW, HPLC Grade	02, 07	225, 319, 336	210, 240, 305+351+338, 403+233
Acetonitril	VWR, MS-Grade	02, 07	225, 302+312+332, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Ameisensäure	VWR, 99 - 100 %	02, 05, 06	226, 302, 331, 314	210, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Ammoniak, NH ₃	Merck, 25 %	05, 07, 09	314, 335, 410	261, 271, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338
Ammoniumchlorid, NH ₄ Cl	VWR, ≥ 99 %	07	302, 319	270, 305+351+338
<i>trans-ortho</i> -Cumarsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 97 %	07	302, 315, 319, 335	261, 280, 301+312+330, 302+352, 304+340+312
Deuteriumoxid, D ₂ O	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	-	-	-
Dichlormethan, DCM	VWR, ≥ 99,8 %	07, 08	315, 319, 336, 351	201, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+311
Diethylether	VWR, 100 %	02, 07	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 243, 280, 304+340, 308+311
Dimethylsulfoxid, DMSO	Carl Roth, ≥ 99,8 %	-	-	-
Dinatriumhydrogen- phosphat (wasserfrei)	Merck, ≥ 99 %	-	-	-
Essigsäure	Merck, ≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 280, 303+361+353, 305+351+338+310
Essigsäureanhydrid	Fluka, ≥ 99 %	02, 05, 06	226, 302, 314, 330	210, 280, 301+312, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Ethanol, EtOH	VWR, 99,5 %	02, 07	225, 319	210, 233, 240, 241, 242, 305+351+338
<i>trans</i> -Ferulasäure	Alfa Aesar, 99%	07	315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Kjeldahl-Katalysator	Roth	-	412	273
Lithiumchlorid, LiCl	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	07	302, 315, 319	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 308+313
Methanol, MeOH	VWR, HPLC Grade	02, 06, 08	225, 301, 311, 315, 319, 331, 370	210, 260, 280, 301+310, 307+311, 305+351+338
methanolische Salzsäure, 1,25 M	Merck, für GC	02, 05, 06, 08	225, 290, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311

1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	05,06	302, 311, 314	270, 280, 301+312, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338		
Methyliodid	VWR, ≥ 99 %	06, 08	312, 315, 335, 351, 301+331	201, 280, 301+310, 302+352, 304+340, 311		
Natriumacetat, NaOAc	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-		
Natriumbordeuterid, NaBD4	Doutero, 99 %	02, 05, 06	260, 301+311, 314	231+232, 260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338		
Natriumborhydrid, NaBH4	Sigma-Aldrich, 99 %	02, 05, 06, 08	260, 301, 314, 360F, EUH014	231+232, 260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338		
Natriumdihydrogen- phosphat (wasserfrei)	Sigma-Aldrich, 99 %	-	-	-		
Natriumhydroxid, NaOH	Carl Roth, ≥ 99 %	05	290, 314	233, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310		
Natriumthiosulfat	Carl Roth, ≥ 99 %	-	-	-		
Salzsäure, HCl	Merck, 37 %	05, 07	290, 314, 335	260, 280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310		
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	Fluka, 95 - 98 %	05	290, 314	280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310		
Tetrahydrofuran, THF	VWR, > 98 %	02, 07, 08	225, 319, 335, 351, EUH019	201, 210, 243, 280, 304+340, 305+351+338, 308+311		
Trifluoressigsäure, TFA	Sigma Aldrich, ≥ 99 %	05, 07	314, 332, 412	261, 273, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338		
GHS02	GHS03	GHS05	GHS06	GHS07	GHS08	GHS09
						
Entzündlich	Brand- fördernd	Ätzend	Giftig	Gesundheits- schädlich	Systemische Gesundheits- gefährdung	Umwelt- gefährlich

7.2 Standardsubstanzen für Mono- und Oligosaccharide

Gruppe	Saccharide	Kurzbezeichnung	Reinheit	Hersteller
Arabinoxyloligosaccharide	2 ³ ,3 ³ -Di- α -L-Arabinofuranosylxylotriase	A ²⁺³ XX	> 95 %	Megazyme
	2 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylotriase	A ² XX	> 90 %	Megazyme
	3 ² - α -L-Arabinofuranosylxylobiose	A ³ X	> 95 %	Megazyme
	3 ³ - α -L- und 2 ³ - α -L-Arabinofuranosylxylotetraose	Mix XA ² XX, XA ³ XX	> 90 %	Megazyme
Cellooligosaccharide	Cellobiose	C ₂	≥ 98 %	Carl Roth
	Cellotriose	C ₃	> 95 %	Megazyme
	Cellotetraose	C ₄	> 90 %	Megazyme
	Cellopentaose	C ₅	> 95 %	Megazyme
	Cellohexaose	C ₆	> 95 %	Megazyme
Interne Standards	2-Desoxy-D-Glucose	2d-Glc	> 99 %	Sigma
	Isomaltotriose	IMT	Analytical Standard	Sigma-Aldrich
Maltooligosaccharide	Maltose-Monohydrat	Mal ₂	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
	Maltotriose	Mal ₃	≥ 90 %	Sigma-Aldrich
	Maltotetraose	Mal ₄	≥ 94 %	Sigma-Aldrich
	Maltopentaose	Mal ₅	≥ 95 %	Sigma-Aldrich
Manno-oligosaccharide	Mannobiose	Man ₂	> 95 %	Megazyme
	Mannotriose	Man ₃	> 95 %	Megazyme
	Mannotetraose	Man ₄	> 95 %	Megazyme
	Mannopentaose	Man ₅	> 98 %	Megazyme
	Mannohexaose	Man ₆	> 95 %	Megazyme
Monosaccharide	D-Fructose	Fru	≥ 99 %	Sigma
	D-Galactosamin-hydrochlorid	GalN	≥ 99 %	Sigma
	D-Galactose	Gal	> 99 %	Sigma-Aldrich
	D-Galacturonsäure Monohydrat	GalA	> 97 %	Sigma-Aldrich
	D-Glucosamin-hydrochlorid	GlcN	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
	D-Glucose	Glc	≥ 99,5 %	Sigma
	D-Glucuronsäure	GlcA	> 98 %	Sigma
	D-Mannit	-	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
	D-Mannose	Man	≥ 99 %	Sigma
	D-Ribose	Rib	≥ 98 %	Roth
	D-Xylose	Xyl	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
	L-Arabinose	Ara	> 99 %	Sigma
	L-Fucose	Fuc	99 %	Alfa Aesar
Oligosaccharide der Raffinose-Familie	L-Rhamnose	Rha	> 95 %	Sigma-Aldrich
	Raffinose-Pentahydrat	Raf	99 %	Alfa Aesar
	Stachyose-Hydrat	Sta	98 %	Biosynth Carbosynth
Xylooligosaccharide	Verbascose	Ver	> 95 %	Megazyme
	Xylobiose	X ₂	> 95 %	Megazyme
	Xylotriase	X ₃	> 90 %	Megazyme
	Xylotetraose	X ₄	> 95 %	Megazyme
	Xylopentaose	X ₅	> 95 %	Megazyme
	Xylohexaose	X ₆	> 95 %	Megazyme
Polysaccharide	Weizenarabinoxylan mittlere Viskosität	-	~ 95 %	Megazyme
	Xylan aus Buchenholz	Xylan	> 90 %	Sigma

7.3 Puffer und Reagenzien

Acetonitril/H₂O für nPGC-SPE

- 50 mL bidest. H₂O zu 50 mL Acetonitril geben

Acetonitril/H₂O mit 0,1 % Ameisensäure für nPGC-SPE

- 50 mL bidest. H₂O zu 50 mL Acetonitril geben
- 100 µL Ameisensäure hinzufügen

Natriumbordeuterid (2 M, in Ammoniak):

- 20 mg Natriumbordeuterid in 0,3 mL Ammoniak lösen
- Vor Verwendung frisch ansetzen

Natriumborhydrid-Lösung (30 mg /mL DMSO)

- 30 mg Natriumborhydrid in 1 mL DMSO im Ultraschallbad lösen
- Vor Verwendung frisch ansetzen

Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0 bzw. 6,25)

- 12,4 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat in 1 L Wasser lösen
- 13,3 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1 L Wasser lösen
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat-Lösung vorlegen und Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung zugeben bis pH 6,0 bzw. 6,25

TFA-Lösung (2 M)

- 15,4 mL in 100-mL-Messkolben geben
- Mit bidest. H₂O auffüllen

7.4 Enzyme

Enzym	Herkunft	Herstellt	Aktivität
α -Amylase (thermostabile)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Megazyme	3000 U/mL
α -Amylase (Termamyl 120 L, thermostabile)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma-Aldrich	≥ 500 Units/mg Protein
α -Amylase (thermostabile)	-	AB Vista	200 000 TAU/g
α -Galactosidase	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	606 U/mg
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich	≥ 260 U/mL
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	26000 U/g
endo-Arabinanase	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	200 U/mL
endo-Galactanase	<i>Aspergillus niger</i>	Megazyme	1300 U/mL
endo-Xylanase	<i>Trichoderma reesei</i>	AB Vista	1020000 BXU/g
Glucoamylase	-	AB Vista	500 GAN/mL
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich	≥ 300 U/mg
Protease	<i>Bacillus licheniformis</i>	Megazyme	9 U/ml
Protease (Alcalase 2.4 L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma-Aldrich	$\geq 2,4$ U/g
Xyloglucanase	<i>Paenibacillus</i> sp.	Megazyme	1000 U/mL

7.5 Instrumente

7.5.1 Verwendete Säulen

Gruppe	Säule	Partikelgröße	Maße (Länge x Innendurchmesser) bzw. (Bettgewicht, Volumen)	Hersteller
GC	DB-225 und DB-225 MS	0,25 μ m	30 m x 0,25 mm	Agilent
	DB-5 und DB-5 MS	0,25 μ m	30 m x 0,25 mm	Agilent
HPLC	AminoTrap	-	4 x 50 mm	Dionex, Thermo Scientific
	CarboPac PA20	6 μ m	150 mm x 3 mm	Dionex, Thermo Scientific
	CarboPac PA200	6 μ m	250 mm x 3 mm	Dionex, Thermo Scientific
	Luna C18 (2)	5 μ m	250 x 4,6 mm	Phenomenex
	Luna Phenyl-Hexyl	5 μ m	250 x 4,6 mm	Phenomenex
Präparativ	Amberlite XAD-2	-	Säulenvolumen ca. 300 mL	Supelco
	Bio-Gel P2 (präparativ)	< 45 μ m	85 cm x 2,6 cm	Bio-Rad
	Sephadex LH-20 (präparativ)	25 - 100 μ M	100 x 2,5 cm	Sigma
SPE	C18 (Chromabond C ₁₈)	-	500 mg, 3 mL,	Macherey-Nagel
	nPGC (Supelclean ENVI-Carb)	-	250 mg, 3 mL	Sigma-Aldrich

7.5.2 Analysegeräte

GC-FID

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

GC-MS

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

HPAEC-PAD

Hersteller:	Thermo Scientific
Gerätebezeichnung:	Dionex ICS-5000 System
Pumpe:	Dionex ICS-5000 Dual Pump
Autosampler:	Dionex AS-AP
Detektorkompartiment:	Dionex ICS-5000 DC
Detektor (PAD)	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
Detektorkompartiment:	Dionex ICS-6000 DC
Detektor (PAD/CD):	Electrochemical Detector, Conductivity Detector
Detektor (MS):	ThermoFisher Scientific ISQ IC Mass Spectrometer
Suppressor:	Dionex AERS 500 (4mm)

HPLC-DAD

Hersteller:	Shimadzu
Pumpe:	CBM-20A
Autosampler:	SIL-20AC
Detektor (DAD):	SPM20A

HPLC-DAD/MS

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

NMR-Spektrometer

Hersteller:	Bruker Corporation
Bezeichnung:	Ascend 500
Feldstärke:	500 MHz
Probenkopf:	Prodigy, Kryoprobenkopf

Präparative LC-RID

Anwendung:	Trennung mittels BioGel P-2
Pumpe:	HPLC Pump K-500 (Knauer)
Detektor (RID):	Smartline RI Detektor 2300 (Knauer)
Fraktionssammler:	SF-2120 (Advantec)

Präparative LC-UV

Anwendung:	Trennung mittels Sephadex LH-20
Pumpe:	880 Pump (Jasco)
Detektor (UV):	BT 8200 UV/VIS Detector (Biotronik)
Fraktionssammler:	FC 204 fraction collector (Gibson)

8. Arbeitsvorschriften

8.1 Grundcharakterisierung der Einzelfuttermittel

8.1.1 Mahlen

- Proben zuerst auf einen Durchmesser $\leq 2,5$ mm mahlen
- Dann auf $\leq 0,5$ mm mahlen

8.1.2 Bestimmung des Wassergehalts

- ca. 1 g Probenmehl (nicht entfettet) im Vakuumtrockenschrank bei 70 °C und 100 mbar über Nacht trocknen
- Vorgang bis zu einem konstanten Gewicht wiederholen

8.1.3 Entfetten

- Probenmehl in der 1,5-fachen Menge Aceton aufschlämmen und 20 min rühren
- Bei 5000 rpm 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Waschvorgang dreimal wiederholen
- Bei 50 °C im Trockenschrank über Nacht trocknen

8.1.4 Analytische Bestimmung des Gehalts an Zellwandmaterial

- 1 g entfettetes Probenmehl mit 50 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0) in einen 250-mL-Erlenmeyerkolben geben
- 100 μ L thermostabile α -Amylase (3000 U/mL, Megazyme) zugeben
- Für 30 min bei 92 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Probe in Eis auf Raumtemperatur abkühlen
- pH-Wert auf 7,5 mit NaOH (1 M) einstellen
- 100 μ L Protease (50 mg/mL, 9 U/mg, Megazyme, frisch ansetzen) für Mais bzw. 500 μ L für Soja zugeben
- Für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Probe in Eis auf Raumtemperatur abkühlen
- pH-Wert auf etwa 4,5 mit HCl (0,25 M) einstellen
- 200 μ L Amyloglucosidase (9,5 mg/mL, 36000 U/g, Megazyme, frisch ansetzen) zugeben
- Für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Warme Lösung über zuvor ausgeglühten Filtertiegel mit Celite abfiltrieren
- Filtrat aufbewahren
- Rückstand mit 2 x 25 mL und 1 x 10 mL 60 °C warmem H₂O waschen

- Filtrate vereinigen und aufbewahren
- Rückstand mit 2 x 25 mL Ethanol (99 %) waschen, Filtrat verwerfen
- Rückstand mit 2 x 25 mL Aceton waschen, Filtrat verwerfen
- Rückstand im Filtertiegel bei 105 °C über Nacht trocknen → UZM
- LZM aus vereinigttem Überstand der Waschschritte durch Zugabe der vierfachen Menge Ethanol (99 %) über Nacht ausfällen
- Lösung über neue, zuvor ausgeglühten Filtertiegel mit Celite abfiltrieren
- Rückstand mit 2 x 25 mL und 1 x 10 ml Ethanol (78 %) waschen, Filtrat verwerfen
- Rückstand mit 2 x 25 mL Ethanol (99 %) waschen, Filtrat verwerfen
- Rückstand mit 2 x 25 mL Aceton waschen, Filtrat verwerfen
- Rückstand bei 105 °C über Nacht trocknen → LZM

Bestimmung des Aschegehalts

- Probe in Tiegeln mindestens 4 h bei 500 °C im Muffelofen veraschen
- Nach Abkühlen auswiegen

Proteinbestimmung nach Kjeldahl

- Rückstand mit Celite aus Tiegel in einen Aufschlusskolben geben
- Wenige Glasperlen und 500 mg Kjeldahl-Katalysator zugeben
- 5 mL konz. H₂SO₄ zugeben
- 1,5 h auf einem Heizblock erhitzen bis zum Auflösen des Probenrückstands
- Lösung abkühlen lassen und anschließend vorsichtig 10 mL bidest. H₂O zugeben
- Lösung quantitativ in einen 50-mL-Messkolben überführen und mit bidest. H₂O auf 50 mL auffüllen
- Kalibrierung zur Bestimmung des Proteingehalts mittels ammoniaksensitiver Elektrode ansetzen und messen (s. Tabelle V1)
- 1 mL der verdünnten Aufschlusslösung in 49 mL bidest. H₂O in ein Becherglas geben
- 3 mL NaOH (2 M) zugeben und mit einem Uhrglas abdecken
- Mit ammoniaksensitiver Elektrode Proteingehalt messen

Tabelle V1: Ansatz der Kalibrierung für die Bestimmung des Proteingehalts mittels ammoniaksensitiver Elektrode. Als Stammlösung diente eine NH₄Cl-Lösung (100 mg N/L = 382 mg NH₄Cl/100 mL H₂O). Jedem Kalibrierpunkt werden 4 mL verdünnte H₂SO₄ (4 mL konz. H₂SO₄ in 50 mL bidest. H₂O) zugegeben. Zur Messung der Kalibrierpunkte werden 50 mL Kalibrierlösung mit 3 mL NaOH (2 M) versetzt.

Kalibrierpunkt	Ansatz (x µL Stammlösung 200 mL)	N [mg/L]
1	20	0,1
2	200	1
3	2000	10

8.1.5 Präparative Isolierung des Zellwandmaterials

- Einwaage mit 100 ml Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0) in einen 250-mL-Erlenmeyerkolben geben
 - Mais: 10 g, Soja: 7 g
- Thermostabile α -Amylase (Termamyl 120 L, Sigma-Aldrich) zugeben
 - Mais: 1,5 mL, Soja: 750 μ L
- Für 20 min bei 92 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Probe in Eis auf Raumtemperatur abkühlen
- pH-Wert auf 7,5 mit NaOH (1 M) einstellen
- Protease (Alcalase 2.4 L, Sigma) zugeben
 - Mais: 350 μ L, Soja: 1050 μ L
- Für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Probe in Eis auf Raumtemperatur abkühlen
- pH-Wert auf etwa 4,5 mit HCl (1 M) einstellen
- Amyloglucosidase (\geq 260 U/mL, Sigma-Aldrich) zugeben
 - Mais: 700 μ L, Soja: 350 μ L
- Für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Warme Lösung für 15 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand abtrennen und aufheben
- Rückstand mit 4 x 50 mL 60 °C warmem H₂O waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und mit aufgehobenen Überstand vereinigen
- Rückstand mit 2 x 50 mL Ethanol (99 %) waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand mit 2 x 50 mL Aceton waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand bei 40 °C über Nacht trocknen \rightarrow UZM

- LZM aus vereinigttem Überstand der Waschschrift durch Zugabe der vierfachen Menge Ethanol (99 %) über Nacht ausfällen
- Überstand abgießen
- Restliche Lösung für 12 min bei 5000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Rückstand mit 2 x 50 mL Ethanol (78 %) waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand mit 2 x 50 mL Ethanol (99 %) waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand mit 2 x 50 mL Aceton waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand bei 50 °C über Nacht trocknen \rightarrow LZM

Anmerkung: Ein weiterer kleinerer Ansatz der Sojaproben wurde mit 5 g Mehl angesetzt, Puffer und Enzyme entsprechend reduziert.

Stärkenachweis

- Spatelspitze UZM, LZM bzw. entfettetes Mehl in ca. 5 mL dest. H₂O aufkochen
- Abkühlen lassen
- Mit Jod-Kaliumiodid-Lösung versetzen

Nachweis freier Monosaccharide

UZM:

- 5 mg UZM in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen, 500 µL bidest. H₂O zugeben
- Vortexen, 5 min bei 12800 rpm zentrifugieren
- 20 µL des Überstandes mit 20 µL D-Mannit (1 mM) und 160 µL bidest. H₂O mischen
- Messung mittels HPAEC-PAD (Bedingungen s. Kapitel 8.2.1)

LZM:

- 5 mg LZM in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen, 100 µL bidest. H₂O und 400 µL Ethanol zugeben
- Vortexen, Präzipitation abwarten, 5 min bei 12800 rpm zentrifugieren
- 50 µL des Überstandes eindampfen
- In 50 µL bidest. Wasser aufnehmen
- 20 µL der Lösung mit 20 µL D-Mannit (1 mM) und 160 µL bidest. Wasser mischen
- Messung mittels HPAEC-PAD (Bedingungen s. Kapitel 8.2.1)

8.1.6 Bestimmung des Gehalts an Klason-Lignin

- 200 mg UZM in ein 50-mL-Schottglas einwiegen
- 5 mL Schwefelsäure (12 M) unter Eiskühlung zugeben
- 30 min im Eisbad stehen lassen und dabei alle 5 min umrühren
- 2 h bei Raumtemperatur rühren
- 32,5 mL bidest. H₂O zugeben
- Lösung 3 h bei 100 °C hydrolysieren
- Hydrolysat nach Abkühlen auf Eis quantitativ über einen Glasfilter filtrieren
- Filtrat wird für die Monosaccharidanalyse von Mais verwendet (s. Kapitel 8.2.1)
- Rückstand mit bidest. H₂O säurefrei waschen (ca. 800 mL)
- Filter bei 40 °C im Trockenschrank über Nacht trocknen
- Je ein Filter mit Rückstand wird für Protein- bzw. Aschekorrektur verwendet (s. Kapitel 8.1.4)

8.1.7 Bestimmung der Oligosaccharide der Raffinose-Familie

- 0,5 g Probenmehl (nicht entfettet, nicht getrocknet) in ein Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 10 mL Ethanol (80 %) zugeben
- Unter ständigem Schütteln für 30 min bei 40 °C behandeln
- Zentrifugieren (5000 rpm, 10 min) und Überstand aufbewahren
- Extraktionsschritt mit Rückstand zweimal für 10 min wiederholen und Überstände vereinigen
- Vereinigte Überstände zur Trockene eindampfen
- In 2,5 mL bidest. H₂O aufnehmen.
- Durch PTFE-Spritzenfilter (Porengröße: 0,45 µm, Filterdurchmesser: 13 mm, Hersteller: Chromafil) filtrieren
- Lösung entsprechend verdünnen und mittels HPAEC-PAD analysieren

HPAEC-PAD-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD), AgCl-Elektrode (20 °C) Waveform: Carbohydrates (Quad-Potential)
Gradient:	s. Tabelle V2
Kalibrierung:	Quadratisch (6-Punkt-Kalibrierung) Raffinose, Stachyose, Verbascose: 1; 5; 10; 15; 20 und 30 µM

Tabelle V2: Gradientenprogramm zur Analyse der Oligosaccharide der Raffinose-Familie mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
0,1	90	10	0
10,0	50	50	0
35,0	50	40	10
35,1	0	0	100
50,0	0	0	100

8.2 Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide

8.2.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Schwefelsäure-Hydrolyse:

- 10 mg der UZM mit einigen Glasperlen in ein 4-mL-GC-Vial geben
- 150 µl Schwefelsäure (12 M) zugeben und vortexen
- 30 min in ein Eisbad stellen und alle 10 min vortexen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen und alle 30 min vortexen
- Mit 975 µl bidest. H₂O verdünnen
- 3 h im Trockenschrank bei 100 °C hydrolysieren
- Abkühlen lassen
- Alles mit einer Spritze aufnehmen und durch PTFE-Spritzenfilter (Porengröße: 0,45 µm, Filterdurchmesser: 13 mm, Hersteller: Chromafil) filtrieren
- 100 µL Filtrat mit 75 µL NaOH (4 M) und 825 µL bidest. H₂O versetzen
- 20 µL Probe (alternativ Filtrat aus Klason-Lignin-Bestimmung verwenden, siehe Arbeitsvorschrift Kapitel 8.1.6) mit 20 µL D-Mannit-Lösung (1 mM) und 160 µL bidest. H₂O versetzen (je nach Probe entsprechend verdünnen)
- Messung mittels HPAEC-PAD

Methanolyse mit TFA-Hydrolyse:

- 6 mg der LZM in ein 1,5-mL-GC-Vial geben
 - ALTERNATIV: Oligosaccharid-Lösung herstellen, in 1,5-mL-GC-Vial geben und zur Trockene eindampfen
- 0,5 mL methanolische Salzsäure (1,25 M) zugeben
- Mit geschlossenem Deckel verschließen und bei 80 °C 16 h im Trockenschrank behandeln
- Abkühlen und 40 µl in ein kleines GC-Vial pipettieren
- Im Evaporator bis zur Trockene eindampfen
 - Bei Oligosacchariden gesamte 0,5 mL zur Trockene eindampfen
- 500 µL TFA-Lösung (2 M) zugeben
- Verschließen und bei 121 °C 1 h im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator zur Trockene eindampfen
- Zweimal je 200 µL Ethanol (99 %) hinzufügen und zur Trockene eindampfen
- In 180 µL bidest. H₂O aufnehmen und 20 µL D-Mannit (1 mM) hinzufügen (je nach Probe entsprechend verdünnen)
- Messung mittels HPAEC-PAD

HPAEC-PAD-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA20 (6 µm, 150 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD), AgCl-Elektrode (20 °C, IntAmp) Waveform: Carbohydrates (Quad-Potential)
Gradient:	s. Tabelle V3
Kalibrierung:	Quadratisch (zwei 5-Punkt-Kalibrierungen), 10 Monosaccharide (Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose, Galacturonsäure, Glucuronsäure): 1, 6, 12, 18 und 25 µM; 25, 50, 75, 100 und 125 µM

Tabelle V3: Gradientenprogramm zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	90	10	0
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	60	40

8.2.2 Methylierungsanalyse

Methylierung:

- Ca. 5 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas einwiegen
- Probe in 2 mL DMSO lösen
- 15 min im Ultraschallbad behandeln, über Nacht quellen lassen und nochmal 15 min im Ultraschallbad behandeln
- 100 mg frisch unter Stickstoff gemörserte NaOH zugeben
- 90 Minuten im Ultraschallbad, 90 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen
- 1 mL Methyliodid zugeben
- 30 Minuten im Ultraschallbad und 30 Minuten bei RT inkubieren
- 3 mL Dichlormethan zugeben
- 5 mL Natriumthiosulfat-Lösung (0,1 M) zugeben
- gut mischen
- wässrige Phase abnehmen, organische Phase 2 x mit je 5 mL bidest. H₂O waschen
- Lösungsmittel abrotieren, ggf. kleinen Rest mittels Stickstoff komplett trocknen

- über Nacht bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen
- in 2 mL DMSO lösen, 30 Minuten im Ultraschallbad behandeln
- Methylierung wiederholen
- über Nacht bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen

Hydrolyse:

- 2 mL TFA (2 M) zugeben, 90 Minuten bei 121 °C im Trockenschrank hydrolysieren
- Lösungsmittel abrotieren, ggf. kleinen Rest unter Stickstoff abblasen

Reduktion:

- 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 mL Ammoniak (2 M) hinzugeben
- 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zum Abbruch der Reaktion 100 µL Essigsäure zugeben

Acetylierung:

- Unter Eiskühlung 450 µL 1-Methylimidazol, 3 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- Unter Eiskühlung 3 mL bidest. H₂O zugeben
- Abkühlen und mit 5 mL Dichlormethan extrahieren (gut vortexen)
- Organische Phase dreimal mit je 5 mL bidest. H₂O waschen (gut vortexen)
- Restwasser im Gefrierschrank (-18 °C) über Nacht ausfrieren
- Organische Phase in anderes Gefäß (z. B. 3,5-mL-Vial) überführen (taut schnell auf); sind Partikel enthalten, zügig durch Faltenfilter filtrieren
- GC-Analyse der organischen Phase (wenn nötig entsprechend verdünnen)

Bedingungen GC-MS / GC-FID (Trennung DB-225):

Säule:	DB-225 MS und DB-225 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Injektionsvolumen:	1 µL bis 3 µL (an Proben angepasst)
Injektionsart:	Split 1:5 bis 1:30 (Verhältnis an Proben angepasst)
Injektortemperatur:	220 °C
Trägergas:	Helium bei 37 cm/s
Detektion (MS):	Elektronenstoß (EI) mit 70 eV, Transferline-Temp. 220 °C
Detektion (FID):	Temperatur: 240 °C, Makeup-Gas: Stickstoff
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur 140 °C für 1 min, dann mit 20 °C/min bis 170 °C, mit 2 °C/min bis 200 °C, mit 20°C bis 220 °C, halten für 20 min

Bedingungen GC-MS / GC-FID (Trennung DB-5):

Säule:	DB-5 MS und DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Injektionsvolumen:	1 µL bis 3 µL (an Proben angepasst)
Injektionsart:	Split 1:5 bis 1:30 (Verhältnis an Proben angepasst)
Injektortemperatur:	250 °C
Trägergas:	Helium bei 40 cm/s
Detektion (MS):	Elektronenstoß (EI) mit 70 eV, Transferline-Temp. 275 °C
Detektion (FID):	Temperatur: 325 °C, Makeup-Gas: Stickstoff
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur 140 °C für 2 min, dann mit 1 °C/min bis 180 °C, halten für 5 min mit 10 °C bis 300 °C, halten für 5 min

8.2.3 Profiling von Arabinan- und Galactan oligosacchariden

- 5 mg ZM in ein 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen
- 500 µL bidest. H₂O hinzufügen und vortexen
- 5 µL einer *endo*-Arabinanase-Lösung (20 U/mL) bzw. 5 µL einer *endo*-Galactanase-Lösung (100 U/mL) zugeben
- Gut mischen, aber nicht vortexen
- 24 h bei 40 °C im Schüttelinkubator inkubieren
- Enzyme 5 min im 95 °C warmen Wasserbad inaktivieren
- Zentrifugieren (10 min bei 20800 g)
- Überstand in anderes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und Rückstand verwerfen
- 105 µL bidest. H₂O mit 30 µL Überstand und 15 µL Raffinose-Lösung (100 µM) mischen
- Messung mittels HPAEC-PAD

HPAEC-PAD-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD), AgCl-Elektrode (20 °C, IntAmp) Waveform: Carbohydrates (Quad-Potential)
Gradient:	s. Tabelle V4 (AN) bzw. Tabelle V5 (GN)

Tabelle V4: Gradientenprogramm zur Analyse der Arabinan oligosaccharide mittels Hochleistungs-anionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

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

Tabelle V5: Gradientenprogramm zur Analyse der Galactan oligosaccharide mittels Hochleistungs-anionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0,0	90	10	0
10,0	90	10	0
20,0	50	50	0
60,0	50	40	10
75,0	0	50	50
80,0	0	0	100
90,0	0	0	100

8.2.4 Profiling von Xyloglucan oligosacchariden

- 10 mg ZM in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen
- 400 µL bidest. H₂O zugeben und vortexen
- 2,5 µL Xyloglucanase (3000 U) zugeben
- 24 h bei 40 °C im Schüttelinkubator inkubieren
- Zum Abbruch der Reaktion 1,6 mL Ethanol zugeben
- 1 h Präzipitation abwarten und zentrifugieren (10 min bei 20800 g)
- Überstand abnehmen und durch PTFE-Spritzenfilter (Porengröße: 0,45 µm, Filterdurchmesser: 13 mm, Hersteller: Chromafil) filtrieren
- 500 µL Filtrat bis zur Trockene eindampfen
- Rückstand in 100 µL Isomaltotriose-Lösung (10 µM) aufnehmen
- Lösung mittels HPAEC-PAD/MS analysieren (evtl. verdünnen)

HPAEC-PAD/MS-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion (PAD):	AgCl-Elektrode, 20 °C, Waveform: Carbohydrates(Quad-Potential)
Detektion (MS):	Elektrolytisch regenerierender Suppressor (Gegenstrom mit Wasser), anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor Zugabe von 0,5 mM LiCl-Lösung (0,05 mL/min) für Adduktbildung ESI im Positiv-Modus: <i>Full-Scan</i> (300-1000) und SIM (entsprechende <i>m/z</i> der einzelnen Xyloglucanoligosaccharide)
Gradient:	s. Tabelle V6

Tabelle V6: Gradientenprogramm zur Analyse der Xyloglucanoligosaccharide mittels Hochleistungs-anionenaustauschromatographie und gepulst amperometrischem Detektor sowie massenspektrometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	40	60	0
0,0	40	60	0
0,1	40	60	0
10,0	5	95	0
20,0	5	92	3
60,0	5	88	7
75,0	0	50	50
80,0	0	0	100
90,0	0	0	100

8.2.5 Profiling zur Analyse der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure

- 100 mg ZM in ein 15 mL-Pyrexglas einwiegen
- 5 ml TFA (50 mM) zugeben und vortexen
- 2 h bei 100 °C in einem kochenden Wasserbad rühren (vor Licht schützen)
- Mit Eis abkühlen
- 10 min mit 2000 x g zentrifugieren
- 1,5 mL des Überstands über C18-SPE (Chromabond, 3 mL, 500 mg) aufreinigen:
 - Mit 6 mL Methanol waschen
 - Mit 6 mL bidest. H₂O rekonditionieren
 - Probe aufgeben
 - Mit 6 mL bidest. H₂O waschen
 - Mit 6 mL Methanol in ein 15 mL-Pyrexglas eluieren
- Eluat am Rotationsverdampfer eindampfen
- Über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C und 100 mbar trocknen
- 2 mL Natriumborhydrid-Lösung (30 mg Natriumborhydrid/mL DMSO) zugeben
- Für 18 h bei 30 °C rühren (vor Licht schützen)
- Schnell tropfenweise 2 mL HCl zugeben (1 M, je 500 µL zugeben, vortexen, Gas entlassen)
- Ggf. mit DMSO/bidest. H₂O (50:50) verdünnen
- Lösung mittels HPLC-DAD/MS analysieren

HPLC-DAD/MS-Bedingungen:

Säule:	Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
Fluss:	0,5 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Detektion (DAD):	325 nm
Detektion (MS):	ESI im positiven Modus, Kapillartemperatur: 350 °C, Sprayspannung: 4 kV, Kapillarspannung: 47 V
Gradient:	s. Tabelle V7
Kalibrierung:	linear FA: 6-Punkt-Kalibrierung mit 2, 10, 70, 130, 190 und 230 µM FAX: 5-Punkt-Kalibrierung mit 5, 10, 15, 20 und 25 µM FAXG: 5-Punkt-Kalibrierung mit 5, 10, 15, 20 und 25 µM

Tabelle V7: Gradientenprogramm zur Analyse der Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarraydetektor und massenspektrometrischem Detektor. Eluent A: 0,1 % Ameisensäure in bidest. H₂O, Eluent B: Acetonitril.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %
0	95	5
4	95	5
8	90	10
10	90	10
14	84	16
23	84	16
33	50	50
34	5	95
36	5	95
37	95	5
42	95	5

8.2.6 Isolierung von Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure

Maiskörner mahlen

- auf $\leq 0,5$ mm \rightarrow Vorschrift s. Kapitel 8.1.1

Entfetten

- mit Aceton \rightarrow Vorschrift s. Kapitel 8.1.3

Präparative Isolierung des UZM

nach Vorschrift Kapitel 8.1.5 mit folgenden Anpassungen:

- 60 g entfettetes Mehl + 600 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M; pH 6,25)
- Zugabe von 60 μ L thermostabile α -Amylase (AB Vista) und 1,5 mL Thermamyl 120 L (Sigma-Aldrich)
- 30 min bei 95 °C inkubieren
- Abkühlen lassen auf 50 °C, dann 60 μ L Glucoamylase (AB Vista) zugeben
- 30 min bei 50 °C inkubieren
- Abkühlen lassen, dann pH mit NaOH auf 7,5 einstellen
- Zugabe von 1,5 mL Protease (Alcalase 2.4 L, Sigma)
- 30 min bei 60 °C inkubieren
- Abkühlen lassen, dann pH mit HCl auf 4,5 einstellen
- Zugabe von 1 mL Amyloglucosidase (≥ 260 U/mL, Sigma-Aldrich)
- 30 min bei 60 °C inkubieren
- Zentrifugieren
- Rückstand waschen (3 x 60 °C warmes Wasser, 2 x Ethanol, 2 x Aceton)
- Trocknen bei 50 °C über Nacht \rightarrow UZM

Nachverdau (s. Vorgehen oben)

- ca. 110 mg UZM auf 700 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M; pH 6,25)
- Thermamyl (4 mL, pH 6,0; 30 min, 92 °C),
- Alcalase (2 mL, pH 7,5; 40 min, 60 °C) und
- Amyloglucosidase (2mL, pH 4,5; 40 min 60 °C)

Freisetzung der Seitenketten mittel TFA (gesamt 2 x 2 Durchläufe, unter Lichtausschluss)

- 20 bzw. 25 g nachverdautes UZM mit 300 bzw. 375 mL TFA (50 mM) versetzen
- Für 20 min auf einer Heizplatte unter rühren erhitzen bis 95 °C
- Auf Eis abkühlen
- 1200 bzw. 1500 mL Ethanol (4-fache Menge) zugeben
- Mindestens 3 h präzipitieren lassen
- Rückstand abzentrifugieren (10 min, 5000 rpm), waschen (3 x 80% Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x Aceton) und trocknen (→ Kapitel 8.2.8)
- Überstand unter Lichtausschluss am Rotationsverdampfer (max. 40 °C) auf ca. 100 mL einengen
- Zentrifugieren (Überstand → Amberlite)

Aufreinigung mittels Amberlite XAD-2 (Supelco, Säulenvolumen ca. 300 mL)

(gesamt 4 Durchläufe + einer mit vereinigten H₂O-Fractionen, unter Lichtausschluss)

- Konditionieren mit 300 - 600 mL Methanol und 500 - 600 mL VE-Wasser
- Ca. 50 mL des eingeengten Überstands nach Ethanolfällung aufgeben
- Mit 600 mL VE-Wasser waschen (H₂O-Fraktion)
- Mit 600 ml Methanol/Wasser (50/50, v/v) eluieren (MeOH/H₂O-Fraktion)
- Mit 500 mL Methanol spülen (MeOH-Fraktion)

- Alle vier H₂O-Fractionen vereinigen, einengen und nochmal mittels Amberlite fraktionieren (es waren noch ferulasäurehaltige Komponenten nachweisbar)

- Alle fünf MeOH/H₂O-Fractionen am Rotationsverdampfer einengen, vereinigen und weiter einengen auf ca. 10,5 mL → Sephadex

Fraktionierung mittels Sephadex LH-20 (1 Lauf, unter Lichtausschluss)

- Vereinigte und eingeengte Amberlite MeOH/H₂O-Fractionen auf präparatives LC-UV-System aufgeben und Lauf starten
- Gesammelte Fraktionen entsprechend Chromatogramm (s. Abbildung A5, Kapitel 9.1) vereinigen und am Rotationsverdampfer einengen
- Einfrieren und gefriertrocknen

LC-UV-Bedingungen (präparatives System):

Säulenmaterial:	Sephadex LH-20 (Sigma)
Fluss:	0,5 mL/min (nach 75,5 h umgestellt auf 0,2 mL/min)
Eluent:	VE-Wasser, isokratisch
Injektionsvolumen:	10 mL
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	UV, 350 nm (nach 75,5 h umgestellt auf 325 nm)
Fraktionensammler:	6 min pro Gläschen

8.2.7 Identifizierung der isolierten ArabinoxylanseitenkettenBestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

- Methanolyse mit TFA-Hydrolyse → s. Kapitel 8.2.1

Bestimmung des Molekulargewichts und der UV-Spektren

- Kleine Menge gefriergetrocknete Fraktion in Methanol/Wasser (50/50, v/v) lösen
- Mittels HPLC-DAD/MS analysieren

HPLC-DAD/MS-Bedingungen:

Säule:	Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße)
Fluss:	0,5 mL/min
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulentemperatur:	Raumtemperatur
Detektion (DAD):	Spectra: 200 - 600 nm, Filterbandweite: 9 nm, Channel: 325 nm
Detektion (MS):	ESI im positiven Modus, <i>Full Scan</i>
Gradient:	s. Tabelle V8

Tabelle V8: Gradientenprogramm zur Analyse der isolierten Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarraydetektor und massenspektrometrischem Detektor. Eluent A: 0,1 % Ameisensäure in bidest. H₂O, Eluent B: Methanol.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %
0	88	12
5	88	12
30	0	100
35	0	100
36	88	12
40	88	12

NMR

- Ca. 2 mg der gefriergetrockneten Fraktion in 200 μL D_2O lösen, gefriertrocknen
- In 200 μL D_2O aufnehmen, gefriertrocknen
- In 500 μL D_2O aufnehmen, für NMR-Messung 1 μL Aceton zugeben

NMR-Spektroskopie:

Referenzierung: Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm; $\delta_{\text{C}} = 30,89$ ppm)

Pulssequenzen: Alle Experimente wurden mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt, im Modus „Non-Uniform Sampling“ (NUS) wurde jeweils ein NUS-Anteil von 50 % eingestellt

^1H	zg30 (Scanzahl: 16)
HSQC	hsqcedetgp (Scanzahl: 4; NUS)
HSQC-TOCSY	hsqcetgpml (Scanzahl: 16; NUS)
HMBC	hmbcgpplndqf (Scanzahl: 8; NUS)
H2BC	h2bcetgp13 (Scanzahl: 32; NUS)

8.2.8 Präparative Gewinnung weiterer Arabinoxyloligosaccharide

Enzymatische Hydrolyse (2 x 2 Durchgänge, unter Lichtausschluss)

- Ca. 15,8 g bzw. 22,2 g Rückstand nach TFA-Hydrolyse und Ethanol-fällung (s. Kapitel 8.2.6) in 300 bzw. 420 mL VE-Wasser aufnehmen
- pH mit NaOH (2 M) auf 6,3 einstellen
- 314 bzw. 439 μL *endo*-Xylanase (AB Vista) zugeben
- Im Wasserbad bei 80 °C für 6 h inkubieren, alle 30 min schwenken
- Bei 100 °C inaktivieren und direkt auf Eis abkühlen
- Überstand abzentrifugieren und durch Miracloth filtrieren
- Rückstand aufschlemmen, nochmal zentrifugieren und Überstände vereinigen
- Rückstand waschen (2 x Ethanol, 2 x Aceton)
- Überstand am Rotationsverdampfer auf ca. 100 mL einengen
- Mit 4-facher Menge Ethanol fällen und über Nacht präzipitieren lassen
- Zentrifugieren
- Rückstand in H_2O aufnehmen und gefriertrocknen
- Überstand am Rotationsverdampfer einengen auf ca. 30 mL \rightarrow Amberlite

Aufreinigung mittels Amberlite XAD-2

(4 Durchläufe + 2 Durchläufe mit vereinigten H_2O -Fraktionen, unter Lichtausschluss)

- Probe: Eingeengter Überstand nach Enzymhydrolyse und Ethanol-fällung
- Vorgehen s. Kapitel 8.2.6

- Vereinigte H_2O -Fraktion (Oligosaccharide ohne Ferulasäure) \rightarrow Bio-Gel

- Vereinigte MeOH/H₂O-Fraktion (Oligosaccharide mit Ferulasäure) → Sephadex
- Vereinigte MeOH-Fraktion → aufbewahrt

Fraktionierung der H₂O-Fraktion mittels Bio-Gel P2 (3 Läufe)

- Vereinigte und eingeeengte H₂O-Fraktion nach Enzymhydrolyse und Amberlite auf präparatives LC-RID-System aufgeben und Lauf starten
- Gesammelte Fraktionen entsprechend Chromatogramm (s. Abbildung A6, Kapitel 9.1) vereinigen und am Rotationsverdampfer einengen
- Einfrieren und gefriertrocknen

LC-RID-Bedingungen (präparatives System):

Säulenmaterial: Bio-Gel P2 (Bio-Rad)
 Fluss: 1 mL/min
 Eluent: VE-Wasser
 Injektionsvolumen: 10 mL
 Säulentemperatur: 45 °C
 Detektion: RI
 Fraktionensammler: 2,5 min pro Gläschen

Fraktionierung mittels Sephadex LH-20 (2 Läufe, unter Lichtausschluss)

- Vereinigte und eingeeengte MeOH/H₂O-Fraktion nach Enzymhydrolyse und Amberlite auf präparatives LC-UV-System aufgeben und Lauf starten
- Gesammelte Fraktionen entsprechend Chromatogramm (s. Abbildung A7, Kapitel 9.1) vereinigen und am Rotationsverdampfer einengen
- Einfrieren und gefriertrocknen

LC-UV-Bedingungen (präparatives System):

Säulenmaterial: Sephadex LH-20 (Sigma)
 Fluss: 0,5 mL/min (nach 27,6 bzw. 30 h umgestellt auf 1 mL/min)
 Eluent: VE-Wasser, isogradisch
 Injektionsvolumen: 10 mL
 Säulentemperatur: Raumtemperatur
 Detektion: UV, 350 nm (nach 27,6 bzw. 30 h umgestellt auf 325 nm)
 Fraktionensammler: 6 min pro Gläschen

8.2.9 Bestimmung der phenolischen Säuren und Oligoferulasäure

- 25 mg ZM in ein 15 mL-Pyrexglas einwiegen + Rührfisch
- NaOH (2 M) mit Stickstoff begasen und 2,5 mL zur Probe zugeben
- Pyrexglas mit Stickstoff fluten und gut verschließen
- 18 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und Rühren verseifen
- Mit konz. HCl auf pH < 2 ansäuern (ca. 0,5 mL, mit pH-Papier prüfen)
- Interne Standardsubstanzen zugeben
 - Monomere: 6 · 150 µL *ortho*-Cumarsäure-Lösung (1 mg/ml MeOH)
 - Dimere: 20 · 100 µL 5-5(Mono-)Methyl-DFS-Lösung (100 µg/mL THF/H₂O)
- 3 x mit 1 mL Diethylether extrahieren (Vortexen, zentrifugieren bei max. 2000 rpm, 2 - 3 min und organische Phasen vereinigen)
- Diethylether unter Stickstoff bis zur Trockene abdampfen
- Rückstand in 200 · 1000 µL MeOH/H₂O (50/50, v/v) aufnehmen (gut vortexen, Lösung sollte klar sein)
- Lösung mittels HPLC-DAD analysieren

Herstellung von *cis*-Ferulasäure:

- 2 mL *trans*-Ferulasäure (10 mg/mL MeOH) für 4 h mit 254 nm behandeln
- Bei eindampfen Analyten wieder in 2 mL Methanol aufnehmen
- Konzentration über die Messung der *trans*-Ferulasäure bestimmen

HPLC-DAD-Bedingungen:

Säule:	Luna Phenyl-Hexyl (250 x 4,6 mm, 5 µm)
Fluss:	1 mL/min
Injektionsvolumen:	20 µL
Säulentemperatur:	45 °C
Detektion:	DAD, 280 nm (Monomere und Dimere)
Gradient:	s. Tabelle V9
Kalibrierung:	Monomere: linear (6-Punkt-Kalibrierung) - 4-Hydroxybenzaldehyd: 1; 5; 10; 15; 20 und 25 µg/mL - <i>trans-para</i> -Cumarsäure: 1; 5; 10; 15; 20 und 25 µg/mL - <i>trans</i> -Ferulasäure: 1; 25; 50; 75; 100 und 125 µg/mL - <i>cis</i> -Ferulasäure: 0,4; 13,4; 26,7; 40,1; 53,5 und 66,8 µg/mL

Tabelle V9: Gradientenprogramm zur Analyse der phenolischen Säuren und Oligoferulasäuren mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarraydetektor. Eluent A: 1 mM Trifluoressigsäure (TFA), Eluent B: Methanol/1 mM TFA (90/10, v/v) Eluent C: Acetonitril/1 mM TFA (90/10, v/v).

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
Trennung monomerer Komponenten			
0	87	0	13
10	87	0	13
20	77	3	20
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 oligomerer Komponenten			
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

8.3 Charakterisierung der zugesetzten Komponenten

8.3.1 HPAEC-PAD/MS-Methode für (Arabino-)Xylooligosaccharide

- Probelösung entsprechend verdünnen, dabei Isomaltotriose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 10 µM)
- Mittels HPAEC-PAD bzw. HPAEC-PAD/MS analysieren

HPAEC-PAD/MS-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion (PAD):	AgCl-Elektrode, 20 °C, Waveform: Carbohydrates(Quad-Potential)
Detektion (MS):	Elektrolytisch regenerierender Suppressor (Gegenstrom mit Wasser), anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor Zugabe von 0,5 mM LiCl-Lösung (0,05 mL/min) für Adduktbildung ESI im Positiv-Modus: <i>Full-Scan</i> (150 - 850) und SIM (entsprechende <i>m/z</i> der einzelnen (A)XOS, s. Tabelle V11)
Gradient:	s. Tabelle V10

Tabelle V10: Gradientenprogramm zur Analyse der (Arabino-)Xylooligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischem Detektor sowie massenspektrometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	35,0	65,0	0,0
18,0	35,0	63,5	1,5
22,0	35,0	63,5	1,5
50,0	35,0	53,0	12,0
50,1	0,0	0,0	100,0
60,0	0,0	0,0	100,0

Tabelle V11: Komponentenliste für die massenspektrometrische Detektion zur Analyse der (Arabino-)Xylooligosaccharide ((A)XOS) mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie. Gemessen werden Lithiumaddukte (m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis).

(A)XOS	Startzeit in min	Endzeit in min	m/z
X ₂	4,2	18,2	289,2
X ₃	9,9	23,9	421,2
X ₄	18,1	32,1	553,3
X ₅	25,0	39,0	685,3
X ₆	28,7	42,7	412,2
A ² XX	30,4	44,4	553,3
A ³ X	32,1	46,1	421,2
XA ² XX	33,9	47,9	685,3
XA ³ XX	35,0	49,0	685,3
A ²⁺³ XX	41,3	55,3	685,3

8.3.2 Analyse der Mono- und Oligosaccharide der Xylooligosaccharid-Probe

Extraktion:

- 10 - 25 mg Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen
- Zugabe von 200 µL bidest. H₂O
- Inkubation für 30 min im Schüttelinkubator (40 °C)
- Zugabe von 800 µL 99%igem Ethanol
- Präzipitatbildung abwarten (mind. 30 min)
- Rückstand abzentrifugieren (12000 rpm, 10 min)
- Überstand im Evaporator bis zur Trockene eindampfen
- Zugabe von 200 µL bidest. H₂O, nochmals zentrifugieren → Oligosaccharidfraktion

Analyse freier Monosaccharide

- Überstand verdünnen und direkt mittels HPAEC-PAD mit dem Monosaccharid-Gradienten (s. Kapitel 8.2.1, Tabelle V3) analysieren

Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktion

- 10 µL des Überstands in ein GC-Vial geben und zur Trockene eindampfen
- Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben durchführen und mittels HPAEC-PAD analysieren

Analyse der Oligosaccharide

- Überstand verdünnen, dabei Isomaltotriose zugeben und mit der in Kapitel 8.3.1 beschriebenen HPAEC-PAD/MS-Methode für (A)XOS analysieren

8.3.3 Charakterisierung der Xylanase

Test zur Freisetzung von Oligosacchariden aus den Einzelfuttermitteln

- Ca. 5 mg Probe (UZM, LZM von Mais und Soja) in Eppendorf-Reaktionsgefäß geben
- 350 µL bidest. H₂O zugeben, vortexen, 1 h bei Raumtemperatur hydratisieren lassen
- Zugabe von 5 µL Enzymlösung unterschiedlicher Aktivitäten (0 x, 2 x und 100 x Standarddosis von 16000 BXU/kg)
- Bei 40 °C für 4 h inkubieren
- Zugabe von 1400 µL Ethanol zur Inaktivierung
- Zentrifugieren
- 100 µL des Überstands in ein HPAEC-Vial überführen und evaporieren
- In 100 µL 10 µM Isomaltotriose-Lösung aufnehmen
- Mittels HPAEC-PAD/MS mit den in Kapitel 8.4.5 beschriebenen HPAEC-Bedingungen für die Analyse mehrere Oligosaccharide nebeneinander analysieren

Inaktivierungstests

- 5 mg Xylan aus Buchenholz in Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen und in H₂O oder Ethanol/H₂O (50 % bis 80 %) aufnehmen
- *endo*-Xylanase zugeben (Negativkontrolle ohne Enzymzugabe mitführen)
- Inaktivieren (vortexen, zentrifugieren, auf 98 °C erhitzen für 5 min, für 15 min im Ultraschallbad behandeln; Positivkontrolle ohne Inaktivierung mitführen)
- Inkubieren bei 80 °C für 2 h
- Ggf. Ethanol evaporieren und Rückstand in H₂O aufnehmen oder zentrifugieren, Überstand überführen, evaporieren und Rückstand in H₂O aufnehmen
- Mittels HPAEC-PAD messen (HPAEC-Bedingungen s. Kapitel 8.2.3 Arabinan-profiling oder Kapitel 8.3.1 HPAEC-Methode für (A)XOS)

8.4 Analyse der Ileumproben

8.4.1 Extraktion

- 100 mg gefriergetrocknete Ileumprobe in Eppendorf-Reaktionsgefäß einwiegen
- 1000 µL 80%iges Ethanol zugeben und vortexen
- Für 30 min bei 40 °C im Schüttler extrahieren (800 rpm)
- Vortexen, 1 min stehen lassen, zentrifugieren
- Überstand in 15-mL-Zentrifugenröhrchen überführen
- Rückstand in 1000 µL Ethanol (80 %) aufnehmen, vortexen
- Für 10 min bei 40 °C im Schüttler extrahieren
- Vortexen, 1 min stehen lassen, zentrifugieren
- Überstand mit vorherigem Überstand in 15-mL-Zentrifugenröhrchen vereinigen
- Rückstand in 500 µL Ethanol (80 %) aufnehmen, vortexen
- Für 10 min bei 40 °C im Schüttler extrahieren
- Vortexen, 1 min stehen lassen, zentrifugieren
- Überstand mit vorherigen Überständen in 15-mL-Zentrifugenröhrchen vereinigen
- Vereinigte Überstände im Evaporator einengen (ca. 3 h)
- Mit H₂O auf ca. 2 mL auffüllen
- Einfrieren (-80 °C) und über Nacht gefriertrocknen (Vorsicht: Kann überkochen)
- Gefriergetrockneter Rückstand in 1 mL bidest. H₂O aufnehmen
- Gut vortexen und bei Raumtemperatur lösen lassen
- Zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen → **NLKH-Fraktion Ileum** (für freie Monosaccharide + RFO und SPE)
- Im Gefrierschrank aufbewahren
- Rückstand waschen (2 x Ethanol, 1 x Aceton) und trocknen

8.4.2 Bestimmung der freien Monosaccharide und Raffinoseoligosaccharide

- Proben (NLKH-Fraktion Ileum) verdünnen und dabei 2-Desoxy-D-Glucose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 25 µM)
- Mittels HPAEC-PAD messen

HPAEC-PAD-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA20 (6 µm, 150 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD), AgCl-Elektrode (20 °C, IntAmp) Waveform: Carbohydrates (Quad-Potential)
Gradient:	s. Tabelle V12
Kalibrierung:	10 Monosaccharide, Quadratisch (zwei 5-Punkt-Kalibrierungen): Fucose, Rhamnose, Arabinose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose, Galacturonsäure, Glucuronsäure (1, 6, 12, 18 und 25 µM; 25, 50, 75, 100 und 125 µM) RFO (zwei 5-Punkt-Kalibrierungen, Verbascose nur unterer Bereich): Raffinose, Stachyose, Verbascose (1, 6, 12, 18 und 25 µM; 25, 50, 75, 100 und 125 µM) Interner Standard: 2-Desoxy-D-Glucose (25 µM)

Tabelle V12: Gradientenprogramm zur Bestimmung der freien Monosaccharide und Oligosaccharide der Raffinose-Familie mittels Hochleistungsanionenaustauschromatographie und gepulst amperometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	90	10	0
0,0	90	10	0
1,5	97	3	0
22,0	97	3	0
32,0	0	100	0
37,0	0	100	0
37,1	0	60	40
52,0	0	60	40

8.4.3 Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (nPGC-SPE)

nPGC-SPE:

- Probe (NLKH-Fraktion Ileum) auftauen, vortexen und zentrifugieren
- Aufreinigung mittels nPGC (250 mg, 3 mL, Supelclean ENVI-Carb, Sigma-Aldrich)
 - Konditionieren:
 - Acetonitril (3 x 1 mL)
 - H₂O (3 x 1 mL)
 - Probe aufgeben (400 µL)
 - Waschen (Eluat verwerfen):
 - H₂O (2 x 1 mL)
 - H₂O (2 x 2 mL)
 - Eluieren (**Eluat** in 4-mL-Gläschen auffangen → enthält Oligosaccharide)
 - Acetonitril/H₂O mit Ameisensäure (50/50, v/v mit 0,1 %) (3 x 1 mL)
 - Rekonditionieren:
 - Acetonitril (4 x 1,5 mL)
 - H₂O (4 x 1,5 mL)
 - Acetonitril (2 x 1,5 mL)
 - Zweiter Zyklus (nochmal Konditionieren, Probe aufgeben, Waschen, Eluieren) und anschließend Kartusche entsorgen

Acetonitril/H₂O-Eluat (Oligosaccharide) trocknen:

- Eluat im Evaporator einengen (ca. 3 h)
- Acetonitril-freie Lösung einfrieren (-80 °C)
- Über Nacht gefriertrocknen
- Rückstand in 400 µL bidest. H₂O aufnehmen, vortexen
- 1600 µL Ethanol zugeben, vortexen
- Zur Trockene eindampfen
- Zweimal 1000 µL Ethanol zugeben und zur Trockene eindampfen
- In 400 µL bidest. H₂O aufnehmen → **Oligosaccharid-Fraktion Ileum** (für Monosaccharidzusammensetzung und Oligosaccharidprofil)

8.4.4 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

- Je Probe (Oligosaccharid-Fraktion) 20 µL in 1,5-mL-Vial geben
- Im Evaporator zur Trockene eindampfen (ca. 25 min)
- 500 µL TFA-Lösung (2 M) hinzugeben, vortexen
- Fest verschließen und 1 h bei 121 °C im Trockenschrank behandeln
- Abkühlen lassen und im Evaporator zur Trockene eindampfen (ca. 2 – 2,5 h)
- Zweimal je 200 µL Ethanol (99 %) hinzufügen und zur Trockene eindampfen
- In 200 µL H₂O aufnehmen

- Verdünnen, dabei 2-Desoxy-D-Glucose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 25 µM)
- Mittels HPAEC-PAD messen wie in Kapitel 8.2.1 beschrieben

8.4.5 HPAEC-PAD/MS-Methode zur Bestimmung des Oligosaccharidprofils

- Probenlösung nach SPE-Aufreinigung (Oligosaccharid-Fraktion) entsprechend verdünnen (1:10 bzw. 1:20), dabei Isomaltotriose als interner Standard zugeben (Endkonzentration: 10 µM)
- Mittels HPAEC-PAD/MS mit SIM-Spuren analysieren

Generierung der Invertaseabbauprodukte der RFO als Oligosaccharidstandards:

- 100 µL RFO-Lösung (100 µM; Raffinose, Stachyose, Verbascose) mit 10 µL Invertaselösung (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) und 90 µL bidest. H₂O versetzen
- Für 2 h bei 40 °C inkubieren (Endpunktverdau)
- Bei 98 °C für 3 min inaktivieren

HPAEC-PAD/MS-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA200 (6 µm, 250 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion (PAD):	AgCl-Elektrode, 20 °C, Waveform: Carbohydrates(Quad-Potential)
Detektion (MS):	Elektrolytisch regenerierender Suppressor (Gegenstrom mit Wasser), anschließend Kontrolle der Entsalzung mittels Leitfähigkeitsdetektor Zugabe von 0,5 mM LiCl-Lösung (0,05 mL/min) für Adduktbildung ESI im Positiv-Modus: <i>Full-Scan</i> (150 - 850) und SIM (entsprechende <i>m/z</i> der einzelnen Oligosaccharide, s. Tabelle V14)
Gradient:	s. Tabelle V13

Tabelle V13: Gradientenprogramm zur Analyse verschiedener Oligosaccharide nebeneinander mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischem sowie massenspektrometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
20,0	35,0	65,0	0,0
28,0	35,0	63,5	1,5
32,0	35,0	63,5	1,5
60,0	35,0	53,0	12,0
62,0	35,0	53,0	12,0
62,1	0,0	0,0	100,0
77,0	0,0	0,0	100,0

Tabelle V14: Komponentenliste für die massenspektrometrische Detektion zur Analyse verschiedener Oligosaccharide nebeneinander mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie. Alle Spuren werden ab Minute 5 bis Minute 65 aufgenommen. Gemessen wird jeweils das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) des dominierenden Lithiumaddukts, meist einfach geladen, bei höheren Oligosacchariden zweifach geladen (+2). In der Profilingmethode integriert sind Xylo (X)-, Arabinoxylo-, Cello (C)-, Manno (Man)-, Malto (Mal)-, Arabinan (A)- und Galactan (G)-Oligosaccharide, Oligosaccharide der Raffinose-Familie und deren Invertase-Abbauprodukte (xGal+Glc) sowie Arabinoxylanseitenketten.

Zusammensetzung	m/z	Oligosaccharide
2 Pentosen	289,2	XA, AX, X ₂ , A-2b, A-2c
3 Pentosen, 5 Hexosen (2+)	421,4	X ₃ , A ³ X, A-3a, A-3b, Man ₅ , (C ₅)
4 Pentosen	553,5	X ₄ , A ² XX
5 Pentosen	685,6	X ₅ , XA ² XX, XA ³ XX, A ²⁺³ XX
6 Pentosen (2+)	412,3	X ₆
2 Hexosen	349,3	Saccharose, Gal+Glc, Man ₂ , G-2a, C ₂ , Mal ₂
3 Hexosen	511,4	2Gal+Glc, Man ₃ , Raffinose, Isomaltotriose, C ₃ , G-3a, Mal ₃
4 Hexosen	673,6	3Gal+Glc, Man ₄ , Stachyose, C ₄ , Mal ₄
6 Hexosen (2+)	502,4	Man ₆ , (C ₆)
1 Hexose + 1 Pentose	319,3	G-2c, G-2b
2 Hexosen + 1 Pentose	481,4	G-3c, G-3b
3 Hexosen + 1 Pentose	643,6	G-4a

8.4.6 Bestimmung von Arabinan- und Galactanoligosacchariden

- Probenlösung nach SPE-Aufreinigung (Oligosaccharid-Fraktion) entsprechend verdünnen
- Mittels HPAEC-PAD/MS analysieren mit den in Kapitel 8.2.3 beschriebenen HPAEC-PAD-Bedingungen

8.4.7 Abbau störender Oligosaccharide zur Analyse der Bindungstypen

Enzymverdau:

- 400 µL Probe (NLKH-Fraktion Ileum) in Eppendorf-Reaktionsgefäß geben
- 40 µL Enzym-Mix zugeben
(Invertase 1 mg/mL, α-Galactosidase 0,5 mg/mL, Amyloglucosidase 1 mg/mL)
- Für 2,5 h bei 40 °C im Schüttler (400 rpm) inkubieren
- In der Zwischenzeit nPGC-Kartuschen konditionieren
- 5 min abkühlen lassen
- Kurz zentrifugieren (zur Entfernung der Tropfen im Deckel)
- Gesamte Probe auf nPGC aufgeben

nPGC-SPE:

- Aufreinigung mittels nPGC (EnviCarb, 250 mg, 3 mL) und anschließend Eluat trocknen wie in Kapitel 8.4.3 beschrieben, mit folgender Abweichung:
 - Beim Waschschrift mit mehr H₂O spülen (2 x 1 mL und 4 x 2 mL H₂O)
 - → **Oligosaccharid-Fraktion Ileum mit Enzymverdau**

Monosaccharidzusammensetzung nach TFA-Hydrolyse:

- TFA-Hydrolyse mit den Proben nach SPE-Aufreinigung (Oligosaccharid-Fraktion Ileum mit Enzymverdau) wie in Kapitel 8.4.4 beschrieben durchführen

Methylierungsanalyse:

- 250 µL Probe nach SPE-Aufreinigung (Oligosaccharid-Fraktion Ileum mit Enzymverdau) in ein Pyrexglas geben, einfrieren und gefriertrocknen
- Methylierungsanalyse wie in Kapitel 8.2.2 beschrieben durchführen mit folgender Abweichung:
 - Es wird im halben Ansatz gearbeitet (alle Chemikalienmengen halbiert)
- Die Messung erfolgt mittels GC-FID (DB-225) und GC-MS (DB-225 MS und DB-5 MS)

8.5 Analyse der Caecumproben

8.5.1 Extraktion

- Gefriergetrocknete Proben mit Eppendorf-Reaktionsgefäß wiegen
- Proben in 15-mL-Zentrifugenröhrchen überführen und mit Spatel zermahlen
- Leeres Eppendorf-Reaktionsgefäß wiegen
- Zur Probe 2 mL 80%iges Ethanol zugeben und gut vortexen
- Zentrifugenröhrchen drehen um sicherzustellen, dass alles benetzt ist
- 30 min bei 40 °C inkubieren (alle 10 min schütteln)
- Zentrifugieren (2000 rpm, 2 min)
- Überstand in 15-mL-Zentrifugenröhrchen überführen
- Rückstand in 1 mL Ethanol (80 %) aufnehmen und mit Spatel umrühren
- 10 min auf Schüttler (40 °C) extrahieren (ca. 900 rpm), zentrifugieren
- Überstand mit vorherigem Überstand in 15 mL- Zentrifugenröhrchen vereinigen
- Rückstand in 1 mL Ethanol (80 %) aufnehmen
- 10 min auf Schüttler (40 °C) extrahieren, zentrifugieren
- Überstand mit anderen vereinigen
- Rückstand in 1 mL Ethanol (80 %) aufnehmen
- 10 min auf Schüttler (40 °C) extrahieren, zentrifugieren
- Überstand mit anderen vereinigen
- Vereinigte Überstände in Evaporator einengen um Ethanol zu entfernen (ca. 4 h)
- Auf ca. 2 mL mit H₂O auffüllen
- Einfrieren (-80 °C) und über Nacht gefriertrocknen (Vorsicht: Kann überkochen)
- Gefriergetrockneter Rückstand in 1 mL bidest. H₂O aufnehmen
- Gut vortexen, mindestens 15 min bei Raumtemperatur alle 3 - 5 min vortexen
- Zentrifugieren (12 min, 5000 rpm)
- Überstand in neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen → **NLKH-Fraktion Caecum** (für SPE)
- Im Gefrierschrank aufbewahren

8.5.2 Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (C18-nPGC-SPE)

C18-SPE:

- Probe (NLKH-Fraktion Caecum) auftauen, vortexen und zentrifugieren
- Aufreinigung mittels C18 (500 mg, 3 mL, Chromabond C₁₈, Macherey-Nagel)
 - Konditionieren:
 - Methanol/H₂O (80/20, v/v) (1 x 2,5 mL)
 - H₂O (3 x 2,5 mL)
 - Probe aufgeben (400 µL)
 - Eluieren (**Eluat** in 15-mL-Zentrifugenröhrchen auffangen → nPGC)
 - H₂O (2 x 1mL)
 - H₂O (2 x 2mL)

nPGC-SPE:

- Anschließende Aufreinigung mittels nPGC (250 mg, 3 mL, Supelclean ENVI-Carb, Sigma-Aldrich)
 - Konditionieren:
 - Acetonitril (3 x 1 mL)
 - H₂O (3 x 1 mL)
 - Probe (wässriges Eluat nach C18) schrittweise aufgeben und Eluat in 15-mL-Zentrifugenröhrchen auffangen
 - 1. Elution (Eluat in gleichem 15-mL-Zentrifugenröhrchen auffangen → **H₂O-Eluat**, enthält Monosaccharide):
 - H₂O (2 x 1 mL)
 - H₂O (1 x 2 mL)
 - 2. Elution (Eluat in 4-mL-Gläschen auffangen → **Acetonitril/H₂O-Eluat**, enthält Oligosaccharide)
 - Acetonitril/H₂O (50/50, v/v) (3 x 1 mL)
 - Rekonditionieren (Eluat verwerfen):
 - Acetonitril (4 x 1,5 mL)
 - H₂O (4 x 1,5 mL)
 - Acetonitril (2 x 1,5 mL)
 - Zweiter Zyklus (nochmal Konditionieren, Probe aufgeben, 1. Elution, 2. Elution) und anschließend Kartusche entsorgen

H₂O-Eluat trocknen:

- H₂O-Eluat einfrieren und gefriertrocknen
- Rückstand in 400 µL bidest. H₂O aufnehmen → **Monosaccharid-Fraktion Caecum** (für freie Monosaccharide)

Acetonitril/H₂O-Eluat (Oligosaccharide) trocknen:

- Acetonitril/H₂O-Eluat im Evaporator einengen (ca. 3 h)
- Acetonitril-freie Lösung einfrieren (-80 °C)
- Über Nacht gefriertrocknen
- Rückstand in 400 µL bidest. H₂O aufnehmen, vortexten
- 1600 µL Ethanol zugeben, vortexten
- Zur Trockene eindampfen
- 1000 µL Ethanol zugeben und wieder zur Trockene eindampfen
- Rückstand in 400 µL bidest. H₂O aufnehmen → **Oligosaccharid-Fraktion Caecum** (für Monosaccharidzusammensetzung und Oligosaccharidprofil)

8.5.3 Bestimmung der freien Monosaccharide

- Proben (Monosaccharid-Fraktion Caecum) zentrifugieren und verdünnen, dabei 2-Desoxy-D-Glucose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 25 µM)
- Mit den in Kapitel 8.2.1 beschriebenen HPAEC-PAD-Bedingungen analysieren

8.5.4 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

- TFA-Hydrolyse wie in Kapitel 8.4.4 beschrieben durchführen mit folgenden Abweichungen:
 - 46 µL Proben (Oligosaccharid-Fraktion Caecum) in 1,5-mL-Vial geben
 - Am Ende in 115 µL bidest. H₂O aufnehmen
 - Verdünnen, dabei 2-Desoxy-D-Glucose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 25 µM)
 - Mittels HPAEC-PAD unter Verwendung der Aminotrap mit den in Kapitel 8.2.1 aufgeführten Bedingungen (Monosaccharidbestimmung) messen

8.5.5 Bestimmung von Rhamnose und Arabinose neben Galactosamin

- Probe entsprechen verdünnen, dabei 2-Desoxy-D-Glucose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 25 µM)
- Mittels HPAEC-PAD analysieren

HPAEC-PAD-Bedingungen:

Säule:	Dionex CarboPac PA20 (6 µm, 150 mm x 3 mm, Thermo Scientific)
Fluss:	0,4 mL/min
Injektionsvolumen:	25 µL
Säulentemperatur:	25 °C
Detektion:	gepulst amperometrisch (PAD), AgCl-Elektrode (20 °C, IntAmp) Waveform: Carbohydrates (Quad-Potential)
Gradient:	s. Tabelle V15
Kalibrierung:	3 Monosaccharide, Quadratisch (5-Punkt-Kalibrierungen): Galactosamin, Rhamnose, Arabinose (1, 6, 12, 18 und 25 µM) Interner Standard: 2-Desoxy-D-Glucose (25 µM)

Tabelle V15: Gradientenprogramm zur Bestimmung von Galactosamin, Rhamnose und Arabinose mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischem Detektor. Eluent A: Reinstwasser, Eluent B: 0,1 M NaOH, Eluent C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc.

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %	Eluent C in %
-20,0	0,0	100,0	0,0
-10,0	0,0	100,0	0,0
-9,9	98,5	1,5	0,0
0,0	98,5	1,5	0,0
0,5	98,5	1,5	0,0
1,0	97,0	3,0	0,0
11,5	97,0	3,0	0,0
11,6	0,0	60,0	40,0
22,0	0,0	60,0	40,0

8.5.6 Bestimmung des Oligosaccharidprofils

- Probenlösung nach SPE-Aufreinigung (Oligosaccharid-Fraktion Caecum) entsprechend verdünnen (1:2), dabei Isomaltotriose als internen Standard zugeben (Endkonzentration: 10 µM)
- Mittels HPAEC-PAD/MS mit SIM-Spuren messen wie in Kapitel 8.4.5 beschrieben (Methode zur Bestimmung des Oligosaccharidprofils)

8.5.7 Bestimmung von Arabinan- und Galactanligosacchariden

- Probenlösung nach SPE-Aufreinigung (Oligosaccharid-Fraktion Caecum) entsprechend verdünnen
- Mittels HPAEC-PAD/MS analysieren mit den in Kapitel 8.2.3 beschriebenen HPAEC-PAD-Bedingungen (Arabinan- und Galactanprofiling)

9. Anhang (Abbildungen und Tabellen)

9.1 Abbildungen

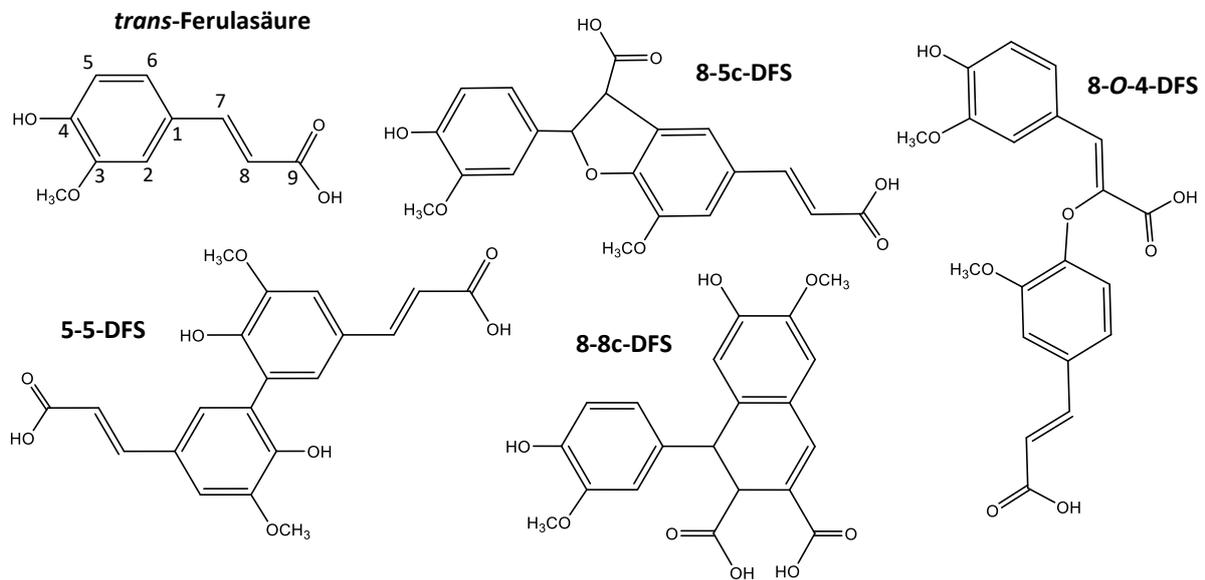


Abbildung A1: Struktur von *trans*-Ferulasäure sowie ausgewählten Dehydrodiferulasäuren (DFS) (c: cyclisch)

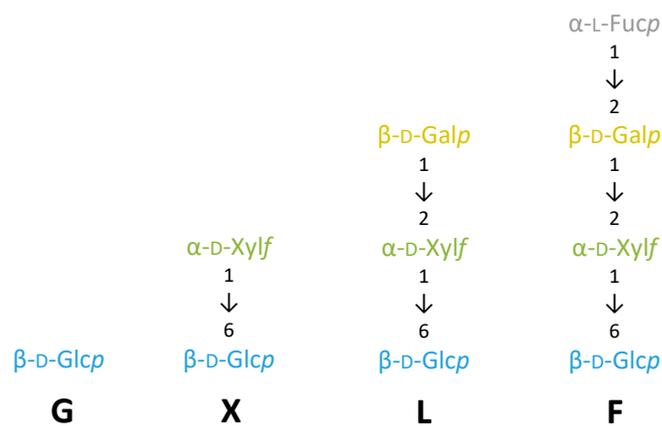


Abbildung A2: Typische Strukturelemente der Xyloglucane mit der üblichen Benennung nach Fry und Mitarbeitenden (1993) (Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Gal: Galactose, Fuc: Fucose, p: -pyranose, f: -furanose)

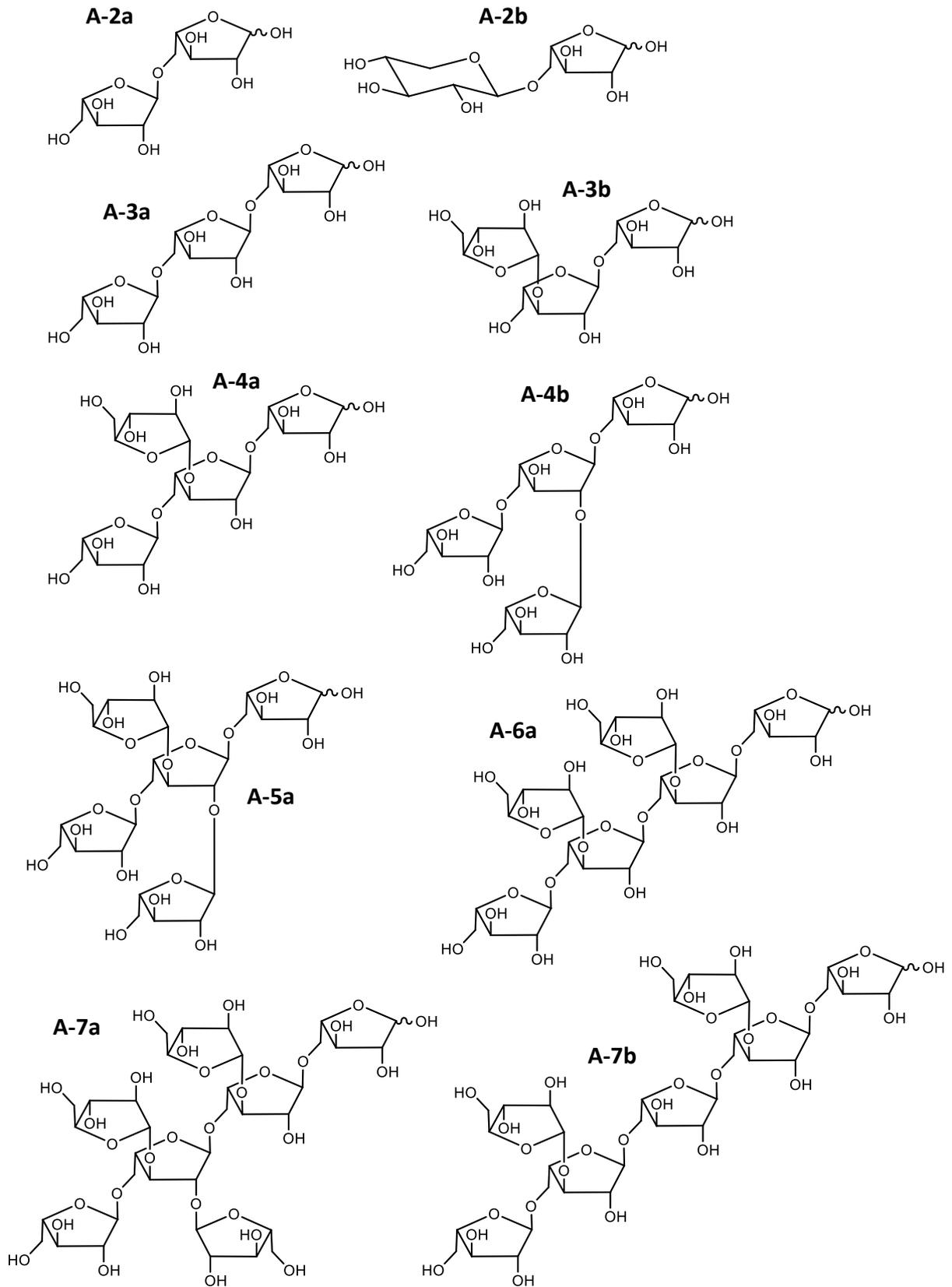


Abbildung A3: Strukturen der Arabinanoligosaccharide (nur detektierte bzw. im Oligosaccharid-Profilung integrierte Arabinanoligosaccharide gezeigt, nach Wefers & Bunzel (2016))

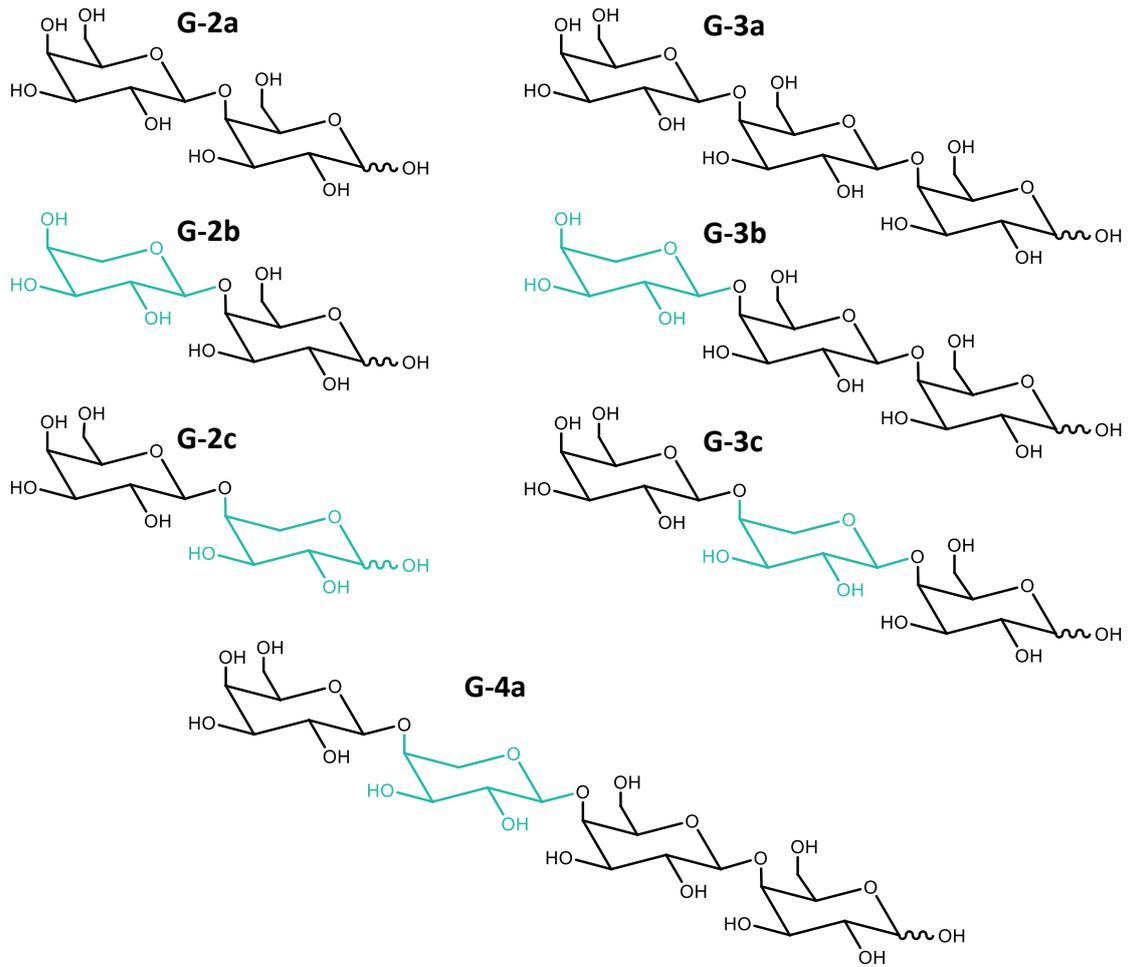


Abbildung A4: Strukturen der Galactanoligosaccharide (schwarz: Galactose, grün: Arabinose; nach Wefers & Bunzel (2016))

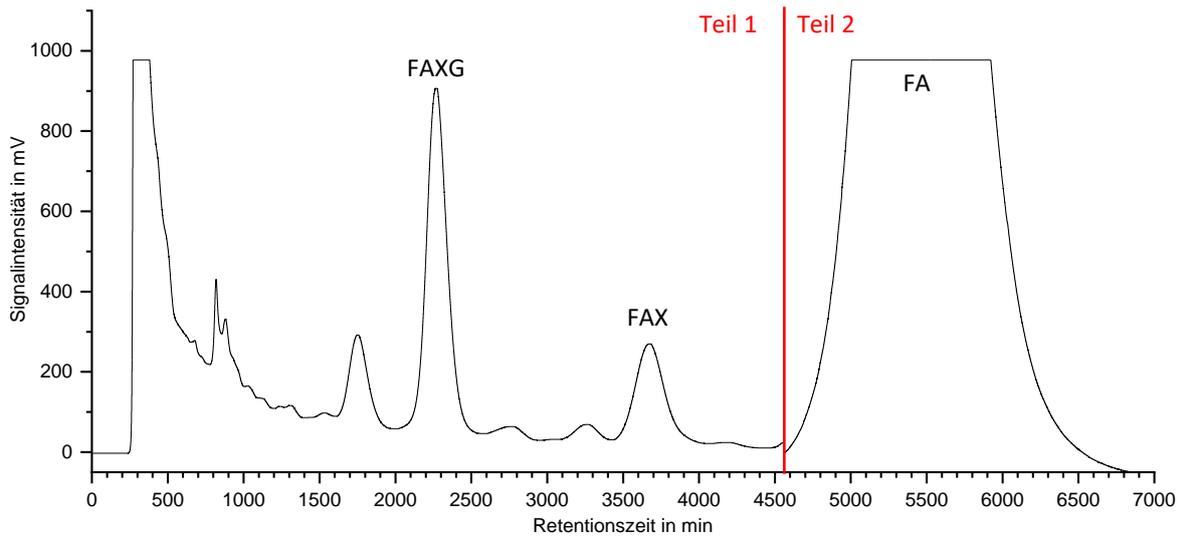


Abbildung A5: Chromatogramm (UV-Detektor) des Sephadex-Laufs der isolierten Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure nach milder TFA-Hydrolyse und Aufreinigung mittels Amberlite (MeOH/H₂O-Fraktion). Teil 1 (bis Minute 4534): Fluss 0,5 mL/min, 350 nm; Teil 2 (ab Minute 4534): Fluss 0,2 mL/min, 325 nm; weitere chromatographische Bedingungen s. Kapitel 8.2.6. (FA: 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAXG: α -L-Galactopyranosyl- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose)

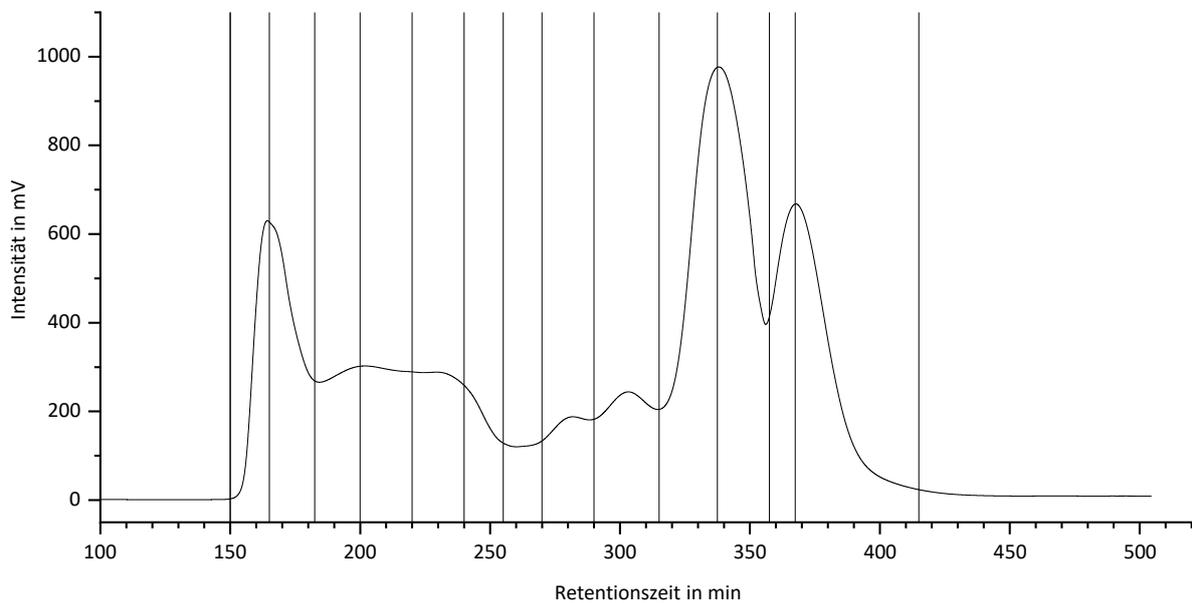


Abbildung A6: Chromatogramm (RID) des Bio-Gel-Laufs der isolierten Arabinoxylanoligosaccharide ohne Ferulasäure nach enzymatischer Hydrolyse und Aufreinigung mittels Amberlite (H₂O-Fraktion) mit den gesammelten Fraktionen. Chromatographische Bedingungen s. Kapitel 8.2.8

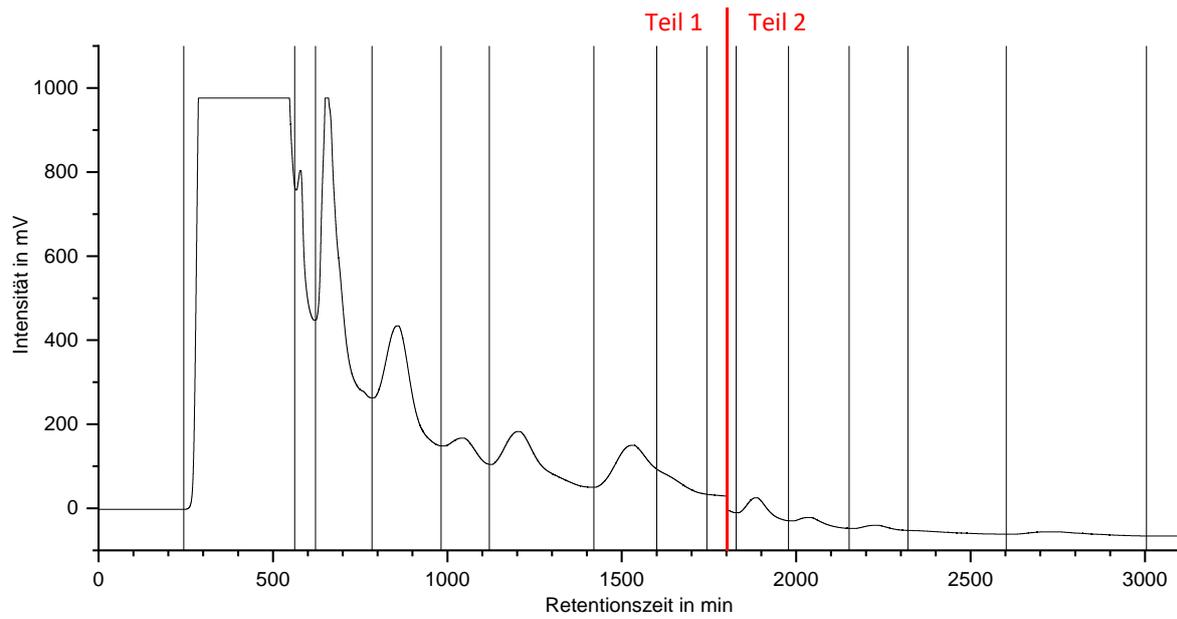


Abbildung A7: Chromatogramm (UV-Detektor) des Sephadex-Laufs der isolierten Arabinoxylanoligosaccharide mit Ferulasäure nach enzymatischer Hydrolyse und Aufreinigung mittels Amberlite (MeOH/H₂O-Fraktion) mit den gesammelten Fraktionen. Teil 1 (bis Minute 1800): Fluss 0,5 mL/min, 350 nm; Teil 2 (ab Minute 1800): Fluss 1 mL/min, 325 nm; weitere chromatographische Bedingungen s. Kapitel 8.2.8

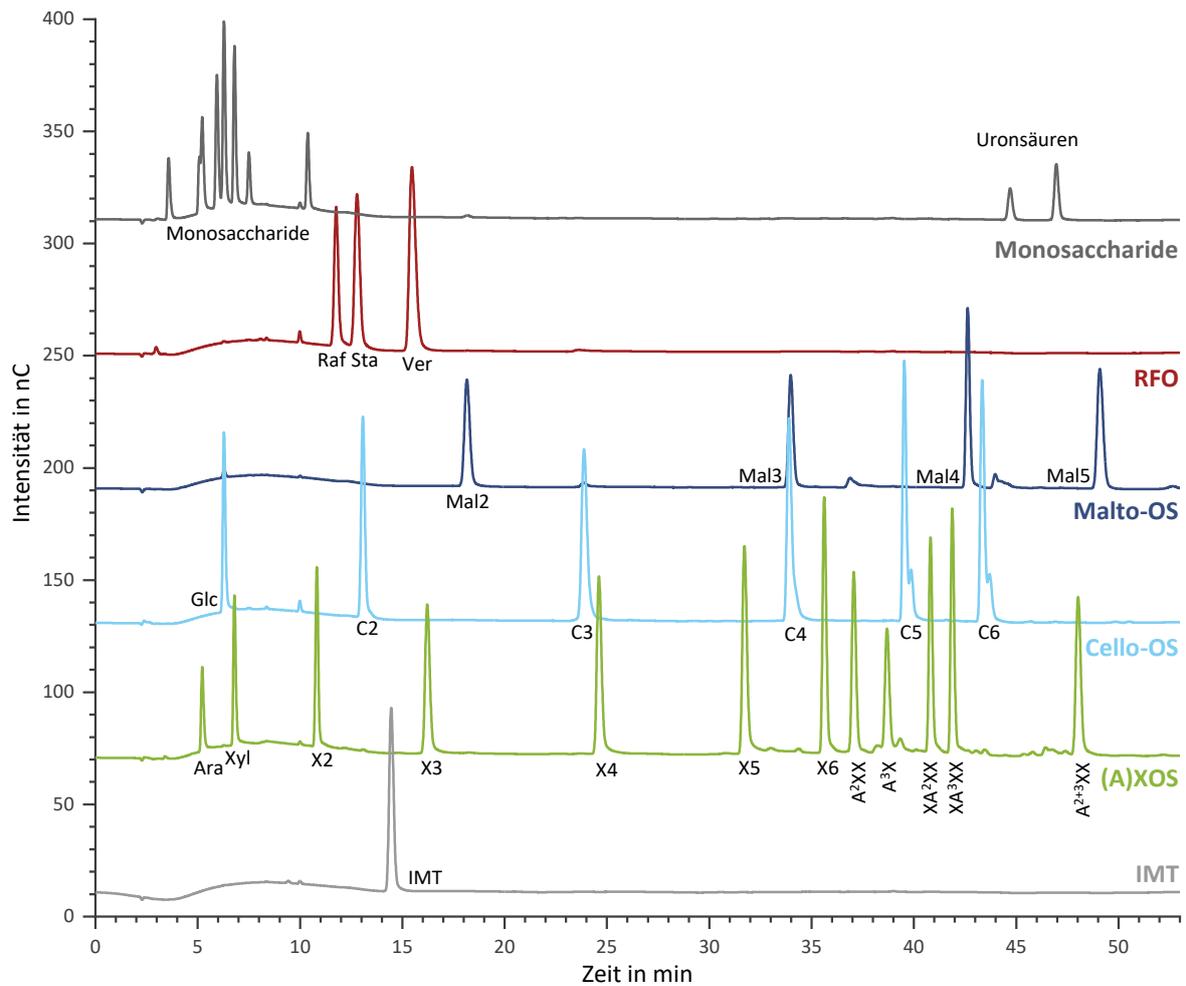


Abbildung A8: Chromatogramme (HPAEC-PAD) von Standardmischungen gemessen mit der (Arabino-) Xylooligosaccharid ((A)XOS)-Methode entwickelt im Rahmen der Masterarbeit von Lukas Sitter. HPAEC-Bedingungen sind in Kapitel 8.3.1 aufgeführt (OS: Oligosaccharide, RFO: OS der Raffinose-Familie, IMT: Isomaltotriose, Raf: Raffinose, Sta: Stachyose, Ver: Verbascose, Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose; modifiziert nach Sitter, 2022).

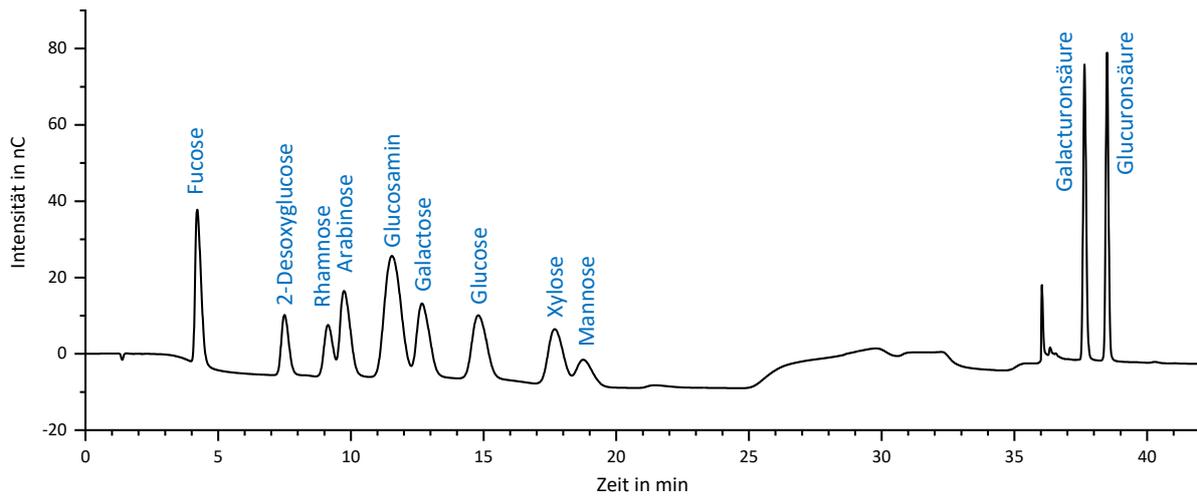


Abbildung A9: Chromatogramm (HPAEC-PAD) der in den Darmproben detektierten Monosaccharide (2-Desoxyglucose dient als interner Standard, Galactosamin koeluiert mit Rhamnose, Ribose eluiert bei einer Retentionszeit von 24 Minuten; chromatographische Bedingungen s. Kapitel 8.2.1)

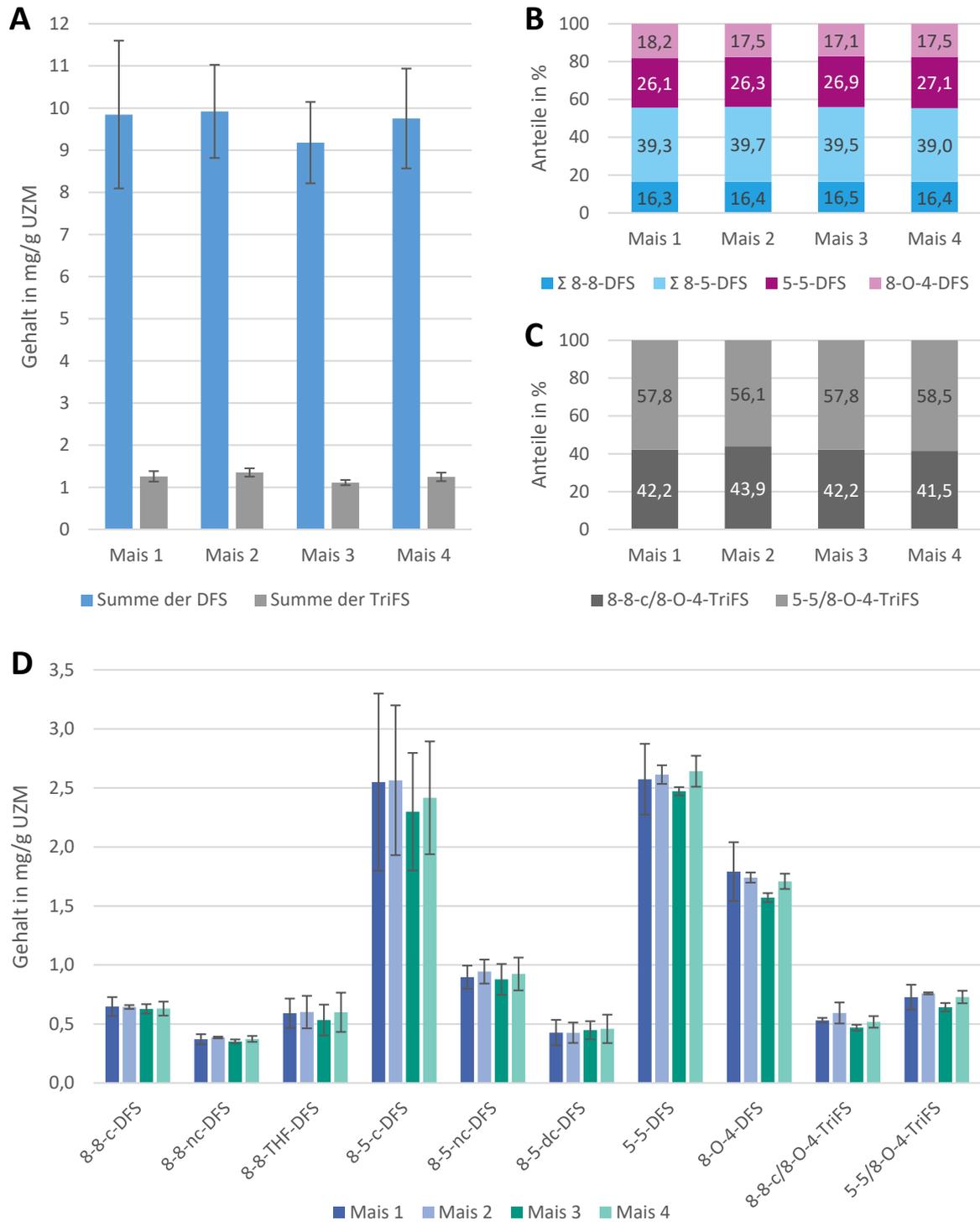


Abbildung A10: Bestimmung der phenolischen Säuren sowie Dehydrodiferulasäuren (DFS) und Dehydrotriferulasäuren (TriFS) (mg/g UZM ± Standardabweichung bzw. %, n = 3). A: Gehalte der DFS und TriFS des unlöslichen Zellwandmaterials (UZM) der vier Maisproben; B: Prozentuale Verteilung der DFS; C: Prozentuale Verteilung der TriFS; D: Gehalte der DFS und TriFS des UZMs (c: cyclisch, nc: nicht-cyclisch, THF: Tetrahydrofuran, dc: decarboxyliert; modifiziert nach Wagner, 2022)

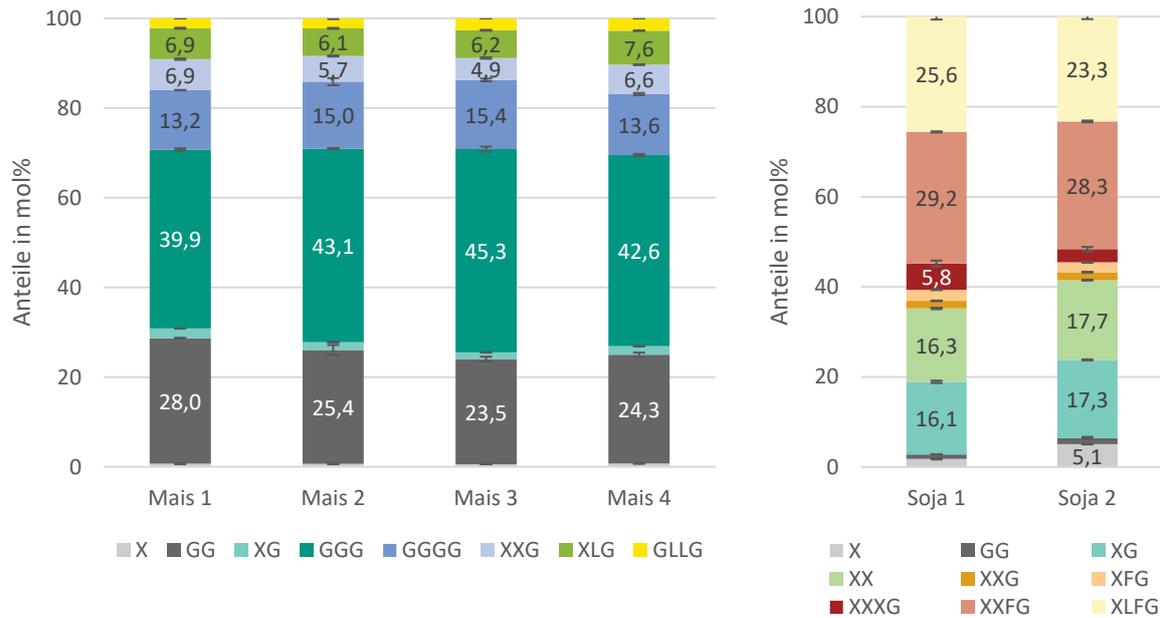


Abbildung A11: Prozentuale Verteilung der Xyloglucan-Oligosaccharide des unlöslichen Zellwandmaterials der vier Maisproben (links) und der zwei Sojaprobe (rechts) (mol% \pm Range/2, n=2). Die Bezeichnung der Oligosaccharide erfolgte nach der üblichen Nomenklatur von Fry *et al.* (1993) (modifiziert nach Wagner, 2022).

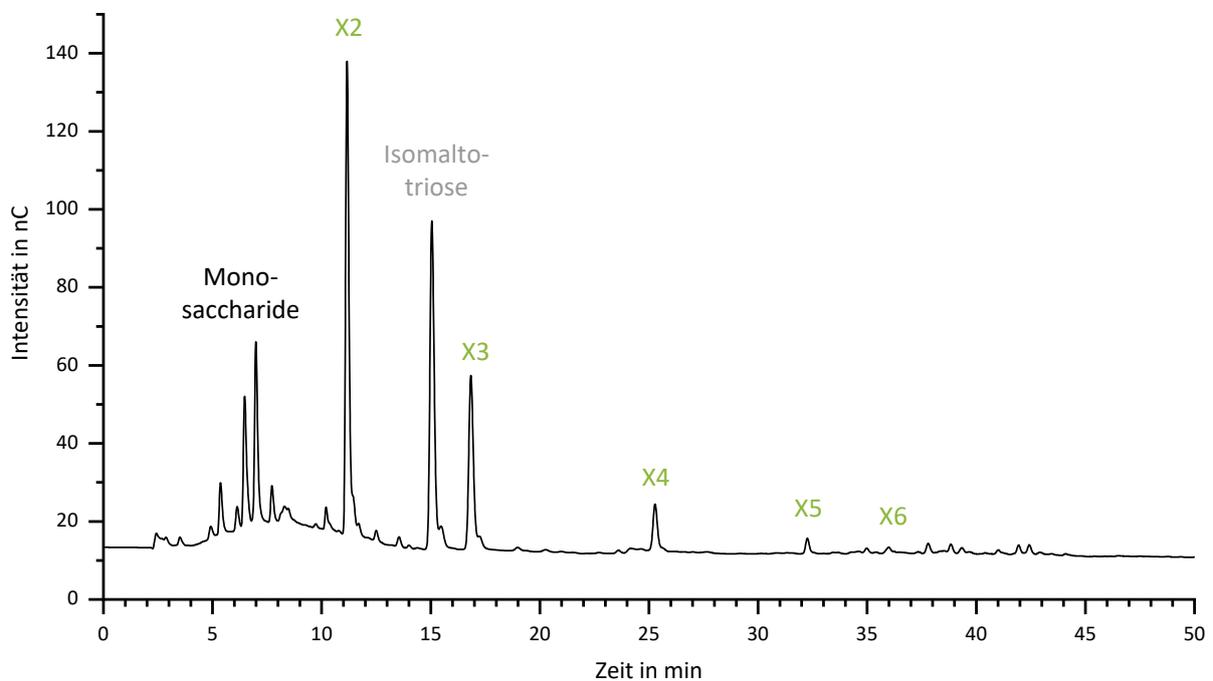


Abbildung A12: Chromatogramm (HPAEC-PAD) der Messung des im Fütterungsversuch eingesetzten Xylooligosaccharid-haltigen Materials. Gemessen wurde mit der HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung von (Arabino-)Xylooligosacchariden mit Isomaltotriose als internem Standard (chromatographische Bedingungen s. Kapitel 8.3.1; X2 bis X6: Xylobiose bis Xylohexaose; modifiziert nach Sitter, 2022).

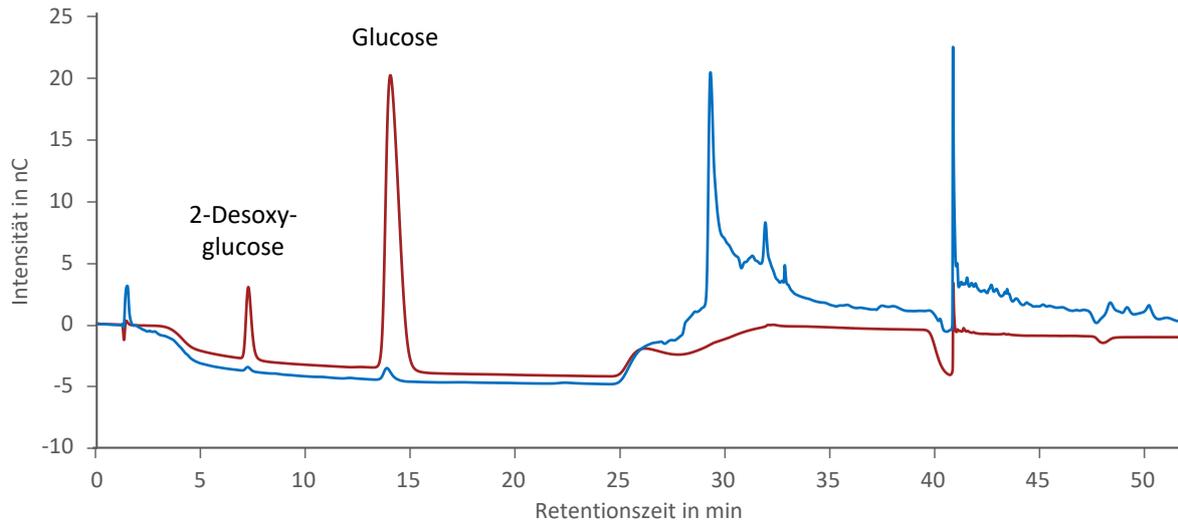


Abbildung A13: Beispielchromatogramm (HPAEC-PAD) zur Veranschaulichung der Matrixeffekte der Caecumproben ohne SPE-Aufreinigung. Rot: 200 μM Glucose-Standardlösung mit 25 μM 2-Desoxyglucose als interner Standard, blau: Probenlösung 1:4 verdünnt (Caecumprobe nach ethanolischer Extraktion und Entfernung des Ethanols) aufgestockt mit 200 μM Glucose und 25 μM 2-Desoxyglucose. Idealerweise sollten die Peaks von 2-Desoxyglucose und Glucose im roten und blauen Chromatogramm die gleichen Flächen aufweisen (Rausch, 2022).

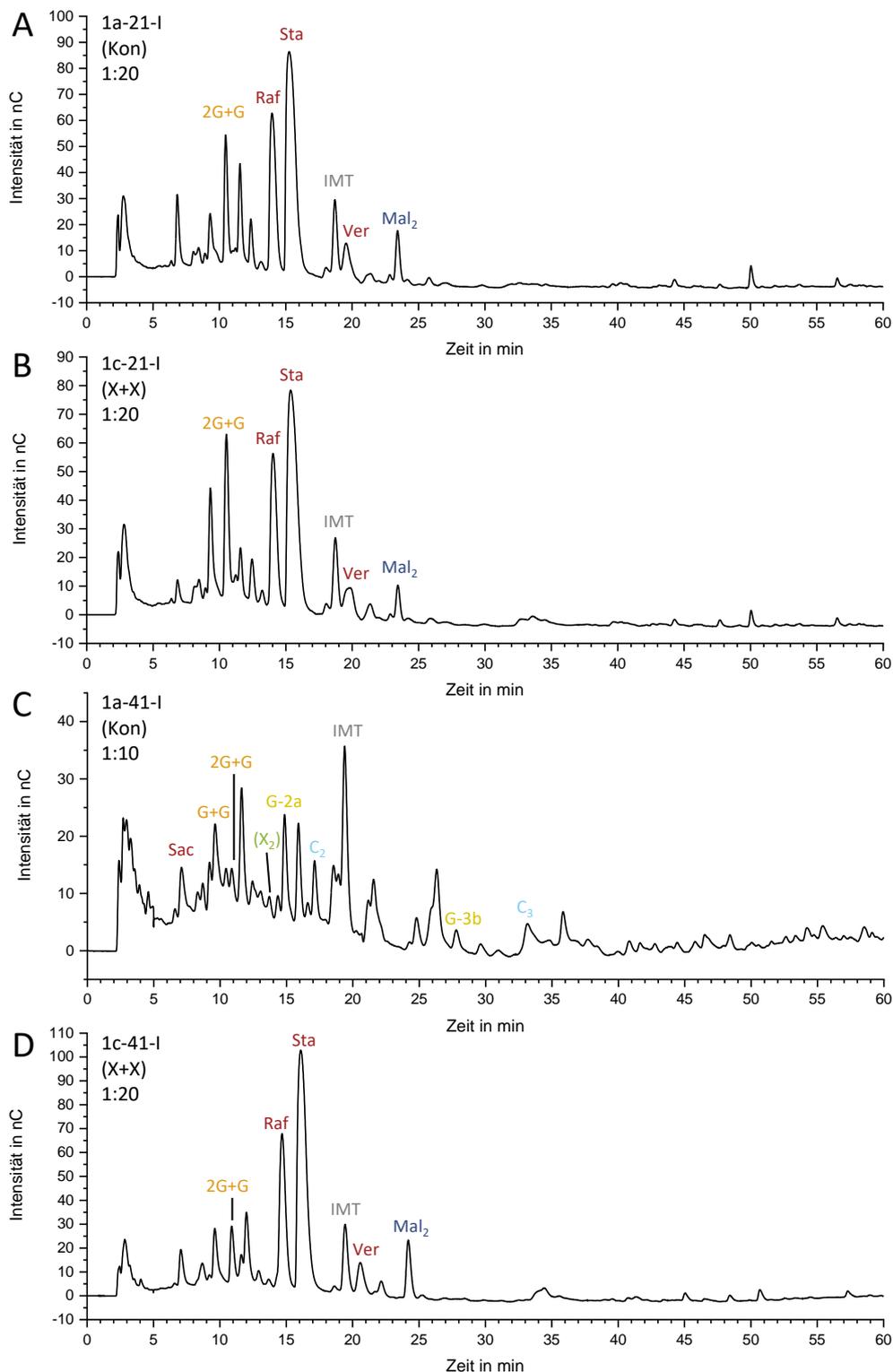


Abbildung A14: Beispielchromatogramme (PAD) der Oligosaccharid (OS)-Fraktionen von Ileumproben mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Gezeigt sind je eine Probe nach 21 Tagen Fütterung der Kontrollgruppe (Kon, A) und der Xylanase-und-Xylo-OS-Gruppe (X+X, B) sowie nach 41 Tagen Fütterung der Kon-Gruppe (C) und der X+X-Gruppe (D). Probenbezeichnungen und Verdünnungsfaktoren sind in den Chromatogrammen angegeben. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mittels MS. Isomaltotriose (IMT) wurde als interner Standard zugegeben (Sac: Saccharose, Raf: Raffinose, Sta: Stachyose, Ver: Verbascose, G+G und 2G+G: Invertaseabbauprodukte von Raf und Sta, Mal₂: Maltobiose, X₂: Xylobiose, C₂ und C₃: Cellobiose und -triose, G-2a und G-3b: Galactan OS).

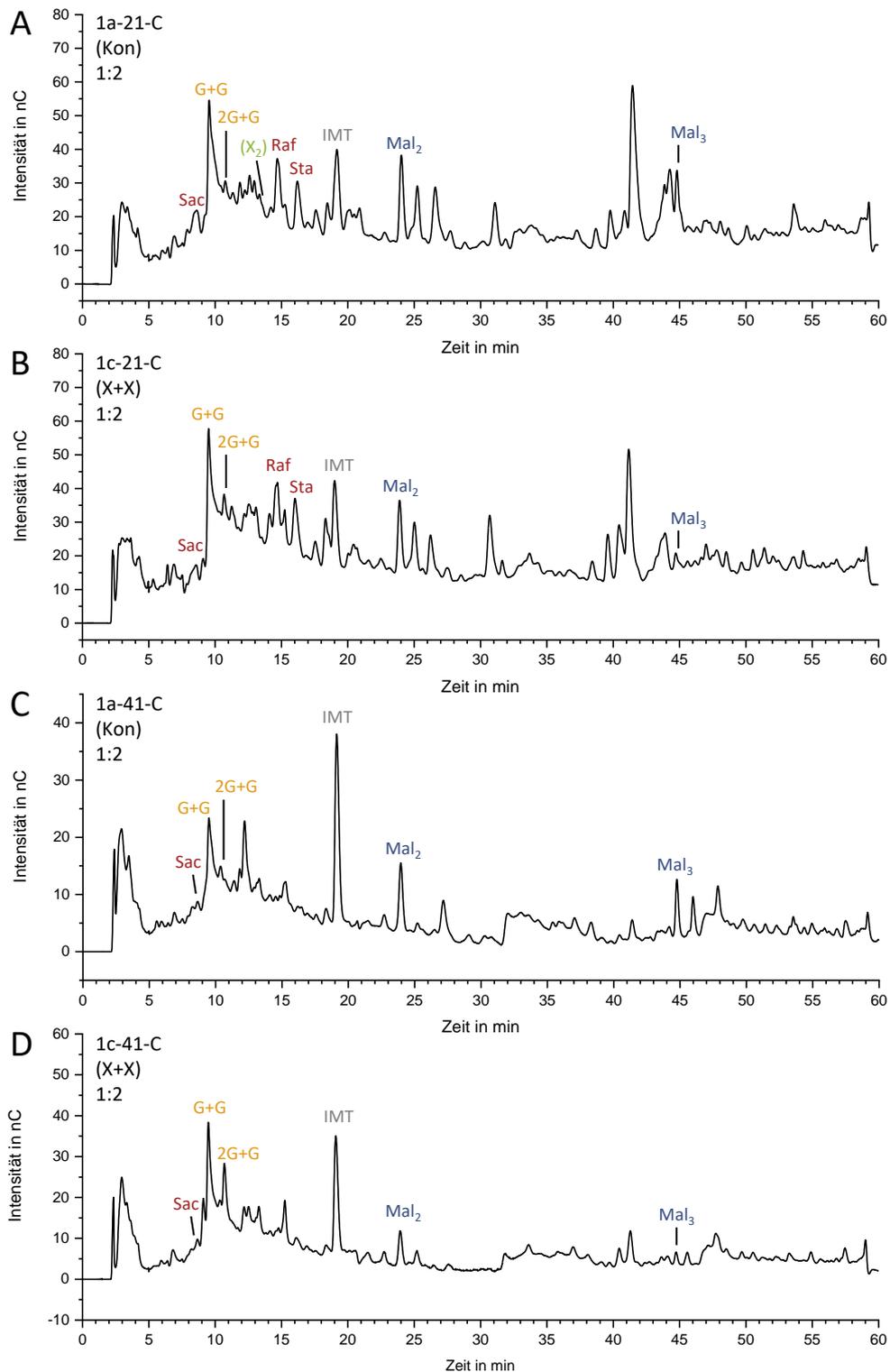


Abbildung A15: Beispielchromatogramme (PAD) der Oligosaccharid (OS)-Fraktionen von Caecumproben mit der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Gezeigt sind je eine Probe nach 21 Tagen Fütterung der Kontrollgruppe (Kon, A) und der Xylanase-und-Xylo-OS-Gruppe (X+X, B) sowie nach 41 Tagen Fütterung der Kon-Gruppe (C) und der X+X-Gruppe (D). Probenbezeichnungen und Verdünnungsfaktoren sind in den Chromatogrammen angegeben. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mittels MS. Isomaltotriose (IMT) wurde als interner Standard zugegeben (Sac: Saccharose, Raf: Raffinose, Sta: Stachyose, G+G und 2G+G: Invertaseabbauprodukte von Raf und Sta, Mal₂ und Mal₃: Maltobiose und -triose, X₂: Xylobiose)

Ileum mit EV Mais 3 Tag 21 und 41	Xylo-OS					Arabinoxylo-OS					RFO & RFO- Abbauprodukte			Cello-OS			Malto-OS			Manno-OS					Arabinan-OS				Galactan-OS											
	X2	X3	X4	X5	X6	A ³ XX	A ³ X	XA ² XX	XA ³ XX	A ²⁺³ XX	Sac	Raf	Sta	Gal+Glc	2Gal+Glc	3Gal+Glc	C2	C3	C4	Mal2	Mal3	Mal4	Man2	Man3	Man4	Man5	A-2b	A-2a	A-3a	A-3b	G-2c	G-2b	G-2a	G-3c	G-3b	G-4a				
Kon	5a-21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	2	1	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na	na	na	na	na
	6a-21	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	na	na	na	
Xyla	4b-21	2	2	2	1	1	1	0	0	0	2	3	2	3	3	2	1	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	na	na	na	na	na
	6b-21	2	2	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	na	na	na		
X+X	4c-21	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	na	na									
	5c-21	2	2	2	1	1	1	0	0	0	2	0	0	2	1	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	na	na		
Kon	5a-41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na	na	na	na	
	6a-41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	na	na	na		
Xyla	4b-41	2	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	3	0	0	na	na	na	na	na	
	6b-41	2	2	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	1	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	na	na	na	na	na	na	na	na	na			
X+X	4c-41	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	4	0	1	na	na	na	na	na		
	5c-41	2	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	2	3	0	1	na	na	na	na	na		

Abbildung A17: Ermitteltes Oligosaccharid (OS)-Profil der Ileumproben für die Methylierungsanalyse nach Enzymverdau (EV) mit α -Galactosidase, Invertase und Amyloglucosidase von Tag 21 und Tag 41 (Basisfutter Mais 3) der Futtermittelformen Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylo-OS (X+X). 0 - 4: zunehmende Menge an OS (0: nicht detektierbar bis 4: Signal der Probe mindestens 2-mal höher als Vergleichssignal der Standardsubstanzmessung (5 μ M)), na: nicht analysiert, nicht aufgeführte OS wurden nicht detektiert, C3 und G-3a koeluiieren: hier als C3 angegeben (RFO: OS der Raffinose-Familie)

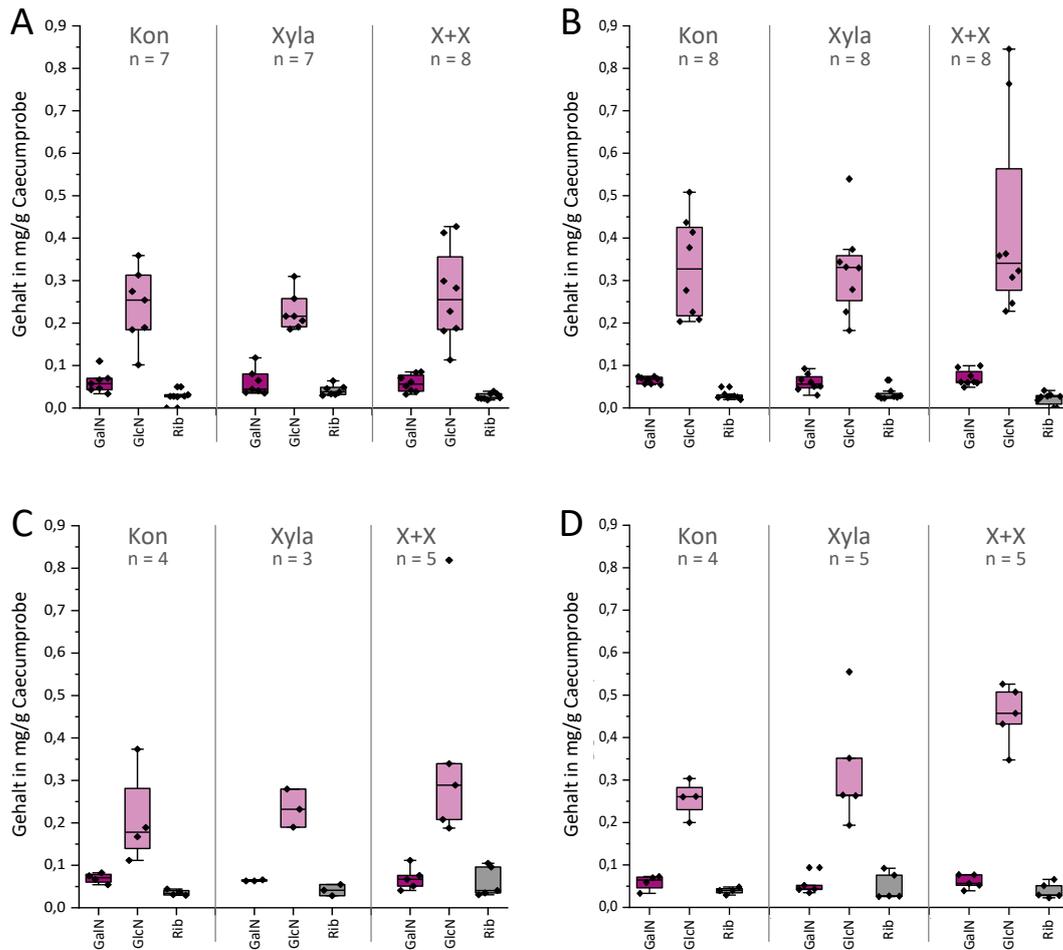


Abbildung A18: Ergänzung zur Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (mg/g Caecumprobe, n = Anzahl analysierter biologischer Replikate). Aufgeführt sind die Monosaccharide, die nicht aus Oligosacchariden pflanzlichen Ursprungs stammen. Proben nach 21 Tagen Fütterung mit Basisfutter Mais 3 (A) und Mais 4 (B); Proben nach 41 Tagen Fütterung mit Basisfutter Mais 3 (C) und Mais 4 (D); jeweils drei Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X) (GalN: Galactosamin, GlcN: Glucosamin, Rib: Ribose)

9.2 Tabellen

Tabelle A1: Zusammensetzung der im Fütterungsversuch eingesetzten Basisfuttermittel (Alleinfuttermittel)

Zutaten in %	Starterfutter				Mastfutter			
	Mais 1	Mais 2	Mais 3	Mais 4	Mais 1	Mais 2	Mais 3	Mais 4
Sorte								
Mais	60,00	60,00	60,00	60,00	65,00	65,00	65,00	65,00
Mikronisiertes Soja (HP-300) (Soja 1)	13,70	17,73	18,18	17,67	0,00	3,57	4,07	3,52
Sojabohnenmehl 47 (Soja 2)	18,19	13,86	13,53	14,28	27,4	23,66	23,31	24,12
Schmalz	3,83	4,17	4,08	3,84	3,48	3,86	3,74	3,49
Salz	0,36	0,35	0,35	0,35	0,31	0,31	0,31	0,31
DL Methionin	0,33	0,33	0,32	0,33	0,26	0,26	0,25	0,25
Lysin HCl	0,23	0,21	0,2	0,21	0,25	0,23	0,22	0,21
Threonin	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07	0,06	0,05	0,05
Limeston	1,16	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17
Mono Dical Phos	0,92	0,91	0,91	0,91	0,68	0,67	0,67	0,67
Vitamin premix	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Phytase (Quantum Blue)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sepiolite	0,80	0,80	0,80	0,80	0,96	0,80	0,80	0,80

Tabelle A2: Zuordnung der Mais- und Sojaproben

Bezeichnung	Name	Versand Name (UAB ID)
Mais 1	Kendras	N20-133
Mais 2	Kefrancos	N20-134
Mais 3	Kerubino	N20-135
Mais 4	Keyras	N20-136
Soja 1	Micronized soy (HP-300)	N20-137
Soja 2	Soybean meal 47	N20-138

Tabelle A3: Übersicht der Ileum- und Caecumproben für Basisfutter Mais 1 und 2 mit ursprünglicher Benennung. Proben wurden nicht analysiert; markiert sind die Proben, die im Probensatz fehlen (dunkelgrau) (Kon: Kontrolle, Xyla: mit Xylanase, X+X: mit Xylanase und Xylooligosacchariden)

Mais	Futter- variante	Tag 21		Tag 41	
		Ursprüngliche Nummer Ileum	Caecum	Ursprüngliche Nummer Ileum	Caecum
1	Kon	21-C1	21-C1	42-C1	42-C1
		21-C13	21-C13	42-C13	42-C13
		21-C34	21-C34	42-C34	42-C34
		21-C46	21-C46	42-C46	42-C46
		21-C55	21-C55	42-C55	42-C55
		21-C67	21-C67	42-C67	42-C67
		21-C76	21-C76	42-C76	42-C76
		21-C88	21-C88	42-C88	42-C88
1	Xyla	21-C4	21-C4	42-C4	42-C4
		21-C16	21-C16	42-C16	42-C16
		21-C25	21-C25	42-C25	42-C25
		21-C37	21-C37	42-C37	42-C37
		21-C58	21-C58	42-C58	42-C58
		21-C70	21-C70	42-C70	42-C70
		21-C79	21-C79	42-C79	42-C79
		21-C91	21-C91	42-C91	42-C91
1	X+X	21-C7	21-C7	42-C7	42-C7
		21-C19	21-C19	42-C19	42-C19
		21-C28	21-C28	42-C28	42-C28
		21-C40	21-C40	42-C40	42-C40
		21-C49	21-C49	42-C49	42-C49
		21-C61	21-C61	42-C61	42-C61
		21-C82	21-C82	42-C82	42-C82
		21-C94	21-C94	42-C94	42-C94
2	Kon	21-C10	21-C10	42-C10	42-C10
		21-C22	21-C22	42-C22	42-C22
		21-C31	21-C31	42-C31	42-C31
		21-C43	21-C43	42-C43	42-C43
		21-C52	21-C52	42-C52	42-C52
		21-C64	21-C64	42-C64	42-C64
		21-C73	21-C73	42-C73	42-C73
		21-C85	21-C85	42-C85	42-C85
2	Xyla	21-C5	21-C5	42-C5	42-C5
		21-C17	21-C17	42-C17	42-C17
		21-C26	21-C26	42-C26	42-C26
		21-C38	21-C38	42-C38	42-C38
		21-C59	21-C59	42-C59	42-C59
		21-C71	21-C71	42-C71	42-C71
		21-C80	21-C80	42-C80	42-C80
		21-C92	21-C92	42-C92	42-C92
2	X+X	21-C8	21-C8	42-C8	42-C8
		21-C20	21-C20	42-C20	42-C20
		21-C29	21-C29	42-C29	42-C29
		21-C41	21-C41	42-C41	42-C41
		21-C50	21-C50	42-C50	42-C50
		21-C62	21-C62	42-C62	42-C62
		21-C83	21-C83	42-C83	42-C83
		21-C95	21-C95	42-C95	42-C95

Tabelle A4: Übersicht der Ileum- und Caecumproben für Basisfutter Mais 3 und 4 mit ursprünglicher und neu eingeführter Benennung. Markiert sind Proben, die fehlen (dunkelgrau), nicht vollständig analysiert wurden (hellgrau, s. Kapitel 3.4.5), bei Extraktion verloren gegangen sind (*) und für Analyse der Bindungstypen ausgewählt wurden (fett, s. Kapitel 3.4.4) (Kon: Kontrolle, Xyla: mit Xylanase, X+X: mit Xylanase und Xylooligosacchariden).

Mais	Futter- variante	Kennung	Tag 21			Tag 41		
			Ursprüngliche Nummer	Neue Bezeichnung		Ursprüngliche Nummer	Neue Bezeichnung	
				Ileum	Caecum		Ileum	Caecum
3	Kon	1a	21-C11	1a-21-I	1a-21-C*	42-C11	1a-41-I	1a-41-C
		2a	21-C23	2a-21-I	2a-21-C	42-C23	2a-41-I	2a-41-C
		3a	21-C32	3a-21-I	3a-21-C	42-C32	3a-41-I	3a-41-C
		4a	21-C44	4a-21-I	4a-21-C	42-C44	4a-41-I	4a-41-C
		5a	21-C53	5a-21-I	5a-21-C	42-C53	5a-41-I	5a-41-C
		6a	21-C65	6a-21-I	6a-21-C	42-C65	6a-41-I	6a-41-C
		7a	21-C74	7a-21-I	7a-21-C	42-C74	7a-41-I	7a-41-C
		8a	21-C86	8a-21-I	8a-21-C	42-C86	8a-41-I	8a-41-C
3	Xyla	1b	21-C2	1b-21-I	1b-21-C*	42-C2	1b-41-I	1b-41-C
		2b	21-C14	2b-21-I	2b-21-C	42-C14	2b-41-I	2b-41-C
		3b	21-C35	3b-21-I	3b-21-C	42-C35	3b-41-I	3b-41-C
		4b	21-C47	4b-21-I	4b-21-C	42-C47	4b-41-I	4b-41-C
		5b	21-C56	5b-21-I	5b-21-C	42-C56	5b-41-I	5b-41-C
		6b	21-C68	6b-21-I	6b-21-C	42-C68	6b-41-I	6b-41-C
		7b	21-C77	7b-21-I	7b-21-C	42-C77	7b-41-I	7b-41-C
		8b	21-C89	8b-21-I	8b-21-C	42-C89	8b-41-I	8b-41-C
3	X+X	1c	21-C24	1c-21-I	1c-21-C	42-C24	1c-41-I	1c-41-C
		2c	21-C30	2c-21-I	2c-21-C	42-C30	2c-41-I	2c-41-C
		3c	21-C45	3c-21-I	3c-21-C	42-C45	3c-41-I	3c-41-C
		4c	21-C51	4c-21-I	4c-21-C	42-C51	4c-41-I	4c-41-C
		5c	21-C63	5c-21-I	5c-21-C	42-C63	5c-41-I	5c-41-C
		6c	21-C66	6c-21-I	6c-21-C	42-C66	6c-41-I	6c-41-C
		7c	21-C81	7c-21-I	7c-21-C	42-C81	7c-41-I	7c-41-C
		8c	21-C84	8c-21-I	8c-21-C	42-C84	8c-41-I	8c-41-C
4	Kon	1d	21-C15	1d-21-I	1d-21-C	42-C15	1d-41-I	1d-41-C
		2d	21-C21	2d-21-I	2d-21-C	42-C21	2d-41-I	2d-41-C
		3d	21-C33	3d-21-I	3d-21-C	42-C33	3d-41-I	3d-41-C
		4d	21-C42	4d-21-I	4d-21-C	42-C42	4d-41-I	4d-41-C
		5d	21-C54	5d-21-I	5d-21-C	42-C54	5d-41-I	5d-41-C
		6d	21-C60	6d-21-I	6d-21-C	42-C60	6d-41-I	6d-41-C
		7d	21-C75	7d-21-I	7d-21-C	42-C75	7d-41-I	7d-41-C
		8d	21-C96	8d-21-I	8d-21-C	42-C96	8d-41-I	8d-41-C
4	Xyla	1e	21-C3	1e-21-I	1e-21-C	42-C3	1e-41-I	1e-41-C
		2e	21-C9	2e-21-I	2e-21-C	42-C9	2e-41-I	2e-41-C
		3e	21-C36	3e-21-I	3e-21-C	42-C36	3e-41-I	3e-41-C
		4e	21-C48	4e-21-I	4e-21-C	42-C48	4e-41-I	4e-41-C
		5e	21-C57	5e-21-I	5e-21-C	42-C57	5e-41-I	5e-41-C
		6e	21-C69	6e-21-I	6e-21-C	42-C69	6e-41-I	6e-41-C
		7e	21-C87	7e-21-I	7e-21-C	42-C87	7e-41-I	7e-41-C
		8e	21-C90	8e-21-I	8e-21-C	42-C90	8e-41-I	8e-41-C
4	X+X	1f	21-C6	1f-21-I	1f-21-C	42-C6	1f-41-I	1f-41-C
		2f	21-C12	2f-21-I	2f-21-C	42-C12	2f-41-I	2f-41-C
		3f	21-C18	3f-21-I	3f-21-C	42-C18	3f-41-I	3f-41-C
		4f	21-C27	4f-21-I	4f-21-C	42-C27	4f-41-I	4f-41-C
		5f	21-C39	5f-21-I	5f-21-C	42-C39	5f-41-I	5f-41-C
		6f	21-C72	6f-21-I	6f-21-C	42-C72	6f-41-I	6f-41-C
		7f	21-C78	7f-21-I	7f-21-C	42-C78	7f-41-I	7f-41-C
		8f	21-C93	8f-21-I	8f-21-C	42-C93	8f-41-I	8f-41-c

Tabelle A5: Ergebnisse der Charakterisierung und Identifizierung der isolierten Arabinoxylanseitenketten mit Ferulasäure (FA: 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose, FAXG: α -L-Galactopyranosyl- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose)

Fraktionsnummer	Substanz	Monosaccharidanalyse	Molekulargewicht [M+Na] ⁺	UV-Spektrum	Ausbeute
F21	FA	94% Arabinose 6% Glucose	349	Ferulasäure	Ca. 32 mg
F19	FAX	56 % Arabinose, 44 % Xylose	481	Ferulasäure	Ca. 7 mg
F14	FAXG	38% Arabinose, 30% Galactose 31% Xylose	643	Ferulasäure	Ca. 26 mg

Tabelle A6: Kenndaten zur Methode für die Bestimmung von (Arabino-)Xylooligosacchariden ((A)XOS) mittels HPAEC-PAD. Die Benennung der AXOS entspricht dem gängigen System nach Fauré und Mitarbeitenden (2009) (RRT: relative Retentionszeit in Bezug auf Isomaltotriose (ca. 14,5 min), RRF: relativer Responsefaktor ermittelt mit Isomaltotriose (10 μ M), LOD: Nachweisgrenze (Signal-Rauschverhältnis 3:1), LOQ: Bestimmungsgrenze (Signal-Rauschverhältnis 10:1); Sitter, 2022).

(A)XOS	RRT	RRF	Konzentrationsbereiche in μ M	LOD in μ M	LOQ in μ M
X ₂	0,74	1,884	0,1 - 30,0	0,025	0,075
X ₃	1,12	1,325	0,1 - 30,0	0,010	0,050
X ₄	1,66	1,143	0,1 - 30,0	0,025	0,075
X ₅	2,12	1,044	0,1 - 24,0	0,010	0,050
X ₆	2,36	0,960	0,1 - 18,0	0,010	0,050
A ² XX	2,48	1,272	0,1 - 30,0	0,025	0,100
A ³ X	2,59	1,715	1,0 - 30,0	0,250	0,750
XA ² XX	2,71	1,249	0,1 - 30,0	0,010	0,050
XA ³ XX	2,78	1,206	0,1 - 30,0	0,025	0,075
A ²⁺³ XX	3,91	1,267	0,1 - 30,0	0,050	0,100

Tabelle A7: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des unlöslichen Zellwandmaterials der Maisproben (mol% ± Range/2, n = 2) (PMAA: partiell methyliertes Alditolacetat, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose; Wagner, 2022)

PMAAs in mol%	Mais 1	Mais 2	Mais 3	Mais 4
t-Glcp	1,44 ± 0,03	1,16 ± 0,10	1,63 ± 0,04	1,04 ± 0,04
1,3-Glcp	1,85 ± 0,25	1,89 ± 0,14	2,60 ± 0,07	2,39 ± 0,04
1,4-Glcp	30,10 ± 0,25	23,81 ± 0,09	32,48 ± 1,43	22,50 ± 1,45
1,4,6-Glcp	1,86 ± 0,06	1,69 ± 0,07	2,06 ± 0,03	1,85 ± 0,13
Summe	35,24 ± 0,59	28,55 ± 0,40	38,77 ± 1,56	27,78 ± 1,66
t-Xylp	1,80 ± 0,02	1,71 ± 0,04	2,28 ± 0,09	1,90 ± 0,17
1,4-Xylp	4,54 ± 0,13	4,32 ± 0,34	4,87 ± 0,23	4,06 ± 0,44
1,2,4-Xylp	1,62 ± 0,01	1,31 ± 0,12	1,51 ± 0,08	1,45 ± 0,11
1,3,4-Xylp	9,25 ± 0,11	8,04 ± 1,04	9,43 ± 0,11	9,48 ± 0,67
1,2,3,4-Xylp	17,16 ± 0,27	25,42 ± 2,71	13,26 ± 1,66	22,16 ± 3,30
Summe	34,38 ± 0,54	40,81 ± 4,25	31,34 ± 2,16	39,05 ± 4,70
t-Araf	14,31 ± 0,07	11,63 ± 2,04	14,73 ± 0,46	13,57 ± 1,44
1,2-Araf	0,98 ± 0,03	0,81 ± 0,03	1,06 ± 0,02	0,89 ± 0,05
1,3-Araf	1,30 ± 0,02	1,15 ± 0,04	1,38 ± 0,01	1,33 ± 0,10
1,5-Araf/1,4-Arap	2,80 ± 0,10	2,76 ± 0,37	2,94 ± 0,00	3,08 ± 0,31
1,2,5-Araf	0,53 ± 0,10	0,52 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,64 ± 0,00
1,3,5-Araf	0,29 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,23 ± 0,02
1,2,3,5-Araf	6,04 ± 0,29	11,13 ± 1,80	4,33 ± 0,91	9,25 ± 2,02
Summe	26,25 ± 0,64	28,19 ± 4,34	25,32 ± 1,46	28,99 ± 3,95
t-Galp	1,47 ± 0,07	1,44 ± 0,16	1,70 ± 0,05	1,48 ± 0,15
1,4-Galp	1,14 ± 0,02	0,80 ± 0,05	1,20 ± 0,12	1,19 ± 0,08
Summe	2,61 ± 0,09	2,24 ± 0,20	2,91 ± 0,18	2,67 ± 0,23
t-Manp	0,14 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,03
1,4-Manp	0,97 ± 0,02	0,74 ± 0,09	1,04 ± 0,06	1,00 ± 0,03
Summe	1,10 ± 0,02	0,86 ± 0,09	1,22 ± 0,09	1,12 ± 0,06
1,2,4-Rhap	0,41 ± 0,12	0,23 ± 0,12	0,45 ± 0,02	0,39 ± 0,06
Summe	0,41 ± 0,12	0,23 ± 0,12	0,45 ± 0,02	0,39 ± 0,06

Tabelle A8: Ergebnisse der Methylierungsanalyse des löslichen Zellwandmaterials der Maisproben (mol% ± Range/2, n = 2) (PMAA: partiell methyliertes Alditolacetat, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Man: Mannose; Wagner, 2022)

PMAA in mol%	Mais 1	Mais 2	Mais 3	Mais 4
t-Glcp	4,81 ± 0,93	4,40 ± 0,47	4,27 ± 0,39	4,60 ± 0,58
1,4-Glcp	16,10 ± 2,90	13,24 ± 2,30	19,68 ± 2,62	20,16 ± 1,84
1,3,6-Glcp	0,81 ± 0,33	0,57 ± 0,03	0,71 ± 0,21	1,04 ± 0,36
1,4,6-Glcp	2,27 ± 0,66	1,73 ± 0,07	1,83 ± 0,37	2,44 ± 0,38
Summe	24,00 ± 4,82	19,94 ± 2,88	26,49 ± 3,59	28,23 ± 3,16
t-Xylp	1,89 ± 0,01	2,05 ± 0,08	1,79 ± 0,01	1,89 ± 0,11
1,4-Xylp	4,85 ± 0,25	5,27 ± 0,31	4,55 ± 0,03	4,64 ± 0,16
1,2,4-Xylp	1,34 ± 0,07	1,34 ± 0,04	1,20 ± 0,20	1,12 ± 0,16
1,3,4-Xylp	8,78 ± 0,11	9,43 ± 0,74	8,68 ± 0,45	8,36 ± 0,75
1,2,3,4-Xylp	6,57 ± 0,16	8,06 ± 0,33	7,04 ± 0,02	6,31 ± 0,04
Summe	23,42 ± 0,60	26,15 ± 1,50	23,26 ± 0,71	22,33 ± 1,22
t-Araf	18,69 ± 1,95	21,85 ± 0,52	19,99 ± 1,08	17,38 ± 0,02
1,2-Araf	1,85 ± 0,09	1,84 ± 0,04	1,28 ± 0,07	1,52 ± 0,32
1,3-Araf	2,59 ± 0,39	2,78 ± 0,13	2,86 ± 0,32	2,65 ± 0,27
1,5-Araf + 1,4-Arap	3,09 ± 0,29	3,16 ± 0,00	3,03 ± 0,15	3,09 ± 0,12
1,3,5-Araf	0,80 ± 0,33	0,71 ± 0,02	0,84 ± 0,12	1,17 ± 0,00
Summe	27,03 ± 3,06	30,34 ± 0,71	27,99 ± 1,74	25,80 ± 0,73
t-Galp	2,16 ± 0,13	1,83 ± 0,06	1,81 ± 0,06	1,77 ± 0,01
1,3-Galp oder 1,3-Manp	0,81 ± 0,04	0,79 ± 0,00	0,74 ± 0,06	0,78 ± 0,04
1,4-Galp	1,87 ± 0,03	0,93 ± 0,12	0,72 ± 0,15	0,85 ± 0,16
1,3,6-Galp	3,03 ± 0,52	3,44 ± 0,04	3,68 ± 0,50	3,36 ± 0,86
Summe	7,88 ± 0,72	6,98 ± 0,22	6,96 ± 0,77	6,76 ± 1,07
t-Manp	10,83 ± 1,31	10,61 ± 0,34	9,61 ± 1,53	10,25 ± 1,92
1,2-Manp oder 1,2 Galp	6,07 ± 0,59	5,38 ± 0,13	5,09 ± 0,05	5,84 ± 0,08
1,4-Manp	0,77 ± 0,12	0,60 ± 0,05	0,61 ± 0,10	0,79 ± 0,16
Summe	17,68 ± 2,02	16,59 ± 0,51	15,30 ± 1,68	16,88 ± 2,15

Tabelle A9: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von unlöslichem (UZM; links) und löslichem (LZM; rechts) Zellwandmaterial der Sojaprobe (mol% ± Range/2, n = 2) (PMAA: partiell methyliertes Alditol-acetat, t: terminal, p: -pyranose, f: furanose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Fuc: Fucose; Wagner, 2022)

PMAA in mol%	UZM		LZM	
	Soja 1	Soja 2	Soja 1	Soja 2
t-Glcp	0,66 ± 0,05	0,58 ± 0,12	1,81 ± 0,09	1,33 ± 0,02
1,3-Glcp	3,45 ± 0,20	2,16 ± 0,25	0,92 ± 0,06	1,55 ± 0,17
1,4-Glcp	25,64 ± 1,64	25,50 ± 0,57	9,00 ± 0,35	8,55 ± 0,07
1,3,6-Glcp	–	–	1,88 ± 0,33	2,28 ± 1,12
1,4,6-Glcp	3,73 ± 0,26	3,68 ± 0,13	1,87 ± 0,01	1,18 ± 0,26
Summe	33,49 ± 2,15	31,91 ± 1,07	15,48 ± 0,86	14,89 ± 1,65
t-Xylp	4,56 ± 0,64	5,89 ± 0,17	1,83 ± 0,10	1,81 ± 0,09
1,2-Xylp + 1,4-Xylp	5,60 ± 0,47	6,29 ± 0,59	2,41 ± 0,07	2,14 ± 0,26
1,2,4-Xylp	1,77 ± 0,05	1,71 ± 0,17	1,02 ± 0,05	0,64 ± 0,06
1,3,4-Xylp	0,32 ± 0,00	0,14 ± 0,08	0,36 ± 0,04	0,16 ± 0,02
1,2,3,4-Xylp	0,54 ± 0,17	0,45 ± 0,03	1,77 ± 0,05	3,15 ± 0,10
Summe	12,80 ± 1,34	14,49 ± 1,05	7,39 ± 0,30	7,89 ± 0,53
t-Araf	11,82 ± 0,55	11,03 ± 0,18	11,32 ± 0,12	11,77 ± 0,73
1,2-Araf	0,63 ± 0,05	0,61 ± 0,04	1,16 ± 0,01	1,01 ± 0,13
1,3-Araf	–	–	0,97 ± 0,04	1,15 ± 0,08
1,5-Araf + 1,4-Arap	11,16 ± 0,59	11,18 ± 0,08	8,72 ± 0,06	9,56 ± 0,36
1,2,5-Araf	2,51 ± 0,20	2,47 ± 0,02	–	–
1,3,5-Araf	3,93 ± 0,27	4,24 ± 0,05	2,58 ± 0,14	2,73 ± 0,11
1,2,3,5-Araf	4,60 ± 0,41	4,46 ± 0,36	2,72 ± 0,13	2,38 ± 0,08
Summe	34,66 ± 2,07	34,00 ± 0,75	27,48 ± 0,49	28,60 ± 1,50
t-Galp	4,05 ± 0,35	4,23 ± 0,08	7,57 ± 0,57	7,63 ± 0,34
1,3-Galp oder 1,3-Manp	–	–	2,80 ± 0,08	2,91 ± 0,11
1,4-Galp	7,98 ± 0,05	9,01 ± 0,99	7,75 ± 0,99	5,33 ± 0,58
1,6-Galp	–	–	5,91 ± 0,43	5,25 ± 0,19
1,3,6-Galp	–	–	5,48 ± 1,11	8,52 ± 0,24
Summe	12,03 ± 0,39	13,23 ± 1,08	29,51 ± 3,17	29,62 ± 1,46
t-Manp	1,58 ± 0,07	0,73 ± 0,02	7,19 ± 0,21	5,72 ± 0,44
1,2-Manp oder 1,2-Galp	–	–	6,76 ± 0,55	4,49 ± 0,51
1,4-Manp	2,74 ± 0,31	3,12 ± 0,32	3,99 ± 0,09	7,16 ± 0,17
Summe	4,32 ± 0,38	3,85 ± 0,34	17,94 ± 0,86	17,38 ± 1,13
1,2-Rhap	1,02 ± 0,08	1,05 ± 0,09	0,83 ± 0,08	0,64 ± 0,07
1,2,4-Rhap	0,76 ± 0,04	0,78 ± 0,04	–	–
Summe	1,78 ± 0,11	1,82 ± 0,14	0,83 ± 0,08	0,64 ± 0,07
t-Fucp	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,00	1,36 ± 0,21	0,99 ± 0,06
Summe	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,00	1,36 ± 0,21	0,99 ± 0,06

Tabelle A10: Ergebnisse des Vorversuchs zur Bestimmung der Anzahl der Extraktionsschritte für die Analyse der Ileum- und Caecumproben. Extrahiert wurde mit 80%igem Ethanol bei 40 °C beim 1. Extraktionsschritt für 30 min, bei den folgenden Extraktionsschritten für 10 min. Die Extrakte wurden nach entfernen des Ethanols mittels HPAEC-PAD analysiert. Für die Ileumproben wurden die freien Monosaccharide Galactose und Glucose bestimmt; für die Caecumproben wurden die Flächen zweier Oligosaccharid-Signale ausgewählt.

Probe	Parameter	Berechnung	1. Extraktionsschritt	2. Extraktionsschritt	3. Extraktionsschritt
Ileum	Freie Galactose in pmol	Prozentuale Verteilung über die Extraktionsschritte	67,7	22,6	9,7
		<i>Anteil an 1. Extraktionsschritt in %</i>	100,0	33,4	14,4
	Freie Glucose in pmol	Prozentuale Verteilung über die Extraktionsschritte	69,3	27,5	3,2
		<i>Anteil an 1. Extraktionsschritt in %</i>	100,0	39,6	4,6
Caecum	Fläche Oligosaccharid-Signal 1	Prozentuale Verteilung über die Extraktionsschritte	46,9	35,3	17,8
		<i>Anteil an 1. Extraktionsschritt in %</i>	100,0	75,3	38,1
	Fläche Oligosaccharid-Signal 2	Prozentuale Verteilung über die Extraktionsschritte	56,2	31,3	12,5
		<i>Anteil an 1. Extraktionsschritt in %</i>	100,0	55,7	22,1

Tabelle A11: Retentionszeiten (RT) und relative Retentionszeiten (RRT, in Bezug auf Isomaltotriose als interner Standard) der entwickelten Profilingmethode zur Detektion von Oligosacchariden (OS) verschiedener OS-Gruppen nebeneinander mittels HPAEC-PAD/MS (XOS: Xylo-OS, AXOS: Arabinoxylo-OS, AX-SK: Arabinoxylanseitenketten, RFO: OS der Raffinose-Familie, RFO + Inv: Invertaseabbauprodukte der OS der Raffinose-Familie)

OS-Gruppe	OS	RT in min	RRT	OS-Gruppe	OS	RT in min	RRT
Int. Standard	Isomaltotriose	19,6	1,00	RFO	Saccharose	8,6	0,44
XOS	X2	13,8	0,71	RFO + Inv	Gal+Glc	9,7	0,49
	X3	22,3	1,14	Galactan-OS	G-2c	10,6	0,54
	X4	34,7	1,77	RFO + Inv	2Gal+Glc	11,0	0,56
	X5	43,0	2,19	Manno-OS	Man2	11,1	0,57
	X6	47,0	2,40	Galactan-OS	G-2b	12,3	0,63
AXOS	A ² XX	48,4	2,47	AX-SK	XA	12,9	0,66
	A ³ X	50,1	2,56	Manno-OS	Man3	13,2	0,67
	XA ² XX	52,1	2,66	RFO + Inv	3Gal+Glc	13,2	0,67
	XA ³ XX	53,2	2,71	XOS	X2	13,8	0,71
	A ²⁺³ XX	59,5	3,03	Galactan-OS	G-2a	15,0	0,76
AX-SK	XA	12,9	0,66	RFO	Raffinose	15,1	0,77
	AX	19,6	1,00	Manno-OS	Man4	16,1	0,82
Manno-OS	Man2	11,1	0,57	RFO	Stachyose	16,7	0,85
	Man3	13,2	0,67	Cello-OS	C2	17,3	0,88
	Man4	16,1	0,82	Int. Standard	Isomaltotriose	19,6	1,00
	Man5	19,7	1,01	AX-SK	AX	19,6	1,00
	Man6	24,0	1,23	Manno-OS	Man5	19,7	1,01
Cello-OS	C2	17,3	0,88	RFO	Verbascose	21,1	1,08
	C3	33,2	1,69	XOS	X3	22,3	1,14
	C4	45,2	2,31	Manno-OS	Man6	24,0	1,23
	C5	50,9	2,59	Malto-OS	Mal2	24,4	1,24
	C6	54,7	2,79	Galactan-OS	G-3c	25,1	1,28
Malto-OS	Mal2	24,4	1,24	Arabinan-OS	A-2b	25,7	1,31
	Mal3	45,1	2,30	Galactan-OS	G-3b	28,0	1,43
	Mal4	54,0	2,76	Cello-OS	C3	33,2	1,69
	Mal5	60,5	3,09	Galactan-OS	G-3a	33,3	1,70
	RFO	Saccharose	8,6	0,44	XOS	X4	34,7
Raffinose		15,1	0,77	Galactan-OS	G-4a	42,8	2,19
Stachyose		16,7	0,85	XOS	X5	43,0	2,19
Verbascose		21,1	1,08	Arabinan-OS	A-2a	44,6	2,27
RFO + Inv		Gal+Glc	9,7	0,49	Malto-OS	Mal3	45,1
	2Gal+Glc	11,0	0,56	Cello-OS	C4	45,2	2,31
	3Gal+Glc	13,2	0,67	XOS	X6	47,0	2,40
Arabinan-OS	A-2b	25,7	1,31	AXOS	A ² XX	48,4	2,47
	A-2a	44,6	2,27	AXOS	A ³ X	50,1	2,56
	A-3a	59,1	3,01	Cello-OS	C5	50,9	2,59
	A-3b	61,1	3,12	AXOS	XA ² XX	52,1	2,66
Galactan-OS	G-2c	10,6	0,54	AXOS	XA ³ XX	53,2	2,71
	G-2b	12,3	0,63	Malto-OS	Mal4	54,0	2,76
	G-2a	15,0	0,76	Cello-OS	C6	54,7	2,79
	G-3c	25,1	1,28	Arabinan-OS	A-3a	59,1	3,01
	G-3b	28,0	1,43	AXOS	A ²⁺³ XX	59,5	3,03
	G-3a	33,3	1,70	Malto-OS	Mal5	60,5	3,09
	G-4a	42,8	2,19	Arabinan-OS	A-3b	61,1	3,12

Tabelle A12: Verschiedene Durchschnittswerte der Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzungen der Oligosaccharidfraktionen der Ileumproben nach 21 Tagen Fütterung nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (mg/g Ileumprobe ± Standardabweichung) (Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X); n: Anzahl Messwerte, GlcN: Glucosamin, n.a.: nicht analysiert)

Mais	Futter-variante	n	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	GlcN
3	Kon (a)	8	0,76 ± 0,05	14,28 ± 1,85	10,97 ± 1,84	0,12 ± 0,01	0,85 ± 0,05	n.a.
3	Xyla (b)	8	0,79 ± 0,09	14,72 ± 2,96	11,43 ± 2,20	0,28 ± 0,03	0,78 ± 0,08	n.a.
3	X+X (c)	8	0,83 ± 0,07	14,15 ± 2,05	10,68 ± 1,67	0,35 ± 0,03	0,78 ± 0,07	n.a.
4	Kon (d)	8	0,70 ± 0,06	15,86 ± 1,56	13,30 ± 1,50	0,12 ± 0,02	1,03 ± 0,07	0,22 ± 0,03
4	Xyla (e)	8	0,73 ± 0,07	14,41 ± 1,89	12,06 ± 1,72	0,32 ± 0,05	0,91 ± 0,07	0,23 ± 0,03
4	X+X (f)	8	0,72 ± 0,06	15,44 ± 1,47	12,47 ± 2,06	0,35 ± 0,04	0,90 ± 0,08	0,21 ± 0,05
3	a - c	24	0,79 ± 0,08	14,38 ± 2,25	11,03 ± 1,86	0,25 ± 0,10	0,80 ± 0,07	n.a.
4	e - f	24	0,72 ± 0,06	15,24 ± 1,69	12,61 ± 1,77	0,27 ± 0,11	0,95 ± 0,09	0,22 ± 0,04
3 + 4	a - f	48	0,75 ± 0,08	14,81 ± 2,02	11,82 ± 1,97	0,26 ± 0,11	0,87 ± 0,11	n.a.

Tabelle A13: Verschiedene Durchschnittswerte der Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzungen der Oligosaccharidfraktionen der Ileumproben nach 41 Tagen Fütterung nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure, berechnet ohne auffällige Proben (*/*) s. Abbildung 21 (mg/g Ileumprobe ± Standardabweichung) (Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X); n: Anzahl Messwerte, Fuc: Fucose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, GlcN: Glucosamin)

Mais	Futter-variante	n	Fuc	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	GlcN
3	Kon (a)	4	0,08 ± 0,06	1,17 ± 0,38	2,28 ± 0,71	3,29 ± 0,79	0,34 ± 0,21	1,13 ± 0,18	0,47 ± 0,12
3	Xyla (b)	3	0,12 ± 0,01	1,95 ± 0,14	4,11 ± 0,83	4,49 ± 0,30	0,61 ± 0,15	1,30 ± 0,06	0,58 ± 0,01
3	X+X (c)	3	0,10 ± 0,01	1,64 ± 0,40	2,29 ± 1,48	3,02 ± 0,97	0,44 ± 0,22	1,07 ± 0,08	0,53 ± 0,03
4	Kon (d)	2	0,12 ± 0,00	1,43 ± 0,11	3,01 ± 0,32	3,49 ± 0,69	0,42 ± 0,14	1,17 ± 0,05	0,55 ± 0,02
4	Xyla (e)	5	0,09 ± 0,06	1,11 ± 0,40	2,53 ± 1,84	2,76 ± 1,92	0,31 ± 0,21	1,09 ± 0,25	0,47 ± 0,11
4	X+X (f)	2	0,11 ± 0,02	1,68 ± 0,03	3,53 ± 0,30	3,94 ± 0,19	0,39 ± 0,15	1,21 ± 0,07	0,60 ± 0,01
3	a - c	10	0,10 ± 0,04	1,55 ± 0,45	2,83 ± 1,26	3,57 ± 0,92	0,46 ± 0,21	1,16 ± 0,15	0,52 ± 0,08
4	d - f	9	0,10 ± 0,05	1,31 ± 0,38	2,86 ± 1,38	3,18 ± 1,48	0,35 ± 0,18	1,13 ± 0,19	0,51 ± 0,10
3 + 4	a - f	19	0,10 ± 0,04	1,43 ± 0,43	2,84 ± 1,28	3,38 ± 1,20	0,41 ± 0,20	1,15 ± 0,17	0,52 ± 0,09

Tabelle A14: Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Ileumproben für die Methylierungsanalyse nach Enzymverdau mit α -Galactosidase, Invertase und Amyloglucosidase sowie Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (mg/g Ileumprobe, n = 1) (XOS: Xylooligosaccharide, n.q.: nicht quantifizierbar)

Futter-variante	Probe	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose	Fucose
Kontrolle	5a-21-I	0,68	0,10	0,97	2,79	3,49	n.q.
	6a-21-I	0,76	0,10	0,75	1,66	2,48	n.q.
Xylanase	4b-21-I	0,82	0,26	0,97	4,83	5,82	n.q.
	6b-21-I	0,77	0,22	0,86	1,79	2,65	n.q.
Xylanase + XOS	4c-21-I	0,82	0,33	0,77	2,19	3,01	n.q.
	5c-21-I	0,80	0,32	0,71	2,12	3,19	n.q.
Kontrolle	5a-41-I	0,69	0,14	1,04	0,67	1,57	0,07
	6a-41-I	1,15	0,24	1,35	0,87	2,41	0,10
Xylanase	4b-41-I	1,85	0,50	1,14	1,95	2,76	0,10
	6b-41-I	1,82	0,75	1,24	2,76	3,58	0,13
Xylanase + XOS	4c-41-I	1,56	0,32	1,12	2,37	2,25	0,10
	5c-41-I	1,73	0,67	0,93	1,06	2,40	0,11

Tabelle A15: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Oligosaccharidfraktionen ausgewählter Ileumproben nach enzymatischem Verdau mit α -Galactosidase, Invertase und Amyloglucosidase (mol%, n = 1, zwei Proben pro Futtervariante). Bei der Berechnung wurden alle bestimmten PMAAs mit einbezogen (Xyla: Xylanase, X+X: Xylanase und Xylooligosaccharide; Glc: Glucose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Rib: Ribose, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose).

Ileumproben	Tag 21 (x-21-l)						Tag 41 (x-41-l)					
	Kontrolle		Xyla		X+X		Kontrolle		Xyla		X+X	
	5a	6a	4b	6b	4c	5c	5a	6a	4b	6b	4c	5c
PMAA in mol%												
t-Glcp	19,0	20,9	17,1	19,2	21,3	19,3	15,4	16,4	13,9	10,8	13,3	12,2
1,2-Glcp	1,7	1,8	1,5	2,3	1,8	2,0	2,7	2,6	2,8	1,9	2,1	2,5
1,4-Glcp	11,4	9,2	9,7	8,9	7,6	8,1	4,7	4,5	5,2	5,3	3,9	4,6
1,6-Glcp	9,0	6,6	14,5	6,8	7,3	8,0	6,2	7,4	6,2	7,0	5,7	7,2
1,2,6-Glcp	1,0	1,0	0,8	0,9	0,8	0,9	1,1	0,5	0,9	0,9	0,9	0,7
1,3,6-Glcp	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
Summe	42,3	39,7	43,7	38,2	39,1	38,6	30,4	31,6	29,1	26,1	26,0	27,3
t-Galp	19,5	15,6	19,9	16,2	16,1	15,0	6,0	5,7	7,6	8,8	11,3	4,9
1,3-Galp + 1,2,5-Araf	2,2	1,9	2,1	1,7	1,9	2,1	1,8	2,0	1,9	1,8	1,8	1,7
1,4-Galp	1,3	1,5	0,7	1,9	1,4	1,4	1,7	1,4	4,6	4,0	4,5	1,5
1,6-Galp	5,3	3,7	9,3	3,9	3,9	3,8	2,2	2,1	1,7	2,7	2,9	1,8
1,3,6-Galp	3,4	4,0	2,4	3,4	3,4	3,7	6,4	5,3	4,8	3,0	3,3	2,9
Summe	31,8	26,6	34,4	27,0	26,7	26,1	18,1	16,6	20,6	20,2	23,7	12,8
t-Manp	5,3	6,6	3,5	6,0	5,6	4,7	9,6	9,2	7,5	5,3	7,7	5,3
1,2-Manp	4,6	5,6	3,0	4,7	4,9	4,5	5,0	4,7	3,9	3,5	4,0	3,2
1,3-Manp	0,4	0,5	0,4	0,6	0,4	0,6	1,7	1,8	1,0	1,1	1,3	1,5
1,4-Manp	0,4	0,5	0,3	0,4	0,5	0,4	0,7	0,5	0,6	0,9	0,6	1,0
1,6-Manp	1,0	1,4	0,7	1,3	1,6	1,4	5,7	4,3	4,0	6,6	4,5	5,9
1,3,6-Manp	1,2	0,8	1,0	0,6	0,9	1,1	1,5	1,3	0,7	0,9	1,0	1,3
Summe	12,9	15,3	8,9	13,6	14,0	12,6	24,2	21,8	17,7	18,2	19,0	18,2
t-Xylp	0,9	1,2	1,1	2,0	2,5	2,5	2,1	2,2	3,2	3,1	2,4	4,4
1,4-Xylp/1,2-Xylp	0,9	1,1	2,2	3,4	4,6	4,5	1,7	2,2	3,3	6,5	2,3	8,5
1,2,4- + 1,3,4-Xylp	0,5	0,5	0,8	0,4	0,6	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9	0,6	1,3
1,2,3,4 Xylp	0,2	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	3,6	0,5	0,6	3,8	0,4	0,9
Summe	2,5	3,0	4,3	6,1	8,2	7,9	8,1	5,7	8,0	14,5	5,6	15,1
t-Araf	3,7	5,4	2,9	4,5	3,8	4,6	6,8	9,8	9,4	8,0	9,8	10,1
1,2-Araf	0,5	0,5	0,4	0,6	0,7	0,7	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,8
1,3-Araf	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,7	1,4	1,5	1,5	1,8
1,5-Araf, 1,4-Arap	4,6	6,5	4,1	7,2	5,5	7,0	6,5	8,0	9,8	7,8	9,9	10,6
1,3,5-Araf	0,6	1,0	0,5	1,0	0,7	1,1	1,3	2,0	1,7	1,3	1,7	1,7
1,2,3,5-Araf	0,7	1,0	0,5	1,1	0,8	0,9	1,8	1,8	1,2	1,5	1,6	1,2
Summe	10,1	14,4	8,4	14,5	11,5	14,2	18,9	24,2	24,5	20,8	25,4	26,3
t-Ribf	0,5	1,0	0,3	0,6	0,6	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3

Tabelle A16: Gehalte der freien Monosaccharide in den Caecumproben nach 21 und 41 Tagen Fütterung (mg/g Caecumprobe, n = 1), Rohdaten für die Box-Plot-Diagramme in Abbildung 26 (Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X); Fuc: Fucose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, Fru: Fructose)

Tag 21, Basisfutter Mais 3								Tag 21, Basisfutter Mais 4								
Probe	Fuc	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Fru	Probe	Fuc	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Fru	
Kon	2a-21-C	0,018	0,026	0,088	0,091	0,004	0,013	0,040	1d-21-C	0,000	0,005	0,018	0,021	0,000	0,009	0,006
	3a-21-C	0,000	0,009	0,071	0,150	0,000	0,022	0,039	2d-21-C	0,000	0,006	0,019	0,019	0,000	0,006	0,008
	4a-21-C	0,017	0,028	0,150	0,242	0,011	0,035	0,072	3d-21-C	0,000	0,000	0,034	0,028	0,000	0,009	0,010
	5a-21-C	0,000	0,009	0,043	0,101	0,000	0,017	0,038	4d-21-C	0,000	0,000	0,040	0,083	0,000	0,000	0,000
	6a-21-C	0,020	0,000	0,043	0,071	0,000	0,000	0,027	5d-21-C	0,008	0,011	0,038	0,024	0,000	0,000	0,016
	7a-21-C	0,025	0,055	0,176	0,110	0,000	0,005	0,000	6d-21-C	0,129	0,044	0,122	0,209	0,000	0,014	0,074
	8a-21-C	0,031	0,014	0,039	0,122	0,000	0,020	0,038	7d-21-C	0,012	0,000	0,011	0,015	0,000	0,000	0,000
									8d-21-C	0,021	0,011	0,035	0,050	0,000	0,000	0,014
Xyla	2b-21-C	0,000	0,000	0,035	0,054	0,000	0,011	0,021	1e-21-C	0,000	0,000	0,019	0,037	0,000	0,000	0,000
	3b-21-C	0,010	0,022	0,104	0,155	0,000	0,019	0,051	2e-21-C	0,000	0,011	0,070	0,063	0,000	0,012	0,025
	4b-21-C	0,009	0,011	0,043	0,145	0,000	0,017	0,035	3e-21-C	0,082	0,095	0,183	0,073	0,000	0,017	0,021
	5b-21-C	0,013	0,048	0,083	0,253	0,000	0,026	0,074	4e-21-C	0,013	0,000	0,017	0,031	0,000	0,000	0,000
	6b-21-C	0,013	0,026	0,096	0,160	0,000	0,019	0,091	5e-21-C	0,000	0,006	0,023	0,038	0,000	0,000	0,011
	7b-21-C	0,027	0,000	0,048	0,121	0,000	0,000	0,033	6e-21-C	0,000	0,000	0,015	0,019	0,000	0,000	0,015
	8b-21-C	0,032	0,016	0,047	0,099	0,006	0,016	0,042	7e-21-C	0,000	0,000	0,026	0,041	0,000	0,000	0,017
									8e-21-C	0,015	0,000	0,035	0,034	0,000	0,000	0,015
X+X	1c-21-C	0,000	0,013	0,041	0,094	0,000	0,014	0,032	1f-21-C	0,000	0,000	0,019	0,020	0,000	0,000	0,000
	2c-21-C	0,010	0,024	0,072	0,106	0,006	0,014	0,031	2f-21-C	0,000	0,007	0,057	0,039	0,000	0,010	0,000
	3c-21-C	0,060	0,054	0,112	0,157	0,000	0,021	0,046	3f-21-C	0,081	0,047	0,137	0,095	0,000	0,024	0,063
	4c-21-C	0,013	0,046	0,151	0,223	0,011	0,033	0,096	4f-21-C	0,040	0,025	0,145	0,157	0,000	0,000	0,030
	5c-21-C	0,025	0,017	0,098	0,211	0,010	0,020	0,056	5f-21-C	0,028	0,032	0,143	0,046	0,000	0,011	0,027
	6c-21-C	0,022	0,000	0,017	0,021	0,000	0,000	0,022	6f-21-C	0,032	0,010	0,045	0,099	0,000	0,000	0,026
	7c-21-C	0,022	0,000	0,035	0,115	0,000	0,010	0,041	7f-21-C	0,016	0,009	0,067	0,029	0,000	0,009	0,013
	8c-21-C	0,000	0,006	0,040	0,071	0,000	0,000	0,027	8f-21-C	0,015	0,000	0,019	0,016	0,000	0,000	0,000
Tag 41, Basisfutter Mais 3								Tag 41, Basisfutter Mais 4								
Probe	Fuc	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Fru	Probe	Fuc	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Fru	
Kon	1a-41-C	0,104	0,094	0,175	0,830	0,019	0,058	0,206	3d-41-C	0,071	0,126	0,177	1,592	0,056	0,095	0,108
	3a-41-C	0,049	0,074	0,087	0,497	0,011	0,028	0,093	5d-41-C	0,030	0,038	0,059	0,234	0,000	0,015	0,020
	5a-41-C	0,076	0,064	0,140	0,358	0,000	0,021	0,080	7d-41-C	0,083	0,023	0,071	0,173	0,000	0,000	0,028
	6a-41-C	0,811	0,397	4,229	6,637	0,220	0,562	1,858	8d-41-C	0,157	0,183	0,326	2,181	0,066	0,067	0,111
Xyla	1b-41-C	0,071	0,192	0,126	1,564	0,022	0,060	0,241	2e-41-C	0,033	0,031	0,047	0,216	0,000	0,000	0,017
	4b-41-C	0,067	0,020	0,043	0,127	0,000	0,000	0,034	4e-41-C	0,257	0,109	0,202	0,250	0,044	0,023	0,041
	6b-41-C	0,028	0,053	0,060	0,188	0,000	0,000	0,041	5e-41-C	0,097	0,040	0,058	0,146	0,000	0,000	0,023
X+X	1c-41-C	0,013	0,039	0,062	0,144	0,008	0,016	0,042	6e-41-C	0,044	0,022	0,040	0,089	0,000	0,012	0,015
	2c-41-C	0,088	0,037	0,117	0,587	0,015	0,036	0,069	8e-41-C	0,597	0,354	0,924	0,214	0,000	0,000	0,094
	4c-41-C	0,317	0,208	0,212	0,851	0,060	0,059	0,073	1f-41-C	0,022	0,025	0,068	0,083	0,000	0,014	0,019
	5c-41-C	0,087	0,041	0,144	0,290	0,021	0,013	0,076	3f-41-C	0,014	0,032	0,034	0,088	0,000	0,013	0,020
	8c-41-C	0,208	0,041	0,205	0,205	0,016	0,033	0,056	4f-41-C	0,045	0,076	0,073	0,305	0,000	0,026	0,027
									5f-41-C	0,482	0,275	1,083	2,493	0,091	0,094	0,204
								6f-41-C	0,069	0,097	0,111	0,821	0,029	0,043	0,055	

Tabelle A17: Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung der Oligosaccharidfraktionen der Caecumproben nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure nach 21 und 41 Tagen Fütterung (mg/g Caecumprobe, n = 1), Rohdaten für die Box-Plot-Diagramme in Abbildung 27 bzw. Abbildung A18 (Futtervarianten: Kontrolle (Kon), mit Xylanase (Xyla) und mit Xylanase und Xylooligosacchariden (X+X); Fuc: Fucose, Rha: Rhamnose, Ara: Arabinose, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Xyl: Xylose, Man: Mannose, GalN: Galactosamin, GlcN: Glucosamin, Rib: Ribose, n.q.: nicht quantifizierbar)

		Tag 21, Basisfutter Mais 3							Tag 21, Basisfutter Mais 4							
	Probe	Fuc	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Probe	Fuc	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man
Kon	2a-21-C	0,018	n.q.	0,140	0,778	0,375	0,043	0,139	1d-21-C	0,013	n.q.	0,059	0,288	0,224	0,022	0,147
	3a-21-C	0,016	n.q.	0,087	0,306	0,240	0,047	0,142	2d-21-C	0,013	n.q.	0,091	0,320	0,218	0,032	0,150
	4a-21-C	0,026	n.q.	0,156	0,826	0,535	0,062	0,297	3d-21-C	0,021	n.q.	0,090	0,258	0,249	0,030	0,141
	5a-21-C	0,017	n.q.	0,113	0,267	0,289	0,050	0,130	4d-21-C	0,000	n.q.	0,080	0,346	0,421	0,040	0,152
	6a-21-C	0,025	n.q.	0,104	0,285	0,291	0,055	0,108	5d-21-C	0,000	n.q.	0,102	0,488	0,255	0,024	0,111
	7a-21-C	0,000	n.q.	0,181	3,429	2,497	0,076	0,282	6d-21-C	0,035	n.q.	0,324	9,590	4,630	0,107	0,789
	8a-21-C	0,035	n.q.	0,131	0,359	0,330	0,090	0,221	7d-21-C	0,013	n.q.	0,109	0,229	0,137	0,026	0,050
									8d-21-C	0,014	n.q.	0,107	0,436	0,255	0,027	0,065
Xyla	2b-21-C	0,018	n.q.	0,079	0,181	0,214	0,036	0,113	1e-21-C	0,020	n.q.	0,073	0,143	0,152	0,029	0,115
	3b-21-C	0,028	n.q.	0,097	0,298	0,265	0,049	0,203	2e-21-C	0,017	n.q.	0,086	0,261	0,232	0,023	0,134
	4b-21-C	0,030	n.q.	0,115	0,419	0,413	0,051	0,094	3e-21-C	0,020	n.q.	0,217	1,341	0,744	0,048	0,231
	5b-21-C	0,035	n.q.	0,385	0,961	0,538	0,096	0,099	4e-21-C	0,020	n.q.	0,117	0,259	0,192	0,031	0,151
	6b-21-C	0,027	n.q.	0,167	1,009	0,626	0,072	0,164	5e-21-C	0,010	n.q.	0,066	0,147	0,179	0,016	0,081
	7b-21-C	0,022	n.q.	0,100	0,236	0,304	0,059	0,155	6e-21-C	0,019	n.q.	0,061	0,166	0,215	0,020	0,108
	8b-21-C	0,020	n.q.	0,114	0,290	0,337	0,060	0,157	7e-21-C	0,020	n.q.	0,095	0,171	0,234	0,042	0,157
									8e-21-C	0,028	n.q.	0,088	0,263	0,237	0,035	0,078
X+X	1c-21-C	0,020	n.q.	0,108	0,297	0,216	0,052	0,082	1f-21-C	0,015	n.q.	0,080	0,215	0,194	0,022	0,069
	2c-21-C	0,014	n.q.	0,120	0,479	0,208	0,052	0,210	2f-21-C	0,015	n.q.	0,093	0,408	0,238	0,028	0,123
	3c-21-C	0,023	n.q.	0,128	0,502	0,236	0,043	0,182	3f-21-C	0,000	n.q.	0,188	2,004	1,024	0,104	0,340
	4c-21-C	0,000	n.q.	0,167	1,581	0,815	0,062	0,316	4f-21-C	0,057	n.q.	0,192	1,850	0,876	0,110	0,304
	5c-21-C	0,025	n.q.	0,160	0,764	0,505	0,078	0,146	5f-21-C	0,000	n.q.	0,132	1,484	0,838	0,048	0,349
	6c-21-C	0,024	n.q.	0,112	0,401	0,223	0,056	0,111	6f-21-C	0,021	n.q.	0,089	0,426	0,364	0,024	0,128
	7c-21-C	0,017	n.q.	0,089	0,209	0,238	0,042	0,081	7f-21-C	0,019	n.q.	0,097	0,427	0,227	0,038	0,259
	8c-21-C	0,019	n.q.	0,075	0,145	0,184	0,034	0,103	8f-21-C	0,014	n.q.	0,103	0,544	0,211	0,037	0,176
		Tag 41, Basisfutter Mais 3							Tag 41, Basisfutter Mais 4							
	Probe	Fuc	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man	Probe	Fuc	Rha	Ara	Gal	Glc	Xyl	Man
Kon	1a-41-C	0,024	0,028	0,056	0,144	0,260	0,054	0,127	3d-41-C	0,029	0,072	0,080	0,105	0,435	0,057	0,184
	3a-41-C	0,000	0,112	0,023	0,066	0,156	0,021	0,064	5d-41-C	0,032	0,014	0,032	0,063	0,144	0,031	0,125
	5a-41-C	0,018	0,054	0,033	0,078	0,257	0,034	0,110	7d-41-C	0,023	0,021	0,044	0,108	0,320	0,028	0,107
	6a-41-C	0,043	0,041	0,168	0,579	1,136	0,123	0,307	8d-41-C	0,000	0,096	0,065	0,094	0,384	0,043	0,166
Xyla	1b-41-C	0,014	0,056	0,042	0,096	0,212	0,037	0,101	2e-41-C	0,016	0,021	0,027	0,041	0,099	0,020	0,110
	4b-41-C	0,021	0,021	0,042	0,101	0,209	0,033	0,094	4e-41-C	0,036	0,037	0,082	0,316	0,594	0,048	0,226
	6b-41-C	0,032	0,029	0,067	0,126	0,260	0,052	0,144	5e-41-C	0,000	0,023	0,043	0,113	0,253	0,033	0,133
									6e-41-C	0,011	0,019	0,018	0,046	0,099	0,015	0,074
X+X	1c-41-C	0,035	0,061	0,053	0,174	0,192	0,049	0,107	8e-41-C	0,043	0,042	0,144	0,396	0,193	0,054	0,219
	2c-41-C	0,022	0,048	0,039	0,064	0,133	0,038	0,096	1f-41-C	0,012	0,017	0,029	0,076	0,081	0,016	0,150
	4c-41-C	0,026	0,040	0,065	0,072	0,174	0,039	0,182	3f-41-C	0,015	0,027	0,038	0,085	0,266	0,034	0,085
	5c-41-C	0,037	0,037	0,061	0,163	0,353	0,053	0,119	4f-41-C	0,020	0,055	0,028	0,078	0,177	0,027	0,120
	8c-41-C	0,094	0,035	0,087	0,192	0,197	0,059	0,195	5f-41-C	0,022	0,096	0,061	0,144	0,695	0,046	0,172
									6f-41-C	0,037	0,027	0,053	0,108	0,282	0,033	0,125

Fortgesetzt auf nächster Seite

Fortsetzung Tabelle A17

Tag 21, Basisfutter Mais 3				Tag 21, Basisfutter Mais 4				
Probe	GalN	GlcN	Rib	Probe	GalN	GlcN	Rib	
Kon	2a-21-C	0,066	0,254	0,027	1d-21-C	0,057	0,508	0,027
	3a-21-C	0,057	0,275	0,027	2d-21-C	0,067	0,414	0,024
	4a-21-C	0,070	0,313	0,050	3d-21-C	0,074	0,437	0,028
	5a-21-C	0,047	0,189	0,027	4d-21-C	0,056	0,226	0,032
	6a-21-C	0,043	0,184	0,028	5d-21-C	0,068	0,277	0,025
	7a-21-C	0,034	0,102	0,000	6d-21-C	0,070	0,378	0,050
	8a-21-C	0,110	0,359	0,031	7d-21-C	0,055	0,208	0,019
					8d-21-C	0,074	0,204	0,025
Xyl/a	2b-21-C	0,041	0,216	0,032	1e-21-C	0,061	0,373	0,039
	3b-21-C	0,044	0,258	0,033	2e-21-C	0,080	0,279	0,066
	4b-21-C	0,065	0,191	0,038	3e-21-C	0,050	0,332	0,027
	5b-21-C	0,118	0,216	0,046	4e-21-C	0,092	0,539	0,023
	6b-21-C	0,035	0,186	0,049	5e-21-C	0,030	0,226	0,025
	7b-21-C	0,036	0,206	0,064	6e-21-C	0,067	0,330	0,023
	8b-21-C	0,080	0,310	0,030	7e-21-C	0,051	0,344	0,028
					8e-21-C	0,044	0,182	0,027
X+X	1c-21-C	0,041	0,188	0,034	1f-21-C	0,075	0,246	0,030
	2c-21-C	0,061	0,427	0,019	2f-21-C	0,060	0,308	0,028
	3c-21-C	0,052	0,283	0,039	3f-21-C	0,062	0,363	0,000
	4c-21-C	0,083	0,228	0,023	4f-21-C	0,049	0,323	0,041
	5c-21-C	0,071	0,299	0,034	5f-21-C	0,059	0,228	0,000
	6c-21-C	0,085	0,413	0,022	6f-21-C	0,061	0,359	0,026
	7c-21-C	0,032	0,113	0,024	7f-21-C	0,099	0,845	0,027
	8c-21-C	0,038	0,182	0,024	8f-21-C	0,096	0,763	0,018

Tag 41, Basisfutter Mais 3				Tag 41, Basisfutter Mais 4				
Probe	GalN	GlcN	Rib	Probe	GalN	GlcN	Rib	
Kon	1a-41-C	0,082	0,167	0,037	3d-41-C	0,070	0,304	0,040
	3a-41-C	0,066	0,112	0,031	5d-41-C	0,059	0,261	0,029
	5a-41-C	0,054	0,189	0,029	7d-41-C	0,073	0,200	0,048
	6a-41-C	0,075	0,373	0,044	8d-41-C	0,033	0,260	0,040
Xyl/a	1b-41-C	0,063	0,232	0,028	2e-41-C	0,035	0,263	0,027
	4b-41-C	0,063	0,190	0,041	4e-41-C	0,052	0,352	0,092
	6b-41-C	0,066	0,280	0,055	5e-41-C	0,043	0,193	0,076
					6e-41-C	0,042	0,264	0,026
				8e-41-C	0,094	0,555	0,027	
X+X	1c-41-C	0,051	0,289	0,096	1f-41-C	0,057	0,457	0,023
	2c-41-C	0,067	0,208	0,035	3f-41-C	0,039	0,507	0,051
	4c-41-C	0,076	0,340	0,105	4f-41-C	0,077	0,432	0,066
	5c-41-C	0,041	0,188	0,041	5f-41-C	0,077	0,526	0,029
	8c-41-C	0,112	0,819	0,031	6f-41-C	0,052	0,347	0,028

Tabelle A18: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Caecumproben. Analysiert wurden gepoolte Proben aus dem Probensatz für die Methodenentwicklung (Pool 2: Futter auf Maisbasis mit Xylanase, Pool 4: Futter auf Maisbasis mit Xylanase und Xylooligosacchariden (XOS), Pool 6: Futter auf Maisbasis mit Weizenkleiezugabe und Xylanase, Pool 8: Futter auf Maisbasis mit Weizenkleiezugabe sowie Xylanase und XOS; Glc: Glucose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Rib: Ribose, Rha: Rhamnose, Fuc: Fucose, t: terminal, p: -pyranose, f: -furanose; Rausch, 2022)

PMAA in mol%	Pool 2	Pool 4	Pool 6	Pool 8
t-Glcp	22,3 ± 0,6	21,8 ± 0,2	22,1 ± 0,2	23,2 ± 0,7
1,3-Glcp	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,0	3,1 ± 0,0	3,9 ± 0,4
1,4-Glcp	12,6 ± 0,6	11,0 ± 1,6	11,7 ± 1,0	8,4 ± 0,3
1,6-Glcp	5,0 ± 0,3	7,4 ± 0,5	7,6 ± 0,1	5,9 ± 0,4
Summe	43,2 ± 0,1	43,8 ± 0,8	44,5 ± 0,7	41,4 ± 0,3
t-Galp	8,8 ± 0,5	11,4 ± 0,6	11,7 ± 0,4	8,8 ± 0,0
1,2-Galp	3,9 ± 0,0	3,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2
1,3-Galp	2,7 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,0	2,8 ± 0,3
1,4-Galp	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,0
1,6-Galp	2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,0	3,3 ± 0,2	2,7 ± 0,1
Summe	19,2 ± 0,6	21,8 ± 0,9	22,4 ± 0,6	19,6 ± 0,7
t-Manp	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,0
1,2-Manp	3,8 ± 0,1	5,2 ± 0,0	4,5 ± 0,4	5,4 ± 0,8
1,4-Manp	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0
1,6-Manp	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,0	4,3 ± 0,1	5,1 ± 0,0
Summe	12,4 ± 0,2	13,9 ± 0,0	12,2 ± 0,2	14,4 ± 0,8
t-Xylp	7,1 ± 0,6	6,4 ± 0,0	7,0 ± 0,0	8,7 ± 0,4
1,2/1,4-Xylp	4,8 ± 0,4	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,0	2,6 ± 0,2
Summe	11,9 ± 0,2	9,4 ± 0,1	9,8 ± 0,1	11,3 ± 0,6
t-Arap	6,6 ± 1,1	5,7 ± 0,2	6,1 ± 0,2	5,8 ± 0,4
1,2-Ribf/Araf	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
1,4-Arap/1,5-Araf	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Summe	9,2 ± 0,9	8,5 ± 0,2	8,0 ± 0,1	8,1 ± 0,1
1,2-Rhap	2,5 ± 0,8	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1	3,4 ± 0,3
1,3-Rhap/Fucp	0,9 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0
2,3-Fucp/Rhap	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Summe	3,4 ± 0,9	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3
t-Fucp	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2

10. Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Kanbar, A.*, Schäfer, D.S.***, Keller, J., Nick, P. & Bunzel, M. (2022)**: Toward bioeconomy of a multipurpose cereal: Cell wall chemistry of Sorghum is largely buffered against stem sugar content. *Cereal chemistry*, 99: 786–801.

**Adnan Kanbar and Daniela S. Schäfer contributed equally to this study.*

Vorträge auf Fachtagungen

Schäfer, D.S., Melo-Durán, D. & Bunzel, M. (2023): Analyse des Oligosaccharid-Profiles in Geflügeldarmproben zur Aufklärung von Effekten verschiedener Futterzusätze. *Poster-Flashtalk - 51. Deutsche Lebensmittelchemietage 2023*, Bonn, Deutschland.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Schäfer, D.S., Sitter, L., Schmidt, R. & Bunzel, M. (2022): Screening-Methode zur Bestimmung von (Arabino-)Xylooligosacchariden mittels HPAEC-PAD/MS. *50. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg, Deutschland.

Schäfer, D.S.; Rausch, A.; Šimić, A. & Bunzel, M. (2023): Methode zur Analyse von Oligosacchariden in Darmproben von Geflügel. *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Karlsruhe, Deutschland.

Schäfer, D.S., Melo-Durán, D. & Bunzel, M. (2023): Oligosaccharide profiles in intestinal samples from broilers and the influence of xylanase and xylooligosaccharide supplementation. *Cereals & Grains 23*, Schaumburg, USA.