

Entwicklung und Anwendung analytischer Verfahren zur Strukturcharakterisierung von Arabinoxylanen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von

M. Sc. Lukas Sitter

1. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2026

*„Denkt daran, den Blick zu den Sternen zu richten und nicht nach unten
auf eure Füße.“*

– Stephen Hawking

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 06.08.2026

Lukas Sitter

Hinweis zu bereits veröffentlichten Teilen der Arbeit

Teile der in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse wurden bereits in folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht:

Sitter, L. & Bunzel, M. (2026). 2D-NMR characterization of higher substituted oligo-saccharides isolated from enzymatic wheat flour arabinoxylan hydrolysates. *Frontiers in Plant Science*, 17, 1784230. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1784230>

Sitter, L. & Bunzel, M. (2026). Advanced structural profiling of arabinoxylans from cereal grains by high performance anion exchange chromatography with parallel pulsed amperometric and mass spectrometric detection. *Carbohydrate Research*, 569, 110074. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2026.110074>

Die betreffenden Abschnitte wurden für die vorliegende Arbeit in angepasster oder erweiterter Form übernommen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Zellwand von Getreide.....	2
1.1.1	Der Aufbau von Getreidepflanzen und -körnern	2
1.1.2	Der Aufbau und die Funktion der pflanzlichen Zellwand	3
1.1.3	Die Grundbausteine pflanzlicher Zellwandpolysaccharide.....	4
1.1.4	Das Netzwerk aus Cellulose und Hemicellulosen	5
1.1.5	Pektine.....	7
1.2	Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane	9
1.2.1	Die Variabilität der Substitution mit Arabinose	11
1.2.2	Weitere Substituenten.....	16
1.2.2.1	Acetylgruppe	16
1.2.2.2	Glucuronsäure und deren 4-O-Methylderivat	17
1.2.2.3	Seitenketten mit estergebundenen Hydroxyzimtsäuren	18
1.2.2.4	Oligomere, ferulasäurefreie Seitenketten	21
1.2.3	Die Ausbildung von Ferulasäure-Crosslinks.....	21
1.2.3.1	Cyclobutandimere.....	22
1.2.3.2	Dehydrodiferulasäuren	22
1.3	Enzymatischer Abbau von Arabinoxylanen	25
1.4	Ernährungsphysiologische Aspekte von Arabinoxylanen	28
1.4.1	Definition von Ballaststoffen.....	28
1.4.2	Präbiotische Wirkung von Arabinoxylanen und deren Oligosacchariden	30
1.5	Lebensmitteltechnologische Eigenschaften von Arabinoxylanen.....	31
2	ZIELSETZUNG.....	33
3	MATERIAL UND METHODEN	35
3.1	Beschreibung des eingesetzten Probenmaterials	35
3.2	Aufarbeitung der Getreideproben	36
3.2.1	Präparative Ballaststoffisolierung.....	36
3.2.2	Extraktionsmethoden zur Analyse der Arabinoxylanstruktur	37

3.3	Charakterisierung der Polysaccharide in den Getreideballaststoffen	40
3.3.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung nach Säurehydrolyse	40
3.3.2	Methylierungsanalyse zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse.....	43
3.4	Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen.....	45
3.4.1	Freisetzung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen.....	46
3.4.2	Isolierung und Aufreinigung von Arabinoxyloligosacchariden.....	48
3.4.3	Trennung der ferulasäurehaltigen von den ferulasäurefreien Arabinoxyloligosacchariden.....	50
3.4.4	Isolierung und Aufreinigung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide	51
3.4.5	Massenspektrometrische Analyse der isolierten Standardsubstanzen.....	52
3.5	NMR-spektroskopische Methoden.....	55
3.5.1	Ein- und zweidimensionale NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Oligosacchariden	57
3.5.2	Quantifizierung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie	61
3.5.3	<i>Inversion-Recovery</i> -Experiment zur Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit.....	65
3.5.4	Prozessierung der NMR-Spektren.....	66
3.6	Entwicklung einer HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode.....	68
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	69
4.1	Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen	69
4.1.1	Charakterisierung der Ausgangsmaterialien.....	69
4.1.2	Isolierung der Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen.....	73
4.1.3	Strukturaufklärung der Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen.....	75
4.1.4	Isolierung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen	82
4.1.5	Strukturaufklärung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharid- Standardsubstanzen	84
4.2	Entwicklung und Anwendung einer HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode.....	91
4.2.1	Bestimmung relativer Responsefaktoren und Validierung	93
4.2.2	Trennung auf einem alternativen Säulenmaterial	96
4.2.3	Anwendung der Methode zur Untersuchung der Arabinoxylanfeinstruktur auf verschiedene Getreideballaststoffe.....	97
4.3	NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen.....	103

4.3.1	Markersignale von Xylo- und Arabinoxyloligosacchariden	103
4.3.2	Markersignale zur qualitativen Analyse von ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosacchariden	106
4.3.3	Auswahl der HSQC-Aufnahmeparameter für die Quantifizierung und Bestimmung relativer Responsefaktoren	108
4.3.4	Enzymatische Freisetzung und Trennung ferulasäurehaltiger und -freier Oligosaccharide	112
4.3.5	Anwendung der Methode zur Analyse der in Getreidehydrolysaten vorkommenden Strukturelemente	115
4.3.5.1	(Arabino-)Xyloligosaccharide aus unlöslichen Ballaststoffen	116
4.3.5.2	Lösliche Ballaststoffe	118
4.3.5.3	Qualitative Analyse ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide aus unlöslichen Weizenballaststoffen	121
4.4	Zusammenfassende Diskussion	123
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	129
6	LITERATURVERZEICHNIS	133
7	CHEMIKALIEN UND INSTRUMENTE.....	151
7.1	Chemikalienliste	151
7.2	Hergestellte Pufferlösungen und Reagenzien	154
7.3	Enzyme	154
7.4	Instrumente	155
8	ARBEITSVORSCHRIFTEN.....	159
8.1	Ausgangsmaterialien	159
8.2	Aufarbeitung der Getreideproben	159
8.2.1	Mahlen	159
8.2.2	Entfetten	159
8.2.3	Präparative Isolierung der unlöslichen und löslichen Ballaststoffe	160
8.3	Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide in den Getreideballaststoffen	161
8.3.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung	161
8.3.2	Bestimmung der Bindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse	163

8.4	Gewinnung von Arabinoxyloligosacchariden.....	165
8.4.1	Freisetzung der Arabinoxyloligosaccharide aus Weizenarabinoxylan.....	165
8.4.2	Aufreinigung der Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen.....	166
8.5	Gewinnung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide	168
8.5.1	Freisetzung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide aus unlöslichen Ballaststoffen	168
8.5.2	Aufreinigung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen	169
8.6	Strukturcharakterisierung der isolierten Standardsubstanzen	170
8.6.1	Monosaccharidzusammensetzung nach Trifluoressigsäure-Hydrolyse.....	170
8.6.2	Bestimmung der Molekülmassen.....	171
8.6.3	NMR-Spektroskopie.....	172
8.7	Quantifizierung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie	172
8.8	Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten mittels <i>Inversion-Recovery</i> -Experiment.....	173
8.9	HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode zur Strukturcharakterisierung von Arabinoxylanen aus Getreide.....	173
8.10	HSQC-Profilierungsmethode zur Bestimmung verschiedener Strukturelemente von Arabinoxylanen.....	175
8.10.1	Enzymatische Freisetzung von (Arabino-)Xyloligosacchariden aus Getreideballaststoffen.....	175
8.10.2	Chromatographische Trennung ferulasäurefreier und -haltiger Arabinoxyloligosaccharide aus den unlöslichen Ballaststoffen.....	176
8.10.3	Analyse mittels ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR.....	177
9	ANHANG	179
10	PUBLIKATIONSLISTE	237

Abkürzungsverzeichnis

AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
Ara	L-Arabinose
AX	Arabinoxylan
A/X	Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis
AXOS	Arabinoxyloligosaccharide
BS	Ballaststoffe
c	zyklisch, engl. <i>cyclic</i>
CAZymes	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
CD	Leitfähigkeitsdetektor, engl. <i>Conductivity Detector</i>
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
DAc	Acetylierungsgrad (engl. <i>Degree of Acetylation</i>)
dc	decarboxyliert
DFS	Dehydrodiferulasäure
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisationsgrad, engl. <i>Degree of Polymerization</i>
DS	Substitutionsgrad, engl. <i>Degree of Substitution</i>
dXyl	disubstituierte Xylose
EI	Elektronenstoßionisation
ELSD	Lichtstreuendetektor, engl. <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
ESI	Elektronensprayionisation
f	Furanose
FA	5-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranose
FAX	β -D-Xylopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranose
FAXG	α -L-Galactopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranose

FAXGG	α -D-Galactopyranose-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Galactopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranose
FAXGX	α -D-Xylopyranose-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Galactopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylopyranose-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranose
FID	Flammenionisationsdetektion
FID*	freier Induktionsabfall, engl. <i>Free Induction Decay</i>
FS	Ferulasäure
Gal	D-Galactose
GalA	D-Galacturonsäure, engl. <i>Galacturonic Acid</i>
Glc	D-Glucose
GC	Gaschromatographie
GlcA	D-Glucuronsäure, engl. <i>Glucuronic Acid</i>
GAX	Glucuronoarabinoxylane
GH	Glykosidhydrolase
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie, engl. <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie, engl. <i>High Performance Anion Exchange Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
H2BC	<i>Heteronuclear 2-Bond Correlation</i>
LOD	Nachweisgrenze, engl. <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze, engl. <i>Limit of Quantification</i>
LT	Laminaritriose
IMT	Isomaltotriose
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i>
ISt	interne Standardsubstanz
LC	Flüssigchromatographie, engl. <i>Liquid Chromatography</i>
MeGlc	Methyl- α -D-Glucopyranosid

MLG	<i>mixed-linked</i> β -Glucane
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mXyl	monosubstituierte Xylose
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
nc	nicht-zyklisch, engl. <i>non-cyclic</i>
NMR	Kernspinresonanz, engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NUS	<i>Non-Uniform Sampling</i>
nPGC	nicht-poröser graphitischer Kohlenstoff, engl. <i>Non-Porous Graphitic Carbon</i>
OS	Oligosaccharide
p	Pyranose
PAD	gepulst amperometrische Detektion, engl. <i>Pulsed Amperometric Detection</i>
PGC	poröser graphitischer Kohlenstoff, engl. <i>Porous Graphitic Carbon</i>
PMAA	partiell methylierte Alditolacetate
PS	Polysaccharide
Rha	L-Rhamnose
RI	Brechungsindex, engl. <i>Refractive Index</i>
RP	Umkehrphase, engl. <i>Reversed Phase</i>
RRF	relativer Responsefaktor, engl. <i>Relative Response Factor</i>
RRT	relative Retentionszeit, engl. <i>Relative Retention Time</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>
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis, engl. <i>Signal-to-Noise-Ratio</i>
SPE	Festphasenextraktion, engl. <i>Solid Phase Extraction</i>
SSB	<i>Sine Bell Shift</i>
TFA	Trifluoressigsäure, engl. <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TriFS	Dehydrotriferulasäure
tXyl	terminale Xylose

UBS	unlösliche Ballaststoffe
uXyl	unsubstituierte Xylose
WEAX	wasserlösliches Arabinoxylan, engl. <i>Water-Extractable Arabinoxylan</i>
WUAX	wasserunlösliches Arabinoxylan, engl. <i>Water-Unextractable Arabinoxylan</i>
XOS	Xylooligosaccharide
Xyl	D-Xylose
XYL_{ABV}	<i>endo</i> - β -1,4-Xylanase aus der Glykosidhydrolase-Familie 11 von der Firma AB Vista (<i>Trichoderma reesei</i> , EC 3.2.1.8)
XYL₁₀	<i>endo</i> - β -1,4-Xylanase aus der Glykosidhydrolase-Familie 10 von Nzytech (<i>Clostridium thermocellum</i> , EC 3.2.1.8, CtXyn10B)
XYL₁₁	<i>endo</i> - β -1,4-Xylanase aus der Glykosidhydrolase-Familie 11 von Megazyme (<i>Neoxallimastix patriciarum</i> , EC 3.2.1.8, E-XYLNP)
2D	zweidimensional

1 Einleitung

Getreide zählt weltweit zu den wichtigsten Nahrungs- und Futtermitteln und bildet eine zentrale Lebensgrundlage für einen Großteil der Weltbevölkerung. Die globalen Getreideerntemengen sind in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen und werden für das Erntejahr 2025/26 auf rund 2,9 Milliarden Tonnen geschätzt. Zu den bedeutendsten Getreidearten zählen Mais, Weizen, Reis und Gerste, deren Anbauflächen regional stark variieren (Statista, 2025). Neben ihrem hohen Stärke- und Proteingehalt sind Getreidekörner auch wertvolle Lieferanten von Mineralstoffen, Vitaminen und Ballaststoffen (BS), welche sich vor allem in den äußeren Schichten des Getreidekorns und im Keimling befinden. BS werden nach der *American Association of Cereal Chemists* (AACC) definiert als „essbare Pflanzenteile oder analoge Kohlenhydrate, die im menschlichen Dünndarm weder verdaut noch resorbiert werden können und im Dickdarm vollständig oder teilweise fermentiert werden.“ Sie sind für die menschliche Ernährung nicht essenziell, spielen dennoch eine große Rolle, da eine ballaststoffreiche Ernährung mit zahlreichen positiven Effekten auf die Gesundheit verbunden sind wie der Senkung des Cholesterin- und/oder Blutzuckerspiegels (AACC, 2001). Darüber hinaus fungieren BS als Präbiotika und tragen zum Wachstum gesundheitsfördernder Mikroorganismen im Dickdarm bei. Bei BS handelt es sich zum überwiegenden Teil um Polysaccharide (PS) der pflanzlichen Zellwand. Dazu zählen Cellulose, Hemicellulosen und Pektine. Arabinoxylane (AX) stellen neben *mixed-linked* β -Glucanen (MLG) die mengenmäßig bedeutendste Gruppe von Hemicellulosen in Getreidezellwänden dar und tragen zu deren Stabilität und Festigkeit bei. Im Hinblick auf ihre lebensmitteltechnologischen Eigenschaften spielen AX beispielsweise beim Brotbacken eine zentrale Rolle, da sie sowohl die Wasserbindung des Teigs als auch dessen Struktur und Gashaltbarkeit während der Teig gärung beeinflussen. Des Weiteren werden sie auch als Verdickungs- und Geliermittel in Lebensmitteln genutzt, was im Wesentlichen auf die Struktur der AX zurückzuführen ist. Durch Substitution mit *trans*-Ferulasäure (FS) können AX im Rahmen eines enzymkatalysierten oxidativen Kopplungsprozesses kovalent miteinander vernetzt werden, wodurch Hydrogele entstehen, die die Textur eines Lebensmittels maßgeblich beeinflussen können. Als potenzielle Präbiotika rücken auch Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxyloligosaccharide (AXOS), die durch den hydrolytischen Abbau der AX entstehen, zunehmend in den Fokus der Lebens- und Futtermittelindustrie. Auch hier wurde in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen den präbiotischen Effekten und der Struktur der Poly- und Oligosaccharide belegt (Pollet *et al.*, 2012; Van Craeyveld *et al.*, 2008). Daten zu Struktur-Wirkungsbeziehungen beim Menschen sind jedoch nur begrenzt verfügbar. Da die Struktur der AX sowohl zwischen verschiedenen Getreidearten als auch innerhalb der unterschiedlichen Schichten des Getreidekorns stark variiert, bedarf es analytische Methoden zur strukturellen Charakterisierung der AX.

1.1 Die Zellwand von Getreide

1.1.1 Der Aufbau von Getreidepflanzen und -körnern

Aus botanischer Sicht gehört Getreide zur Familie der Süßgräser (Poaceae) und demnach zur Ordnung der Grasartigen (Poales). Viele der heutigen kultivierten Getreidepflanzen ähneln sich in ihrem Aufbau und lassen sich im Wesentlichen in vegetative (Wurzeln, Halm, Blätter) und reproduktive (Blütenstand, Ähre/Rispe, Frucht) Pflanzenorgane unterteilen. Das verzweigte Wurzelsystem der Getreidepflanzen dient der Verankerung im Boden und gewährleistet zugleich die Aufnahme von Wasser sowie mineralischen Nährstoffen, die für das vegetative und generative Wachstum erforderlich sind. Der oberirdische Sprossapparat umfasst den Halm und die Ähre. Der Halm ist durch mehrere Knoten (Nodien) gegliedert, aus denen Blattscheiden und Blätter hervorgehen. Der Blütenstand differenziert sich im Verlauf der generativen Entwicklungsphase zum Fruchtstand, welcher die Getreidekörner (Karyopsen) trägt, und je nach Getreideart unterschiedliche morphologische Ausprägungen aufweist. Bei Weizen (*Triticum aestivum* L.), Roggen (*Secale cereale* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) handelt es sich um eine Ähre, während bei Hafer (*Avena sativa* L.) und Reis (*Oryza sativa* L.) eine Rispe ausgebildet wird. Eine Ähre besteht aus einem einfachen, unverzweigten Blütenstand, bei dem die Ährchen kompakt und direkt entlang der Hauptachse (Rhachis) angeordnet sind. Im Gegensatz dazu weist die Rispe einen verzweigten Blütenstand auf, bei dem die Ährchen über gestielte Seitenachsen an der Hauptachse sitzen. Die Maispflanze (*Zea mays* L.) hingegen bildet einen Kolben als charakteristischen Fruchtstand aus. Des Weiteren gehören Getreide zu den monokotylen Pflanzen, die beim Keimen nur ein Keimblatt ausbilden.

Das Getreidekorn ist eine einsamige Schließfrucht, bei der die Fruchtwand mit der Samenschale verwachsen ist (Karyopse). Das Getreidekorn dient primär als Speicherorgan für die Nährstoffe, die während der Keimung dem Embryo zur Verfügung stehen. Die äußeren Schichten des Getreidekorns umfassen die Fruchtwand (äußeres und inneres Perikarp) und die Samenschale (Testa, Epidermis). Diese enthalten bezogen auf das gesamte Getreidekorn, die größten Mengen an BS (Zellwand-PS, Lignin bzw. ligninähnliche Polymere) und Mineralstoffen (Saulnier *et al.*, 2012). Darunter liegt das Endosperm mit der Aleuronschicht, die den stärkehaltigen Mehlkörper von den äußeren Kornschichten abgrenzt, und reich an Proteinen, Lipiden, Vitaminen und Enzymen ist. Letztere steuern während der Keimung den Nährstoffabbau im Endosperm. Das Endosperm (Aleuronschicht + Mehlkörper) bildet das zentrale Speichergewebe und macht den Großteil des Getreidekorns (~ 70 - 80 %) aus. Der Mehlkörper besteht aus dünnwandigen Zellen, die Stärke und Speicherproteine (Prolamine, Gluteline) enthalten. Der Keimling, der einen hohen Gehalt an Lipiden und Vitaminen (B-Vitamine und Tocopherole) aufweist, besitzt die embryonalen Anlagen für die neue Pflanze und wird während der Keimung über das Schildchen (Scutellum) mit Nährstoffen aus dem Endosperm versorgt. Bei der Verarbeitung der Getreidekörner zu Mehl wird je nach Ausmahlungsgrad der Keimling und die Kleie, welche die äußeren Schichten des Getreidekorns und den größten Teil der Aleuronschicht

umfasst, abgetrennt, was den Verlust von Vitaminen, Mineralstoffen und BS zur Folge hat. Aus diesem Grund sind Vollkornprodukte, die alle Bestandteile des Getreidekorns enthalten, aus ernährungsphysiologischer Sicht positiver zu bewerten. So konnte in einigen epidemiologischen Studien bereits gezeigt werden, dass der regelmäßige Verzehr von Vollkornprodukten mit gesundheitlichen Vorteilen wie einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Typ-2-Diabetes verbunden ist (Mellen *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2012).

1.1.2 Der Aufbau und die Funktion der pflanzlichen Zellwand

Die pflanzliche Zellwand spielt eine zentrale Rolle für die strukturelle Integrität und Funktion von Pflanzenzellen. Sie umgibt den Protoplasten und verleiht der Zelle mechanische Stabilität und Form, in dem sie dem inneren Turgordruck entgegenwirkt. Dadurch bildet sie eine natürliche, elastische Schutzbarriere gegenüber äußeren Einflüssen (mechanische Belastung, pathogene Mikroorganismen). Des Weiteren reguliert sie den osmotischen Wasserhaushalt der Zelle, ermöglicht die Kommunikation zwischen Zellen, steuert den kontrollierten Stoffaustausch, beeinflusst das Zellwachstum und trägt zur Spezialisierung und Ausbildung verschiedener pflanzlicher Gewebe bei (Zhang *et al.*, 2025).

Die Eigenschaften der pflanzlichen Zellwand sind auf ein hochkomplexes und variables Netzwerk aus PS, Strukturproteinen und phenolischen Verbindungen zurückzuführen, deren Zusammensetzung und Wechselwirkungen in Abhängigkeit von Pflanzenart, Zelltyp, Gewebe, Entwicklungsstadium der Pflanze und äußeren Umweltfaktoren stark variieren können. Die äußerste Schicht bildet die Mittellamelle, welche vor allem aus Pektinen besteht. Sie verbindet benachbarte Zellen miteinander und sorgt somit für die Gewebestabilität. Darauf folgt die Primärzellwand, welche sich aus einem unlöslichen, mechanisch stabilen Gerüst aus Cellulose-Mikrofibrillen zusammensetzt. Dieses Gerüst ist in einer wässrigen Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen, löslichen Strukturproteinen (Extensine, Arabinogalactan-Proteine) sowie anorganischen Ionen (Ca^{2+} -Ionen) eingebettet. Anders als die Typ I-Primärzellwände von Dikotyledonen (und nicht-commeliniden Monokotyledonen), die überwiegend in Obst und Gemüse vorkommen, enthalten Typ II-Primärzellwände von Gräsern größere Mengen an Xylanen (20 - 40 %) und MLG (10 - 30 %), während Xyloglucane (1 - 5 %), (Gluco-)Mannane (< 1 %) und Pektine (5 %) eine untergeordnete Rolle spielen. Der Anteil an Cellulose ist bei beiden Zellwandtypen in etwa gleich (15 - 30 %). Sobald das Zellwachstum beendet ist, wird bei bestimmten Zelltypen, beispielsweise in Xylem- und Sklerenchymzellen, zusätzlich eine Sekundärzellwand aufgelagert. Diese enthält im Vergleich zur Primärzellwand größere Mengen an Cellulose (35 - 45 %) und Xylanen (40 - 50 %) sowie Lignin (20 %), ein komplexes, polyphenolisches Makromolekül (Vogel, 2008). Aufgrund der starren Molekülstruktur und des hydrophoben Charakters von Lignin nimmt die Flexibilität und Permeabilität der Zellwand bei Auflagerung einer Sekundärschicht ab, was beispielsweise den Wassertransport im Leitgewebe

1 Einleitung

ermöglicht. Des Weiteren können weitere phenolische Verbindungen, die mit der Epidermis und Cuticula assoziiert vorliegen wie Cutin, Suberin und pflanzliche Wachse vorkommen (McDougall *et al.*, 1996; Vogel, 2008). Im Folgenden werden die Strukturen der für die Typ-II-Primärzellwand relevanten Zellwand-PS näher erläutert, welche sich in drei Gruppen unterteilen: Cellulose, Hemicellulosen, darunter AX und MLG, sowie Pektine.

1.1.3 Die Grundbausteine pflanzlicher Zellwandpolysaccharide

Die PS der pflanzlichen Zellwand zeichnen sich durch eine ausgeprägte strukturelle Diversität aus, die auf eine Vielzahl unterschiedlicher Monosaccharide zurückgeführt werden kann. Diese unterscheiden sich unter anderem in der Anzahl der Kohlenstoffatome (Pentose/Hexose), der Ringform (Furanose (*f*)/Pyranose (*p*)), der Chiralität (D/L) sowie der anomeren Konfiguration (α/β) (McDougall *et al.*, 1996). Durch die Verknüpfung der Monomereinheiten zu einem PS wird die anomere Konfiguration (mit Ausnahme der reduzierenden Enden) in der glykosidischen Bindung fixiert. Die in der pflanzlichen Zellwand am häufigsten vorkommenden Monosaccharide sind in Abbildung 1 dargestellt. Dazu zählen die neutralen Hexosen D-Glucopyranose (Glc_p), D-Galactopyranose (Gal_p) und D-Mannopyranose, die aus Hexosen abgeleiteten Uronsäuren D-Glucopyranuronsäure (Glc_pA, engl. *Glucuronic Acid*) und D-Galactopyranuronsäure (Gal_pA, engl. *Galacturonic Acid*), die Pentosen D-Xylopyranose (Xyl_p), L-Arabinofuranose (Ara_f)/-pyranose (Ara_p) und L-Apiofuranose, sowie die Desoxyzucker L-Fucopyranose und L-Rhamnopyranose (Rha_p). Die monomeren Bausteine der PS können über frei vorliegende Hydroxygruppen, die nicht durch die Halbacetalbildung im Ring gebunden sind, miteinander verknüpft sein. Es gibt sowohl lineare als auch verzweigte PS, deren Seitenketten gleichmäßig oder in Clustern entlang des Rückgrats angeordnet sein können. Außerdem tragen weitere Substituenten wie Methyl- und Acetylgruppen wesentlich zu den funktionellen und strukturellen Eigenschaften der PS bei. Insbesondere in Getreidezellwänden spielen auch die an AX über Estergruppen gebundenen Hydroxymethylsäurederivate wie die *trans*-FS eine zentrale Rolle bei der Ausbildung inter- und intramolekularer Vernetzungen (s. Kapitel 1.1.4 und 1.2.3).

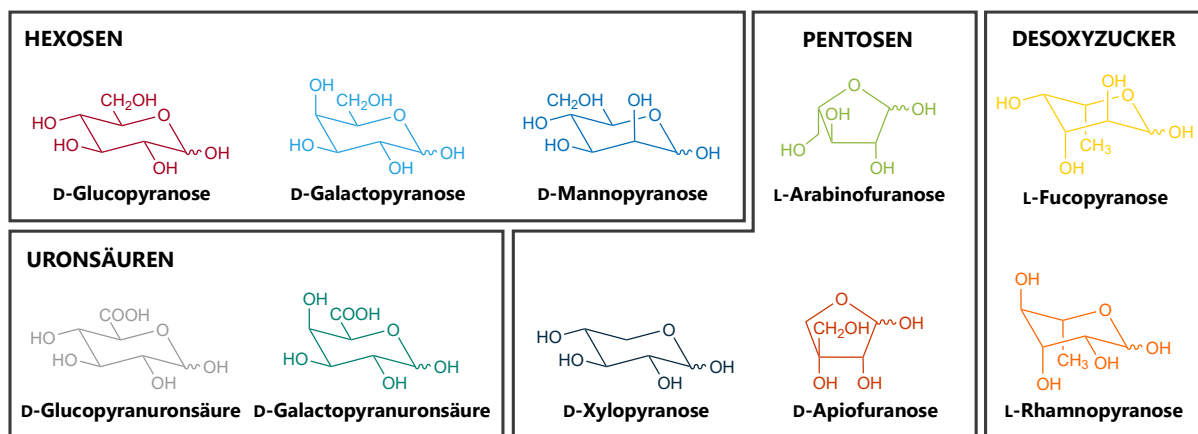


Abbildung 1: Strukturen der am häufigsten in Zellwandpolysacchariden vorkommenden Monosaccharide

1.1.4 Das Netzwerk aus Cellulose und Hemicellulosen

Cellulose ist das am häufigsten natürlich vorkommende Biopolymer auf der Erde und struktureller Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände. Es besteht aus einer linearen Kette von β -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidisch verknüpften D-Glcp-Einheiten, bei der jede nachfolgende Einheit um 180° gedreht ist. Die Anordnung der Hydroxymethylgruppe in Position C5 der Glcp ist entscheidend für die Ausbildung starker intra- und intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen. Bis zu 15.000 Monomereinheiten können in den Polymerketten gebunden sein, wobei angenommen wird, dass die in Primärzellwänden vorkommende Cellulose ein weitaus niedrigeren Polymerisationsgrad (DP, engl. *Degree of Polymerization*) als die in Sekundärzellwänden vorkommende Cellulose besitzt (O'Sullivan, 1997). Die Polymerketten bilden Mikrofibrillen mit 30 - 100 Ketten im Durchmesser aus, die je nach Lokalisation innerhalb der Zellwand unterschiedlich orientiert sein können und damit das Zellwachstum steuern (McDougall *et al.*, 1996). Bis zu sechs polymorphe Strukturen der Cellulose werden beschrieben, die ineinander konvertierbar sind und sich in der Ausrichtung der Kettenstränge und den daraus resultierenden Wasserstoffbrückenbindungen unterscheiden (O'Sullivan, 1997). So stellt Cellulose I mit parallel angeordneten Strängen die native Form dar und kann durch Alkalibehandlung in Cellulose II mit antiparallelen Strängen umgewandelt werden. Darüber hinaus wird zwischen weniger geordneten (amorphen) und hochgeordneten (kristallinen) Bereichen der Cellulose unterschieden. Primärzellwände enthalten vermehrt amorphe Bereiche, während in Sekundärzellwänden fast ausschließlich hochkristalline Bereiche vorzufinden sind (McDougall *et al.*, 1996).

Hemicellulosen, deren Bezeichnung etymologisch aus der Cellulose abgeleitet ist, besitzen ebenfalls ein Rückgrat aus β -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften D-Pyranosen und stellen eine weitere wichtige Komponente der pflanzlichen Zellwand dar. Über Wasserstoffbrückenbindungen können sie die räumlich unterschiedlich orientierten Cellulosemikrofibrillen miteinander verknüpfen und tragen so zur Ausbildung einer dreidimensionalen Netzwerkstruktur bei. In Gräsern wird diese Rolle vor allem von der strukturell vielfältigen Gruppe der Xylane übernommen. Glucuronoxylane und (Glucurono-)arabinoxylane besitzen ein Rückgrat aus β -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Xylp-Einheiten. Im Falle der Glucuronoxylane, die vermehrt in Sekundärzellwänden sowohl von monokotylen als auch von dikotylen Pflanzen (Hölzer) vorzufinden sind, liegen unregelmäßig über die O2-Position im Rückgrat α -D-GlcpA- bzw. 4-O-Methyl- α -D-GlcpA-Einheiten gebunden vor (Vogel, 2008). Dagegen werden die in den Typ-II-Primärzellwänden vorkommenden Xylane im Allgemeinen als AX bezeichnet, da hier das Xylp-Rückgrat überwiegend mit α -L-Araf substituiert vorliegt. Kommt zusätzlich GlcA als Substituent vor, wird seltener auch von Glucuronoarabinoxylanen (GAX) gesprochen. Die Anzahl und das Muster der Araf-Substitution variiert je nach Getreideart und Gewebetyp (s. Kapitel 1.2.1) und hat direkten Einfluss auf die molekularen Wechselwirkungen mit Cellulose. Entscheidend ist hierbei das Vorkommen von längeren Abschnitten an unsubstituierten Xylp-Einheiten, die mit den Cellulosesträngen interagieren können. Dies geht in der Regel mit einer Abnahme der

1 Einleitung

Wasserlöslichkeit der AX einher (Köhnke *et al.*, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass Pflanzen durch Veränderung der Substitution der AX mit Ara den Feuchtigkeitsgehalt im Gewebe kontrollieren können, wodurch die Wasserdiffusion durch die Zellwand entweder erleichtert oder eingeschränkt wird (Saulnier *et al.*, 2012). Über Esterbindungen können zusätzlich Hydroxyzimtsäurederivate gebunden über die O5-Position der Araf vorliegen, die ein weiteres strukturgebendes Element von Getreidezellwänden darstellen und die Funktionalität der AX maßgeblich beeinflussen. Hierbei ist die *trans*-FS am häufigsten vertreten, deren Vorkommen mit Ausnahme von Vertretern der Fuchsschwanzgewächse (Amaranthaceae), der beispielsweise die Zuckerrübe, der Spinat oder auch Pseudogetreide wie Quinoa angehören, auf commelinide Monokotyledonen beschränkt ist (Ishii & Tobita, 1993; Ralet *et al.*, 2005; Wefers *et al.*, 2015). Im Zuge radikalinitiiert-oxidativer Kopplungsreaktionen können FS-Reste Di- und Oligomere ausbilden, die die AX sowohl intra- als auch intermolekular untereinander oder mit anderen Zellwandbestandteilen wie Lignin vernetzen (Allerdings *et al.*, 2005; Bunzel, 2010; Bunzel *et al.*, 2008; Jilek & Bunzel, 2013; Ralph *et al.*, 1995). Diese kovalenten Bindungen tragen maßgeblich zur mechanischen Stabilität und Festigkeit der pflanzlichen Zellwände von Gramineen bei. Insbesondere die in den äußeren Schichten des Getreidekorns vorkommenden sauren GAX enthalten im Vergleich zu AX aus Endospermzellwänden größere Mengen an monomerer und oligomerer FS (Antoine *et al.*, 2003). Das Vorkommen und die genaue Struktur der Di- und Oligomere der FS wird in Kapitel 1.2.3.2 näher betrachtet.

MLG treten im Pflanzenreich nach bisherigen Kenntnissen neben Gräsern auch noch in Pflanzen der Gattung der Schachtelhalme (*Equisetum*) auf (Sørensen *et al.*, 2008). Die unverzweigten PS bestehen aus einer Kette von β -(1 $\rightarrow$ 4)- und β -(1 $\rightarrow$ 3)-glykosidisch verknüpften D-Glcp-Einheiten. Die β -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Glcp bilden überwiegend Blöcke aus drei (Cellotriosyl-) und vier (Cellotetraosyl-)Einheiten, die über β -(1 $\rightarrow$ 3)-Bindungen unterbrochen werden und deren molares Verhältnis je nach Getreideart zwischen 1,5 und 4,5 variiert (Lazaridou & Biliaderis, 2007). Dieses Verhältnis beeinflusst unter anderem die Wasserlöslichkeit der MLG. Strukturen, in denen entweder Cellotriosyl-Einheiten oder Cellotetraosyl-Einheiten dominieren, nehmen in der Regel eine gleichmäßigere Konformation an und sind daher besser in der Lage, unlösliche Aggregate zu bilden. Typische Getreide mit einem sehr hohen Gehalt an MLG sind Gerste und Hafer mit 3,0 - 8,0 % bzw. 4,0 - 6,0 % bezogen auf die Trockenmasse des Getreidekorns (Lee *et al.*, 1997; Nishantha *et al.*, 2018). Sie kommen vermehrt in Zellwänden des Endosperms vor, mit Ausnahme von Weizen, bei dem sie primär in der Aleuronschicht vorzufinden sind. Die genaue Funktion der MLG in Getreidezellwänden ist noch nicht abschließend geklärt. Zwar können die MLG aufgrund ihrer flexiblen Struktur an die Oberfläche der Cellulosemikrofibrillen adsorbieren, die intermolekularen Wechselwirkungen sind jedoch schwächer als bei AX oder Xyloglucanen (Kiemle *et al.*, 2014). Neue Studien gehen davon aus, dass enzymatisch freigesetzte Oligosaccharide (OS) aus MLG entscheidend an der Immunabwehr von Pflanzen gegen pathogene Mikroorganismen beteiligt sind (Barghahn *et al.*, 2021; Rebaque *et al.*, 2021).

Im Gegensatz zu Typ-I-Primärzellwänden dikotyler Pflanzen spielen Xyloglucane in Getreidezellwänden anteilmäßig nur eine untergeordnete Rolle. Sie sind in ihrer Grundstruktur aus einem Glcp-Rückgrat aufgebaut, das in regelmäßigen Abständen über die O6-Position mit Xylp-Einheiten substituiert vorliegt. Der Substitutionsgrad (DS, engl. *Degree of Substitution*) liegt in Dikotyledonen bei 60 - 75 % und in Gräsern bei 30 - 40 % (Fry, 1989). Je nach Herkunft des Pflanzenmaterials oder dessen Entwicklungszustand können Xyloglucan-Seitenketten um bis zu drei zusätzliche Monosaccharide erweitert werden. Typischerweise wird die Xylose an der O2-Position durch eine β -D-Galp ergänzt. Zudem tritt ein weiteres Strukturelement auf, bei dem diese Galactose an ihrer O2-Position zusätzlich mit einer α -L-Fucopyranose versehen ist (Steck *et al.*, 2021). Neben diesen im Pflanzenreich häufig vorkommenden Motiven gibt es weitere Seitenkettenstrukturen, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter thematisiert werden. In der Familie der Süßgräser bildet der XXG_n-Typ (n = 1 - 5) den sich wiederholenden Grundbaustein der Xyloglucane. Daneben sind auch galactosylierte Xyloglucane vorzufinden, während fucosylierte Seitenketten nicht auftreten (Hsieh & Harris, 2009).

Mannane stellen eine mengenmäßig kleine, aber strukturell vielfältige Gruppe der Hemicellulosen dar. So können sie in Homo-, Gluco-, Galacto- und Galactoglucomannane unterteilt werden. In Getreidezellwänden kommen überwiegend lineare Mannane vor, die aus β -(1→4)-verknüpften D-Mannopyranosen bestehen, und Glucomannane, die aus einer zufälligen Abfolge aus Mannose- und Glc-Einheiten aufgebaut sind. In den Zellwänden des Endosperms dienen sie primär als Speicherpolysaccharide, die während der Keimung durch *endo*- β -(1→4)-Mannanasen abgebaut werden können (Verhertbruggen *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2012).

1.1.5 Pektine

Pektine sind neben Cellulose und Hemicellulosen zentrale Bestandteile pflanzlicher Zellwände und stellen eine sehr heterogene und komplexe Gruppe von PS dar, deren Struktur weitestgehend aus der Uronsäure D-GalpA sowie neutralen Monosacchariden wie L-Rhap-, L-Araf- und L-Galp-Einheiten aufgebaut ist. Pektine kommen vor allem in der Mittellamelle, aber auch in der Primär- und Sekundärzellwand vor, wobei Typ-I-Primärzellwände deutlich größere Mengen an Pektinen (20 - 35 %) enthalten als Typ-II-Primärzellwände (5 %) (Vogel, 2008). Aufgrund ihrer komplexen und variablen Struktur übernehmen sie eine Reihe an strukturellen und regulatorischen Funktionen. So tragen sie unter anderem zur mechanischen Stabilität und Flexibilität der Zellwand bei, sind verantwortlich für die Zelladhäsion benachbarter Zellen, regulieren die Porenstruktur der Zellwand und damit die Diffusion von Wasser und gelösten Molekülen im Apoplasten (Peaucelle *et al.*, 2012; Voragen *et al.*, 2009).

In dem von de Vries und Mitarbeitenden (1981) erstmals beschriebenen Modell zur Definition der räumlichen Gesamtstruktur der Pektine enthalten diese sowohl *smooth* als auch *hairy regions* (de Vries *et al.*, 1981). Die unverzweigten Homogalacturonane, die oft den größten Teil

1 Einleitung

des Pektins (~ 60 %) ausmachen, bestehen aus einer linearen Kette von α -(1→4)-verknüpften D-GalpA-Einheiten und bilden daher die *smooth regions*. Die GalpA-Einheiten können über die O6-Position methylierter und/oder über die Positionen O2 und/oder O3 acetyliert vorliegen. Pektine werden je nach Grad der Methylierung in niedrig- und hochveresterte Pektine eingeteilt (Voragen *et al.*, 2009). Der Veresterungsgrad hat direkten Einfluss auf die Ausbildung von inter- oder intramolekularen Crosslinks. In längeren, esterfreien Abschnitten des Homogalacturonans können divalente Kationen, beispielsweise Ca^{2+} -Ionen, an die deprotonierten Carboxylgruppen binden und somit zu einer Vernetzung der Pektine bzw. zur Ausbildung einer Gelstruktur („Egg-Box“-Modell) führen (Peaucelle *et al.*, 2012).

Die sogenannten *hairy regions* umfassen die Rhamnogalacturonane Typ I und II, die nach diesem Modell kovalent an das Homogalacturonan gebunden sind. Typ I besitzt ein alternierendes Rückgrat aus α -(1→4)-gebundenen D-GlcpA- und α -(1→2)-gebundenen L-Rhap-Einheiten. Analog zum Homogalacturonan können die GlcA-Einheiten zusätzlich methyliert bzw. acetyliert sein. Darüber hinaus enthält Rhamnogalacturonan Typ I neutrale Seitenketten wie Arabinane, Galactane und/oder Arabinogalactane Typ I, die über die O4-Position der Rhap an das Rückgrat geknüpft sind. Arabinane bestehen aus einem Grundgerüst von α -(1→5)-verbundenen L-Araf-Einheiten, welches über die Positionen O2 und/oder O3 verzweigt vorliegen kann (Westphal *et al.*, 2010). Unter „Galactanen“ werden meist unverzweigte, lineare Ketten aus β -(1→4)-verknüpften D-Galp-Einheiten verstanden. Enthalten diese zusätzlich Araf-Einheiten beispielsweise in Position O3 der Hauptkette, werden diese im Allgemeinen als Arabinogalactane Typ I bezeichnet. Darüber hinaus treten auch zusätzliche D-Galp in Position O6 oder L-Arap am terminalen, nicht-reduzierenden Ende auf (Voragen *et al.*, 2009). Des Weiteren sind die Arabinogalactane vom Typ II zu nennen, die in der Literatur häufig gemeinsam mit Pektinen behandelt werden. Im Gegensatz zu den Arabinogalactanen Typ I sind sie aus β -(1→3)-verknüpften Galp-Einheiten aufgebaut, die zusätzlich an Position O6 monomere oder oligomere Seitenketten aus β -(1→6)-verknüpften Galp tragen können. Diese Seitenketten können ihrerseits mit Araf verzweigt sein. Bis heute ist nicht abschließend geklärt, ob diese PS direkt an Rhamnogalacturonan Typ I gebunden vorliegen oder lediglich indirekt über stark assoziierte, hydroxyprolinreiche Proteine verknüpft sind.

Bei Rhamnogalacturonan Typ II handelt es sich sinngemäß um ein substituiertes Galacturonan, welches sich durch komplexe, aber hochkonservierte Seitenkettenstrukturen auszeichnet, die über die Positionen O2 und O3 an das GalpA-Rückgrat gebunden sind. Die Seitenketten enthalten bis zu zwölf verschiedene Monosaccharide, darunter auch in der Zellwand selten vorkommende Zucker wie D-Apiofuranose (O'Neill *et al.*, 2004). Durch die enzymatische Hydrolyse der homogalacturonanreichen Abschnitte des Pektins konnte gezeigt werden, dass Rhamnogalacturonan Typ II tatsächlich freigesetzt wird. Dies weist darauf hin, dass es kovalent an das Homogalacturonan gebunden ist (Ishii & Matsunaga, 2001).

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

FS-haltige AX stellen die dominierenden Hemicellulosen in Getreidezellwänden dar. Charakteristisch ist das aus β -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidisch verknüpften Xylp-Einheiten aufgebaute Rückgrat, an das eine Vielzahl an unterschiedlichen Substituenten geknüpft sein kann. Am häufigsten treten α -L-Araf-Einheiten auf, die in den Positionen O2 und/oder O3 der Xylp-Einheiten gebunden vorliegen können (s. Abbildung 2) (McCleary *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2016b). Die Anzahl und Verteilung der Araf-Substituenten entlang des Xylp-Rückgrats variiert stark nach Getreideart und Gewebetyp, weshalb in Kapitel 1.2.1 näher darauf eingegangen wird. Die in Position O3 gebundenen Araf-Reste können über deren O5-Position teilweise mit Hydroxyzimtsäuren verestert sein (Schendel *et al.*, 2016b). Insbesondere in Mais, der größere Mengen an zellwandgebundener FS enthält, treten komplexere, FS-haltige Seitenketten auf, in denen neben der Araf weitere Neutralzucker wie D-Xylp und D/L-Galp gebunden vorliegen können (s. Kapitel 1.2.1.4) (Allerdings *et al.*, 2006; Saulnier *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnten natürlicherweise vorkommende oligomere Seitenketten aus α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)-L-Ara identifiziert werden, die typisch für Getreide-AX sind und keine zusätzlich estergebundene FS tragen (Schendel & Bunzel, 2025). Einen weiteren Substituenten stellt die zu den Uronsäuren gehörende GlcpA und deren 4-O-Methylderivat dar. Diese kann über die O2-Position an das Xylp-Rückgrat geknüpft sein und konnte beispielsweise in AX aus Mais, Hafer und Hirse beobachtet werden (Huisman *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2015; Verbruggen *et al.*, 1998). AX können zudem acetyliert vorliegen, was die strukturelle Vielfalt nochmals erweitert (Ishii, 1991; Schendel *et al.*, 2016b; Wende & Fry, 1997b). Das über Jahrzehnte gewonnene Wissen über die Struktur der AX beruht neben der semiquantitativen Bestimmung des molaren Verhältnisses an vorkommenden Monomeren und deren Bindungspositionen vor allem auf der Isolierung und Charakterisierung von OS, die partiell durch enzymatische oder säurekatalysierte Hydrolyse aus AX freigesetzt wurden (Allerdings *et al.*, 2006; Gruppen *et al.*,

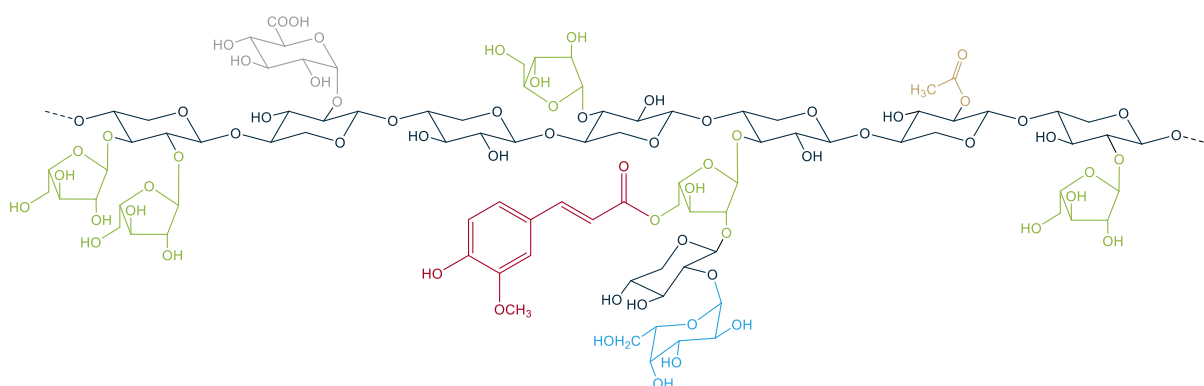


Abbildung 2: Schematische Struktur ferulasäurehaltiger Arabinoxylane. Das Rückgrat besteht aus β -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften D-Xylopyranose-Einheiten (schwarz), an das verschiedene Substituenten gebunden sein können. Am häufigsten treten α -L-Arabinofuranosen (grün) auf, die an die Positionen O2 und/oder O3 der Xylose geknüpft sind und zusätzlich über die Position O5 der Arabinofuranose mit *trans*-Ferulasäure (rot) verestert sein können. Komplexe, ferulasäurehaltige Seitenketten können darüber hinaus weitere Neutralzucker, wie D-Xylo- und D/L-Galactopyranosen, enthalten. Zu den weiteren möglichen Substituenten zählen D-Glucopyranuronsäuren (hellgrau), sowie deren 4-O-Methylderivate und Acetylgruppen (braun).

1 Einleitung

1992c; McCleary *et al.*, 2015; Saulnier *et al.*, 1995; Schendel *et al.*, 2016b). Die enzymatische Hydrolyse von AX mittels *endo*-(1→4)-Xylanasen, die zur Freisetzung von AXOS und XOS führt, ist ein gängiger Ansatz, um die beschriebenen Strukturen nachzuweisen (McCleary *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2016b), funktioniert jedoch nur für enzymatisch zugängliche AX aus Getreidearten wie Weizen oder Roggen. Komplexere AX-Strukturen, wie sie beispielsweise in Mais vorkommen, sind nur durch vorherige Behandlung des Zellwandmaterials enzymatisch abbaubar (Appeldoorn *et al.*, 2013). Die enzymatische Hydrolyse von AX wird in Kapitel 1.3 näher thematisiert.

Die Gesamtheit an möglichen Struktureinheiten ist vielfältig und komplex. Zur Beschreibung der Strukturmotive in den AX bzw. deren hydrolytischen Abbauprodukten bedarf es daher einer einheitlichen und eindeutigen Nomenklatur. Auf der Grundlage der Terminologie von Xyloglucanoligosacchariden entwickelte die Arbeitsgruppe um Fauré (2009) ein System für die Nomenklatur von OS aus Heteroxylenen. Hierbei wird jedem Segment aus der Hauptkette ein bestimmter Großbuchstabe zugeordnet. Die resultierenden Einbuchstabencodes beginnen mit dem nicht-reduzierenden, terminalen Ende der Hauptkette. Der Buchstabe „X“ steht für unsubstituierte oder endständige β -(1→4)-verknüpfte Xylp-Einheiten. An das Xylan-Rückgrat gebundene Seitenketten werden ebenfalls mit einem Großbuchstaben versehen. Hierbei steht „A“ für eine L-Araf-Einheit, die an die Xylp aus dem Rückgrat gebunden vorliegt. Auch größere Seitenketten, die aus mehreren Einheiten bestehen und häufiger vorkommen, können mit Hilfe von Großbuchstaben beschrieben werden. Der Buchstabe „D“ steht z. B. für das Strukturmotiv β -D-Xylp-(1→?)- α -L-Araf-(1→?)- innerhalb eines Seitenkettensegments. Die jeweiligen Bindungspositionen der Seitenketten werden durch eine oder mehrere hochgestellte Ziffern angezeigt. Ausgehend vom terminalen nicht-reduzierenden Ende der Seitenkette werden die Ziffern jeweils nacheinander aufgeführt und durch Kommata getrennt. Die letzte Ziffer in der Sequenz deutet die Verknüpfung mit dem Xylan-Rückgrat an, z. B. beschreibt A³ eine Araf-Einheit, die an die O3-Position der Xylp gebunden ist. Eine zweifache Substitution mit Araf wird durch ein „Plus“-Zeichen kenntlich gemacht. Zudem werden hochgestellte Kleinbuchstaben zur Kennzeichnung von nicht-glykosidischen Substituenten wie FS (f) oder Acetylgruppen (a) genutzt. Demnach steht z. B. A^{5f3} für eine in O5-Position feruloylierte Araf-Einheit, die über die O3-Position an das Xylan-Rückgrat geknüpft ist. In Abbildung 3 ist beispielhaft ein FS-haltiges Arabinoxyloligosaccharid (FAXOS) dargestellt, das mit Hilfe der Nomenklatur eindeutig beschrieben werden kann (Fauré *et al.*, 2009; Schendel *et al.*, 2015).

Anders als die Struktur der AX variiert deren Gehalt nicht nur zwischen verschiedenen Getreidearten und Gewebetypen, sondern auch zwischen verschiedenen Sorten innerhalb einer Getreideart. Darüber hinaus haben äußere Faktoren wie Anbau- und Umweltbedingungen einen größeren Einfluss auf den AX-Gehalt (Korge *et al.*, 2023). Innerhalb des Getreidekorns kommen FS-haltige AX vor allem in den äußeren Randschichten (Aleuronschicht, Frucht- und Samenschale), den Kleiebestandteilen, vor. So beträgt beispielsweise der AX-Gehalt in

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylyane

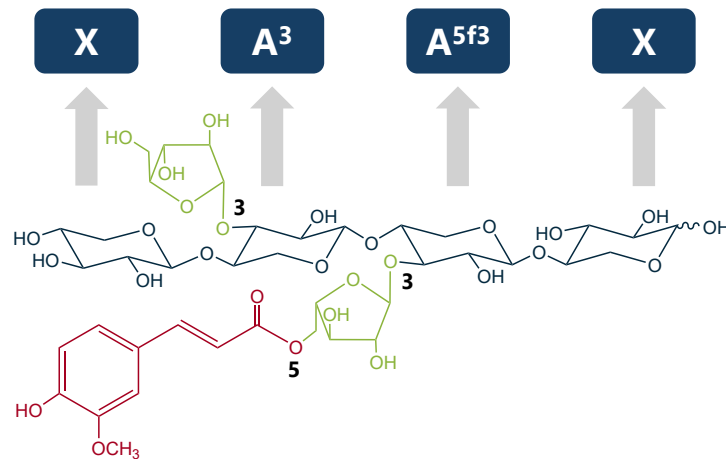


Abbildung 3: Eingeführte Nomenklatur am Beispiel eines ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids.

Unsubstituierte Xylopyranose (Xylp)-Einheiten (schwarz) werden mit einem „X“ gekennzeichnet. Im Falle einer Substitution der Xylp mit Arabinofuranose (Araf)-Einheiten (grün) wird stellvertretend der Buchstabe „A“ verwendet. Nicht-glykosidische Substituenten wie die *trans*-Ferulasäure (FS, rot) werden mit einem hochgestellten Kleinbuchstaben (f) abgekürzt. Während die vorangestellte Ziffer die Bindungsposition der FS zur Araf anzeigt, stellt die letzte Ziffer in der Sequenz die Verknüpfung zum Xylp-Rückgrat dar.

Weißmehl aus herkömmlichem Winter- und Sommerweizen, das zum größten Teil aus Bestandteilen des Endosperms besteht, bei 1,4 - 2,8 % bzw. 1,7 - 2,8 % der Trockenmasse, während der AX-Anteil in der Kleie bei 13,2 - 22,1 % bzw. 12,7 - 19,2 % der Trockenmasse liegt (Gebruers *et al.*, 2008). Andere, wirtschaftlich bedeutende Getreidearten, wie Roggen (3,0 - 3,3 % im Endosperm, 12,1 - 13,3 % in der Kleie) oder Gerste (1,7 - 2,2 % im Endosperm, 4,8 - 9,8 % in der Kleie), weisen in den äußeren Schichten des Getreidekorns, je nach betrachteter Sorte, etwas niedrigere AX-Gehalte auf (Andersson *et al.*, 2008; Shewry *et al.*, 2010). Üblicherweise werden Gehaltsangaben auf Basis der Monosaccharidzusammensetzung gemacht, die den AX-Anteil aus der Summe der freigesetzten Ara und Xyl nach saurer Hydrolyse durch Multiplikation mit einem Korrekturfaktor (0,88) berechnen. Dabei ist zu beachten, dass je nach Beschaffenheit des eingesetzten Probenmaterials Ara und Xyl auch aus anderen Zellwand-PS wie Arabinanen, Arabinogalactanen oder Xyloglucanen freigesetzt werden können. Zudem kann es im sauren Milieu teilweise zu einem Abbau dieser Monosaccharide kommen (s. Kapitel 3.3.1). Beides kann das Ergebnis beeinflussen und muss bei der Interpretation der Daten entsprechend berücksichtigt werden.

1.2.1 Die Variabilität der Substitution mit Arabinose

Die ausgeprägte strukturelle Heterogenität der AX wird maßgeblich durch den Grad und das Muster der Substitution mit Araf bestimmt, die in Abhängigkeit von Getreideart, Gewebe, Entwicklungsstadium sowie genetischen und umweltbedingten Faktoren variiert. Zur Beschreibung der Substitution wird häufig das Arabinose-zu-Xylose-Verhältnis (A/X) herangezogen, das aus der Monosaccharidzusammensetzung (s. Kapitel 3.3.1) abgeleitet wird und eine Abschätzung der durchschnittlichen Substitutionsdichte ermöglicht. Bei der

1 Einleitung

Betrachtung des A/X ist jedoch zu berücksichtigen, dass sowohl Ara als auch Xyl aus anderen Zellwand-PS bzw. aus oligomeren (FS-haltigen) Seitenketten (s. Kapitel 1.2.2.3) der AX freigesetzt werden können. Zur Unterscheidung zwischen unsubstituierten (uXyl), monosubstituierten (mXyl) und disubstituierten Xylose-Einheiten (dXyl) wird zudem eine Methylierungsanalyse (s. Kapitel 3.3.2) durchgeführt, die eine semiquantitative Bestimmung der in AX vorkommenden Bindungspositionen erlaubt (Saulnier *et al.*, 2007). Beide Analysen liefern jedoch keine Informationen darüber, wie die Araf-Substituenten räumlich verteilt sind, was entscheidend für die physikochemischen Eigenschaften der AX ist. In Kapitel 1.1.4 wurde bereits thematisiert, dass die Wasserlöslichkeit der AX in direktem Zusammenhang mit der Verteilung der Araf-Substituenten entlang des Xylan-Rückgrats steht. Demnach neigen AX mit längeren Abschnitten an uXylp stärker zur Aggregation und können besser mit den Cellulosesträngen interagieren, wodurch diese AX vermehrt wasserunlöslich sind (WUAX, engl. *Water-Unextractable Arabinoxylan*). Die Wasserlöslichkeit von AX wird demnach weniger durch die absolute Anzahl der Araf-Substituenten bestimmt, sondern vielmehr durch deren Verteilung entlang des Xylan-Rückgrats sowie durch das Vorkommen von uXylp. Wasserlösliche AX (WEAX, engl. *Water-Extractable Arabinoxylan*) zeichnen sich tendenziell durch einen geringen Anteil an uXylp sowie eine möglichst regelmäßige Anordnung von mXylp und/oder dXylp aus, was ihre Löslichkeit in Wasser begünstigt (Köhnke *et al.*, 2011). Neben dem Substitutionsmuster mit Ara haben das Molekulargewicht und das Vorkommen von FS-Crosslinks (s. Kapitel 1.2.3) ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Wasserlöslichkeit der AX (Maes & Delcour, 2002; Saulnier *et al.*, 2007). Die durch enzymatische Hydrolyse freigesetzten XOS und AXOS liefern Informationen über die Verteilung der Araf-Substituenten. Der Einsatz von *endo*-Xylanasen ist jedoch nur bedingt möglich, da diese zwei oder drei aufeinanderfolgende uXylp zur Spaltung benötigen (Pollet *et al.*, 2010). Hochsubstituierte AX sind daher häufig resistent gegen eine enzymatische Hydrolyse. Ergänzend oder alternativ zur enzymatischen Hydrolyse kann auch eine Periodatoxidation durchgeführt werden, bei der selektiv vicinale, freie Hydroxylgruppen gespalten und zu Aldehyden oxidiert werden. Demnach werden bevorzugt uXylp oxidiert, während mXylp und dXylp intakt bleiben. Aus der Menge der oxidierten Fragmente lässt sich statistisch ableiten, wie viele uXylp im Durchschnitt zwischen substituierten Xylp-Einheiten liegen. Aussagen über die exakte Sequenz der Araf-Substituenten können jedoch nicht getroffen werden (Izydorczyk & Biliaderis, 1994).

Weizen

Obwohl WEAX nur zu geringen Anteilen in den Kleiebestandteilen verschiedener Weizensorten vorkommen (0,30 - 0,55 % Anteil an der Trockenmasse), variiert deren A/X stark (0,70 - 1,70), unabhängig von der betrachteten Weizensorte (Gebruers *et al.*, 2008). Durch eine gestufte Ethanol-fällung konnten Unterschiede im A/X der WEAX aus Weizenkleie aufgezeigt werden, wobei mit zunehmender Ethanolkonzentration (20 - 80 %) ein Anstieg von 0,31 auf 0,85 beobachtet wurde (Maes & Delcour, 2002). Der überwiegende Anteil der in Weizenkleie

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

vorkommenden AX ist jedoch wasserunlöslich (8,6 % - 17,6 % Anteil an der Trockenmasse). Alkalisch extrahierte WUAX aus Weizenkleie zeigen ein durchschnittliches A/X von 0,71, wobei anteilig vermehrt AX mit höherem A/X ($> 1,01$) vorkommen. AX aus Weizenkleie besitzen zudem einen hohen Anteil an dXylp (15,8 %) und O3-monosubstituierter Xylp (18,1 %), wobei ein kleiner Anteil von 1,6 % auch in Position O2 monosubstituiert vorliegt (Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999). Außerdem enthalten die AX auch große Menge an terminaler Xylose (tXyl) von 11,6 %, die sowohl aus dem nicht-reduzierenden Ende der AX als auch aus oligomeren (FS-haltigen) Seitenketten stammen können (s. Kapitel 1.2.2.3). Bei näherer Betrachtung der äußeren Schichten des Weizenkorns zeigt sich, dass die AX in der Aleuronschicht (A/X = 0,37) und in der Samenschale aus Nucellar-Epidermis und Testa (A/X = 0,13) nur gering substituiert vorliegen, was die geringe Wasserlöslichkeit dieser AX erklärt (Parker *et al.*, 2005). Dagegen sind AX aus der inneren (A/X = 1,06) und äußeren Perikarpschicht (A/X = 1,14) stärker substituiert. Letztere weisen zudem einen hohen Gehalt an kovalent verknüpften Dimeren der FS auf (4,1 mg/g), die zu einer Vernetzung der AX führen, wodurch deren Wasserlöslichkeit abnimmt (Saulnier *et al.*, 2007).

Der durchschnittliche Gehalt an WEAX und WUAX in den Zellwänden des Weizenendosperms beträgt 0,5 % bzw. 1,7 %, somit sind etwa ein Viertel der enthaltenen AX wasserlöslich (Ordaz-Ortiz & Saulnier, 2005). Zahlreiche Studien belegen, dass sowohl WEAX als auch WUAX aus dem Weizenendosperm als Gemische mit stark heterogener Struktur vorliegen (Cleemput *et al.*, 1995; Dervilly-Pinel *et al.*, 2001; Gruppen *et al.*, 1992a, 1992b; Izydorczyk & Biliaderis, 1994). So variiert beispielsweise das A/X innerhalb der WEAX von 0,51 bis 0,91 (Izydorczyk & Biliaderis, 1994) und in den WUAX zwischen 0,36 und 1,08 (Gruppen *et al.*, 1992b). Auch die prozentualen Anteile der Bindungspositionen innerhalb verschiedener Subfraktionen der WEAX (uXylp: 51,9 - 63,1 %, mXylp: 13,2 - 21,7 %, dXylp: 14,6 - 33,2 %) und der WUAX (uXylp: 51,7 - 70,3 %, mXylp: 13,6 - 22,4 %, dXylp: 6,6 - 32,7 %) sind unterschiedlich, jedoch lassen sich ähnliche Strukturen für WUAX und WEAX ableiten (Gruppen *et al.*, 1992b). Postulierte Strukturmodelle von AX aus Weizenendosperm, die auf Ergebnissen aus enzymatischen Hydrolysen und Periodatoxidationen basieren, gehen von einer nicht-zufälligen Verteilung der Araf-Substituenten aus (Dervilly-Pinel *et al.*, 2004; Gruppen *et al.*, 1993). Die AX lassen sich in hoch- und niedrigsubstituierte Bereiche einteilen. In den hochsubstituierten Bereichen können Cluster von ein bis drei aufeinanderfolgenden substituierten Xylp-Einheiten vorkommen, gefolgt von einer uXylp. Mit steigender Substitutionsdichte der AX werden vermehrt AXOS mit dXylp und entsprechend weniger mit mXylp freigesetzt, was darauf hindeutet, dass in diesen Bereichen die Disubstitution bevorzugt wird. Die niedrigsubstituierten Bereiche können Abschnitte mit bis zu sieben aufeinanderfolgenden uXylp enthalten. Innerhalb dieser Bereiche treten die substituierten Xylp-Einheiten entsprechend einzeln (isoliert) oder paarweise auf (Gruppen *et al.*, 1992c; Gruppen *et al.*, 1993).

1 Einleitung

Roggen

In den Kleiebestandteilen des Roggens ist der WEAX-Anteil mit 1,04 - 1,21 % (bezogen auf die Trockenmasse) etwas höher als im Weizen. Dabei beträgt das A/X der in Roggenkleie enthaltenen WEAX zwischen 0,72 und 0,78. Im Endosperm von Roggen ist dagegen ein leicht höherer Anteil an WEAX von 1,28 - 1,44 % (bezogen auf die Trockenmasse) zu beobachten. Damit sind etwa ein Drittel der im Endosperm vorkommenden AX wasserlöslich (Shewry *et al.*, 2010). Sie besitzen ein zum Weizen vergleichbares A/X, jedoch kommen vermehrt mXylp vor und weniger uXylp und dXylp (Dervilly-Pinel *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppe um Vinkx (1995) konnte nach gestufter Ammoniumsulfatfällung drei Subfraktionen von WEAX aus Roggen isolieren, die sich erheblich in ihrer Struktur unterschieden. Demnach können die WEAX in niedrigsubstituierte (A/X = 0,55), moderat substituierte (1,09) und hochsubstituierte Populationen (1,42) unterteilt werden. Mit zunehmendem A/X nahmen die prozentualen Anteile an uXylp (von 50 % auf 22 %) und mXylp (von 47 % auf 18 %) ab, während der Anteil an dXylp (von 3 % auf 60 %) größer wurde. Ebenfalls auffällig war der starke Anstieg an mXylp, die in Position O2 substituiert vorlag (O2/O3-Verhältnis = 0,02 - 3,50).

WUAX aus Roggen zeigen eine zum Weizen ähnliche strukturelle Komplexität. Demnach variiert deren A/X zwischen 0,40 und 1,04. Im Durchschnitt sind etwa 49,2 % der Xylp-Einheiten unsubstituiert, 30,6 % monosubstituiert und 20,2 % disubstituiert. Mit zunehmender Substitutionsdichte nimmt der Anteil an dXylp zu. Im Gegensatz zu AX aus Weizen bleibt jedoch der Anteil an mXylp auch in höher substituierten Bereichen relativ konstant (Verwimp *et al.*, 2007).

Gerste

WEAX aus der Gerste kommen zu gleichen Anteilen (bezogen auf die Trockenmasse) in Endosperm (0,15 - 0,38 %) und Kleie (0,15 - 0,35 %) vor (Andersson *et al.*, 2008). Aufgrund des hohen Gehalts an MLG in der Gerste, die durch stufenweise Fraktionierung nur schwer abzutrennen sind, erfordert die strukturelle Analyse der vorhandenen AX einen vorherigen Abbau der MLG mittels Lichenase und β -Glucosidase. Analog zu Weizen und Roggen ist die Struktur der WEAX ebenfalls heterogen, was sich in einem A/X von 0,40 bis 0,92 widerspiegelt. Darüber hinaus enthalten WEAX aus Gerste einen höheren Anteil an O2-monosubstituierten Xylp-Einheiten (~ 5,0 %) (Dervilly *et al.*, 2002).

Ein vergleichbares Substitutionsmuster zeigt sich auch für alkalisch-extrahierte AX aus Gerste, wobei noch größere Mengen an O2-monosubstituierten Xylp (6,2 - 14,0 %) nachgewiesen werden konnten (Storsley *et al.*, 2003). Anhand des Profils enzymatisch freigesetzter XOS und AXOS konnte ein Strukturmodell für WUAX aus Gerste abgeleitet werden. Dabei besteht das AX aus Blöcken, die resistent gegen eine enzymatische Hydrolyse sind, jedoch nicht stark substituiert sind. Daraus lässt sich vermuten, dass diese Blöcke aus ein bis zwei

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

aufeinanderfolgenden substituierten Xylp-Einheiten (mXylp und dXylp) aufgebaut sind, die jeweils durch eine uXylp voneinander getrennt sind. Da im Vergleich zum Ausgangsmaterial nur geringe Mengen an O²-monosubstituierten Xylp und dXylp in den freigesetzten OS nachgewiesen werden konnten, liegen diese Strukturmerkmale vermehrt in den enzymresistenten Bereichen vor (Viëtor *et al.*, 1994) .

Hafer

Der AX-Gehalt von Haferkörnern kann bis zu 11,6 % des Gesamtkorns betragen, wobei das Verhältnis von WEAX zu WUAX ungefähr 1:10 beträgt (Tian *et al.*, 2015). In der Literatur wird von unterschiedlichen A/X-Werten für alkalisch extrahierte AX aus Hafer berichtet. Demnach werden sowohl niedrig substituierte AX mit einem A/X von 0,11 - 0,61 (Tian *et al.*, 2015), als auch moderat substituierte AX (0,45 - 1,00) beschrieben (Virkki *et al.*, 2005). Im Allgemeinen lässt sich jedoch sagen, dass die AX eine geringe Substitutionsdichte zeigen, was auch anhand der Anteile enzymatisch freigesetzter XOS und AXOS aus alkalisch extrahierten AX abgelesen werden kann. Die ermittelten Anteile deuten darauf hin, dass AX aus Hafer eine clusterartige Struktur aufweisen, die durch längere Abschnitte aus uXylp mit partiell eingestreuten mXylp gekennzeichnet ist und zudem Bereiche enthält, die vollständig gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse resistent sind. Bei der Analyse des substituierten Anteils wurden überwiegend O³-monosubstituierte und in geringen Mengen O²-monosubstituierte AXOS freigesetzt, jedoch keine AXOS mit dXylp (Tian *et al.*, 2015). Nach derzeitigem Stand wurden keine Methylierungsdaten zu AX aus Hafer beschrieben, die eine verlässliche Aussage über die vorkommenden Bindungspositionen ermöglichen.

Reis

WEAX aus Reis zeigen ein durchschnittliches A/X von 0,84 mit variablen Anteilen an unterschiedlichen Bindungspositionen (uXylp: 30,6 - 40,4 %; mXylp: 38,2 - 51,8 %, dXylp: 17,6 - 21,4 %). Ähnlich zur Gerste kommen in WEAX aus Reis auch größere Mengen an O²-monosubstituierten Xylp-Einheiten vor (3,7 - 13,9 %) (Rao & Muralikrishna, 2007). Für die WUAX wurde ein zu den WEAX vergleichbares Bindungsmuster beschrieben, wobei der Anteil an mXylp im Endosperm größer ist als in der Kleie (Shibuya & Iwasaki, 1985). Die begrenzte enzymatische Zugänglichkeit der Strukturen führt dazu, dass bisher nur wenig über die Verteilung der Araf-Substituenten bekannt ist.

Hirse

Im Vergleich zu anderen Getreidearten werden für AX aus Hirse höhere A/X (~ 0,8 - 1,2) beschrieben (Subba Rao & Muralikrishna, 2004; Verbruggen *et al.*, 1995). Die größere Anzahl

1 Einleitung

an Araf-Substituenten kommt unter anderem durch das Vorkommen von Arabinobiose-Seitenketten zustande (s. Kapitel 1.2.2.4), die bereits in isolierten AXOS aus Hirse nachgewiesen werden konnten (Mazumder & York, 2010; Verbruggen *et al.*, 1998). Das Substitutionsmuster der AX ist mit dem von Reis vergleichbar und weist prozentuale Anteile von 22,8 - 44,4 % uXylp, 9,7 - 17,8 % dXylp sowie 38,1 - 59,9 % mXylp auf (Verbruggen *et al.*, 1995).

Mais

AX aus Mais weisen eine ausgeprägte strukturelle Komplexität auf, was neben der Substitution mit Araf-Einheiten auf das Vorkommen von komplexen, FS-haltigen Seitenketten und größeren Mengen an Acetylgruppen und Uronsäuren zurückzuführen ist, welche in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben werden (Akshatha *et al.*, 2024). AX, die durch milde alkalische Hydrolyse aus Maisfasern isoliert worden sind, besitzen ein moderates A/X von 0,73. Das A/X in Mais stellt jedoch keinen verlässlichen Indikator für den DS der AX dar, da Mais-AX im Vergleich zu anderen Getreidearten einen höheren Anteil an tXylp-Einheiten (16,1 %) aufweisen, die aus komplexen, FS-haltigen Seitenketten stammen. Zudem enthalten Mais-AX gegenüber Weizen mehr O3-monosubstituierte Xylp (26,0 %) und geringere Anteile an dXylp (10,5 %) (Kang *et al.*, 2019).

1.2.2 Weitere Substituenten

1.2.2.1 Acetylgruppe

Die Substitution mit Acetylgruppen stellt ein weiteres Strukturmerkmal von AX dar. Im Gegensatz zu Glucuronoxylanen aus Harthölzern, in denen Acetylgruppen in den Position O2 und/oder O3 der Xylp-Einheit vorkommen können, liegt in AX nach bisherigen Kenntnissen ausschließlich die O2-Position der Xylp-Einheit acetyliert vor. Aufgrund der eingeschränkten enzymatischen Zugänglichkeit acetylierter Strukturen ist die Anzahl an erbrachten Nachweisen durch Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen nach wie vor begrenzt. Aus Maiskleie konnten beispielsweise FAXOS isoliert werden, bei der eine Xylp-Einheit sowohl eine FS-haltige Arabinoseseitenkette in Position O3 als auch ein Acetylgruppe in Position O2 trägt (Appeldoorn *et al.*, 2013). Eine O2-Acetylierung kann auch am terminalen, nicht-reduzierenden Ende, das in Nachbarschaft zur feruloylierten Arabinoseeinheit liegt, auftreten, wie am Beispiel eines isolierten FAXOS ($X^{2a}A^{5f3}X$) aus Weizenkleie gezeigt werden konnte (Schendel *et al.*, 2016b). In der Literatur werden zudem FAXOS-Strukturen beschrieben, die aus Zellwänden von Bambussprossen (Ishii, 1991) und Zuckerrohr-Bagasse (Azuma *et al.*, 1990) isoliert worden sind, bei der die feruloylierte Araf-Einheit in der Seitenkette in der O2-Position acetyliert ist. Derartige Strukturen konnten in Getreidezellwänden noch nicht nachgewiesen werden. Durch eine intramolekulare Umesterungsreaktion können Acetylgruppen zwischen verschiedenen Positionen innerhalb des Moleküls migrieren, was die exakte Lokalisation der Bindungsposition

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

zusätzlich erschwert. Dabei handelt es sich um eine regioselektive Reaktion, in der die Acetylgruppe nucleophil von einer freien Hydroxylgruppe, unter Ausbildung einer Ringstruktur als Zwischenstufe, angegriffen wird (s. Abbildung 4). Eine Migration der Acetylgruppe konnte sowohl zwischen den Positionen O2, O3 und O4 innerhalb einer tXylp-Einheit (Puchart & Biely, 2015) als auch zwischen den O2-Positionen einer Xylp- und einer Araf-Einheit beobachtet werden, die über eine (1→3)-glykosidische Bindungen miteinander verbunden sind (Puchart *et al.*, 2025).

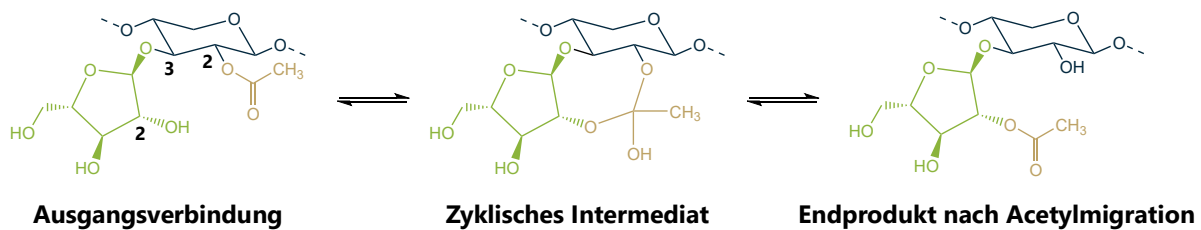


Abbildung 4: Migration der Acetylgruppe (braun) zwischen einer Xylopyranose-Einheit (Xylp, schwarz) und einer (1→3)-glykosidisch gebundenen Arabinofuranose-Einheit (Araf, grün). Durch eine regioselektive Umesterungsreaktion unter Ausbildung einer Ringstruktur als Zwischenstufe kommt es zur Migration der Acetylgruppe zwischen der O2-Position der Xylp und der Araf (modifiziert nach Puchart *et al.*, 2025).

Der Grad der Acetylierung (DAc, engl. *Degree of Acetylation*) ist sowohl von der jeweiligen Getreideart als auch von dem betrachteten Gewebetyp abhängig. Unter den verschiedenen Getreidearten enthalten vor allem AX aus Mais größere Mengen an Acetylgruppen. So beträgt deren Gehalt in Maiskleie beispielsweise 3,9 % bezogen auf die Trockenmasse, wobei durchschnittlich etwa ein Viertel der Xylp-Einheiten acetyliert (DAc = 0,26) vorliegen (Agger *et al.*, 2010). Auch für AX aus Gerste (0,17), Hafer (0,20) und Hirse (0,26) werden größere DAc beschrieben (Kabel *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2015; Verbruggen *et al.*, 1993). AX aus Weizenkleie sind dagegen nur schwach acetyliert (DAc = 0,07) (Kabel *et al.*, 2002).

1.2.2.2 Glucuronsäure und deren 4-O-Methylderivat

Neben Acetylgruppen können auch GlcpA und deren 4-O-Methylderivat über die O2-Position der Xylp-Einheit an das AX-Rückgrat gebunden vorliegen (Verbruggen *et al.*, 1998). GlcpA und das entsprechende 4-O-Methylderivat werden in Methylierungsanalysen von AX nur selten erfasst, da deren Bestimmung eine vorherige Reduktion der Carboxylgruppe voraussetzt, wodurch ein zusätzlicher, zeitaufwendiger Arbeitsschritt notwendig wird (Sims *et al.*, 2018). Ein experimenteller Nachweis, dass die GlcpA tatsächlich als Substituent in AX vorkommt, gelang erstmals durch die Isolierung und Charakterisierung glucuronidierter AXOS aus Sorghumhirse, in denen GlcpA-Substituenten isoliert oder in Nachbarschaft zur einer arabinosylierten Xylp-Einheit auftreten (Verbruggen *et al.*, 1998). In enzymatischen Hydrolysaten aus Hafer konnten ebenfalls glucuronidierte XOS identifiziert werden, die in O2-Position am terminalen, nicht-reduzierenden Ende eine (4-O-Methyl)-GlcpA tragen (Tian *et al.*, 2015). Basierend auf Ergebnissen der Monosaccharidanalyse pflanzlicher Zellwand-PS konnten in

1 Einleitung

wasserunlöslichem Zellwandmaterial aus Sorghumhirse (9,0 %) und Mais (8,5 %) erhöhte Anteile an GlcA nachgewiesen werden (Huisman *et al.*, 2000). Dagegen enthält Weizen geringere Mengen an Uronsäuren, wobei der Anteil in der Kleie (5,0 %) größer ist als im Endosperm (2,6 %) (Nandini & Salimath, 2001). Während der Getreideentwicklung kommt es zu einer lokalen Anreicherung der GlcA in den äußeren Schichten des Getreidekorns. Dabei nimmt der Anteil an GlcA bis zu bestimmten Entwicklungsphasen zu, was auf eine Gewebespezifität bei der Substitution von AX mit GlcA hindeutet (Costes *et al.*, 2025).

1.2.2.3 Seitenketten mit estergebundenen Hydroxyzimtsäuren

Die zu den sekundären Pflanzenstoffen zählenden Hydroxyzimtsäuren sind eine zentrale, strukturgebende Komponente in Getreidezellwänden. Die Substitution der AX mit Hydroxyzimtsäuren stellt ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu Xylanen aus dikotylen und nicht-commeliniden monokotylen Pflanzen dar. Neben *trans*-FS, die in Getreidezellwänden am häufigsten vorkommt, sind auch die *trans-p*-Cumarsäure und die *trans*-Sinapinsäure von Bedeutung (s. Abbildung 5). Die *cis*-FS, die *cis-p*-Cumarsäure und die *trans*-Kaffeesäure

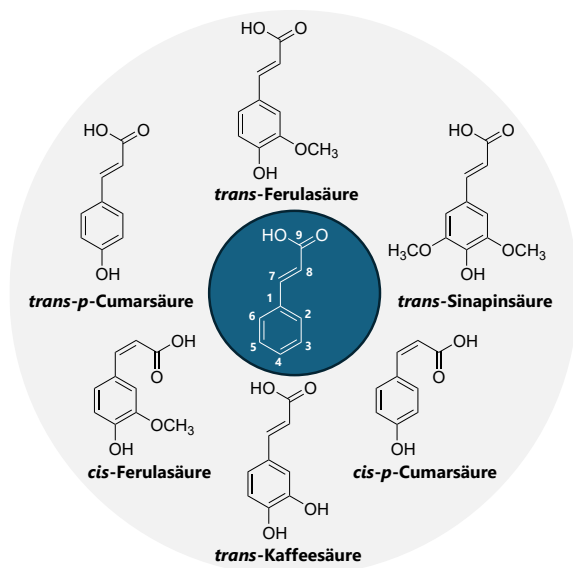


Abbildung 5: Strukturen der nach alkalischer Hydrolyse von Getreidezellwänden freigesetzten Hydroxyzimtsäuren. *p* = para-Stellung der phenolischen Hydroxygruppe

(s. Abbildung 5) konnte ebenfalls in kleineren Mengen aus verschiedenen Getreidezellwänden durch alkalische Hydrolyse freigesetzt werden (Bunzel, 2001; Schendel *et al.*, 2015). Die *cis*-konfigurierten Hydroxyzimtsäuren kommen aber in der Regel nicht in nativer Form vor, da Pflanzen fast ausschließlich die energetisch stabileren *trans*-Isomere bilden. Im Zuge der Probenaufarbeitung kann es durch äußere Lichteinflüsse zur Isomerisierung der Doppelbindung kommen und damit zur Bildung von *cis*-Isomeren (Moni *et al.*, 2021). Der FS-Gehalt (Summe aus *cis*- und *trans*-Isomer) in den unlöslichen Ballaststoffen (UBS) aus verschiedenen Getreidearten liegt zwischen 4,4 mg/g UBS und 8,3 mg/g UBS mit Ausnahme von

Mais, der große Mengen an zellwandgebundener FS enthält (24,8 mg/g UBS). In Mais und Reis kommen zudem größere Mengen an *trans*- und *cis-p*-Cumarsäure vor (2,2 mg/g UBS) (Bunzel, 2001). Zum Nachweis der Bindung der *trans*-FS an das AX über die O5-Position der Araf kann eine milde Säurehydrolyse durchgeführt werden (Saulnier *et al.*, 1995). Die glykosidischen Bindungen der Araf zum Rückgrat der AX sind unter diesen Bedingungen nicht stabil, weshalb es zu einer teilweisen Abspaltung der FS-haltigen Seitenketten kommt ohne Spaltung des Esters. Dies ermöglicht die Analyse FS-haltiger Seitenkettenstrukturen, die eine größere

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

Komplexität aufweisen können. Tabelle 1 zeigt die nach milder Säurehydrolyse der UBS aus verschiedenen Getreidearten nachgewiesenen Mengen FS-haltiger Seitenketten.

Tabelle 1: Gehalt ($\mu\text{mol/g}$ unlösliche Ballaststoffe) an ferulasäurehaltigen Seitenketten von Arabinoxylanen, die nach milder Säurehydrolyse aus verschiedenen Getreidearten freigesetzt worden sind, modifiziert nach Schendel *et al.*, 2016. FA, 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf; FAX, β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf; FAXG, α -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf

	FA ^a	FAX ^a	FAXG ^a
Weizen	29,82 $\pm$ 1,47	0,72 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,01
Roggen	21,59 $\pm$ 6,30	1,11 $\pm$ 0,25	0,15 $\pm$ 0,03
Dinkel	38,17 $\pm$ 3,18	0,99 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,02
Gerste	23,74 $\pm$ 4,04	2,10 $\pm$ 0,41	- ^b
Hafer	4,97 $\pm$ 1,61	1,10 $\pm$ 0,41	- ^b
Rispenhirse	26,82 $\pm$ 1,55	1,25 $\pm$ 0,05	0,25 $\pm$ 0,01
Langkornreis	27,58 $\pm$ 4,10	2,21 $\pm$ 0,24	0,71 $\pm$ 0,03
Mais	100,23 $\pm$ 2,75	12,70 $\pm$ 0,73	3,78 $\pm$ 0,28

^aMittelwert $\pm$ Standardabweichung (n = 3). Alle Werte wurden um Restprotein- und Aschegehalt korrigiert.

^bDetektiert, aber nicht quantifizierbar

Die ubiquitär in allen Getreidearten vorkommende Seitenkette aus 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf (FA), deren Struktur in Abbildung 6 dargestellt ist, wird dabei anteilmäßig am meisten freigesetzt (Schendel *et al.*, 2016a). Die FA-Seitenkette ist über die O3-Position monosubstituierter Xylp an das Rückgrat der AX geknüpft. FAXOS, bei denen die entsprechende FA-Seitenkette (*cis*- und *trans*-Konfiguration) entweder am terminalen, nicht-reduzierenden Ende (A^{5f3}X) oder innerhalb des Xylp-Rückgrats gebunden vorliegt ($\text{XA}^{5f3}\text{X}/\text{XA}^{5f3}\text{XX}$), wurden bereits in verschiedenen Getreidearten wie Weizen, Roggen oder Reis durch enzymatische Hydrolyse mit *endo*-(1 $\rightarrow$ 4)-Xylanasen identifiziert (Bunzel *et al.*, 2002; Schendel *et al.*, 2016b; Steinhart & Bunzel, 2003). Interessanterweise konnte bis heute nicht nachgewiesen werden, dass FA-Seitenketten auch in disubstituierten oder in O2-monosubstituierten Xylp-Einheiten vorkommen. Sie können jedoch in Nachbarschaft zu einer mXylp-Einheit auftreten, wie am Beispiel isolierter Oligosaccharide ($\text{XA}^3\text{A}^{5f3}\text{X}$ und $\text{A}^2\text{A}^{5f3}\text{X}$) aus mehrjährigem Weizengras (*Thinopyrum intermedium*) und Weizenkleie (*Triticum aestivum*) gezeigt wurde (Schendel *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2016b). Während der überwiegende Teil der in der Pflanze gebildeten *trans-p*-Cumarsäure über Esterbindungen an Monolignol-Einheiten des Lignins gebunden vorliegt, kommen auch geringe Mengen als 5-*O-trans*-Cumaryl-L-Araf-Seitenketten von AX vor (s. Abbildung 6), welche in sauren Hydrolysaten aus Maiskleie identifiziert wurden (Allerdings *et al.*, 2006; Ralph *et al.*, 1994a). Obwohl *trans*-Sinapinsäure in den alkalischen Hydrolysaten von Getreidezellwänden vorzufinden ist, fehlt bis heute der Nachweis der zu FA entsprechenden Seitenkette (Bunzel *et al.*, 2002).

1 Einleitung

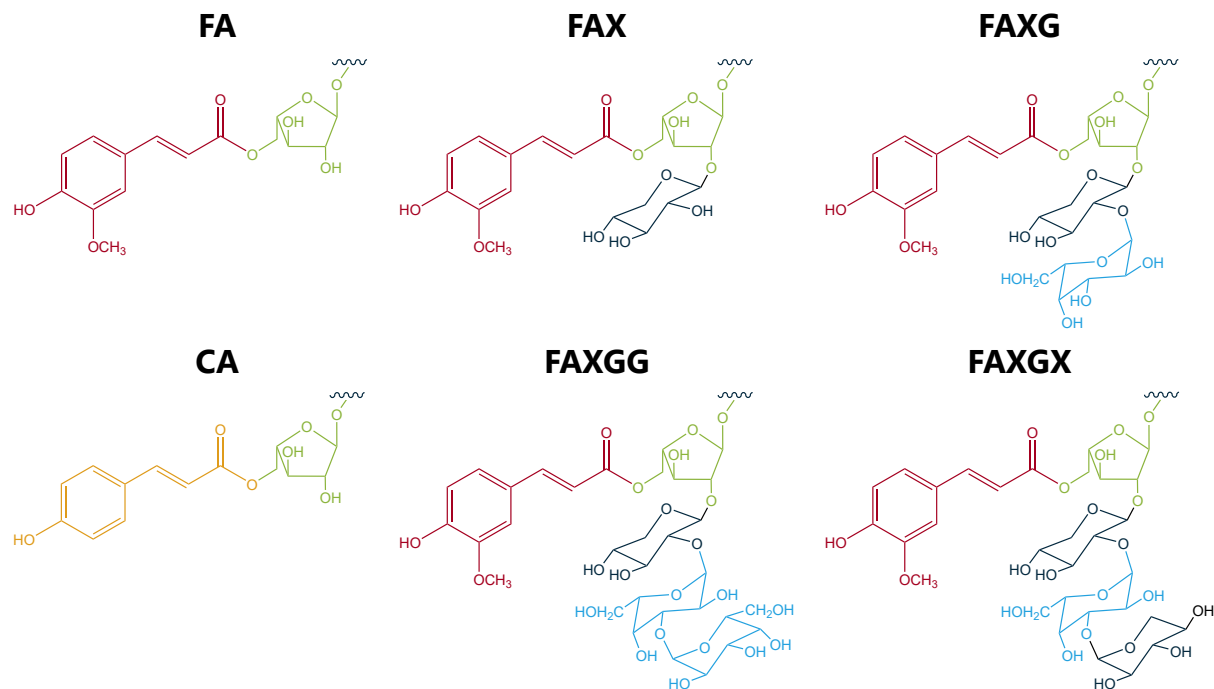


Abbildung 6: Strukturen bekannter hydroxyzimtsäurehaltiger Seitenkettenelemente in Arabinoxylanen, zusammengesetzt aus Arabinofuranose (Araf, grün), Xylopyranose (Xylp, schwarz), Galactopyranose (Galp, hellblau) sowie *trans*-Ferulasäure (rot) und *para*-Cumarsäure (orange). FA, 5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf; FAX, β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf; FAXG, α -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf; CA, 5-*O-trans-para*-Cumaryl-L-Araf; FAXGX, α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf; FAXGG, α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf

Eine weitere, neben FA in den meisten Getreidearten auftretende FS-haltige Seitenkette ist die β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf (FAX), deren Struktur in Abbildung 6 dargestellt ist (Allerdings *et al.*, 2006; Bunzel *et al.*, 2002; Schendel *et al.*, 2016a). Mit Ausnahme von Mais mit ca. 13 $\mu\text{mol/g}$ UBS (s. Tabelle 1) kommt diese jedoch weitaus seltener vor als die FA-Seitenkette (Schendel *et al.*, 2016a). Bunzel und Mitarbeiter (2002) konnten zudem eine entsprechende AXOS-Standardsubstanz aus den UBS von Wildreis isolieren und charakterisieren, die die entsprechende FAX-Seitenkette in der O3-Position gebunden an das Xylp-Rückgrat trägt (D^{2,5f3}X).

Die FAX-Seitenkette kann darüber hinaus in Position O2 der Xylp mit einer zusätzlichen α -L-Galp-Einheit substituiert sein (FAXG). Die entsprechende Seitenkette wurde erstmals aus Maiskleie isoliert und charakterisiert (Saulnier *et al.*, 1995). Schendel und Mitarbeiter (2016) konnten zudem nachweisen, dass diese auch in geringen Mengen in anderen Getreidearten vorkommt (s. Tabelle 1). Durch die enzymatische Hydrolyse von vorbehandeltem Zellwandmaterial aus Mais ließen sich außerdem acetylierte AXOS mit FAXG-Seitenkette identifizieren (Appeldoorn *et al.*, 2010).

Die von Allerdings und Mitarbeitern (2006) aus Maiskleie isolierten, komplexen Seitenketten α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf (FAXGG) und α -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Galp-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 2)-5-*O-trans*-Feruloyl-L-Araf (FAXGX) haben das

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

Spektrum möglicher FS-haltiger Seitenketten nochmals erweitert (s. Abbildung 6). Nach bisherigen Kenntnissen ist deren Vorkommen jedoch auf Mais-AX beschränkt und AXOS mit entsprechender FAXGG- bzw. FAXGX-Seitenkette wurden bis dato nicht nachgewiesen.

1.2.2.4 Oligomere, ferulasäurefreie Seitenketten

Neben den FS-haltigen, komplexen Seitenketten wird häufig auch das Vorkommen oligomerer Seitenketten beschrieben, die keine ester gebundenen Hydroxycimtsäuren tragen. Diese Annahme wird oftmals auf Basis der Ergebnisse der Methylierungsanalyse von Zellwandmaterial aus Getreide getroffen, bei der häufig (1→2)-, (1→3)- und (1→5)-Araf nachgewiesen wird. AXOS, die eine (1→2)-gebundene Arabinobiose-Seitenkette in der O3-Position der Xylp tragen, wurden beispielsweise aus AX der Sorghum- und Rutenhirse isoliert (Mazumder & York, 2010; Verbruggen *et al.*, 1998). Bei AX, die alkalisch aus der pflanzlichen Zellwand extrahiert wurden, ist es nicht auszuschließen, dass vorkommende Seitenketten ursprünglich eine ester gebundene Hydroxycimtsäure enthielten. So handelt es bei der oftmals als „nativ vorkommend“ beschriebenen, oligomeren Seitenkette α -D-Xylp-(1→2)-L-Ara vermutlich um ein experimentelles Artefakt, das im Zuge der alkalischen Extraktion durch Spaltung der Esterbindung aus der FAX-Seitenkette freigesetzt wurde (Pastell *et al.*, 2009). Eine Seitenkette, deren Vorkommen aber zweifelsfrei bestätigt ist, ist die α -D-Xylp-(1→3)-L-Ara (s. Abbildung 7). Durch Isolierung und Strukturcharakterisierung der Seitenkette aus Mais-AX, welches nicht alkalisch extrahiert wurde, konnte gezeigt werden, dass diese natürlicherweise in AX aus Getreide vorkommt (Schendel & Bunzel, 2025).

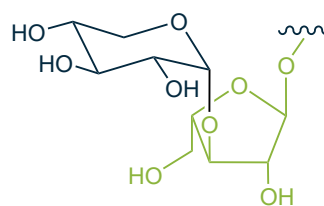


Abbildung 7: Struktur der in natürlicherweise in Arabinoxylanen vorkommenden, oligomeren Seitenkette, bei der eine α -D-Xylopyranose (schwarz) über eine (1→3)-glykosidische Bindung an die α -L-Arabinofuranose (grün) geknüpft ist.

Strukturen, die (1→5)-glykosidisch gebundene Araf enthalten, stammen möglicherweise auch aus oligomeren Seitenketten (Izydorczyk & Biliaderis, 1993), aber diese Seitenketten sind bis heute nicht eindeutig nachgewiesen worden. (1→5)-gebundene Araf ist eine häufig vorkommende Struktureinheit in Arabinanen (vgl. Kapitel 1.1.5), weshalb eine Freisetzung aus mitextrahierten Pektinen denkbar wäre.

1.2.3 Die Ausbildung von Ferulasäure-Crosslinks

Durch die photochemische und/oder enzymkatalysierte, oxidative Dimerisierung der an AX gebundenen Hydroxycimtsäuren, allen voran der *trans*-FS, kommt es zu einer inter- und/oder intramolekularen Vernetzung von AX. Diese Crosslinks tragen entscheidend zur Stabilität und Festigung der Getreidezellwände bei und stärken damit zugleich deren Abwehr gegenüber pathogenen Organismen wie Pilzen oder Insekten (Bunzel, 2010). Darüber hinaus können auch

1 Einleitung

Vernetzungen der AX zu anderen Zellwandkomponenten wie Lignin und Proteinen entstehen (Piber & Koehler, 2005; Ralph *et al.*, 1995).

1.2.3.1 Cyclobutandimere

Hydroxyzimtsäuren können über eine lichtinduzierte [2+2]-Cycloaddition Dimere ausbilden, sogenannte Truxillsäure („*Head-to-Tail*“)- bzw. Truxinsäure („*Head-to-Head*“)-Derivate (vgl. Abbildung 8). Hierbei kommt es zur Bildung eines Cyclobutanrings zwischen den Positionen 7 und 8 der Hydroxyzimtsäuren (vgl. Abbildung 5 in Kapitel 1.2.2.3). Diese Reaktion konnte *in-vitro* sowohl an freier als auch an gebundener *trans*-FS und *trans*-*p*-Cumarsäure, die Homo- und Heterodimere ausbilden, gezeigt werden (Ford & Hartley, 1989; Hartley *et al.*, 1990). In getrockneten Halmen aus Maispflanzen, die über einen längeren Zeitraum UV-Licht ausgesetzt waren, wurden nach alkalischer Hydrolyse bis zu 18 verschiedene Cyclobutan-Dimere aus *trans*-FS und/oder *trans*-*p*-Cumarsäure nachgewiesen (Dobberstein & Bunzel, 2010a). Auch in Extrakten aus Blättern der Gerste konnten Cyclobutandimere identifiziert werden (Ostrowski *et al.*, 2016). Obwohl die Bedeutung der Photodimerisierung im Vergleich zur enzymkatalysierten, oxidativen Kopplung als gering eingeschätzt wird, fehlt es nach wie vor an analytischen Methoden, die neben dem qualitativen Nachweis eine Quantifizierung dieser Substanzen ermöglichen. Methoden, die auf einer gaschromatographischen (GC) oder flüssigchromatographischen Trennung (LC, engl. *Liquid Chromatography*) in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS) bzw. Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) beruhen, bilden dafür vielversprechende Ansätze (Dobberstein & Bunzel, 2010a; Ostrowski *et al.*, 2016).

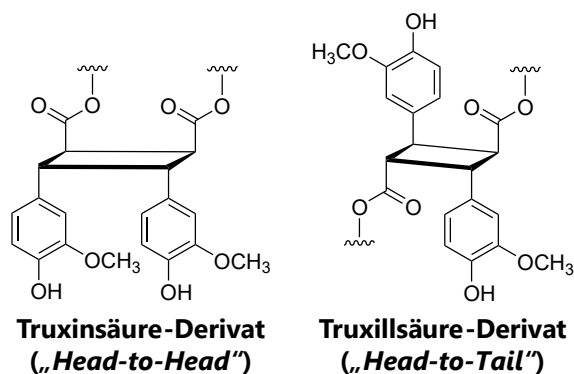


Abbildung 8: Mögliche Strukturen der durch Photodimerisierung entstehenden Cyclobutandimere am Beispiel der *trans*-Ferulasäure

1.2.3.2 Dehydrodiferulasäuren

Die radikalische Dimerisierung von estergebundenen FS-Resten zu Dehydrodiferulasäuren (DFS) ist ein oxidativer Kopplungsprozess, der in der pflanzlichen Zellwand durch die dort lokalisierten Enzyme Peroxidase und/oder Laccase katalysiert wird (s. Abbildung 9A). Während Peroxidasen zusätzlich H_2O_2 als Substrat benötigen, erfolgt die Kopplung mit Laccase bereits

1.2 Die Struktur der ferulasäurehaltigen Arabinoxylane

mit Luftsauerstoff (Mnich *et al.*, 2020; Ralph *et al.*, 2004). Die Abstraktion des phenolischen Wasserstoffs in Position O4 der FS führt zur Bildung eines Phenoxyradikals. Durch die Delokalisierung des Radikals können verschiedene mesomere Grenzstrukturen (s. Abbildung 9A) entstehen, die theoretisch zu einer 5-5-, 4-O-5-, 8-5-, 8-8- und 8-O-4-Kopplung führen können (Bunzel, 2010).

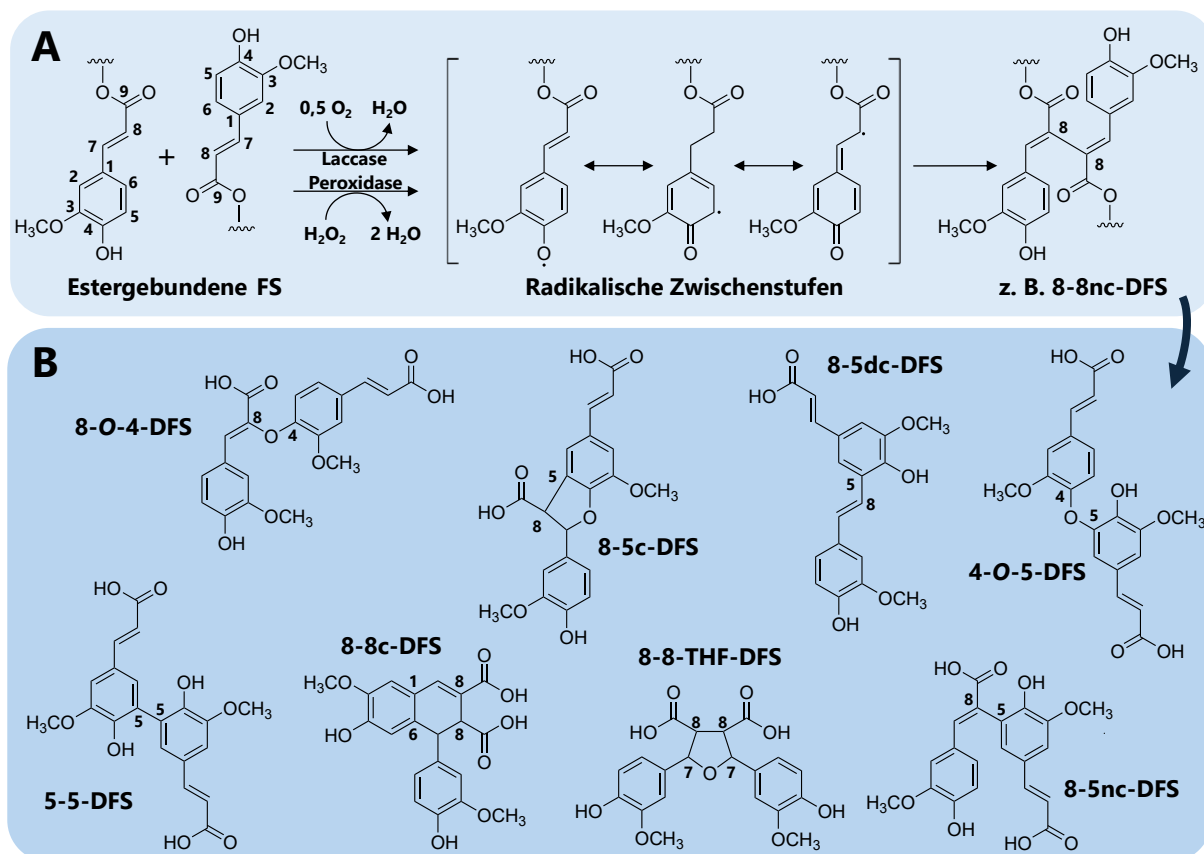


Abbildung 9: A: Enzymkatalysierte (Peroxidase/ H_2O_2 und/oder Laccase/ O_2), oxidative Kopplung zweier estergebundener Ferulasäure (FS)-Reste zu Dehydrodiferulasäuren (DFS). Die Reaktion erfolgt über radikalische, mesomeriestabilisierte Zwischenstufen und kann neben der 8-8nc-DFS auch noch zu weiteren, unterschiedlichen Kopplungen führen (B). c, zyklische Form; nc, offene (nicht-zyklische) Form; dc, decarboxylierte Form; THF, Tetrahydrofuran

Wie bereits am Beispiel der monomeren Hydroxyzimtsäuren (vgl. Kapitel 1.2.2.3) beschrieben wurde, werden die Esterbindungen zwischen den AraF-Einheiten und der DFS durch eine alkalische Hydrolyse gespalten. Nach der Ansäuerung des Hydrolysats und der Extraktion der DFS in organische Lösungsmittel, beispielsweise Diethylether oder Ethylacetat, können diese im Anschluss mit geeigneten LC- und GC-basierten Methoden analysiert werden (Bunzel *et al.*, 2001; Dobberstein & Bunzel, 2010b). Gleichwohl sind zur Quantifizierung dieser Verbindungen Standardsubstanzen notwendig, die sowohl aus der pflanzlichen Zellwand isoliert oder *in-vitro* synthetisiert worden sind (Dobberstein & Bunzel, 2010b; Ralph *et al.*, 1994b). Zu den in Getreidezellwänden identifizierten DFS zählen die 8-5-, 8-8-, 5-5-, 8-O-4- und die 4-O-5-DFS (s. Abbildung 9B), wobei die 8-5-DFS meist dominieren (Bunzel *et al.*, 2001; Dobberstein & Bunzel, 2010b). Der Gehalt an DFS in den UBS verschiedener Getreidearten variiert zwischen

1 Einleitung

2,4 und 12,6 mg/g (Bunzel *et al.*, 2001). Einige der DFS, treten zusätzlich in zyklischer (c, engl. *cyclic*), nicht-zyklischer (nc, engl. *non-cyclic*) und decaboxylierter (dc) Form auf, sowie als Tetrahydrofuran-Dimere (s. Abbildung 9B). Es wird angenommen, dass sowohl die 8-5nc- als auch die 8-5dc-DFS nicht nativ in Pflanzen vorkommen, sondern ausschließlich im Zuge der alkalischen Hydrolyse aus der 8-5c-DFS freigesetzt werden (Bunzel, 2010). Obwohl die Bildung von Dehydrodimeren aus *cis-p*-Cumarsäure theoretisch möglich ist, konnten derartige Strukturen bislang in pflanzlichem Gewebe nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden sowohl Homodimere der *trans*-Sinapinsäure als auch Kreuzprodukte mit FS in den Zellwänden von Getreiden identifiziert (Bunzel *et al.*, 2003).

Im Zuge des radikalischen Kopplungsprozesses können darüber hinaus Dehydrotrimere (TriFS) bzw. Dehydrotetramere der FS ausgebildet werden. TriFS und Dehydrotetramere konnten beispielsweise aus Maiskleie isoliert werden (Bunzel *et al.*, 2006). Auf deren Struktur wird aber an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Die Ausbildung höherer Oligomere der FS in pflanzlichen Zellwänden von Getreide tritt jedoch weitaus seltener auf als die Dimerisierung, da hierfür die gleichzeitige, räumliche Nähe von mehreren FS-Resten notwendig ist, unabhängig davon, ob die Verknüpfung inter- oder intramolekular stattfindet (Bunzel, 2010). So liegt beispielsweise der Gehalt an TriFS in den UBS aus Mais bei 0,92 mg/g (Dobberstein & Bunzel, 2010b).

Trotz umfassender Studien zur Strukturcharakterisierung und Quantifizierung von FS-Oligomeren wurde der Nachweis der Bindung von DFS an AX bislang nur selten erbracht. Über eine milde Säurehydrolyse (vgl. Kapitel 1.2.2.3) oder enzymatisch mit Hilfe von Arabinofuranosidasen, die die glykosidische Bindungen zum Rückgrat der AX spalten, können diarabinosylierte DFS freigesetzt werden, bei denen je eine reduzierende Araf-Einheit an die Carboxylgruppen der DFS gebunden vorliegt (Bunzel, 2010). Auf diese Weise konnten diarabinosylierte 5-5-DFS, 8-O-4-DFS und 8-8c-DFS nachgewiesen werden (Allerdings *et al.*, 2005; Bunzel *et al.*, 2008; Saulnier *et al.*, 1999). Allerdings und Mitarbeiter (2005) identifizierten zudem Strukturen, bei denen die 8-O-4-DFS neben einer gebundene Araf-Einheit auch noch eine ursprüngliche FAX-Seitenkette (vgl. Kapitel 1.2.2.3) enthält (s. Abbildung 10). Demnach sind auch komplexere FS-haltige Seitenketten an der Ausbildung von FS-Crosslinks beteiligt. Obwohl die 8-5c-DFS die dominierende DFS in nahezu allen Getreidearten darstellt, konnte die diarabinosylierte Form bislang nicht aus den Zellwänden von Getreide isoliert werden.

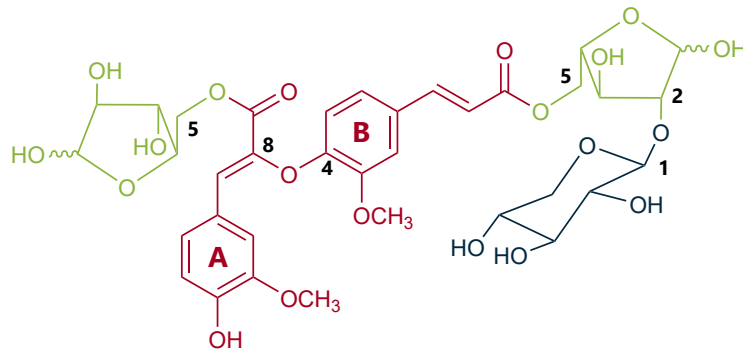


Abbildung 10: Struktur des aus Maiskleie isolierten 8-O-4-Diferulasäure (DFS)-Oligosaccharids. Eine L-Arabinofuranose-Einheit (Araf, grün) ist über die O5-Position an die Einheit A der 8-O-4-DFS (rot) gebunden. Die an Einheit B verknüpfte Araf trägt zusätzlich eine β -D-Xylopyranose (schwarz) in Position O2 und entstammt ursprünglich der FAX-Seitenkette. Darüber hinaus wurden Strukturen nachgewiesen, bei denen beide Einheiten der 8-O-4-DFS ausschließlich arabinosyliert vorliegen oder bei denen Einheit A die FAX-Seitenkette darstellt.

1.3 Enzymatischer Abbau von Arabinoxylanen

Der enzymatische Abbau von AX ist sowohl für die Strukturanalyse als auch für zahlreiche industrielle Anwendungen von zentraler Bedeutung. In der Backwarenindustrie beispielsweise werden häufig AX abbauende Xylanasen zur Verbesserung der rheologischen Teigeigenschaften zugesetzt (Butt *et al.*, 2008). Gleichmaßen können in der Schweine- und Geflügelmast durch den enzymatischen Abbau von AX deren antinutritive Eigenschaften in getreidehaltigen Futtermitteln minimiert werden, was zu einer besseren Nährstoffverfügbarkeit und Futtereffizienz führen kann (He *et al.*, 2020; Zarghi, 2018). Die Auswahl geeigneter Enzyme oder Enzymgemische zur Depolymerisierung richtet sich nach dem angestrebten Zweck der Hydrolyse, dem Ursprung des Xylans und den vorherigen Verarbeitungsschritten, z. B. der eingesetzten Extraktionsmethode. Die Depolymerisierung von AX kann durch eine Reihe spezifischer Enzyme wie *endo*- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylanasen, β -Xylosidasen, α -L-Arabinofuranosidasen, α -Glucuronidasen oder Acetylxylosterasen erfolgen (Biely *et al.*, 2016; Hamann & Noronha, 2022). Im Allgemeinen wirken diese Enzyme synergistisch, d. h. durch den Einsatz einer Enzymmischung lassen sich AX deutlich effizienter abbauen als bei einer sequentiellen Anwendungen einzelner Enzyme (Schmitz *et al.*, 2022).

Endo- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylanasen spalten die β -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidischen Bindungen innerhalb des Xylp-Rückgrats der AX. Dies führt zur Freisetzung von XOS und AXOS, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch als (A)XOS zusammengefasst werden. Sowohl in der Literatur als auch in der Datenbank für kohlenhydrataktive Enzyme (CAZymes, engl. *Carbohydrate-Active enZymes*) werden bis dato neun verschiedene Glykosidhydrolase (GH)-Familien beschrieben, die eine derartige Aktivität zeigen: GH5 (Subfamilien 4 und 25), GH7, GH8, GH10, GH11, GH30 (Subfamilien 7 und 8), GH43, GH51 und GH141 (Mendonça *et al.*, 2023). Für den Abbau von AX sind vor allem die Familien GH5, GH10 und GH11 von Bedeutung, im Falle einer Substitution mit GlcPA bzw. mit dessen 4-O-Methylderviat auch noch die Familie GH30 (Biely *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2011; Pollet *et al.*, 2010). Für analytische Anwendungen werden diese Enzyme

1 Einleitung

häufig rekombinant aus verschiedenen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen gewonnen. Neben dem Ursprung der Enzyme und ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Familien wird die Aktivität und Spezifität von einer Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst. Dazu zählen die Anzahl und Verteilung der Substituenten entlang des AX-Rückgrats, der DP des AX, die strukturelle Zugänglichkeit im Zellwandverbund sowie physikochemische Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und das Vorhandensein von Aktivatoren bzw. Inhibitoren. Auch die Enzymkonzentration und das Enzym-Substrat-Verhältnis sind entscheidend für die katalytische Wirksamkeit. Im Folgenden wird näher auf das Spaltungsmuster und das Produktspektrum der Xylanasen eingegangen.

GH10-Xylanasen spalten bevorzugt glykosidische Bindungen, die benachbart zu mono- bzw. disubstituierten Xylp-Einheiten in Richtung des nicht-reduzierenden Endes der AX liegen. Sie benötigen zwei aufeinanderfolgende uXylp-Einheiten zur Spaltung und generieren daher in der Regel kürzere OS, vorwiegend mit einem DP von 2 - 5. Lineare XOS werden auf bis zu zwei Einheiten abgebaut (X_2). In Abhängigkeit der jeweiligen Bindungsposition der Araf-Einheit stellen A^3X , A^2XX und $A^{2+3}XX$ die kleinsten, substituierten Hydrolyseprodukte dar (Biely *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010). Darüber hinaus tolerieren GH10-Xylanasen auch Araf-Substituenten in der +II Bindungsstelle des Enzyms, weshalb es beispielsweise auch zur Freisetzung von XA^2X bzw. XA^3X kommen kann, deren nicht-reduzierendes Ende unsubstituiert ist (Davies *et al.*, 1997; McCleary *et al.*, 2015). Im Vergleich zu den Vertretern der GH10-Familie sind in Hydrolysaten der GH11-Xylanasen größere (A)XOS mit einem DP von 3 - 10 vorzufinden. Da sie bis zu drei aufeinanderfolgende uXylp-Einheiten für die Spaltung benötigen, werden sie durch eine größere Substitution mit Araf deutlich stärker in ihrer Hydrolyseaktivität beeinträchtigt als GH10-Xylanasen. Je nach GH11-Xylanase stellt X_2 oder X_3 das kleinste, unsubstituierte OS dar. Alle GH11-Xylanasen haben jedoch gemeinsam, dass sie AXOS mit einer uXylp-Einheit am nicht-reduzierenden Ende und mit zwei ausgehend vom reduzierenden Ende bilden. Demzufolge besteht das Rückgrat der AXOS aus mindestens vier Xylp-Einheiten, deren vorletzte Einheit in Richtung des nicht-reduzierenden Endes substituiert vorliegt, wie in XA^3XX oder $XA^{2+3}XX$ (Biely *et al.*, 2016; McCleary *et al.*, 2015). In einer Studie der Arbeitsgruppe um Gruppen (1992c) konnte zudem gezeigt werden, dass *endo*- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylanasen auch höher substituierte Bereiche von AX hydrolysieren können, wenngleich zu einem geringeren Ausmaß. Dies führte zur Freisetzung mehrfach substituierter AXOS mit aufeinanderfolgenden, substituierten Xylp-Einheiten wie $XA^3A^{2+3}XX$ oder $A^{2+3}A^{2+3}XX$. Hierbei ist das Muster an unsubstituiert vorliegenden Xylp-Einheiten vergleichbar mit denen der kleineren AXOS. Die Hydrolyse mit GH10- bzw. GH11-Xylanasen führt auch zur Freisetzung von FAXOS mit z. T. komplexeren, FS-haltigen Seitenketten. Einige dieser Strukturen wurden bereits in Kapitel 1.2.2.3 beschrieben. Analog zu den AXOS zeigt sich, dass $A^{5f3}X$, $XA^{5f3}X$ und $XA^{5f3}XX$ die kleinsten Hydrolyseprodukte darstellen (Schendel *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2016b). Weiterhin kann die Acetylierung des AX-Rückgrats die Aktivität von *endo*-Xylanasen teilweise einschränken. Demnach tolerieren GH10-Xylanasen keine acetylierten Xylp-Einheiten in den

1.3 Enzymatischer Abbau von Arabinoxylanen

Bindungspositionen -II, -I und +II. Durch den Einsatz von AcetylxyLANesterasen können Acetylgruppen aus den Position O2 und/oder O3 der Xylp-Einheit abgespalten werden, was die enzymatische Zugänglichkeit des Rückgrats verbessert (Biely *et al.*, 2013).

Endo-Xylanasen der Familie GH5 weisen eine hohe Substratspezifität gegenüber AX, weshalb sie häufig auch als Arabinoxylanasen bezeichnet werden. Anders als GH10- und GH11-Xylanasen greifen sie ausschließlich hochsubstituierte Bereiche von AX an und zeigen eine hohe Affinität gegenüber in O3-Position mXylp-Einheiten. Die Bindungsstellen -II bis +II können jeweils mit substituierten Xylp-Einheiten besetzt sein, entscheidend für die Hydrolyse ist jedoch die Besetzung der -I Bindungsstelle. Die Hydrolyse von AX mit GH5-Xylanasen führt daher überwiegend zur Freisetzung von AXOS, deren reduzierende Xylp-Einheit in Position O3 monosubstituiert vorliegt (Biely *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 1997).

GH30-Xylanasen spalten bevorzugt an GlcpA- bzw. 4-O-Methyl-GlcpA substituierten Bereichen des Xylp-Rückgrats. Glucuronoxylane aus Harthölzern, bei denen durchschnittlich jede zehnte Einheit mit Uronsäuren substituiert vorliegt, werden durch diese Xylanasen effektiv zu glucuronylierten XOS abgebaut. Aus diesen können durch den Einsatz von α -Glucuronidasen, welche die (1→2)-Bindung der GlcpA bzw. 4-O-Methyl-GlcpA zum Rückgrat spalten, XOS gebildet werden. Bisher ist wenig bekannt über die Wirkungsweise von GH30-Xylanasen gegenüber GAX, es wird jedoch eine ähnliches Spaltungsmuster erwartet. Demnach wird die zweite glykosidische Bindung nach der Verzweigung in Richtung des reduzierenden Endes gespalten. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl an GlcpA- bzw. 4-O-Methyl-GlcpA-Substituenten in GAX wären große OS zu erwarten. Ferner ist noch unklar, wie benachbarte Araf-Substituenten die Erkennung der glucuronidierten Einheit beeinflussen und ob GH30-Xylanasen auch anderen Seitenketten erkennen können (Biely *et al.*, 2016; Nordberg Karlsson *et al.*, 2018).

Anders als bei den *endo*-Xylanasen, die bevorzugt glykosidische Bindungen innerhalb der Hauptkette der AX spalten, handelt es sich bei der Gruppe der β -Xylosidasen um Enzyme mit *exo*-Aktivität. Sie setzen monomere Xyl aus dem terminalen, nicht-reduzierenden Ende des AX-Rückgrats frei. Lineare XOS können somit sukzessive zu Monomeren abgebaut werden. Darüber hinaus wird auch von einer Aktivität dieser Enzyme gegenüber Seitenkettenstrukturen von AX berichtet. Demnach konnte durch den Einsatz von β -Xylosidasen die FAX-Seitenkette zu FA (vgl. Kapitel 1.2.2.3) umgewandelt werden (Wende & Fry, 1997a). β -Xylosidasen gehören den GH-Familien 3, 39, 43 und 52 an, deren Substratspezifität je nach Herkunft stark variieren kann (Lagaert *et al.*, 2014).

α -L-Arabinofuranosidasen können in die GH-Familien 43, 51, 53 und 62 eingeteilt werden. Grundsätzlich lassen sich zwei Enzymgruppen voneinander abgrenzen, die sich in ihrer Selektivität bezüglich der Bindungsposition der Araf-Einheiten unterscheiden. Demnach setzen α -L-Arabinofuranosidasen mit m2,3-Aktivität bevorzugt Araf aus den Positionen O2 oder O3 von mXylp-Einheiten frei und sind in allen erwähnten GH-Familien vertreten. Die kleinere

1 Einleitung

Gruppe der d3 α -L-Arabinofuranosidasen greifen ausschließlich α -(1 $\rightarrow$ 3)-gebundene Araf in dXylp-Einheiten an, zu der beispielsweise Vertreter der GH43-Familie aus *Bifidobacterium adolescentis* oder *Humicola insolens* zählen (Biely *et al.*, 2016; Lagaert *et al.*, 2014; McCleary *et al.*, 2015). Seitenkettenstrukturen, in denen zusätzlich eine FS in O5-Position oder eine β -D-Xylp in O3-Position der Araf gebunden ist (vgl. Kapitel 1.2.2.3 und 1.2.2.4), sind in der Regel resistent gegenüber einer Hydrolyse mit α -L-Arabinofuranosidasen. Die Ausnahme bilden GH51-Enzyme aus *Clostridium thermocellum* und *Cellvibrio japonicus*. Die Inkubation isolierter FAXOS mit diesen Enzymen führte zu einer partiellen Freisetzung der FA-Seitenkette (Schendel *et al.*, 2016c). Der Abbau komplexerer FS-haltiger Seitenketten wie FAX oder FAXG erfordert darüber hinaus den Einsatz von weiteren Enzymen. FS-Esterasen katalysieren die Hydrolyse der Esterbindung in O5-Position zur Araf, was zur Freisetzung von *trans*-FS führt (Biely *et al.*, 2016). Darüber hinaus lassen sich mit Hilfe dieser Enzyme auch DFS aus AX freisetzen, was eine schonendere Alternative zur alkalischen Hydrolyse darstellt (Lin *et al.*, 2022). Um die Galp-Einheit aus der FAXG-Seitenkette abzuspalten, können beispielsweise α -Galactosidasen eingesetzt werden. In Abbildung 11 sind die am enzymatischen Abbau von AX beteiligten Enzyme zusammengefasst.

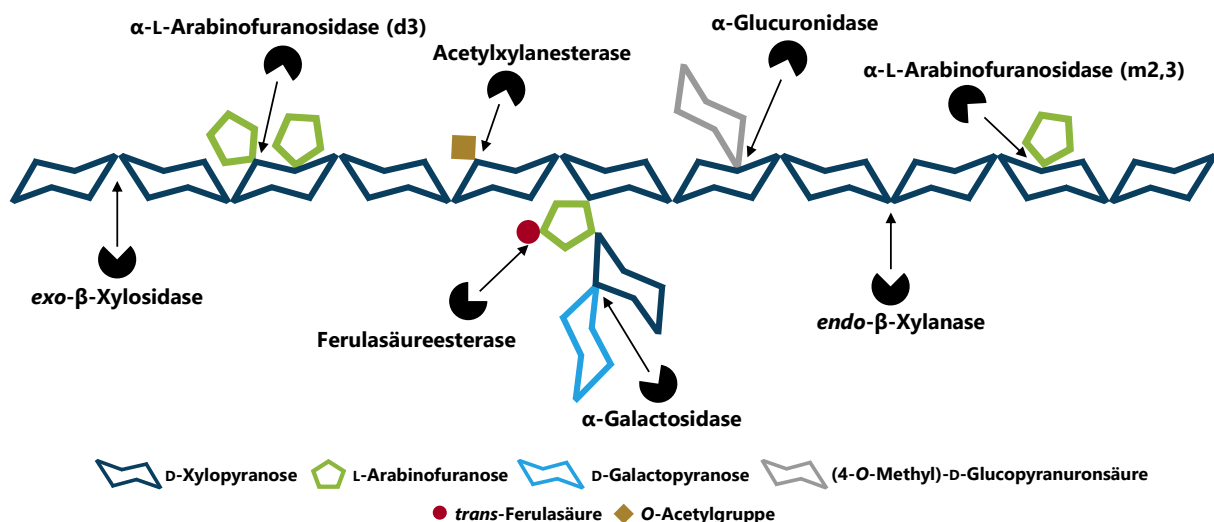


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Spaltungsstellen relevanter Arabinoxylan abbauender Enzyme

1.4 Ernährungsphysiologische Aspekte von Arabinoxylanen

1.4.1 Definition von Ballaststoffen

Aus ernährungsphysiologischer Perspektive werden sowohl AX als auch deren Hydrolyseprodukte den BS zugeordnet. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt zur Sicherstellung einer ausreichenden Ballaststoffzufuhr den regelmäßigen Verzehr ballaststoffreicher Lebensmittel, darunter Obst, Gemüse, Vollkornprodukte und Hülsenfrüchte. Der positive Einfluss von BS auf verschiedene Aspekte der menschlichen Gesundheit gilt grundsätzlich als wissenschaftlich belegt. Als Referenzwert gibt die DGE eine tägliche

1.4 Ernährungsphysiologische Aspekte von Arabinoxylanen

Aufnahmemenge von 30 g BS an, der in der deutschen Bevölkerung jedoch im Durchschnitt deutlich unterschritten wird (DGE & ÖGE, 2025)

Der Begriff BS (engl. *dietary fiber*) kam erstmals im Jahre 1953 auf und wurde als Sammelbegriff von für den Menschen nicht verdaubaren Pflanzenbestandteilen wie Cellulose, Hemicellulosen oder Lignin verwendet (Hipsley, 1953). Erst einige Jahre später wurden BS mehr im Kontext gesundheitsrelevanter Aspekte gesehen und das Spektrum an Substanzen, die den BS zugeordnet werden, wurde ständig erweitert. Die zwischen 1972 und 1976 erschienenen Arbeiten von Burkitt, Trowell und Painter postulierten Zusammenhänge zwischen dem Konsum von BS und dem reduzierten Risiko an bestimmten chronischen Krankheiten zu erkranken, welche auch als „*dietary fiber hypotheses*“ bezeichnet wurden. Der Begriff BS wurde hier zur Beschreibung von Pflanzenrückständen benutzt, die gegenüber der Hydrolyse durch menschliche Verdauungsenzyme resistent waren. Im Jahre 2001 wurde schließlich von der *American Association of Cereal Chemists* (AACC) eine bis heute geltende, tiefergehende Definition von BS veröffentlicht. In dieser werden BS als „essbare Pflanzenteile oder analoge Kohlenhydrate bezeichnet, die im menschlichen Dünndarm weder verdaut noch resorbiert werden können und im Dickdarm vollständig oder teilweise fermentiert werden.“ Zu den BS gehören demnach „PS, OS, Lignin und damit assoziierte Pflanzensubstanzen“. Weiterhin werden BS mit „positiven physiologischen Wirkungen, darunter die Regulierung der Darmtätigkeit und/oder die Senkung des Blutholesterinspiegels und/oder Blutzuckerspiegels“ verbunden (DeVries, 2003). In Deutschland gilt die in Anhang I der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 aufgeführte europäische Definition von BS. Demzufolge sind BS „natürliche oder synthetische Kohlenhydratpolymere aus drei oder mehr Monomereinheiten, die im menschlichen Dünndarm weder verdaut noch resorbiert werden können und eine positive physiologische Wirkung besitzen.“ Diese Definition ist wissenschaftlich weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen. Sie geht im Wesentlichen auf die Richtlinien zu Nährwertangaben des Codex Alimentarius aus dem Jahr 2009 zurück. Die Codex-Richtlinie berücksichtigt neben Kohlenhydratpolymeren auch bestimmte Nicht-Kohlenhydrat-Komponenten, sofern sie eine vergleichbare physiologische Wirkung wie Ballaststoffe aufweisen. Diese werden dort über eine Fußnote in die Definition miteinbezogen. Im Unterschied dazu schließt die europäische Regelung solche Nicht-Kohlenhydrat-Bestandteile ausdrücklich aus. Die Entscheidung, OS ab einem DP von 3 bis 9 ebenfalls in die Definition mitaufzunehmen, beruhte auf der Annahme, dass die Wirkung der Kohlenhydrate als BS allein von der Kettenlänge abhängig ist (de Menezes *et al.*, 2013). Neben dem bereits beschriebenen Effekten wird der Verzehr von BS mit einer Reihe weiterer, physiologisch positiver Wirkungen assoziiert. Dazu zählen ein deutlich geringeres Risiko für koronare Herzkrankheiten, Schlaganfälle, Bluthochdruck, Typ-II-Diabetes, Adipositas, sowie für bestimmte Magen-Darm-Erkrankungen, beispielsweise Divertikulitis, Verstopfung oder Hämorrhoiden (Anderson *et al.*, 2009). BS können darüber hinaus präbiotische Eigenschaften besitzen. Da AX und deren Hydrolyseprodukte ein deutliches präbiotisches Potenzial aufweisen, wird dies im Folgenden genauer erläutert.

1 Einleitung

1.4.2 Präbiotische Wirkung von Arabinoxylanen und deren Oligosacchariden

Als Präbiotika werden unverdauliche Nahrungsbestandteile bezeichnet, die von den körpereigenen Verdauungssäften und -enzymen im Magen und Dünndarm nicht abgebaut werden und gleichzeitig gegen die gastrointestinale Resorption resistent sind. Sie gelangen unverändert in den Dickdarm, wo sie von der dort ansässigen Mikrobiota fermentiert werden. Dabei fördern sie selektiv das Wachstum bzw. die Aktivität von Bakterien, die sich nachweislich positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken (Gibson *et al.*, 2004). Neben bestimmten PS der pflanzlichen Zellwand gibt es im Lebensmittelbereich auch noch weitere Kohlenhydrate, die diese Kriterien erfüllen. Zu den bekanntesten Vertretern, die teilweise auch kommerziell als Präbiotika vermarktet werden, gehören Inulin, Fructooligosaccharide, Galactooligosaccharide und OS aus der Muttermilch. Des Weiteren kann das Konzept von Präbiotika auch auf Nicht-Kohlenhydrat-Substanzen außerhalb des Lebensmittelbereichs erweitert werden. Voraussetzung ist, dass die Substanzen „selektiv von Mikroorganismen des Wirts verwertet werden und einen gesundheitlichen Nutzen bringen“. Zudem müssen die präbiotischen Eigenschaften *in vivo* bei Tieren und/oder Menschen nachgewiesen worden sein (Gibson *et al.*, 2017).

In der Literatur werden zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben, die die präbiotische Wirkung der AX und (A)XOS untersucht haben. Die Daten stammen hauptsächlich aus Tierversuchen, in denen bestimmte präbiotische Effekte beobachtet wurden (Courtin *et al.*, 2008; Damen *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2019; Van Craeyveld *et al.*, 2008). Demnach führt die Aufnahme von AX und/oder (A)XOS zu einem selektiven Anstieg gesundheitsförderlicher Bakterienstämme, wie *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* oder *Firmicutes*, im Colon bzw. Caecum der Tiere. Des Weiteren kommt es durch die Fermentation der AX und (A)XOS zur Bildung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA, engl. *Short-Chain Fatty Acids*), wie Acetat, Propionat und Butyrat, die zu einer Abnahme des pH-Wertes im Dickdarm führen. Dies kann eine verbesserte Mineralstoffaufnahme zur Folge haben sowie eine Hemmung des Wachstums pathogener Bakterien, u. a. *E. coli* oder spezieller Clostridien-Spezies. Ein erhöhter Butyratgehalt wird zudem mit einem reduzierten Krebsrisiko im Dickdarm in Verbindung gebracht. Zugleich verringert sich der Anteil verzweigter SCFA, wie Isobutyrat oder Isovalerat. Die Bildung verzweigter SCFA dient als Marker für die Fermentation von Proteinen, aus der potenziell toxische Endprodukte, z. B. Ammoniak, Phenole oder Thiole, hervorgehen können (Broekaert *et al.*, 2011).

Bei Menschen konnten ebenfalls präbiotische Eigenschaften von AX und (A)XOS festgestellt werden. In einer Studie mit übergewichtigen Menschen mit Anzeichen eines metabolischen Syndroms konnte gezeigt werden, dass die tägliche Aufnahme von (A)XOS (10,4 g/Tag über 4 Wochen) zu einer gesteigerten Population bestimmter Bakterienstämme im Dickdarm, u. a. von *Bifidobacterium* spp. und *Prevotella* spp. führte, welche an der Biosynthese von Vitaminen, Cofaktoren und Neurotransmittern beteiligt sind (Benítez-Páez *et al.*, 2019). Ähnliches wurde

1.5 Lebensmitteltechnologische Eigenschaften von Arabinoxylanen

auch für Probanden beobachtet, die über einen Zeitraum von drei Wochen Weizen- oder Roggenbrot zu sich genommen haben, denen Xylanasen zur *in situ* Bildung der (A)XOS beigefügt worden sind. Die geschätzte, durchschnittliche Aufnahmemenge von 2,1 g AXOS pro Tag führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer deutlichen Zunahme an SCFA, insbesondere an Butyrat, und Bifidobakterien in den Faeces (Damen *et al.*, 2012).

Das Ausmaß der mikrobiellen Fermentation der AX und (A)XOS steht auch in direktem Zusammenhang mit deren Struktur (Van Craeyveld *et al.*, 2008). In einem *in vitro*-Modell des menschlichen Magen-Darm-Trakts werden AXOS mit kleinerem durchschnittlichen DP und kleinerem A/X schneller fermentiert und führen zu einem stärkeren Anstieg an SCFA. Des Weiteren wurde eine erhöhte Aktivität AX abbauender mikrobieller Enzyme festgestellt (Pollet *et al.*, 2012). Bei Menschen konnte zudem beobachtet werden, dass das vermehrte Vorkommen von FS-Crosslinks die Fermentation der AX durch die intestinale Mikrobiota verlangsamt (Hopkins *et al.*, 2003). Allerdings ließ sich dieser Zusammenhang in einer weiteren Studie nicht bestätigen, wonach die bisherige Datenlage insgesamt als nicht eindeutig zu bewerten ist (Funk *et al.*, 2007). Daten zu Struktur-Wirkungsbeziehungen der AX bzw. (A)XOS sind nach wie vor nur begrenzt verfügbar, insbesondere im Hinblick auf Humanstudien.

1.5 Lebensmitteltechnologische Eigenschaften von Arabinoxylanen

Aufgrund ihrer strukturellen Heterogenität weisen AX und (A)XOS vielfältige, technofunktionelle Eigenschaften auf, die bei der Verarbeitung von Lebensmitteln eine zentrale Rolle spielen. In der Backwarenindustrie haben AX beispielsweise einen großen Einfluss auf die Teig- und Brotqualität, was im Wesentlichen auf die hohe Wasserbindefähigkeit der AX und der damit einhergehenden Zunahme der Viskosität zurückzuführen ist. Insbesondere WEAX wirken sich dabei positiv auf die Teigqualität aus (Buksa *et al.*, 2013). Sie erhöhen die Viskosität der wässrigen Phase, die die Gasblasen umgibt, wodurch eine vorzeitige Koaleszenz der Gasblasen verhindert wird. Das eingeschlossene Gas kann nicht entweichen, was zu einem größeren Brotvolumen sowie zu einer feineren und gleichmäßigeren Krumenstruktur führt. Im Gegensatz dazu können WUAX die Teigqualität negativ beeinflussen, indem sie mit dem Gluten um verfügbares Wasser konkurrieren, Glutenproteine an der Ausbildung eines stabilen Netzwerks stören und vorhandene Gasblasen destabilisieren (Courtin & Delcour, 2002; Goesart *et al.*, 2005). Demzufolge werden bei der Teigbereitung häufig *endo*-Xylanasen beigemischt, die bevorzugt die WUAX zu kleineren WEAX abbauen, welche sich wiederum positiv auf die rheologischen Eigenschaften auswirken können (Guo *et al.*, 2018).

Im Brauprozess werden WEAX aus der Gerste neben den MLG für die schlechte Filtrierbarkeit während dem Läutervorgang der Maische verantwortlich gemacht. Dabei geht ein abnehmendes Filtratvolumen mit einem steigenden Gehalt und einem höheren Molekular-

1 Einleitung

gewicht der PS einher. Darüber hinaus wird die Zunahme der Würzeviskosität oftmals als Indikator für die Filtrierbarkeit diskutiert. Zwar führen WEAX und MLG zu einer höheren Viskosität, ein direkter Zusammenhang zwischen Filtrierbarkeit und Viskosität kann jedoch nicht festgestellt werden (Sadosky *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wirken sich AX aufgrund ihrer viskositätserhöhenden Eigenschaften im Bier vermutlich positiv auf bestimmte sensorische Parameter wie Vollmundigkeit und Mundgefühl aus und können zusätzlich die Schaumstabilität des Bieres verbessern (Langenaeken *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2025).

AX besitzen emulgierende Eigenschaften, die vermutlich auf assoziierte, grenzflächenaktive Proteine zurückzuführen sind. Während sich die hydrophoben Bereiche des Proteins in Richtung der Grenzfläche ausrichten, zeigt das hydrophile Kohlenhydratgerüst zur wässrigen Phase hin. Infolge der erhöhten elektrostatischen und sterischen Abstoßungskräfte der dispergierten Tröpfchen kommt es zur Stabilisierung der Emulsion. Beispiele für Emulgatoren, die nach diesem Prinzip funktionieren, sind Gummi Arabicum (E414) oder extrahierte Zuckerrübenpektine (E440), die bereits als Zusatzstoffe in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden. Eine dazu vielversprechende Alternative stellen alkalische Extrakte aus Maisfaser dar, die auch als Maisfaser-Gummi (engl. *corn fiber gum*) bezeichnet werden. Diese enthalten neben den mitextrahierten Proteinen größere Mengen an hochverzweigten AX, wodurch sich stabile Emulsionen ausbilden (Yadav *et al.*, 2007).

Lebensmittelverpackungsmaterialien auf Basis von Nebenströmen der Getreideindustrie sind Gegenstand intensiver Forschung. Demnach können AX aus Weizen- und Maiskleie, die bei der Getreidevermahlung anfallen, sowie Trockenschlempe (engl. *dried distillers grain*) als Nebenprodukt der Bioethanolproduktion zur Herstellung biologisch abbaubarer Materialien genutzt werden und stellen eine Alternative zu fossilen Kunststoffverpackungen dar. In mehreren Erhitzungsschritten werden aus einer Lösung der extrahierten AX und zugesetzten Weichmachern wie Glycerol oder Sorbitol Biofilme hergestellt. Dabei sind die mechanischen Eigenschaften dieser Materialien unter anderem vom Molekulargewicht und dem Substitutionsmuster der AX, sowie der Konzentration der Weichmacher abhängig (Anderson & Simsek, 2019).

(A)XOS werden wegen ihrer präbiotischen Wirkung zunehmend in der Human- und Tierernährung eingesetzt. Enzymatisch aus Weizenkleie gewonnene Extrakte mit bis zu 70 % AXOS mit einem durchschnittlichen DP von 3 - 8 gelten gemäß der Verordnung (EU) Nr. 2015/2283, die auch als *Novel Food*-Verordnung bekannt ist, als neuartige Lebensmittel. (A)XOS treten in immer stärker werdender Konkurrenz zu etablierten Präbiotika wie Inulin, Fructo- und Galactooligosaccharide, die neben gesundheitlichen Vorteilen auch zur Verbesserung von Textur und Geschmack der Lebensmittel beitragen (Singla & Chakkaravarthi, 2017).

2 Zielsetzung

Eine zuverlässige Untersuchung möglicher Struktur-Wirkungsbeziehungen der in Getreide vorkommenden AX erfordert aufgrund ihrer ausgeprägten strukturellen Vielfalt den Einsatz differenzierter analytischer Methoden. In der Kohlenhydratanalytik etablierte Verfahren wie die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung oder die Methylierungsanalyse liefern jedoch nur begrenzte strukturelle Informationen und sind häufig mit hohem Arbeitsaufwand verbunden. Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung enzymatischer Profilingmethoden, die eine detailliertere Strukturcharakterisierung der AX ermöglichen. Hierbei werden die AX teilweise durch *endo*-Xylanasen abgebaut und die dabei freigesetzten OS anschließend analysiert. Für die Entwicklung derartiger Methoden sind jedoch Standardsubstanzen notwendig, die nur begrenzt kommerziell verfügbar sind. Um ein möglichst umfassendes Bild der AX-Struktur zu erhalten, sollen daher sowohl AXOS- als auch FAXOS-Standardsubstanzen aus geeigneten Ausgangsmaterialien isoliert und strukturell charakterisiert werden. Für die Quantifizierung der (A)XOS soll die Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (HPAEC, engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography*) mit gepulst amperometrischer Detektion (PAD, engl. *Pulsed Amperometric Detection*) eingesetzt werden, die sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet. Die Kopplung der HPAEC-PAD mit der MS kann zusätzlich für die Identifizierung der Analyten eingesetzt werden. Im Zuge der Entwicklung und Validierung der Profilingmethode soll auch deren Anwendbarkeit auf verschiedene Getreide-BS getestet werden, um daraus Informationen über die Feinstruktur der AX ableiten zu können. Ein weiteres potenzielles Anwendungsgebiet der zu entwickelnden Methode kann die Analyse (A)XOS-haltiger Präparate, die beispielsweise im Lebens- und Futtermittelbereich eingesetzt werden, darstellen. Obgleich Tierversuche bereits Hinweise darauf liefern, dass (A)XOS präbiotische Eigenschaften besitzen, sind entsprechende Daten beim Menschen nach wie vor begrenzt. Die hier vorgeschlagene, erweiterte Profilingmethode wird die Möglichkeit eröffnen, in zukünftigen Studien die Fermentation von (A)XOS durch die intestinale Mikrobiota sowie die zugrunde liegenden molekularen Abbaumechanismen gezielt zu untersuchen. Ein weiterer Profilingansatz besteht in der Entwicklung einer Methode auf Basis der zweidimensionalen (2D) Kernspinresonanz (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)-Spektroskopie. Durch den Einsatz des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments, bei dem Korrelationen zwischen Protonen und ^{13}C -Kernen über eine Bindung gemessen werden, sollen charakteristische Markersignale für verschiedene Strukturelemente des AX identifiziert werden. Über eine Volumenintegration ist es anschließend möglich, halbquantitative Aussagen über deren Vorkommen zu treffen. Auf diese Weise sollen sämtliche OS des Hydrolysats, einschließlich größerer Fragmente, die das entsprechende Strukturmerkmal enthalten, erfasst werden, was einen wesentlichen Vorteil gegenüber chromatographischen Methoden darstellen kann. Darüber hinaus wird eine chromatographische Trennung der (A)XOS und FAXOS angestrebt, die eine getrennte Analyse beider Fraktionen mittels HSQC-NMR ermöglichen soll.

3 Material und Methoden

3.1 Beschreibung des eingesetzten Probenmaterials

Um die Anwendbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Profilingmethoden zu testen, sowie zur Isolierung von (A)XOS- und FAXOS-Standardsubstanzen wurden verschiedene AX-reiche Ausgangsmaterialien verwendet. Grundsätzlich dienten BS, die im präparativen Maßstab aus entfetteten Vollkornmehlen verschiedener Getreidearten isoliert worden sind (s. Kapitel 3.2), als Substrat für die enzymatischen Hydrolysen. Die Vollkornmehle stammten entweder aus dem lokalen Handel oder wurden durch Vermahlung kommerziell erhältlicher Getreidekörner (< 0,5 mm) hergestellt. Ein limitierender Faktor bei der Auswahl der Getreidearten war die enzymatische Zugänglichkeit der AX-Strukturen, wie sie in nativer Form in den Getreide-BS vorkommen. Demnach wurden ausschließlich Getreidearten ausgewählt, bei denen ohne vorherige Extraktionsschritte der AX und nach enzymatischer Hydrolyse mit *endo*-Xylanasen in ausreichenden Mengen OS freigesetzt worden sind. Dazu zählten zum einen verschiedene Arten innerhalb der Gattung *Triticum*, wie Weizen (*Triticum aestivum*), Emmer (*Triticum dicoccum*), Einkorn (*Triticum monococcum*), Dinkel (*Triticum spelta*) und Kamut (Khorasan-Weizen, *Triticum turanicum*), um zu evaluieren, ob Unterschiede in der Feinstruktur der AX in phylogenetisch eng verwandten Getreidearten zu erkennen sind. Daneben wurden auch weitere Getreidearten, die jeweils verschiedenen Gattungen angehören, wie Roggen (*Secale cereale*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) ausgewählt, bei denen größere Unterschiede in der Feinstruktur der AX zu erwarten sind.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von AXOS-Standardsubstanzen wurde ein kommerziell erhältliches, wasserlösliches AX aus Weizenmehl (mittlere Viskosität) von der Firma Megazyme verwendet. Laut Herstellerangaben wurde das AX alkalisch extrahiert und besitzt eine analytische Reinheit von > 95 %. Im Allgemeinen eignen sich aufgereinigte PS-Präparate sehr gut für die Isolierung von Standardsubstanzen, da deren enzymatische Hydrolyse fast ausschließlich die gewünschten Produkte freisetzt, was die anschließende Fraktionierung und Aufreinigung der OS erleichtert. Des Weiteren verbessert die Wasserlöslichkeit des PS die enzymatische Zugänglichkeit, was in der Regel in einer höheren Ausbeute an freigesetzten OS resultiert.

Aufgrund der Abspaltung der FS im Zuge der alkalischen Extraktion der AX sind derartige Präparate ungeeignet für die Isolierung von FAXOS-Standardsubstanzen. Als Ausgangsmaterialien wurden daher UBS aus kommerziell erhältlichem Roggenvollkornmehl der Firma Alnatura sowie UBS aus vermahlenen Maiskörnern (*Zea mays*) der Firma Dehner verwendet. Insbesondere Mais enthält in größeren Mengen FS-haltige Seitenketten. Die AX im Mais sind jedoch im Gegensatz zu denen im Roggen resistent gegenüber einer enzymatischer Hydrolyse mit *endo*-Xylanasen (Huisman *et al.*, 2000; Schendel *et al.*, 2016a). Im Rahmen der Promotionsarbeit von Daniela Schäfer (2023) wurden durch eine milde Säurehydrolyse der UBS

3 Material und Methoden

aus Maiskörnern komplexere, FS-haltige Seitenketten isoliert. Auch wenn die AX-Strukturen dadurch teilweise abgebaut worden sind, führte dies zu einer verbesserten enzymatischen Zugänglichkeit des Rückstands, was die Freisetzung von FAXOS aus dem BS-Präparat ermöglichte (s. Kapitel 3.4).

3.2 Aufarbeitung der Getreideproben

Da die getrockneten und entfetteten Vollkornmehle erhebliche Mengen an Stärke und Proteinen enthalten, welche die durchgeführten Analysen beeinträchtigen können, wurden diese Bestandteile vor der Untersuchung der Zellwand-PS entfernt. Je nach Fragestellung lassen sich die AX entweder aus dem isolierten Zellwandmaterial, welches weitgehend durch die Ballaststoffe repräsentiert wird, oder alternativ direkt aus dem unbehandelten Mehl gewinnen. Dafür stehen eine Reihe an chemischen und/oder enzymatischen Extraktionsverfahren zur Verfügung, die im Folgenden näher erläutert werden.

3.2.1 Präparative Ballaststoffisolierung

Die präparative Gewinnung von BS aus pflanzlichen Materialien beruht ursprünglich auf einer enzymatisch-gravimetrischen Methode, die von Prosky und Mitarbeitern (1985) entwickelt wurde. In einer Annäherung an die menschliche Verdauung kommen hierbei Enzympräparate zum Einsatz, die einen vollständigen Abbau der Stärke sowie den weitgehenden Abbau der Proteine ermöglichen. Die nach dem enzymatischen Verdau zurückbleibenden niedermolekularen Bestandteile werden durch Waschen mit Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) entfernt. Der Rückstand wird um Restprotein und den Aschgehalt korrigiert und stellt den Gesamtballaststoffgehalt dar. Diese Methode wurde von der *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) offiziell als Methode 985.29 zur Bestimmung des Gesamtballaststoffgehalts vorgestellt. Des Weiteren wurde basierend auf der Löslichkeit der Ballaststoffpolymere eine Unterscheidung in UBS und LBS vorgenommen. Auch die UBS und die LBS werden um ihren Restprotein- und Aschegehalt korrigiert. Die Verwendung einer thermostabilen α -Amylase ermöglicht einen Stärkeabbau bei Temperaturen von nahezu 100 °C, bei denen es zur Verkleisterung der Stärkekörner und in Folge zu einer besseren Solubilisierung der Stärke kommt. Dadurch wird die Stärke effizient von der α -Amylase abgebaut. Diese Bedingungen spiegeln jedoch nicht die im menschlichen Verdauungstrakt vorherrschenden Gegebenheiten wider, weshalb die Methode angepasst werden musste. Die AOAC 2009.01 Methode stellt eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Methode dar. Durch die Verwendung einer Pankreas α -Amylase unter physiologisch relevanten Bedingungen (37 °C, pH 6) anstelle der thermostabilen α -Amylase werden resistente Stärken nicht abgebaut und infolgedessen korrekt als Ballaststoffkomponenten erfasst. Des Weiteren können durch einen zusätzlichen säulenchromatographischen Aufreinigungsschritt auch nicht-verdaubare OS detektiert

werden, die definitionsgemäß ebenfalls zu den BS zählen. Demnach umfasst die AOAC 2009.01 den Gesamtballaststoffgehalt basierend auf der Richtlinie des Codex Alimentarius von 2009 (McCleary *et al.*, 2013). In den darauffolgenden Jahren wurde die offizielle AOAC-Methode (AOAC 2017.16, AOAC 2022.01) weiter verbessert und modifiziert, u. a. durch eine Verkürzung der Inkubationszeiten von 16 h auf 4 h sowie einer verbesserten chromatographischen Abtrennung der niedermolekularen, löslichen BS (McCleary *et al.*, 2019; McCleary & McLoughlin, 2022).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte präparative Isolierung der BS aus den Vollkornmehlen der verschiedenen Getreidearten erfolgte in Anlehnung an die AOAC 985.29 Methode mit kleineren Anpassungen (s. Arbeitsvorschrift 8.2.3). Da die resistenten Stärken nicht von Interesse waren, sollte durch den Einsatz einer thermostabilen α -Amylase bei hohen Temperaturen ein möglichst vollständiger Stärkeabbau erreicht werden. Demzufolge wurden die entfetteten Mehle in Pufferlösungen nacheinander mit thermostabiler α -Amylase (pH 6; 92 °C), Protease (pH 7,5; 60 °C) und Amyloglucosidase (pH 4,5; 60 °C) inkubiert. Anschließend wurden die hochmolekularen, wasserunlöslichen Ballaststoffkomponenten durch Zentrifugation abgetrennt und nacheinander mit Wasser, Ethanol und Aceton gewaschen und schließlich getrocknet. Diese Fraktion wird als UBS bezeichnet. Der Überstand wurde mit den wässrigen Waschfraktionen vereint und enthält neben den verdauten Proteinen bzw. der verdauten Stärke auch noch die wasserlöslichen, nichtpolymeren und polymeren Ballaststoffkomponenten. Durch Zugabe der vierfachen Menge an Ethanol (Endkonzentration = 78 % (v/v)) zum wässrigen Überstand wurde die als LBS bezeichnete Ballaststofffraktion über Nacht präzipitiert. Anschließend wurde die LBS-Fraktion abzentrifugiert, mit Ethanol und Aceton gewaschen und getrocknet. Da die im Fokus dieser Arbeit stehenden AX lediglich in den höhermolekularen Ballaststofffraktionen zu erwarten sind, wurde auf eine präparative Isolierung der im wässrigen Überstand verbleibenden, niedermolekularen BS verzichtet. Zudem wurden die isolierten BS nicht um ihren Asche- und Restproteingehalt korrigiert und bei Analysen, in denen Bezug auf die BS-Einwaage genommen wird, wird im Folgenden stets der unkorrigierte Wert verwendet.

3.2.2 Extraktionsmethoden zur Analyse der Arabinoxylanstruktur

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Isolierung von AX aus pflanzlichen Zellwänden beschrieben, die größtenteils auf chemischen, enzymatischen oder thermomechanischen Methoden basieren. Die Gewinnung von WEAX kann durch Suspendierung von entfetteten und feingemahlenden Probenmaterialien in Wasser erfolgen. Da ein großer Anteil der in Endospermzellwänden vorkommenden AX wasserlöslich ist (> 30 % in Weizen), wird als Ausgangsmaterial häufig einfaches Getreidemehl verwendet. Wahlweise wird auch Getreidekleie eingesetzt, die jedoch im Vergleich zum Endosperm nur einen geringen Anteil an WEAX besitzt (< 3 %). Zur Inaktivierung von endogenen Enzymen wird das Mehl vor

3 Material und Methoden

der eigentlichen Extraktion erhitzt und/oder mit Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) gewaschen, um niedermolekulare Bestandteile zu entfernen (Ganguli & Turner, 2008; Marcotuli *et al.*, 2016). Der nach der wässrigen Extraktion zurückbleibende, unlösliche Rückstand wird abzentrifugiert oder abfiltriert. Da im wässrigen Extrakt neben den WEAX auch noch größere Mengen an gelöster Stärke vorkommen, wird diese durch Zugabe von stärkeabbauenden Enzymen wie α -Amylase und/oder Amyloglucosidase teilweise oder vollständig abgebaut (Ganguli & Turner, 2008; Ordaz-Ortiz & Saulnier, 2005). Störende, wasserlösliche Proteine können sowohl durch Adsorption an Bentonit oder Aluminiumsilikate (Courtin & Delcour, 1998; Ganguli & Turner, 2008) als auch durch Zugabe von Proteasen entfernt werden (Maes & Delcour, 2002). In Anlehnung an die präparative Ballaststoffisolierung (s. Kapitel 3.2.1) kann die enzymatische Behandlung auch bereits mit dem Rohmaterial erfolgen. Bei einigen Getreidearten, insbesondere bei Gerste und Hafer, die größere Mengen wasserlöslicher MLG enthalten, kann zudem der Einsatz von Enzymen sinnvoll sein, welche den Abbau der MLG bewirken, beispielsweise Lichenase und/oder β -Glucosidase (Dervilly *et al.*, 2002). Die WEAX werden schließlich durch Zugabe von Ethanol aus dem wässrigen Extrakt präzipitiert (65 % Endkonzentration (v/v)), gewaschen und getrocknet (Ganguli & Turner, 2008).

Der Großteil der AX ist aufgrund starker Wechselwirkungen mit Cellulose sowie kovalenter FS-Crosslinks, die zwischen einzelnen AX-Strängen und zu anderen Zellwandkomponenten auftreten können, wasserunlöslich. Sie kommen anteilmäßig vermehrt in den äußeren Schichten des Getreidekorns vor (Marcotuli *et al.*, 2016). Für die Extraktion der WUAX werden bevorzugt alkalische Extraktionsverfahren eingesetzt, bei denen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AX und Cellulose aufgebrochen und die Esterbindungen zur FS gespalten werden. Dadurch wird die Löslichkeit der AX deutlich erhöht. Die Wahl der Base und deren Konzentration, als auch die eingesetzte Temperatur und Extraktionsdauer beeinflussen entscheidend die Selektivität der Extraktion sowie die Ausbeute und Eigenschaften der extrahierten AX. Es werden sowohl alkalische Lösungen monovalenter Basen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid oder Natriumcarbonat, als auch divalenter Basen wie Calciumhydroxid oder Bariumhydroxid eingesetzt. (Aguedo *et al.*, 2014; Bender *et al.*, 2017; Gruppen *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 2015). Der Einsatz von Bariumhydroxid hat den Vorteil, dass unlösliche MLG durch die Anwesenheit von Ba^{2+} -Ionen nicht solubilisiert werden, was zu einer selektiven Extraktion von AX führt, wodurch die Ausbeute und Reinheit der PS erhöht wird (Gruppen *et al.*, 1991). In einigen Fällen werden den alkalischen Lösungen auch noch geringe Mengen (2 %) an Wasserstoffperoxid zugesetzt (Escarnot *et al.*, 2011; Maes & Delcour, 2002). Dadurch werden bevorzugt Ligninstrukturen oxidiert und teilweise depolymerisiert, was zu einer Lockerung der Zellwandmatrix und damit zu einer besseren Solubilisierung der WUAX führt (Zhan *et al.*, 2024). Bei der Wahl der Reaktionsbedingungen ist zu beachten, dass es unter alkalischen Bedingungen zu einer Depolymerisierung der AX kommen kann. Dabei wird zwischen der alkalischen Hydrolyse und dem *alkaline peeling* unterschieden. Im Zuge der alkalischen Hydrolyse erfolgt die Spaltung glykosidischer Bindungen über reaktive

Zwischenstufen. Durch die Deprotonierung der zur Acetalgruppe benachbarten Hydroxygruppe kommt es zur Ausbildung eines reaktiven Epoxids. Dieses kann mit Wasser reagieren, was zu einer Spaltung der glykosidischen Bindung führt. Die Spaltung findet bevorzugt zwischen Seitenketten und Rückgrat der AX statt, was zu einem Verlust der Seitenketten während der Extraktion führen kann. Hierfür sind jedoch harschere Bedingungen notwendig (pH > 12, hohe Temperaturen, lange Extraktionszeiten). Im Gegensatz dazu führt das *alkaline peeling* zu einem sukzessiven Abbau des Xylanrückgrats ausgehend vom reduzierenden Ende unter Abspaltung monomerer Xylp-Einheiten. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Isomerisierung der Aldehydgruppe am C1 der reduzierenden Einheit zu einer Ketogruppe an Position C2 über ein 1,2-Endiol als Zwischenstufe. Nach der Bildung eines 2,3-Endiols führt eine β -Alkoxy-Eliminierung zur Spaltung der glykosidischen Bindung an der O4-Position des Rückgrats, wodurch ein neues reduzierendes Ende entsteht, was wiederum tautomerisieren kann (Henriksson *et al.*, 2024). Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumborhydrid (NaBH₄) zur alkalischen Extraktionslösung unterdrückt (Gruppen *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 2015). Dabei wird die reduzierende Einheit reduziert, wodurch kein 1,2-Endiol mehr ausgebildet werden kann und es infolgedessen nicht mehr zu einem Abbau des Xylanrückgrats kommt. Aufgrund der hohen Salzmengen, die bei der alkalischen Extraktion eingesetzt werden bzw. nach Neutralisation entstehen, werden die extrahierten WUAX durch Dialyse aus dem Extrakt isoliert, gegebenenfalls nochmal abzentrifugiert und schließlich gefriergetrocknet (Escarnot *et al.*, 2011; Maes & Delcour, 2002). Zur weiteren Steigerung der Extraktionseffizienz können alkalische Extraktionsverfahren zusätzlich ultraschall- oder mikrowellenunterstützt durchgeführt werden (Janker-Obermeier *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2019). Trotz der hohen Ausbeute und Reinheit der isolierten AX, die durch alkalische Extraktionsverfahren erzielt werden können, geht damit immer eine Abspaltung der estergebundenen FS einher, weshalb diese Methoden nicht zur Analyse der nativen Struktur von FS-haltigen AX geeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf eine alkalische Extraktion der AX aus dem Zellwandmaterial verzichtet.

Die nach der Extraktion erhaltenen AX liegen typischerweise als heterogene Gemische unterschiedlicher Molekülgrößen, Verzweigungsgrade und Substitutionsmuster vor. Zur Gewinnung homogener und hochreiner Fraktionen werden im Anschluss häufig noch löslichkeitsbasierte Trennmethode eingesetzt, wie die Fraktionierung durch eine gestufte Ethanol- (Dervilly *et al.*, 2000; Maes & Delcour, 2002) oder Ammoniumsulfatfällung (Izydorczyk & Biliaderis, 1992). Durch eine schrittweise Erhöhung der Konzentration des Fällungsmittels lassen sich Fraktionen mit variierenden Strukturmerkmalen isolieren. Typischerweise nimmt mit steigender Ethanol- bzw. Ammoniumsulfatkonzentration das A/X sowie der Anteil an substituierten Xylp zu. Eine direkte Korrelation zwischen dem durchschnittlichen Molekulargewicht der AX und der Konzentration des Fällungsmittels konnte dagegen nicht festgestellt werden (Dervilly *et al.*, 2000; Izydorczyk & Biliaderis, 1992; Maes & Delcour, 2002).

3.3 Charakterisierung der Polysaccharide in den Getreideballaststoffen

Die pflanzliche Zellwand ist ein hochkomplexes Polymernetzwerk, dessen mechanische Stabilität und pflanzenphysiologischen Funktionen maßgeblich durch die darin vorkommenden Nicht-Stärke-Polysaccharide bestimmt wird. Diese PS weisen eine ausgeprägte strukturelle Variabilität auf, die sowohl von der Art, dem betrachteten Gewebe und vom Entwicklungsstadium der Pflanze abhängig ist. Für ein tieferes Verständnis der Zellwand ist daher eine detaillierte Analyse der Feinstruktur der beteiligten PS nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in den Getreide-BS enthaltenen PS hinsichtlich ihrer Monosaccharidzusammensetzung sowie der vorliegenden glykosidischen Bindungstypen untersucht. Auf dieser Basis konnten erste strukturelle Rückschlüsse auf die in den BS-Proben enthaltenen AX gezogen werden. Die Entwicklung enzymbasierter Profilingmethoden ermöglichte darüber hinaus eine selektivere und detailliertere Strukturanalyse von AX.

3.3.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung nach Säurehydrolyse

Die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Getreide-BS liefert erste Hinweise auf die zugrunde liegenden PS-Strukturen. Glykosidische Bindungen lassen sich durch saure Hydrolyse spalten, wodurch die monomeren Bestandteile freigesetzt werden. Da die Monosaccharide prinzipiell aus verschiedenen PS stammen können, liefert die Analyse lediglich Hinweise auf einen vorliegenden Polysaccharidtyp. Je nach Probenmaterial und den zu erwarteten PS werden hierfür unterschiedliche saure Hydrolyseverfahren eingesetzt. Zur Analyse der UBS, die typischerweise hohe Mengen an Cellulose enthalten, hat sich die Schwefelsäurehydrolyse nach Saeman *et al.* (1945) als Standardmethode etabliert (s. Arbeitsvorschrift 8.3.1). Dabei werden sowohl kristalline Cellulose als auch schwer zugängliche, neutrale PS durch die Schwefelsäure aufgeschlossen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Polyuronsäuren und Desoxyhexosen dabei nur teilweise erfasst werden (De Ruiter *et al.*, 1992; Willför *et al.*, 2009). Für die Analyse der PS aus den LBS können mildere Reagenzien wie verdünnte Salzsäure oder Trifluoressigsäure (engl., *Trifluoroacetic Acid*, TFA) eingesetzt werden. Insbesondere bei pektinreichem Material bietet sich eine Methanolyse mit anschließender TFA-Hydrolyse an, die von De Ruiter und Mitarbeitern (1992) entwickelt wurde. Die zweistufige Reaktion wird dabei in methanolischer Salzsäure (80 °C, 16 h) durchgeführt. Durch die Protonierung des Sauerstoffs in der glykosidischen Bindung kommt es zur einer positiven Polarisierung des anomeren Kohlenstoffs, der infolgedessen nucleophil von Methanol angegriffen wird und stabile Methylglycoside bildet. Die freigesetzten Methylglycoside können im Anschluss durch TFA wieder in Monosaccharide umgewandelt werden (121 °C, 1 h). Ein weiterer Vorteil der eingesetzten Hydrolysereagenzien ist, dass sie durch Evaporation leicht zu entfernen sind (De Ruiter *et al.*, 1992). Obwohl in Getreidezellwänden lediglich geringe Pektinmengen (~ 5 %) zu erwarten sind (Vogel, 2008),

3.3 Charakterisierung der Polysaccharide in den Getreideballaststoffen

wurde die Methanolyse zur Bestimmung der Monosaccharidverteilung in den LBS-Proben verwendet. Auch zur Charakterisierung des kommerziell erhältlichen Weizen-AX wurde eine Methanolyse durchgeführt, da nicht auszuschließen war, dass bei der Isolierung des AX geringe Mengen an Pektinen mitextrahiert wurden (s. Arbeitsvorschriften 8.3.1).

Für die Bestimmung der freigesetzten Monosaccharide stehen verschiedene Analysemethoden zur Verfügung. Klassischerweise wird die GC in Kombination mit der Flammenionisationsdetektion (FID) eingesetzt, die sich als Standardmethode zur Analyse von Kohlenhydratgemischen etabliert hat (Albersheim *et al.*, 1967; Blakeney *et al.*, 1983; de Neef, 1969; Willför *et al.*, 2009). Aufgrund der geringen Flüchtigkeit der Monosaccharide ist eine vorherige Derivatisierung der Analyten zu Trimethylsilylethern (de Neef, 1969) oder Alditolacetaten (Albersheim *et al.*, 1967) notwendig, was in einem erhöhten Zeitaufwand resultiert. Zur Reduktion der Anzahl potenziell entstehender Derivate werden die Monosaccharide vor der eigentlichen Derivatisierung mittels Natriumborhydrid zu Zuckeralkoholen umgesetzt (Albersheim *et al.*, 1967; Blakeney *et al.*, 1983). Gleichermaßen muss für die Analyse der Uronsäuren deren Carboxylgruppe reduziert werden. Durch die Kopplung der GC mit der MS lassen sich die derivatisierten Monosaccharide nicht nur anhand ihres Retentionsverhaltens, sondern zusätzlich über ihre charakteristischen Fragmentierungsmuster identifizieren (Sasaki *et al.*, 2005). Die Quantifizierung erfolgt durch Kalibrierung mit einem internen Standard (Sorbitol) oder über relative Responsefaktoren (Sweet *et al.*, 1975; Willför *et al.*, 2009). Analysemethoden, die auf einer Trennung der Monosaccharide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) beruhen, werden ebenfalls eingesetzt. Die hohe Polarität der Monosaccharide sowie die fehlende UV/Vis- und Fluoreszenz-Absorption schränken jedoch die Auswahl an möglichen Trennsystemen und kompatiblen Detektionsmöglichkeiten ein. Eine Trennung von Monosacchariden auf Umkehrphasen (C18) ist grundsätzlich möglich, setzt jedoch eine vorherige Derivatisierung der Zucker voraus. Hierzu werden die Monosaccharide häufig mit chromophoren Verbindungen wie 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon markiert, wodurch eine Detektion im UV-Bereich ermöglicht wird (Fu & O'Neill, 1995). Allerdings sind diese Verfahren durch einen erhöhten Arbeitsaufwand sowie eine eingeschränkte Selektivität und Trennleistung gekennzeichnet. Zur Detektion von Monosacchariden können auch ein Brechungsindex- (RI, engl. *Refractive Index*) oder ein Lichtstreuendetektor (ELSD, engl. *Evaporative Light Scattering Detector*) eingesetzt werden, die eine Analyse der Monosaccharide im underivatisierten Zustand ermöglichen. Die RI-Detektion stellt eine einfache und kostengünstige Detektionsmöglichkeit für Kohlenhydrate dar, eignet sich jedoch ausschließlich für isokratische Trennungen (Chávez-Servín *et al.*, 2004). Zu den Nachteilen der RI-Detektion zählen neben ihrer Anfälligkeit gegenüber Druck- und Temperaturschwankungen auch die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit. Bei der Detektion mittels ELSD wird die mobile Phase durch ein Zerstäubergas (engl. *nebulizing gas*), meist Stickstoff, in kleine Tröpfchen zerstäubt und anschließend verdampft. Dabei bleiben die nicht-flüchtigen Analyten als Partikel zurück,

3 Material und Methoden

an deren Oberfläche das Licht gestreut wird, welches letztendlich gemessen wird. Der ELSD erlaubt eine empfindliche und robuste Detektion nicht-flüchtiger Substanzen und eignet sich zudem für komplexe Trennungen, die den Einsatz einer Gradientenelution erfordern. So wird die Detektion mittels ELSD häufig in Kombination mit der Hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC, engl. *Hydrophilic Interaction Chromatography*) verwendet, wodurch eine wirksame Trennung und sensitive Detektion der Monosaccharide ermöglicht wird (Karlsson *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HILIC-ELSD zwar nicht zur Analyse der Monosaccharide eingesetzt, jedoch zur Aufreinigung der isolierten AXOS-Standardsubstanzen angewendet (s. Kapitel 3.4.2).

In den letzten Jahrzehnten hat sich HPAEC-PAD als bevorzugte Methode zur Analyse von Kohlenhydraten etabliert. Durch die Kombination von HPAEC und PAD lassen sich sowohl Mono- und Disaccharide, als auch OS gezielt voneinander trennen und anschließend mit hoher Sensitivität und Selektivität detektieren (Lee, 1990; Rohrer, 2012). Bei dieser Variante der Anionenaustauschchromatographie erfolgt die Trennung der Analyten auf Ionenaustauschprozessen an einer stationären Phase aus quervernetztem Polystyrol, das mit positiv geladenen quartären Ammoniumgruppen funktionalisiert ist. Als mobile Phase wird üblicherweise verdünnte Natronlauge verwendet, bei komplexeren Trennproblemen wird alternativ auch ein Gradient aus Natronlauge und Natriumacetat eingesetzt. Da der Kontakt der Eluenten mit atmosphärischem Kohlenstoffdioxid zur Bildung von Carbonaten führen kann, die die chromatographische Trennleistung signifikant beeinträchtigen können, werden die Eluenten unter Inertgasatmosphäre, beispielsweise Stickstoff oder Helium, gelagert. Unter den stark alkalischen Bedingungen (pH 12 - 13,5) liegen die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate teilweise oder vollständig deprotoniert vor, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen mit der stationären Phase ermöglicht werden. Aufgrund von Unterschieden in den pK_s -Werten, der Anzahl und Position der Hydroxylgruppen und der Konformation der Zucker werden die Analyten unterschiedlich stark von der stationären Phase retardiert, wodurch sie zeitlich getrennt voneinander eluieren. Im Anschluss an die chromatographische Trennung erfolgt die Detektion mittels PAD, wobei die erhöhte Oxidierbarkeit der Zucker im alkalischen Milieu ausgenutzt wird. Die Analyten werden an einer Goldelektrode oxidiert und der dabei freiwerdende Elektronenstrom, der proportional zur Konzentration der Analyten ist, in Coulomb gemessen. Durch Abführen des Elektronenstroms über eine Hilfselektrode wird das angelegte Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode konstant gehalten, wodurch eine reproduzierbare Detektion der Analyten ermöglicht wird. Der elektrochemische Detektor arbeitet zudem mit zyklischen Spannungspulsen, um Ablagerungen auf der Goldelektrode zu verhindern. Nach der Oxidation der Analyten wird das Potential kurzzeitig erhöht, wodurch organische Ablagerungen auf der Elektrodenoberfläche vollständig oxidiert werden. Durch Absenken des Potentials werden die entstandenen Goldoxide im Anschluss wieder reduziert und entfernt. Diese selbstreinigende Funktion ist essenziell für die Signalempfindlichkeit

3.3 Charakterisierung der Polysaccharide in den Getreideballaststoffen

(> 10 pmol) und -reproduzierbarkeit des PAD und trägt darüber hinaus entscheidend zur Lebensdauer der Goldelektrode bei (Rohrer, 2012).

Die aus den Getreide-BS nach saurer Hydrolyse freigesetzten Monosaccharide wurden mittels HPAEC-PAD bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen PAD-Response der Zucker wurde eine externe Kalibrierung unter Zugabe einer internen Standardsubstanz (ISt) durchgeführt. Als ISt eignet sich üblicherweise eine Verbindung, die den Analyten in ihrer chemischen Struktur ähnelt, jedoch natürlicherweise nicht in den untersuchten Proben enthalten ist. Für die Bestimmung der Monosaccharide wurde 2-Desoxy-D-Glucose eingesetzt. Signalveränderungen, die durch variierende Injektionsvolumina oder durch Matrixeinflüsse entstehen, können durch Quantifizierung über das Peakflächenverhältnis zwischen Monosacchariden und ISt teilweise kompensiert werden. Zudem dient 2-Desoxy-D-Glucose als Kontrollgröße zur Überwachung der Stabilität des chromatographischen Systems. Die einzelnen Analysenschritte zur Bestimmung der Monosaccharidverteilung können in der Arbeitsvorschrift 8.3.1 nachgelesen werden.

3.3.2 Methylierungsanalyse zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse

Zur Untersuchung der glykosidischen Bindungspositionen in den PS der Getreide-BS, insbesondere der AX, wurde eine Methylierungsanalyse durchgeführt (s. Abbildung 12). Bei dieser etablierten Standardmethode werden die aus den PS freigesetzten, derivatisierten Monosaccharide, die Informationen über die jeweiligen Bindungspositionen enthalten, zunächst mittels GC-MS strukturell aufgeklärt. Die Bestimmung ihrer relativen Verhältnisse erfolgt anschließend durch die Analyse mittels GC-FID. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methylierungsanalyse orientiert sich an der Methode nach Nunes *et al.* (2008), die wiederum von der Arbeitsgruppe um Wefers (2015) angepasst wurde (s. Arbeitsvorschrift 8.3.2).

Die Permethylierung der freien Hydroxylgruppen der PS, welche nicht in glykosidische Bindungen involviert sind, stellt den ersten Schritt der Methylierungsanalyse dar (s. Abbildung 12). Unter Zugabe von frisch gemörsertem Natriumhydroxid in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Anlehnung an Ciucanu und Kerek (1984) kommt es zu einer Deprotonierung der Hydroxylgruppe, welche anschließend in einer elektrophilen Substitution mit dem Methyljodid unter Austausch der Methylgruppe reagiert. Zur Vermeidung einer Untermethylierung werden schwerlösliche Proben häufig über Nacht in DMSO quellen gelassen bzw. wird der Methylierungsschritt zweimal durchgeführt (Pettolino *et al.*, 2012). Das Vorkommen von vollacetylierten Zuckeralkoholen im GC-Chromatogramm kann auf eine Untermethylierung hindeuten. Bei Interesse an enthaltenen Uronsäuren muss deren Carboxylgruppe vor der eigentlichen Methylierung reduziert werden, was einen zusätzlichen, zeitintensiven Arbeitsschritt erfordert (Kim & Carpita, 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Reduktion verzichtet, da in den Getreideproben lediglich geringe Mengen an GalA und GlcA

3 Material und Methoden

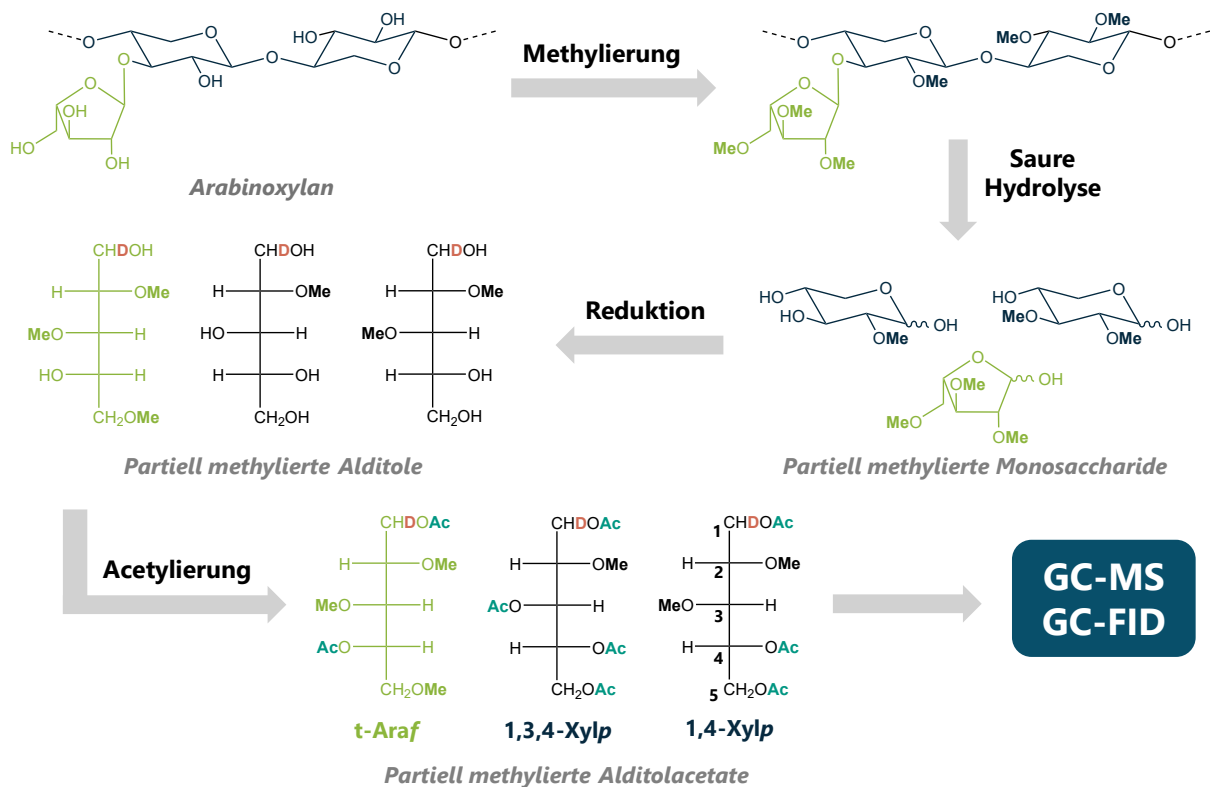


Abbildung 12: Schematischer Ablauf der Methylierungsanalyse am Beispiel eines Ausschnitts aus einem Arabinoxylan, in dem eine L-Arabinofuranose (Araf, grün) über eine (1→3)-Bindung an eine D-Xylopyranose (Xylp, schwarz) geknüpft ist in Nachbarschaft zu einer unsubstituierten, 1,4-glykosidischen gebundenen Xylp-Einheit. t, terminal; GC, Gaschromatographie; FID, Flammenionisationsdetektion; MS, Massenspektrometrie

zu erwarten waren und der Fokus auf der Substitution der AX mit Arabinose lag. Im nächsten Schritt werden die glykosidischen Bindungen der permethylierten PS säurehydrolytisch gespalten. Als Hydrolysereagenz wird 2 M TFA eingesetzt, welche anschließend durch Evaporation wieder entfernt werden kann. Aufgrund der Mutarotation der freigesetzten Zucker geht die Information über deren anomere Konfiguration (α/β) verloren. Nach der Säurehydrolyse erfolgt eine Reduktion der partiell methylierten Monosaccharide zu Zuckeralkoholen mit Natriumborodeuterid. Die dabei erfolgende Ringöffnung führt zum Verlust der Information über die ursprüngliche Ringform der Monomereinheiten. Natriumborodeuterid hat den Vorteil gegenüber undeuteriertem Natriumborhydrid, dass die C1-Position deuteriummarkiert wird, was zur massenspektrometrischen Unterscheidung mancher Zuckerderivate notwendig ist. Beispielsweise führt die Reduktion von 1,2-gebundener Xylp, die in komplexen, FS-haltigen Seitenketten von AX (s. Kapitel 1.2.2.3) auftreten kann, und 1,4-gebundener Xylp aus dem Rückgrat der AX zur Bildung von Produkten mit identischem Substitutions- und Fragmentierungsmuster. Durch die Deuteriummarkierung sind die entstehenden charakteristischen Fragmente von 1,2- und 1,4-Xylp teilweise um eine Masseneinheit verschoben, was trotz Koelution beider Zuckerderivate eine Unterscheidung ermöglicht (Björndal *et al.*, 1970). Zuletzt werden die freigesetzten Hydroxylgruppen, die ursprünglich am Ringsystem oder an glykosidischen Bindungen beteiligt waren, mit

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

Acetanhydrid und 1-Methylimidazol als Katalysator acetyliert (Blakeney *et al.*, 1983). Auf diese Weise werden partiell methylierte Alditolacetate (PMAA) erhalten, deren Flüchtigkeit im Vergleich zu den underivatisierten Monosacchariden deutlich erhöht ist. Da keine Standardsubstanzen von PMAA zur Verfügung stehen, erfolgt die Zuordnung anhand der Elutionsreihenfolge der PMAA sowie den charakteristischen Massenspektren nach Analyse mittels GC-MS. Die Fragmentierung erfolgt mittels Elektronenstoßionisation (EI), bei der thermisch emittierte Elektronen durch ein zwischen Glühkathode und Anode angelegtes Potential beschleunigt und unter Hochvakuumbedingungen mit einer definierten kinetischen Energie von typischerweise 70 eV auf die Analytmoleküle treffen. Nach der Ionisation der Analyten kommt es durch Restenergie zu charakteristischen und gut reproduzierbaren Fragmentierungsreaktionen. Demzufolge stellt die EI eine harte Ionisationstechnik dar. Dabei treten Bindungsbrüche bevorzugt an Positionen auf, an denen zwei methoxysubstituierte Kohlenstoffatome oder ein methoxysubstituiertes und ein acetoxysubstituiertes Kohlenstoffatom benachbart zueinander liegen. Aus den dabei entstehenden Primärfragmenten können sich anschließend weitere, strukturabhängige Sekundärfragmente bilden. Je nach Art und Position der Substituenten entstehen dadurch spezifische Fragmentierungsmuster (Björndal *et al.*, 1967). Durch Vergleich mit Literaturdaten bekannter PS und OS sowie Onlinedatenbanken lassen sich die PMAA zuordnen (Björndal *et al.*, 1967; CCRC, 2007; Sasaki *et al.*, 2005; Sims *et al.*, 2018). Zur Bestimmung der molaren Verhältnisse der identifizierten PMAA werden Korrekturfaktoren angewendet, die auf der *Effective Carbon Response*-Theorie basieren und von der Arbeitsgruppe um Sweet (1975) berechnet wurden. Für die GC-FID-Analyse werden zur GC-MS identische chromatographische Bedingungen eingesetzt, welche in der Arbeitsvorschrift 8.3.2 näher beschrieben sind.

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

In der Kohlenhydratanalytik etablierte Standardmethoden wie die Monosaccharidanalyse oder die Methylierungsanalyse geben einen ersten Überblick über die Struktur der AX. Sie liefern jedoch keine Informationen über die Verteilung der Substituenten entlang des Rückgrats der AX sowie dem Vorkommen von Nicht-Kohlenhydratkomponenten wie Hydroxyzimtsäuren oder Acetylgruppen. Profilingmethoden, die auf einer enzymatischen Freisetzung von OS aus isoliertem Zellwandmaterial beruhen, die im Anschluss durch geeignete LC- oder LC-MS-basierte sowie NMR-spektroskopische Verfahren analysiert werden, stellen schnelle und reproduzierbare Verfahren dar, um einen tiefergehenden Einblick in die Feinstruktur von PS zu gewinnen (Steck *et al.*, 2021; Wefers & Bunzel, 2016a, 2016b). Zur Entwicklung derartiger Methoden werden jedoch Standardsubstanzen von OS benötigt, die meist nur begrenzt zur Verfügung stehen. In einem aufwendigen Prozess werden diese aus der pflanzlichen Zellwand isoliert (Schendel *et al.*, 2015; Wefers *et al.*, 2014). Für eine möglichst umfassende Analyse der

3 Material und Methoden

AX-Struktur werden daher aus ausgewählten Ausgangsmaterialien durch Anwendung von *endo*-Xylanasen sowohl (A)XOS als auch FAXOS in ausreichenden Mengen freigesetzt, die anschließend isoliert, chromatographisch aufgereinigt und strukturcharakterisiert werden. Hierzu geeignete Verfahren werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.4.1 Freisetzung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

Zur Freisetzung von OS aus FS-haltigen AX können sowohl säurehydrolytische als auch enzymatische Verfahren eingesetzt werden. Um zu verhindern, dass AX vollständig zu Monosacchariden abgebaut werden, sind die bei der Säurehydrolyse ausgewählten Bedingungen von besonderer Bedeutung. Schendel und Mitarbeiter (2015) haben auf Basis der von Saulnier *et al.* (1995) beschriebenen milden TFA-Hydrolyse (50 mM, 100 °C, 2 h) sowohl komplexe, FS-haltige Seitenketten als auch FAXOS aus Weizenkleie isoliert. Die milde TFA-Hydrolyse führt bevorzugt zur Spaltung der glykosidischen Bindungen zwischen den Araf-Seitenketten und den Xylp-Einheiten des Rückgrats und ermöglicht dadurch eine semiselektive Freisetzung der Seitenketten. Esterbindungen zwischen Araf-Einheiten und Hydroxyzimtsäuren bleiben unter diesen Bedingungen weitestgehend stabil. Im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse resultiert die saure Hydrolyse jedoch in einer Vielzahl an zufälligen Produkten und kann auch zum Abbau einzelner Monosaccharide führen. Aus diesen Gründen sowie in Anbetracht dessen, dass FS-haltige, komplexe Seitenketten nicht im Fokus dieser Arbeit stehen, wurde die enzymatische Hydrolyse zur gezielten Freisetzung von OS bevorzugt.

In Kapitel 1.3 wurde bereits ausführlich auf die Spezifität von *endo*- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylanasen aus den GH-Familien 10 und 11 eingegangen, die die β -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidischen Bindungen im Rückgrat der AX an bestimmten Positionen spalten. Dies führt zur Freisetzung von (A)XOS bzw. FAXOS mit variablen DP und Substitutionsmustern (Gruppen *et al.*, 1992c; McCleary *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2015). Der Einsatz von GH10- bzw. GH11-Xylanasen ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass sie mindestens zwei bis drei uXylp-Einheiten zur Spaltung benötigen, wodurch höher substituierte Bereiche von AX unzugänglich bleiben (Pollet *et al.*, 2010). Eine vielversprechende Alternative stellen GH5-Xylanasen dar, die gezielt diese hochsubstituierten Strukturen abbauen können (Biely *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2011). Neben der Spezifität der Xylanasen ist auch die Beschaffenheit des Ausgangsmaterials von Bedeutung bei der Auswahl der Enzyme. Bei isolierten Zellwandmaterialien, in denen die AX noch fest in den Zellwandverbund eingebunden sind, empfiehlt sich zur Steigerung der Produktausbeute der Einsatz von Enzymmischungen, die neben Xylanasen auch weitere zellwandabbauende Enzyme enthalten. Driselase ist ein kommerziell erhältliches Enzympräparat, das aus Pilzen der Gruppe der Basidiomyceten gewonnen wird und neben *endo*-Xylanasen auch beispielsweise Cellulasen bzw. β -Cellobiosidasen enthält, die zum Abbau von Cellulose führen. Da Driselase keine FS-Esteraseaktivität zeigt (Micard *et al.*, 1994), ist es zur Isolierung von FAXOS aus pflanzlichen Zellwandmaterialien geeignet (Bunzel *et al.*, 2002; Schendel *et al.*, 2015). Ein Nachteil der

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

Verwendung von Enzymmischungen besteht darin, dass sie zur Bildung von zum Teil unerwünschten Produkten führen, die die chromatographische Aufreinigung der OS erschweren. *Endo*-Xylanasen, die durch rekombinante Genexpression aus Mikroorganismen wie Bakterien oder Hefen gewonnen werden, zeichnen sich durch eine hohe Reinheit aus und zeigen wenige bis keine Nebenaktivitäten. Sie werden sowohl in Kombination mit bereits aufgereinigten, wässrig oder alkalisch extrahierten AX eingesetzt (Courtin & Delcour, 2001; Gruppen *et al.*, 1992c; McCleary *et al.*, 2015) als auch direkt auf isoliertes Zellwandmaterial angewandt (Ordaz-Ortiz *et al.*, 2005; Schendel *et al.*, 2016b). In Abhängigkeit des eingesetzten Substrats werden dadurch überwiegend die gewünschten OS freigesetzt.

Für die Isolierung von AXOS wurde das alkalisch extrahierte Weizen-AX (Megazyme) im präparativen Maßstab in Reinstwasser gelöst (~ 1 g/80 mL). Es wurden jeweils zwei Inkubationsansätze durchgeführt, bei der zum einen eine GH10-Xylanase der Firma Nzytech (*Clostridium thermocellum*, EC 3.2.1.8, CtXyn10B) zugesetzt worden ist (560 U/g Substrat) und zum anderen eine GH11-Xylanase der Firma Megazyme (*Neoxallimastix patriciarum*, EC 3.2.1.8, E-XYLNP, 4000 U/g Substrat), um ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Spaltungsmustern abzudecken. Beide Enzyme werden im Folgenden als XYL₁₀ bzw. XYL₁₁ bezeichnet. Das AX wurde jeweils 4 h lang bei 75 °C (XYL₁₀) bzw. 50 °C (XYL₁₁) inkubiert und der Enzymverdau durch Zugabe von Ethanol (60 % Endkonzentration, (v/v)) gestoppt. Eine zu erwartende Präzipitatbildung von unverdaulichem polymerem Substrat blieb aus, was darauf schließen lässt, dass das AX zum größten Teil in niedermolekulare, Ethanol/Wasser-lösliche Bestandteile abgebaut worden ist. Auf die Zugabe von Puffersalzen, die sich störend auf die nachfolgenden Aufreinigungsschritte auswirken könnten, wurde verzichtet. Des Weiteren wurde auch keine Anpassung des pH-Wertes vorgenommen. Da das pH-Optimum der Xylanasen (XYL₁₀: pH 6,8; XYL₁₁: pH 6) im neutralen bis schwach sauren Bereich liegt, wird der Einfluss als gering eingeschätzt. Die genauen Hydrolysebedingungen von XYL₁₀ bzw. XYL₁₁ können in der Arbeitsvorschrift 8.4.1 nachgelesen werden. Zuletzt wurden beide Hydrolysate für die weitere Isolierung und Aufreinigung eingedampft und schließlich gefriergetrocknet.

In Anlehnung an die Arbeiten von Schendel *et al.* (2015) und Bunzel *et al.* (2002) wurde zur Freisetzung von FAXOS aus isolierten UBS von Roggenvollkornmehl ein Driselasepräparat (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Die UBS (~ 9 g) wurden dafür in Reinstwasser suspendiert (~ 1 g/100 mL), etwa 1 g Driselase hinzugefügt und für 48 h bei 40 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Enzyme hitzeinaktiviert (92 °C) und unlösliche Rückstände abzentrifugiert bzw. abfiltriert (s. Arbeitsvorschrift 8.5.1). Der Überstand wurde entsprechend eingeeengt.

Darüber hinaus konnte bei der Isolierung weiterer FAXOS-Strukturen auf die Promotionsarbeit von Daniela Schäfer (2023) zurückgegriffen werden. AX aus Mais besitzen große Anteile an komplexen, FS-haltigen Seitenketten wie FA, FAX und FAXG (Schendel *et al.*, 2016a), sind jedoch ohne vorherige Behandlung des Zellwandmaterials resistent gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse mit *endo*-Xylanasen. Schäfer (2023) hat aus isolierten UBS von Maiskörnern (insgesamt 90 g getrennt auf mehrere Ansätze) die beschriebenen Seitenketten durch eine

3 Material und Methoden

milde TFA-Hydrolyse mit leicht angepassten Bedingungen (50 mM TFA, 95 - 100 °C, 20 min) freigesetzt und im präparativen Maßstab isoliert und aufgereinigt. Dadurch hat sich die Enzymzugänglichkeit des dabei zurückbleibenden, unlöslichen Rückstands (~ 76 g) verbessert, welcher nach wie vor große Mengen an FS-haltigen AX enthielt. Dieser wurde anschließend in vollentsalztem Wasser mit einer thermostabilen GH11-Xylanase der Firma AB Vista (*Trichoderma reesei*, EC 3.2.1.8, 1020000 BXU/g) für 6 h bei pH 6,3 und 80 °C inkubiert. Diese wird im weiteren Verlauf als XYL_{ABV} abgekürzt. Neben der Xylanaseaktivität weist das Enzym auch nicht standardisierte Nebenaktivitäten wie β -Glucanase-, Mannanase- und Cellulaseaktivitäten auf. Durch Aufkochen des Hydrolysats wurde die Xylanase inaktiviert. Der nach Ethanolfällung (80 % Endkonzentration, (v/v)) gewonnene Überstand, der neben FAXOS auch (A)XOS enthält, wurde anschließend weiter fraktioniert und aufgereinigt.

3.4.2 Isolierung und Aufreinigung von Arabinoxyloligosacchariden

Aufgrund der hohen Viskosität der aufkonzentrierten, enzymatischen Hydrolysate erfolgte eine Vorfraktionierung der (A)XOS mittels präparativer Größenausschlusschromatographie (SEC, engl. *Size Exclusion Chromatography*). Als stationäre Phase wurde eine Polyacrylamidphase (Bio-Gel P2) eingesetzt, bei der die (A)XOS ausschließlich nach ihrem hydrodynamischen Volumen im Wässrigen getrennt werden. Diese Art der SEC-Trennung wurde bereits mehrfach für die Fraktionierung von (A)XOS beschrieben (Gruppen *et al.*, 1992c; McCleary *et al.*, 2015; Pastell *et al.*, 2009). Der vom Hersteller angegebene Molekulargewichtsbereich liegt zwischen 100 bis 1800 Da, wonach (A)XOS bis zu einem DP von zehn getrennt werden können (Gruppen *et al.*, 1992c). Die Säule mit einer Länge von 85 cm und einem Innendurchmesser von 2,6 cm ermöglicht zudem, große Probenmengen aufzugeben. Jedoch enthalten die einzelnen Fraktionen aufgrund der geringen Auflösung der Trennung meist mehrere (A)XOS mit zum Teil unterschiedlichen DP, weshalb eine weitere Aufreinigung oftmals notwendig ist. Entgegen den Herstellerempfehlungen, die wässrige Pufferlösungen als Elutionsmittel vorschlagen, wurde die Bio-Gel-P2-Säule isokratisch mit Reinstwasser bei 40 °C betrieben, um eine Beeinträchtigung nachfolgender Aufreinigungsschritte durch Salze auszuschließen. Die zeitliche Elution der (A)XOS wird mit Hilfe eines RI-Detektors erfasst. In festgelegten Zeitintervallen werden die einzelnen Fraktionen durch einen Fraktionssammler aufgefangen und gemäß dem Chromatogramm vereinigt (s. Arbeitsvorschrift 8.4.2).

Im Anschluss an die SEC folgten eine Reihe an HPLC-basierten, semipräparativen Verfahren, um die (A)XOS-Fractionen weiter aufzureinigen. Infolge der hohen Polarität der (A)XOS sind Umkehrphasen (RP, engl. *Reversed Phase*) mit unpolaren Modifikationen wie C18- oder Phenyl-Hexyl-Phasen für die Trennung von (A)XOS ungeeignet, da diese keine ausreichende Retention ermöglichen. Da in der RP-HPLC mit wässrig-organischen Eluenten oder zum Teil auch mit reinem Wasser gearbeitet wird, kommt es darüber hinaus zur Mutarotation des α - und β -Anomers des reduzierenden Endes der OS, was zu einer Verbreiterung der Peakform bis

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

hin zu Doppelpeaks führt (El Rassi, 1996). Aus diesen Gründen musste auf andere Trennmechanismen zurückgegriffen werden. Für polare Analyten eignen sich beispielsweise HILIC-Säulen auf Silicagelbasis, die mit polaren funktionellen Gruppen wie Diolen, Aminogruppen, Amiden oder Sulfobetainen modifiziert sind (Buszewski & Noga, 2012). Die mobile Phase besteht aus Wasser mit hohen Anteilen an organischen Lösungsmitteln (70 - 80 %), die zur Kontrolle von pH-Wert und Ionenstärke zusätzlich Puffersalze wie Ammoniumacetat oder -formiat enthalten kann. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die Trennung der polaren Analyten hauptsächlich durch deren Verteilung zwischen einer wasserreichen, an der stationären Phase immobilisierten Schicht und dem organischen Anteil des Eluenten bestimmt wird. Die Voraussetzung für die Verwendung von HILIC-Phasen ist, dass die Analyten in der jeweiligen Fließmittelzusammensetzung löslich sind. Insbesondere bei Mischungen mit OS hoher Konzentration kann das Ausfallen der Analyten auf der stationären Phase zu Trennproblemen führen. HILIC-Säulen wurden bereits zur analytischen Trennung von (A)XOS-Gemischen eingesetzt (Juvonen *et al.*, 2019; Kouzounis *et al.*, 2022).

Als Alternative zu HILIC-Phasen bieten sich auch Säulen aus porösem graphitischem Kohlenstoff (engl. PGC, *Porous Graphitic Carbon*) an, die im Gegensatz zu klassischen RP-Säulen keine gebundenen, funktionellen Gruppen enthalten, sondern aus einer sphärischen Graphitschicht aus hexagonal angeordneten Kohlenstoffen bestehen. Dabei basiert die Trennung der Kohlenhydrate auf einer Kombination aus dispersiven Wechselwirkungen, induzierten Dipolkräften sowie spezifischen Adsorptions- und Polarisierungseffekten an der Oberfläche der Graphitschicht. Demzufolge wird die Retention an PGC-Phasen vor allem durch die Polarisierbarkeit der Analyten sowie deren räumliche Struktur und Konformation bestimmt. Es werden zu RP-Phasen vergleichbare Eluenten mit geringem organischem Anteil eingesetzt, der während des chromatographischen Laufs langsam gesteigert wird. Durch eine zusätzliche Temperierung der Säule auf 70 °C kann darüber hinaus der Einfluss der α/β -Mutarotation minimiert werden (Westphal *et al.*, 2010).

Für die Fraktionierung der AXOS wurde eine semipräparative HILIC-Säule (Waters) als auch eine PGC-Säule (Thermo) mit Gradienten aus Wasser und Acetonitril eingesetzt (s. Arbeitsvorschrift 8.4.2). Aufgrund der stark unterschiedlichen Trennmechanismen bildeten beide Säulen eine ideale Ergänzung zueinander, wodurch AXOS, die zuvor auf einer Säule coeluierten, anschließend auf der anderen Säule trennbar waren. Beide Säulen wurde mit einer automatisierten Probenaufgabe und einem programmierbaren 16-Wege-Ventil kombiniert. Aufgrund der Gradientenelution wurden die (A)XOS mittels ELSD detektiert. Bedingt durch die hohen Flussraten (1,5 - 4,0 mL/min) musste das Eluat nach der chromatographischen Trennung im Splitverhältnis 1:20 aufgeteilt werden, wobei der größere Anteil durch das Ventil fraktioniert wurde. Auf diese Weise wurden AXOS-Standardsubstanzen mit Mengen zwischen 1 und 9 mg erhalten, von denen die meisten eine mittels HPAEC-PAD bestimmte Reinheit von mindestens 90 % aufwiesen.

3 Material und Methoden

Trotz HILIC- und PGC-Trennung konnte bei einzelnen, wenigen AXOS-Fractionen noch nicht die für analytische Zwecke erforderliche Reinheit erreicht werden. Diese Fractionen wurden im Anschluss mittels einer semipräparativen HPAEC-Säule (Thermo) weiter aufgereinigt. In Kapitel 3.3.1 wurde bereits die hohe Selektivität und Trennleistung der analytischen HPAEC-PAD für Kohlenhydratgemische dargestellt. Die Anwendung präparativer HPAEC-Säulen zur Fractionierung von (A)XOS ist zudem in der Literatur beschrieben (Bowman *et al.*, 2012; Verbruggen *et al.*, 1998). Da diese jedoch relativ teuer sind, werden sie im Vergleich zu analytischen Säulen seltener eingesetzt. Die Aufreinigung der restlichen AXOS-Fractionen lief aufgrund eines programmierbaren Fractionssammlers ebenfalls vollständig automatisiert ab. Gleiche Fractionen wurden anhand des entsprechenden PAD-Chromatogramms miteinander vereint. Um einen alkalisch induzierten Abbau der gesammelten AXOS (s. Kapitel 3.2.2) zu vermeiden, wurden die Fractionen unmittelbar nach der Aufarbeitung mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Aufgrund des hohen Salzeintrags folgte anschließend eine Abtrennung der Salze über eine Festphasenextraktion (SPE, engl. *Solid Phase Extraction*) an nicht-porösem graphitischem Kohlenstoff (nPGC, engl. *Non-Porous Graphitic Carbon*). Durch Waschen mit Reinstwasser konnten die Salze sowie enthaltene Monosaccharide entfernt und im Anschluss die OS mit Wasser/Acetonitril (50:50) von der Säule eluiert werden. Nach Abdampfen des Acetonitrils wurden die aufgereinigten AXOS-Fractionen schließlich gefriergetrocknet (s. Arbeitsvorschrift 8.4.2).

3.4.3 Trennung der ferulasäurehaltigen von den ferulasäurefreien Arabinoxyloligosacchariden

Der Anteil an FAXOS im enzymatischen Hydrolysat der Roggen-UBS ist im Vergleich zu den restlichen FS-freien OS gering, weshalb diese zunächst mit Hilfe einer präparativen Säulenchromatographie abgetrennt und aufkonzentriert worden sind (s. Arbeitsvorschrift 8.5.2). Als Säulenmaterial wurde Amberlite XAD-2 verwendet, bei dem es sich um ein zur Aufreinigung von FAXOS häufig eingesetztes Polystyrol-Divinylbenzol-Harz handelt (Allerdings *et al.*, 2006; Bunzel *et al.*, 2002; Schendel *et al.*, 2015). Die Trennung basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen sowie van-der-Waals-Kräften zwischen dem Säulenmaterial und dem aromatischen Ringsystem der FS. Monosaccharide und FS-freie OS werden dagegen nicht zurückgehalten, weshalb sie durch Waschen mit Wasser entfernt werden können. Im Anschluss werden die FAXOS mit Wasser/Methanol (50:50) von der Säule eluiert und das Säulenmaterial mit Methanol gereinigt. Bei größeren FAXOS mit einem höheren DP kann es vorkommen, dass die Wechselwirkungen mit dem Amberlite-XAD-2-Material zu schwach sind, da das polare Kohlenhydratgerüst überwiegt, weshalb diese oftmals in der wässrigen Fraction enthalten sind. Bunzel und Mitarbeiter (2002) berichteten von Anteilen der FAXOS in der wässrigen Fraction von 7 % nach saurer und bis zu 75 % nach enzymatischer Hydrolyse. Aufgrund der großen Säulenkapazität wurde sich dennoch für dieses Säulenmaterial zur präparativen Aufreinigung

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

der FAXOS entschieden. Die FAXOS aus den enzymatisch behandelten Mais-UBS wurden ebenfalls durch Amberlite XAD-2 abgetrennt und aufkonzentriert. Dieser Schritt wurde bereits im Zuge der Promotionsarbeit von Daniela Schäfer (2023) vorgenommen.

Für die Entwicklung einer NMR-spektroskopischen Profilingmethode (vgl. Kapitel 4.3) wurde eine getrennte Analyse der aus den Getreide-BS freigesetzten (A)XOS und FAXOS nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁ angestrebt. Die gezielte Aufkonzentrierung der FAXOS ist für eine NMR-spektroskopische Analyse wünschenswert und kann darüber hinaus die Auswertung der Spektren erleichtern, da sich die Anzahl an zum Teil überlagernden Signalen verringert. Eine auf Amberlite XAD-2 basierende präparative Säulenchromatographie erwies sich jedoch für eine quantitative Trennung beider Fraktionen als ungeeignet. Als Alternative bietet sich die RP-HPLC an. Junker und Bunzel (2024) trennten enzymatisch freigesetzte FS-freie und -haltige Arabino- und Galactooligosaccharide auf einer Phenyl-Hexyl-Phase unter Anwendung eines Wasser/Methanol-Gradienten. Die Elution der FS-freien OS wurde anhand ihres ELSD-Signals verfolgt, während FS-haltige OS durch ein zusätzliches UV-Signal bei 325 nm erkennbar waren. Die gesammelten Fraktionen konnten anschließend mittels HPAEC-PAD getrennt voneinander analysiert werden. In Anlehnung an diese Arbeit wurde eine entsprechende Methode für (A)XOS und FAXOS etabliert, die eine getrennte NMR-spektroskopische Analyse beider Fraktionen ermöglichte (s. Kapitel 4.3.4).

3.4.4 Isolierung und Aufreinigung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide

Die von den FS-freien OS abgetrennten FAXOS aus dem Roggenhydrolysat wurden zunächst nach ihrer Größe über eine präparative SEC getrennt. Im Gegensatz zu den (A)XOS wurde als Säulenmaterial Sephadex LH20-Material eingesetzt, das aus quervernetztem, hydroxypropyliertem Dextran aufgebaut ist, wodurch es sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften aufweist. Während die Trennung auf dem Bio-Gel-P2-Material ausschließlich auf einem Größenausschlussmechanismus beruht, kommt es bei dem Sephadex LH20-Material zusätzlich zu Adsorptions- und Verteilungseffekten. Als Eluent wurde vollentsalztes Wasser verwendet (Allerdings *et al.*, 2006; Bunzel *et al.*, 2002). Bei anspruchsvolleren Trennproblemen, beispielsweise zur Trennung von monomeren, FS-haltigen Seitenketten und DFS-Sacchariden kann die Elution auch stufenweise erst durch reines Wasser und anschließend mit Wasser/Methanol (80:20) erfolgen (Allerdings *et al.*, 2005). Die FAXOS wurden mit Hilfe eines automatisierten Fraktionssammlers in festen Zeitintervallen aufgefangen und hinsichtlich ihres UV-Chromatogramms (325 nm) verschiedenen Fraktionen zugeordnet und vereint (s. Arbeitsvorschrift 8.5.2). Eine Sephadex LH20-Trennung wurde auch für die FAXOS aus dem Maishydrolysat durchgeführt (Schäfer, 2023). Die anschließenden Aufreinigungsschritte der Sephadex-Fraktionen erfolgten in dieser Arbeit.

3 Material und Methoden

Die hinsichtlich ihres DP getrennten FAXOS wurde mit Hilfe der semipräparativen HPLC unter Verwendung einer C18-Phase (Wasser/Methanol-Gradient) und der zuvor beschriebenen HILIC-Phase aufgereinigt. Auf die Problematik der α/β -Mutarotation auf RP-Phasen wurde bereits in Kapitel 3.4.2 hingewiesen (El Rassi, 1996). Aufgrund mangelnder Alternativen (zu starke Retention auf PGC-Phasen, alkalische Bedingungen bei der HPAEC) wurde sich dennoch für diese Art der Aufreinigung entschieden (s. Arbeitsvorschrift 8.5.2). Während des gesamten Isolierungsprozesses wurde stets darauf geachtet, die Fraktionen vor Licht zu schützen, um eine *cis/trans*-Isomerisierung der FS zu verhindern. Die Mengen an isolierten und aufgereinigten FAXOS-Standardsubstanzen variierten zwischen 0,7 und 55,4 mg, die eine mit RP-HPLC-UV (325 nm) bestimmte Reinheit von mindestens 85 % aufwiesen.

3.4.5 Massenspektrometrische Analyse der isolierten Standardsubstanzen

Um erste Hinweise auf die Struktur der isolierten AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen zu bekommen, wurde deren Monosaccharidzusammensetzung nach saurer Hydrolyse mittels HPAEC-PAD (vgl. Kapitel 3.3.1) bestimmt. Da lediglich Xylp und Araf als monomere Bestandteile zu erwarten waren, wurde ausschließlich eine kurze TFA-Hydrolyse der gut löslichen OS ohne weitere Behandlung mit methanolischer Salzsäure durchgeführt (s. Arbeitsvorschrift 8.6.1). Anhand der molaren Verhältnisse der freigesetzten Monosaccharide wurde das A/X bestimmt, aus dem Aussagen über den DS der OS abgeleitet werden konnten.

Die Bestimmung des Molekulargewichts der OS mit Hilfe massenspektrometrischer Analysemethoden stellte einen weiteren wichtigen Schritt in der Strukturaufklärung der OS dar. In Kombination mit dem Verhältnis der Monosaccharide lieferte der DP der OS Rückschlüsse auf die konkrete Anzahl an beteiligten Xylp- und Araf-Einheiten. Für die Analyse der AXOS wurde die HPAEC-PAD in Kombination mit MS verwendet, die neben der Bestimmung der Reinheit auch eine Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) der OS ermöglichte. Die in der HPAEC eingesetzten Eluenten weisen eine hohe Salzkonzentration auf, wodurch eine direkte MS-Kopplung erheblich erschwert wird. Um dennoch eine parallele Detektion mittels PAD und MS zu ermöglichen, wird das Eluat nach der chromatographischen Trennung aufgeteilt (s. Abbildung 13). Dabei wird ein Teil unmittelbar zum PAD geleitet, während der verbleibende Anteil vor der MS-Analyse einer Entsalzung unterzogen wird. Die Entsalzung erfolgt mithilfe eines elektrolytisch regenerierenden Suppressors. Hierbei wird im Gegenstrom Wasser elektrolytisch gespalten, wobei die entstehenden Hydroniumionen über eine Ionenaustauschermembran selektiv mit den im Eluat vorhandenen Natriumionen ausgetauscht werden. Die im Eluenten zurückbleibenden bzw. angereicherten Acetationen stören die nachfolgende MS-Analyse nicht. Um das MS-System zusätzlich zu schützen, wird durch einen Leitfähigkeitsdetektor (CD, engl. *Conductivity Detector*) kontrolliert, ob die störenden Salze aus dem Eluat entfernt worden sind. Zur Optimierung der Ionisierungseffizienz wird dem entsalzten Eluat von außen eine geringe Menge Lithiumchlorid zugesetzt, um die gezielte Bildung von

3.4 Freisetzung und Isolierung von Oligosacchariden aus Arabinoxylanen

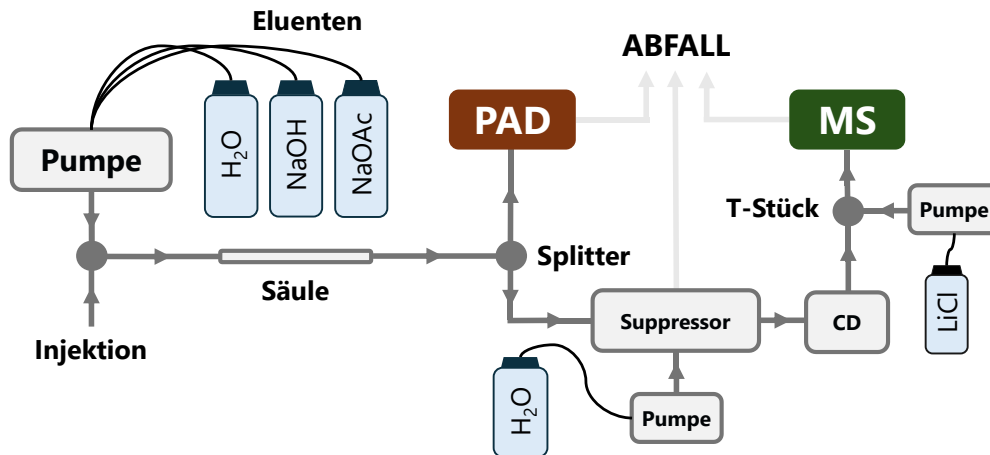


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit paralleler gepulst amperometrischer (PAD) und massenspektrometrischer (MS) Detektion. CD, Leitfähigkeitsdetektor; H₂O, Reinstwasser; LiCl, Lithiumchlorid; NaOAc, Natriumacetat; NaOH, Natronlauge

Lithiumaddukten während der Ionisierung zu fördern. Die anschließende Ionisierung der Analyten, bei der vorrangig Quasimolekülonen $[M+Li]^+$ gebildet werden, erfolgt mittels Elektronensprayionisation (ESI). Dabei handelt es sich um eine schonende Ionisierungstechnik, die den Übergang gelöster Analytionen in die Gasphase erlaubt und bei der es nur zu geringen Fragmentierungen kommt, wodurch die Struktur der Analyten weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Bei der Ionisierung größerer Moleküle ($DP \geq 6$) kann es jedoch vorkommen, dass sich zweifache Lithiumaddukte mit doppelter Ladung bilden. Infolge der Ladungstrennung durch das angelegte elektrische Feld kommt es an der Spitze der beheizbaren Kapillare zur Ausbildung eines Taylor-Konus. Mit Hilfe eines Zerstäubergases wird aus dem Kegel ein feiner Strahl stark geladener Tröpfchen emittiert, der zur Gegenelektrode hin beschleunigt wird. Mit fortschreitender Lösungsmittelverdampfung kommt es zur Reduktion der Tröpfchengröße und schließlich zur Coulomb-Explosion unter Freisetzung der geladenen Analytionen. Der Zerfall der geladenen Tröpfchen wird auch als „*Droplet Jet Fission*“ bezeichnet. Obwohl letzteres Phänomen bislang noch nicht vollständig geklärt ist, bieten theoretische Modelle wie das „*Charged-Residue*“- und das „*Ion-Evaporation*“-Modell mögliche Erklärungsansätze. Der Ionenstrom wird schließlich über eine Transferkapillare in den Massenanalysator geleitet. Der Quadrupol separiert die ankommenden Ionen nach ihrem m/z . Dieser besteht aus vier quadratisch angeordneten Stabelektroden, zwischen denen sich die Ionen auf stabilen bzw. instabilen Bahnen bewegen. Dabei wird meist das Verhältnis von Gleich- zu Wechselspannung konstant gehalten, während die absoluten Spannungsamplituden simultan erhöht werden. Dadurch verschiebt sich das Stabilitätsfenster kontinuierlich zu höheren m/z -Werten, sodass sukzessive Ionen unterschiedlicher m/z den Quadrupol passieren können. Der Massenanalysator kann entweder im *Full-Scan*- oder im *Selected-Ion-Monitoring*-(SIM-)Modus betrieben werden. Im *Full-Scan*-Modus wird der gesamte m/z -Bereich nacheinander erfasst, wodurch sich dieser Modus insbesondere zur Identifizierung von Verbindungen eignet. Mit zunehmender Größe des gescannten m/z -Bereichs verringert sich jedoch die Anzahl der pro

3 Material und Methoden

Peak aufgenommenen Scans. Im SIM-Modus hingegen passieren ausschließlich Ionen mit vordefinierten m/z -Werten den Quadrupol. Da keine Zeit für das Scannen analytisch irrelevanter m/z -Bereiche aufgewendet wird, erhöht sich die Empfindlichkeit der Messung deutlich.

Die Bestimmung des Molekulargewichts sowie eine stufenweise Fragmentierung der isolierten FAXOS-Standardsubstanzen erfolgte durch Direktinjektion in eine lineare Ionenfalle unter Verwendung einer Spritzenpumpe. Lineare Ionenfallen-Massenanalysatoren bestehen ebenfalls aus einem Satz an Quadrupolstäben, die ein zweidimensionales Hochfrequenzfeld erzeugen, sowie Endkappen, zwischen denen Ionen über einen breiten m/z -Bereich gespeichert werden können. Durch Potentialänderungen werden die Ionen nacheinander aus der Falle ausgestoßen und deren m/z in aufsteigender Reihenfolge detektiert. Die simultane Speicherung und zeitliche Anreicherung von Ionen vor der Detektion führt zu einer höheren Empfindlichkeit im *Full-Scan*-Modus im Vergleich zu einfachen Quadrupolen. Gleichmaßen führt dies zu einer geringeren Toleranz gegenüber stark matrixbehafteten Proben, in denen die Detektion der in kleineren Mengen vorliegenden Analyten beeinträchtigt werden kann. Darüber hinaus können Ionen mit bestimmten m/z gezielt zurückgehalten und mit Hilfe eines Kollisionsgases über eine kollisionsinduzierte Dissoziation fragmentiert werden (entspricht MS^2). Dieser Vorgang kann mit den entstehenden Tochterionen wiederholt werden, was wiederum zu einem MS^3 -Spektrum führt. Theoretisch ist eine mehrfache Wiederholung dieses Experiments möglich, was jedoch durch die Konzentration an Analytionen begrenzt wird. Die Fragmentierungsmuster der OS in MS^n -Experimenten geben Rückschlüsse auf bestimmte Substituenten und zum Teil auch auf deren Position im Molekül. Dabei kommt es sowohl zur Spaltung von glykosidischen Bindungen als auch zur Spaltung innerhalb der Ringstruktur („Crossring-Fragmente“), was auf bestimmte Bindungspositionen hindeuten kann (Bauer, 2012; Domon & Costello, 1988). Im positiven Modus bilden FAXOS größtenteils Alkaliaddukte, wobei Quasimolekülionen mit ubiquitär vorkommenden Natriumionen ($[M+Na]^+$) das Spektrum dominieren (Ruthes *et al.*, 2017; Schendel *et al.*, 2015). Fragmentierungsmuster der FAXOS im negativen Modus wurde ebenfalls beschrieben (Wang *et al.*, 2009). Die Versuchsdurchführung sowie die spezifischen Bedingungen zur massenspektrometrischen Analyse der FAXOS-Standardsubstanzen sind in der Arbeitsvorschrift 8.6.2 beschrieben.

Für eine eindeutige Strukturaufklärung der isolierten Standardsubstanzen bedarf es neben der Bestimmung der monomeren Bausteine und der Molekülmasse der Anwendung von eindimensionalen und 2D-NMR-Experimenten. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

3.5 NMR-spektroskopische Methoden

Das Prinzip der NMR-Spektroskopie beruht darauf, dass Kerne mit einem Eigendrehimpuls $\vec{P}$ ein magnetisches Moment $\vec{\mu}$ erzeugen und demnach magnetische Dipole darstellen. Der Zusammenhang zwischen beiden Größen wird durch das gyromagnetische Verhältnis γ beschrieben.

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad (1)$$

Diese kernspezifische Konstante trägt unter anderem zur Nachweisempfindlichkeit eines NMR-Experiments bei. Protonen und das ^{13}C -Isotop gehören zu den NMR-aktiven Kernen und besitzen beide eine Kernspinkquantenzahl $I = \frac{1}{2}$. Während das Proton das mit Abstand häufigste Wasserstoffisotop ($\sim 99,98\%$) darstellt und somit für die NMR-Spektroskopie von großer Bedeutung ist, liegt das natürliche Vorkommen des ^{13}C -Isotops etwa bei 1,1 %, wodurch die Empfindlichkeit von ^{13}C -NMR-Messungen deutlich reduziert wird. Atomkerne, die eine Kernspinkquantenzahl I gleich Null und folglich kein magnetisches Moment besitzen, werden in der NMR-Spektroskopie nicht detektiert. Dazu zählt zum Beispiel das Kohlenstoff-Isotop ^{12}C , welches die Grundlage aller organischer Verbindungen bildet, wodurch deren NMR-spektroskopische Analyse im Allgemeinen erschwert wird (Claridge, 2016).

Werden Atomkerne mit $I = \frac{1}{2}$ in ein statisches Magnetfeld B_0 gebracht, richten sich die Spins entweder parallel oder antiparallel zur Richtung des externen Magnetfeldes aus. Die Ausrichtungen entsprechen zwei Energieniveaus, die als α - und β -Zustand bezeichnet werden. Durch den Einfluss des äußeren Magnetfeldes wird eine Präzessionsbewegung der Kerndipole um die räumliche Achse des Magnetfeldes induziert, was in der klassischen Betrachtungsweise einem Doppelkegel ähnelt. Die Frequenz der Präzession wird als Larmorfrequenz ω_0 bezeichnet und ist der magnetischen Flussdichte B_0 proportional:

$$\omega_0 = -\gamma B_0 / \text{rad} \cdot \text{s}^{-1} \quad \text{oder} \quad \nu_0 = -\frac{\gamma}{2\pi} B_0 / \text{Hz} \quad (2)$$

Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung können Kerne ihren Energiezustand ändern. Dabei tritt nur dann Resonanz ein, wenn die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung ν_0 der Larmorfrequenz entspricht. Die zugehörige Energie ist gegeben durch:

$$\Delta E = h\nu_0 = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (3)$$

Hierbei bezeichnet h das Planksche Wirkungsquantum. Der Besetzungsunterschied ist gemäß der Boltzmann-Verteilung abhängig von der Magnetfeldstärke des externen Magnetfeldes B_0 , der Temperatur und dem gyromagnetischen Verhältnis γ der Spins. Im Gleichgewichtszustand besteht ein geringer Besetzungsüberschuss des energieärmeren α -Niveaus. Durch Summierung aller magnetischen Kernmomente in einer Probe ergibt sich eine makroskopische Magnetisierung M_0 , die im Gleichgewichtszustand in Richtung des externen Magnetfeldes M_z ausgerichtet ist (Claridge, 2016).

3 Material und Methoden

Durch das Einstrahlen eines magnetischen Wechselfeldes B_1 im Radiofrequenzbereich wird das thermische Gleichgewicht gestört. Es kommt zur Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung M_0 in Richtung der transversalen x' - y' -Ebene. Der Auslenkungswinkel Θ ist dabei von der Amplitude B_1 und der Impulsdauer τ_p abhängig. Bei Anwendung eines 90° -Pulses wird entsprechend transversale, detektierbare Magnetisierung erzeugt, die sich gemäß der Larmorfrequenz ω_0 um die z -Achse bewegt. Nach Abschalten des eingestrahlten Magnetfelds B_1 kommt es zu Relaxationsprozessen, wodurch die transversale Magnetisierung abnimmt. Hierbei werden entsprechend den Bloch-Gleichungen zwei Arten unterschieden. Die longitudinale Relaxation bzw. Spin-Gitter-Relaxation beschreibt die Wiederherstellung der ursprünglichen Besetzungsverhältnisse zwischen den beiden Spinzuständen, wodurch die makroskopische Magnetisierung wieder in Richtung der z -Achse ausgerichtet wird. Dies wird durch die T_1 -Relaxationszeit ausgedrückt. Dagegen stellt die transversale Relaxation, die auch als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet wird, die Dephasierung der Spins unter Verlust der Phasenkohärenz dar und wird durch die T_2 -Zeit beschrieben. Da die abklingende Magnetisierung weiterhin mit der Larmorfrequenz ω_0 um die z -Achse präzediert, wird in einer Detektorspule ein oszillierendes Signal erzeugt, der sogenannte freie Induktionsabfall (FID*, engl. *Free Induction Decay*), der Informationen über die Resonanzfrequenzen und -intensitäten enthält. Zur Darstellung eines NMR-Spektrums wird der FID* mathematisch über eine Fourier-Transformation aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne überführt (Claridge, 2016).

In diamagnetischen Molekülen ist das lokal am Kernort wirkende Magnetfeld von der chemischen Umgebung der Kerne abhängig. Demzufolge werden chemisch nicht-äquivalente Kerne unterschiedlich stark abgeschirmt, wodurch sich unterschiedliche Resonanzfrequenzen ergeben:

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0 \quad (4)$$

Die Abschirmungskonstante σ ist eine dimensionslose Größe, die allein von der jeweiligen elektronischen und magnetischen Umgebung der Kerne abhängt und nicht durch das äußere Magnetfeld beeinflusst wird. Dagegen sind die Resonanzfrequenzen ν_1 der Kerne stets über die Resonanzbedingung (Gleichung (4)) mit der magnetischen Flussdichte B_0 verknüpft. Aus diesem Grund wird in der NMR-Spektroskopie die chemische Verschiebung δ , die eine dimensionslose Größe darstellt, definiert. Sie beschreibt die Differenz zwischen der Resonanzfrequenz eines Kerns und der einer Referenzsubstanz, ist unabhängig von der Magnetfeldstärke und wird in ppm angegeben:

$$\delta_{\text{Substanz}} = \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} \cdot 10^6 \quad (5)$$

Die in geringen Mengen zur Messlösung zugesetzte Referenzsubstanz sollte chemisch inert und gut löslich im verwendeten Lösungsmittel sein sowie ein einzelnes, nicht aufgespaltenes Signal liefern. Zudem darf sie keine Wechselwirkungen mit der Probe eingehen und sollte idealerweise außerhalb des Signalbereichs des Analyten liegen. In dieser Arbeit wurde Aceton

als Referenzsubstanz verwendet, da es aufgrund der sechs chemisch äquivalenten Protonen ein einzelnes, klar getrenntes Singulettsignal liefert, im Wässrigen löslich ist und nach der Messung leicht durch Verdampfen entfernt werden kann (s. Kapitel 3.5.4).

3.5.1 Ein- und zweidimensionale NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Oligosacchariden

Um ein vollständiges Bild der Struktur der isolierten AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen zu erhalten, war der Einsatz von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten notwendig. Aus diesem Grund wurde von jeder Standardsubstanz sowohl ein eindimensionales Protonen (^1H)-Spektrum, als auch eine Reihe an ^1H - ^{13}C -korrelierten 2D-NMR-Spektren aufgenommen. Die strukturellen Erkenntnisse, die aus den jeweiligen Spektren abgeleitet werden konnten, führten in ihrer Gesamtheit zu einer vollständigen Struktur im Hinblick auf die Ringform der beteiligten Monomere, deren anomere Konfiguration sowie die jeweiligen Bindungspositionen. Von zentraler Bedeutung bei der NMR-Analyse von OS ist die Wahl des Lösungsmittels. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimente wurden ausschließlich in reinem Deuteriumoxid durchgeführt. Durch den Austausch von Protonen der leicht sauren Hydroxygruppen mit Deuterium, werden in ^1H -NMR-Experimenten lediglich die Signale der an Kohlenstoffen gebundenen Protonen detektiert. Schendel und Bunzel (2022) berichteten von einem Abbau FS-haltiger Seitenketten in Deuteriumoxid unter spontaner Spaltung der Esterbindung. Als Alternative schlugen sie die Durchführung der NMR-Analyse in $\text{DMSO-}d_6$ vor, da die untersuchten Substanzen in diesem Lösungsmittel über mehrere Wochen stabil waren. Ein derartiger Abbau in Deuteriumoxid konnte für die isolierten FAXOS-Standardsubstanzen jedoch nicht beobachtet werden, weshalb die NMR-Messungen in Deuteriumoxid erfolgten (s. Arbeitsvorschrift 8.6.3).

^1H -NMR-Experiment

Die Durchführung eines ^1H -NMR-Experiments stellte den ersten, grundlegenden Schritt in der Strukturaufklärung der OS dar. Zur Impulsanregung wurde ein 30° -Puls eingesetzt, wodurch keine maximale Magnetisierung in der transversalen Ebene erreicht wird, jedoch benötigen die Spins weniger Zeit, um in den Ausgangszustand zurückzukehren. Durch die Wiederholung des Pulsprogramms (Scanzahl = 64 - 256) kommt es zu einer Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/N, engl. *Signal-to-Noise-Ratio*), da aufgenommene FIDs* akkumuliert werden, wobei das S/N mathematisch mit der Wurzel der Scanzahl korreliert (Bharti & Roy, 2012).

Eindimensionale ^1H -NMR-Spektren von OS sind in der Regel durch eine hohe Signalüberlagerung gekennzeichnet. Nur wenige Resonanzen lassen sich eindeutig einzelnen Protonen zuordnen, während der Großteil der Signale als komplexe Multipletts erscheint. Besonders diagnostisch sind jedoch die Signale der anomeren Protonen, die sich typischerweise im

3 Material und Methoden

chemischen Verschiebungsbereich zwischen 4,3 und 5,9 ppm befinden und gegenüber den übrigen Signalen der Ringprotonen deutlich ins Tieffeld verschoben sind. Diese Resonanzen liefern zentrale Strukturinformationen über die beteiligte Monosaccharideinheiten und deren glykosidische Verknüpfungen. Beispielsweise variieren die anomeren Protonensignale der Araf-Einheiten ($\delta_H = 5,2 - 5,4$ ppm) in Abhängigkeit von der jeweiligen Bindungsposition zur Xylp-Einheit (O2, O3 oder O2+O3) sowie von der Position der Xylp-Einheit innerhalb des OS (terminale, nichtreduzierende oder interne Einheit).

Sowohl die (A)XOS als auch die FAXOS besitzen am nichtterminalen Ende eine reduzierende Xylp-Einheit. Aufgrund der Mutarotation der Halbacetal-Gruppe stellt sich in wässriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen der α - und β -Konfiguration der reduzierenden Xylp-Einheit ein. Entsprechend erscheinen im ^1H -NMR-Spektrum zwei separate Signale für das anomere Proton. Dabei liegen die Resonanzsignale anomerer Protonen von α -Glykosiden im Vergleich zu denen der β -Glykoside um etwa 0,3 - 0,7 ppm weiter im Tieffeld, was eine erste Unterscheidung der Konfiguration ermöglicht (Agrawal, 1992). Zusätzlich wird das anomere Signal durch die vicinale $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung zwischen dem anomeren und dem dazu benachbarten Proton an Position 2 zu einem Dublett aufgespalten. Die Größe der Kopplungskonstante erlaubt eine eindeutige Bestimmung der anomeren Konfiguration. Nach der Karplus-Beziehung ($J = J_0 \cos^2 \phi - 0,28$) hängt die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung vom Interplanarwinkel ϕ zwischen den gekoppelten Protonen ab (Karplus, 1963). Im Falle der reduzierenden Xylp-Einheiten liegt die Hydroxylgruppe an Position 2 in äquatorialer Orientierung vor, so resultiert für ein α -konfiguriertes anomeres Proton typischerweise eine Kopplungskonstante von etwa 3 - 4 Hz. Dagegen weist ein β -konfiguriertes anomeres Proton aufgrund der *trans*-diaxialen Anordnung eine größere Kopplungskonstante von etwa 7 - 8 Hz auf (s. Abbildung 14).

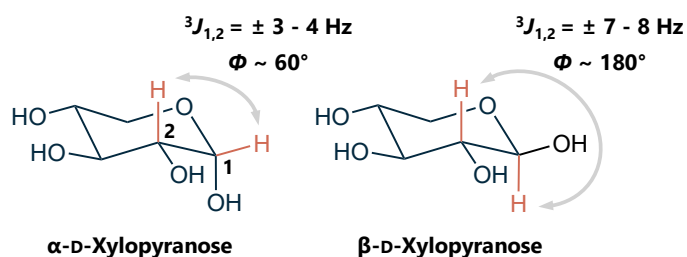


Abbildung 14: Kopplungskonstanten mit dazugehörigen Interplanarwinkeln ϕ für die Kopplung zwischen dem anomeren und dem dazu benachbarten Proton (rot markiert) in einer α - und β -konfigurierten D-Xylopyranose

Zweidimensionale ^1H , ^{13}C -korrelierte Experimente

Im Gegensatz zu eindimensionalen Methoden wird in 2D-NMR-Experimenten eine zusätzliche Frequenzdimension erhalten. Die in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren repräsentieren Korrelationen zwischen skalar gekoppelten Kernen. Jedes Signal ist durch eine spezifische Intensität sowie durch zwei Frequenzkoordinaten beschrieben, die beispielsweise den chemischen Verschiebungen des detektierten Kerns und des Korrelationspartners entsprechen. Infolgedessen erscheinen die Signale aufgelöst entlang zweier Frequenzachsen. 2D-NMR-Experimenten lassen sich grundsätzlich in vier verschiedene Phasen einteilen: Präparation,

Evolution, Mischphase und Detektion. Abbildung 15 zeigt den schematischen Aufbau eines aus zwei Scans aufgebauten 2D-NMR-Experiments.

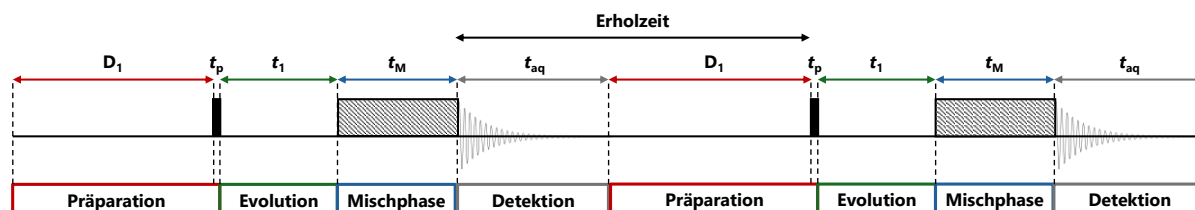


Abbildung 15: Aufbau eines aus zwei Scans bestehenden zweidimensionalen NMR-Experiments. D_1 , Wartezeit zwischen zwei Scans; t_1 , Inkrementierungszeit; t_p , Impulsdauer; t_M , Mischzeit; t_{aq} , Akquisitionszeit (modifiziert nach Claridge, 2016; Fels, 2021)

Die durch den Impuls (t_p) erzeugte transversale Magnetisierung präzediert während der Evolutionsphase unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung sowie skalarer Kopplungen. Um die zweite Frequenzdimension (F1) zu erhalten, wird die Evolutionszeit t_1 inkrementiert. Die Verlängerung von t_1 erfolgt schrittweise, wobei nach jedem einzelnen Inkrement ein FID* aufgezeichnet wird. Entsprechend ist für jedes Inkrement eine erneute Wiederholung der Pulssequenz notwendig. Eine hohe digitale Auflösung in der zweiten Dimension erfordert bei gegebener spektraler Breite eine große Anzahl an Inkrementen, wodurch sich jedoch auch die Gesamtexperimentdauer erheblich verlängert. In der Mischphase kommt es infolge skalarer Kopplungen zu einer Übertragung der Magnetisierung (Kohärenztransfer) zwischen den Korrelationskernen. Im Anschluss wird die Magnetisierung als FID*-Signal erfasst, was der direkten Frequenzdimension entspricht (F2). In der quantitativen NMR-Spektroskopie kommt der Wahl des D_1 -Delays eine besondere Bedeutung zu (s. Kapitel 3.5.2). Da die Relaxation der Kernspins nach Ende der Akquisitionszeit (t_{aq}) noch nicht abgeschlossen ist, muss insbesondere bei quantitativen Messungen darauf geachtet werden, dass zwischen einzelnen Scans ein ausreichend langer D_1 -Delay eingestellt wird, sodass die Kernspins vollständig in den Gleichgewichtszustand zurückkehren können. Dies hat jedoch ebenfalls Einfluss auf die Gesamtexperimentdauer (Claridge, 2016).

Für die Strukturaufklärung organischer Moleküle ist die Abbildung von Korrelationen zwischen ^{13}C -Kohlenstoffkernen und direkt gebundenen Protonen von zentraler Bedeutung. Derartige Korrelationen über eine Bindung hinweg ($^1J_{\text{H,C}}$) können durch das $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Experiment sichtbar gemacht werden (s. Abbildung 16). Demnach lassen sich am Beispiel des A^3X jeder einzelnen Position im Kohlenstoffgerüst der Araf- und Xylp-Einheiten sowohl eine ^1H - als auch eine ^{13}C -chemische Verschiebung zuordnen (im Falle von CH_2 -Gruppen werden zwei Kreuzsignale beobachtet). Der Informationsgehalt von HSQC-Spektren ist mit dem klassischer C,H-korrelierter Experimente vergleichbar. Durch die inverse Versuchsführung, bei der die Signale des empfindlicheren Protons anstelle des weniger empfindlichen Kohlenstoffkerns gemessen werden, lässt sich jedoch eine deutlich höhere Sensitivität erzielen. Dies führt in der Praxis zu erheblich verkürzten Messzeiten ohne Verlust der Spektrenqualität. Im HSQC-Spektrum ist die chemische Verschiebung der Protonen in der F1-Dimension (x-Achse)

3 Material und Methoden

und jene der ^{13}C -Kerne in der F2-Dimension (y-Achse) dargestellt. Zusätzlich führt die Projektion des ^1H -Spektrums in die ^{13}C -Dimension zu einer verbesserten spektralen Auflösung der Korrelationssignale.

Monosaccharideinheiten innerhalb eines OS bilden jeweils in sich geschlossene Spinsysteme. Das HSQC/*Total Correlated Spectroscopy* (TOCSY)-Experiment nutzt diese Eigenschaft aus, indem es Korrelationen innerhalb eines gemeinsamen Spinsystems sichtbar macht und dadurch die Zuordnung der C/H-Signale zu einzelnen Monosaccharideinheiten erleichtert (s. Abbildung 16). Ausgehend von einem Startsignal, beispielsweise dem anomeren Proton, lassen sich im HSQC/TOCSY-Spektrum sukzessive die weiteren C/H-Korrelationen derselben Monosaccharideinheit verfolgen. Insbesondere in den Bereichen der Ringpositionen C2 bis C5 der Xylp-Einheiten ermöglicht dieses Experiment eine verbesserte Zuordnung der Signale im Vergleich zum reinen HSQC-Spektrum.

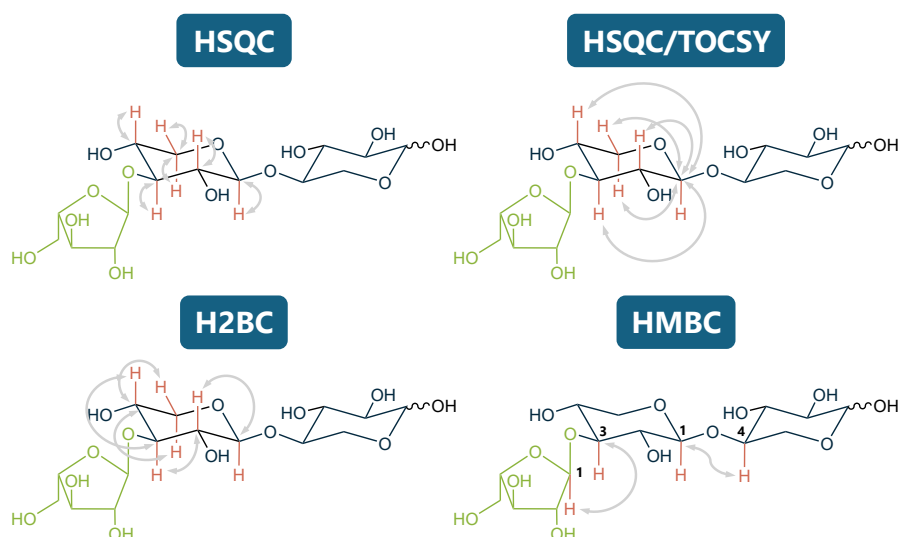


Abbildung 16: Darstellung der für die Strukturaufklärung isolierter Standardsubstanzen verwendeten zweidimensionalen NMR-Korrelationsexperimente am Beispiel des Arabinoxylooligosaccharids A³X. D-Xylopyranose (schwarz), L-Arabinofuranose (grün); HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*; TOCSY, *Total Correlated Spectroscopy*; H2BC, *Heteronuclear 2-Bond Correlation*; HMBC, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

Ergänzend dazu zeigt das *Heteronuclear 2-Bond Correlation* (H2BC)-Experiment Korrelationen von Protonen und protonentragenden Kohlenstoffen, die durch zwei kovalente Bindungen getrennt sind (s. Abbildung 16). Ausgehend vom anomeren C/H-Signal lassen sich so schrittweise die direkten Nachbarn über $^2J_{\text{H,C}}$ -Kopplungen identifizieren (Petersen *et al.*, 2006).

Zur Bestimmung der Positionen glykosidischer Bindungen ist das *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)-Experiment von entscheidender Bedeutung. Im HMBC-Spektrum werden C/H-Korrelationen über zwei bis maximal vier Bindungen hinweg detektiert, wodurch auch Kopplungen über glykosidische Bindungen hinweg zwischen benachbarten Monosaccharideinheiten sichtbar werden (Bubb, 2003). Am Beispiel des A³X (s. Abbildung 16) kann durch die gezeigte Korrelation zwischen dem C1 der terminalen und dem H4 der reduzierenden

Xylp-Einheit entsprechend die (1→4)-Bindung nachgewiesen werden. Darüber hinaus deutet die Korrelation zwischen dem H1 der Araf-Einheit mit dem C3 der tXylp auf eine Verknüpfung der Araf über die O3-Position der tXylp hin.

3.5.2 Quantifizierung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

In der Lebensmittelanalytik hat die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Kontext sogenannter *Metabolomics* Studien hat sie sich als leistungsfähige, schnelle und reproduzierbare Analysemethode zur simultanen Erfassung zahlreicher Metabolite etabliert. In Kombination mit multivariater Datenauswertung können so Lebensmittelverfälschungen aufgedeckt, die geographische Herkunft bestimmt und Marker für die Authentizität von Lebensmitteln identifiziert werden (Consonni & Cagliani, 2019). Da die Signalfächen direkt proportional zur Anzahl angeregter Kerne sind, kann die Quantifizierung direkt durch Zugabe einer Ist ohne die Aufnahme von Kalibrierkurven erfolgen, was einen großen Vorteil der ^1H -NMR-Spektroskopie darstellt (Bharti & Roy, 2012).

In Anlehnung an Steck und Mitarbeitende (2021) sowie Wefers und Bunzel (2016a) wurde die ^1H -NMR-Spektroskopie zur Konzentrationsbestimmung der (A)XOS-Standardsubstanzen eingesetzt. Hierbei erfolgte die Quantifizierung durch Zugabe von Acetanilid als Ist in fester Konzentration zur Lösung der Analyten in Deuteriumoxid. Acetanilid ist zur Quantifizierung geeignet, da es eine hohe Reinheit aufweist, chemisch nicht mit den Analyten interagiert, nicht flüchtig oder hygroskopisch ist, kurze Relaxationszeiten besitzt und sich im ausgewählten Lösungsmittel lösen lässt (Rundlöf *et al.*, 2014). Darüber hinaus erzeugt die Methylgruppe von Acetanilid ein separiertes und intensives Singulettsignal ($\delta_{\text{H}} = 2,17$ ppm). Eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Quantifizierung eines Analyten ist die vollständige Relaxation aller Spinsysteme vom angeregten Zustand in den Grundzustand. Der zwischen einzelnen Scans eingestellte D_1 -Delay sollte daher mindestens das Fünffache der T_1 -Zeit betragen. Ein D_1 von 15 s wurde als ausreichend für die Quantifizierung der (A)XOS angesehen. Bei der Prozessierung der ^1H -NMR-Spektren wurde für alle (A)XOS-Standardsubstanzen ein möglichst einheitliches Vorgehen angewandt. Dies betraf insbesondere die Durchführung der Integration sowie der Basislinien- und Phasenkorrektur. Die Konzentrationsbestimmung der (A)XOS erfolgte auf Grundlage ausgewählter ^1H -Resonanzsignale unter Anwendung der nachfolgenden Gleichung (6):

$$c_x = c_{\text{Ist}} \cdot \frac{M_{\text{W},x}}{M_{\text{W,Ist}}} \cdot \frac{n_{\text{Ist},x}}{n_{\text{H},x}} \cdot \frac{A_x}{A_{\text{Ist}}} \quad (6)$$

Hierbei stehen $M_{\text{W},x}$ und $M_{\text{W,Ist}}$ für die Molekulargewichte der (A)XOS und des Ist in g/mol, $n_{\text{H},x}$ und $n_{\text{H,Ist}}$ für die Anzahl an Protonen, die die ausgewählten Signale im NMR-Spektrum (bei Acetanilid entsprechend drei Protonen) erzeugen, sowie A_x und A_{Ist} für die Flächen unter den entsprechenden Resonanzsignalen (Rundlöf *et al.*, 2014).

3 Material und Methoden

Aufgrund von Signalüberlappungen und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren ist die ^1H -NMR-Spektroskopie nur bedingt zur Quantifizierung von Kohlenhydratgemischen geeignet. Ein vielversprechende Alternative stellen hierfür 2D-NMR-Experimente dar, die durch die zusätzliche Dimension zu einer höheren Auflösung der Signale und damit zu deutlich weniger Signalüberlappungen führen. In der Kohlenhydratanalytik werden vor allem homonukleare 2D-Experimente wie TOCSY und *Correlated Spectroscopy* (COSY), heteronukleare Experimente wie das HSQC-Experiment, sowie Experimente, die nach der Kopplungskonstante auftrennen (engl. *J-resolved*) für quantitative Bestimmungen eingesetzt. Keines dieser 2D-Experimente ist grundsätzlich besser zur Quantifizierung geeignet, weshalb die Wahl von der jeweiligen analytischen Fragestellung abhängen sollte. ^1H , ^{13}C -korrelierte Experimente weisen im Vergleich zu rein protonengekoppelten Methoden eine geringere Sensitivität auf, was sowohl auf die niedrigere natürliche Isotopenhäufigkeit von ^{13}C als auch auf dessen reduziertes gyromagnetisches Verhältnis ($\gamma_{^{13}\text{C}} \sim 0,25 \cdot \gamma_{^1\text{H}}$) zurückzuführen ist. Darüber hinaus sind längere Messzeiten erforderlich, da ein deutlich größerer Bereich chemischer Verschiebungen erfasst werden muss. Dagegen führt die ^{13}C -Korrelation jedoch meist zu einer besseren Trennung überlappender Resonanzsignale im Vergleich zu homonuklearen Protonenexperimenten (Giraudeau, 2014).

In 2D-NMR-Spektren erfolgt die Quantifizierung durch Integration des Signalvolumens, welches in der Praxis meist schwer abzugrenzen ist. Im Gegensatz zu eindimensionalen NMR-Methoden, bei denen die Signalintensität ausschließlich von der Anzahl äquivalenter Spins und der Konzentration des Analyten abhängt, wird das Signalvolumen in mehrdimensionalen Experimenten von einer Vielzahl zusätzlicher proben- und pulssequenzspezifischer Faktoren beeinflusst. Dazu zählen unter anderem die longitudinalen und transversalen Relaxationszeiten, homo- und heteronukleare Kopplungskonstanten, Impulswinkel, Transferzeiten, Wartezeiten zwischen einzelnen Scans sowie *off-resonance*-Effekte. Darüber hinaus wirken sich, wie auch bei eindimensionalen NMR-Experimenten, externe Parameter wie Viskosität, Temperatur, pH-Wert oder Salzkonzentration auf die Signalresponse aus. Die Gesamtheit dieser Abhängigkeiten erschwert die absolute Quantifizierung von Analyten erheblich und wird im Folgenden durch einen unbekannten Abschwächungsfaktor k zusammengefasst:

$$V = k(T_1, T_2, J_{\text{CH}}, J_{\text{HH}}, \text{delays}, \dots) \cdot p \cdot c \cdot V_s \quad (7)$$

Hierbei beschreibt p die Anzahl äquivalenter Kerne, c die Konzentration des Analyten und V_s das spezifische Signalvolumen. Neben der Anpassung der Pulssequenz, durch die die Abhängigkeit von Kopplungskonstanten und/oder Relaxationszeiten aufgehoben wird, sowie der theoretischen, computergestützten Berechnung von k , werden zur Quantifizierung von Kohlenhydraten mittels 2D-NMR vor allem Kalibrierfunktionen eingesetzt (Giraudeau, 2014).

Anwendungen quantitativer ^1H , ^{13}C -HSQC-Methoden zur strukturellen Analyse von PS werden in der Literatur umfassend beschrieben. Sasaki und Mitarbeitende (2014) bestimmten die

Monosaccharidzusammensetzung von Glucanen nach einer Säurehydrolyse durch Integration anomerer Kreuzsignal der verschiedenen Monosaccharide. Durch die Erhöhung der Scanzahl konnten Monosaccharide bis in den unteren mM-Bereich nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse mit denen einer gaschromatographischen Bestimmung vergleichbar waren (Sasaki *et al.*, 2014). Unter Verwendung spezifischer HSQC-Markersignale entwickelten Schendel und Bunzel (2022) ein semiquantitatives Verfahren zur Analyse FS-haltiger Seitenketten von AX, die durch milde TFA-Hydrolyse aus Getreide-BS freigesetzt worden sind. Die Kalibrierung erfolgte dabei mit isolierten Standardsubstanzen, wobei Koffein als Ist verwendet wurde. Die erzielten Ergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung mit denen einer HPLC-basierten Methode. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde auch zur semiquantitativen Bestimmung verschiedener Strukturelemente von Arabinanen und Galactanen gewählt, die auf der HSQC-Analyse enzymatisch freigesetzter OS beruht (Wefers & Bunzel, 2016b). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit isolierter Standardsubstanzen wurde auf eine Kalibrierung verzichtet. Stattdessen wurde ein Referenzsignal definiert, um die HSQC-Response der unterschiedlichen Markersignale zu korrigieren. Auf diese Weise konnten Informationen zum Vorkommen spezifischer Bindungspositionen gewonnen werden.

In Anlehnung an die HSQC-basierten Profilingmethoden von Schendel und Bunzel (2022) sowie Wefers und Bunzel (2016b) wurde ein vergleichbares Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung verschiedener Strukturelemente von FS-haltigen AX entwickelt. Mit Hilfe isolierter AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen konnten Markersignale im HSQC-Spektrum identifiziert werden, die spezifisch ein bestimmtes Strukturelement der AX repräsentieren. Die Korrektur der HSQC-Response erfolgte durch die Bestimmung relativer Responsefaktoren (RRF, engl. *Relative Response Factor*) in Bezug zu einem Referenzsignal einer Ist in fester Konzentration. Die Profilingmethode wurde im Anschluss auf enzymatische Hydrolysate verschiedener Getreide-BS (UBS und LBS) angewandt (s. Kapitel 4.3.5). Durch eine vorherige chromatographische Trennung der aus UBS freigesetzten (A)XOS und FAXOS (vgl. Kapitel 3.4.3) konnte zudem eine getrennte Analyse beider Fraktionen erfolgen.

Sowohl zur Strukturaufklärung (s. Kapitel 3.5.1) als auch zur Quantifizierung im Rahmen der entwickelten Profilingmethode wurde ein phasensensitives, gradientenselektiertes HSQC-Experiment „hsqcedetgp“ der Firma Bruker eingesetzt. Die zusätzliche Phaseninformation ermöglicht die Differenzierung von CH/CH₃- und CH₂-Gruppen im HSQC-Spektrum anhand positiver bzw. negativer Signalphasen. Dies erwies sich insbesondere bei der Auswertung der HSQC-Spektren der Getreidehydrolysate (s. Kapitel 4.3.5) als vorteilhaft, da die Multiplizitätseditierung der Signale neben der chemischen Verschiebung ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal liefert und somit die Signalzuordnung erleichtert. Im Vergleich zu einem konventionellen HSQC-Experiment ist die Experimentdauer der phasensensitiven, gradientenselektierten Variante nur geringfügig erhöht, sodass der zusätzliche Zeitaufwand in der praktischen Anwendung vernachlässigbar bleibt. Abbildung 17 zeigt den Aufbau der „hsqcedetgp“-Pulssequenz.

3 Material und Methoden

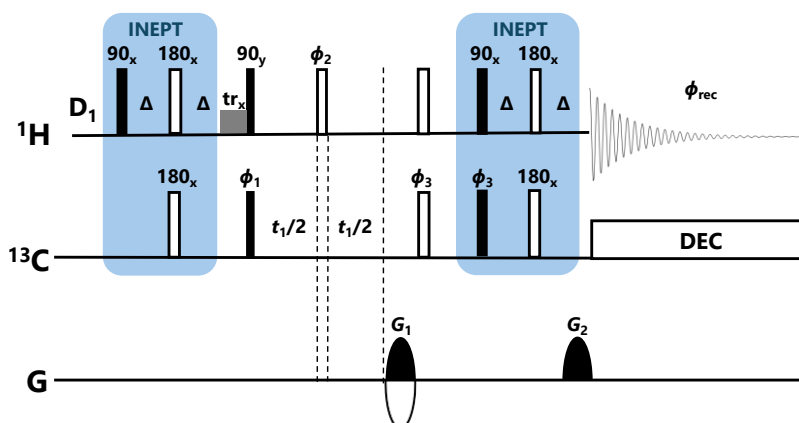


Abbildung 17: Darstellung der Pulssequenz „hsqcetg“ der Firma Bruker. Dabei werden folgende Phasenzyklen angewendet: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, x, -x, -x$; $\phi_3 = 4(x), 4(-x)$. Die Wartezeit Δ während des INEPT-Schrittes entspricht $\Delta = 1/(4 J_{CH})$. Phasenempfindlichkeit in der indirekten Dimension wurde durch die Echo-/Antiecho-Kohärenzordnungsselektion mit den zugehörigen Gradientenverhältnissen $G_1 = 80 \%$, -80% und $G_2 = 20,1 \%$, $20,1 \%$ erhalten (modifiziert nach Fels, 2021). D_1 , Wartezeit zwischen zwei Scans; INEPT, *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*; tr, trim-Puls; DEC, Entkopplung

Zu Beginn wird durch einen 90° -Puls transversale Protonenmagnetisierung erzeugt, die sich unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung und heteronuklearen Kopplung über eine Wartezeit Δ entwickelt. Während der mittig platzierte 180° -Puls in ^1H die chemische Verschiebung während der zweiten Wartezeit Δ refokussiert, kommt es durch den gleichzeitig eingestrahlten 180° -Puls in ^{13}C zu einer Inversion der Präzessionsrichtung der Protonenvektoren, wodurch sich die heteronukleare Kopplung weiterentwickeln kann. Die anschließend vorliegende Antiphasemagnetisierung wird durch Einstrahlen von 90° -Pulsen von den empfindlicheren Protonen auf die unempfindlicheren ^{13}C -Kerne übertragen. Dieser Schritt wird auch als *Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer* (INEPT) bezeichnet und stellt einen zentralen Bestandteil heteronuklearer 2D-Experimente dar. Während der Inkrementierungszeit t_1 entwickelt sich die chemische Verschiebung der indirekten Dimension, die durch den 180° -Puls wieder refokussiert wird. Da während der Evolutionsphase sämtliche Protonenmagnetisierung entlang der z-Achse ausgerichtet ist, findet keine Entwicklung homonuklearer $J_{H,H}$ -Kopplung statt, wodurch Korrelationssignale in der indirekten Dimension als einfache Singulett-Strukturen zu sehen sind. Die während des INEPT-Schrittes nicht auf ^{13}C übertragene Protonenmagnetisierung wird durch den ersten Gradienten der Echo-/Antiecho-Selektion dephasiert und nicht wieder refokussiert. Im Vergleich zu einem Standard-HSQC-Experiment kommt es durch den Einbau einer zusätzlichen Wartezeit und zweier 180° -Refokussierungspulse in beiden Dimension zu einer Multiplizitätseditierung der Korrelationssignale im HSQC-Spektrum. Schließlich wird die Magnetisierung durch einen weiteren INEPT-Schritt wieder auf die Protonen übertragen und durch den zweiten Gradienten refokussiert, sodass letztlich Inphaseprotonenmagnetisierung detektiert wird (Claridge, 2016; de la Vega-Hernández & Antuch, 2015).

Bei der Aufnahme der HSQC-Spektren wurde *Non-Uniform Sampling* (NUS) angewandt, bei der ein zufällig ausgewählter Prozentsatz der regulären Datenpunkte aufgenommen wird, während die restlichen, fehlenden Datenpunkte durch mathematische Algorithmen rekonstruiert werden. Durch dieses Prinzip lässt sich erheblich an Messzeit einsparen, ohne die Auflösung der Signale und damit die Spektrenqualität zu verschlechtern. Hierbei muss beachtet werden, dass die *Sampling*-Rate nicht zu gering ist, da ansonsten der Anteil an Artefakten im Spektrum stark zunimmt. Nach dem Nyquist-Theorem sollte die *Sampling*-Frequenz f_s mindestens doppelt so groß wie die Signalfrequenz sein ($f_s = 1/2 \nu_{\max}$). Als Rekonstruktionsverfahren wurde der *compressed sensing*-Ansatz gewählt (Bostock & Nietlispach, 2017). Darüber hinaus führt ein abnehmender NUS-Anteil zu einer Verbesserung des S/N, da bei der Aufnahme einer geringeren Anzahl von Datenpunkten statistisch weniger Rauschen aufgenommen wird (Palmer *et al.*, 2015). In dieser Arbeit wurde ein NUS-Anteil von 50 % für die HSQC-Experimente gewählt, da hier kein erkennbarer Verlust an Spektrenqualität im Vergleich zu einem uniform aufgenommenen Spektrum festgestellt werden konnte. Auf diese Weise konnte die Messzeit bis um die Hälfte reduziert werden.

3.5.3 *Inversion-Recovery*-Experiment zur Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit

Wie bereits erwähnt kommt der Wahl des D_1 -Delays in der quantitativen NMR-Spektroskopie eine besondere Rolle zu. Da die Akquisitionszeiten bei 2D-NMR-Experimenten deutlich kleiner sind als bei einem ^1H -NMR-Experiment, muss für eine ausreichende Erholzeit der D_1 -Delay entsprechend angepasst werden. Eine Verlängerung der Akquisitionszeit in der direkten Dimension ist zwar möglich, führt jedoch aufgrund der während der Detektion eingesetzten ^{13}C -Breitbandentkopplung zu einem erhöhten Energieeintrag in Probe und Sonde. Die daraus resultierende thermische Belastung ist insbesondere beim Einsatz von Kryoprobenköpfen problematisch, da deren Kühlleistung stärker beansprucht wird. Daher wird die Erholzeit in der Praxis bevorzugt über eine Verlängerung des D_1 -Delays realisiert. Für die Auswahl des D_1 -Delays für die HSQC-basierte Profilingmethode wurden daher die longitudinalen Relaxationszeiten der (A)XOS mithilfe des *Inversion-Recovery*-Experiments ermittelt (s. Abbildung 18).

Durch einen 180° -Puls werden die Besetzungszahlen zwischen α - und β -Zustand umgekehrt, das heißt die Richtung der Magnetisierung wird invertiert. Während der Wartezeit τ , die im Laufe des Experiments inkrementiert wird, findet longitudinale Relaxation statt, wodurch sich der Gleichgewichtszustand wieder einstellt. Nach jedem Inkrementierungsschritt wird die Magnetisierung durch den 90° -Puls in die transversale Ebene gelenkt und als FID* gemessen. Die Wiederherstellung der Gleichgewichtsmagnetisierung folgt dabei einer Kinetik 1. Ordnung und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$I_z(\tau) = I_0 \cdot (1 - 2 \cdot e^{-\frac{\tau}{T_1}}) \quad (8)$$

3 Material und Methoden

Hierbei steht I_z für die Signalintensität zum Zeitpunkt τ und I_0 bildet die maximal messbare Intensität ab. Durch eine graphische Auftrag von I_z kann am Nulldurchgang ($\tau = T_1 \cdot \ln(2)$) schließlich der Wert für T_1 abgelesen werden (Claridge, 2016).

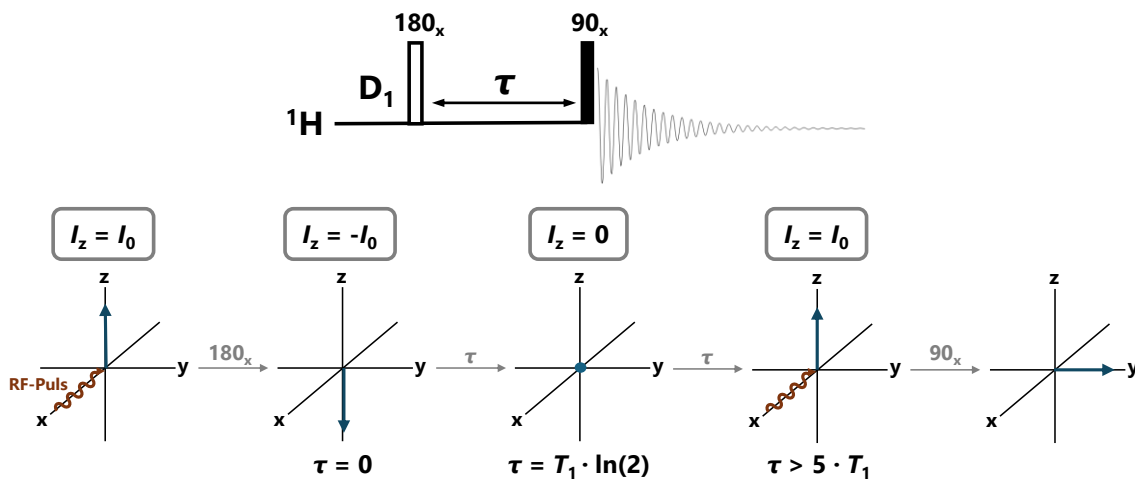


Abbildung 18: Darstellung der Pulssequenz des Inversion-Recovery-Experiments (oben). D_1 , Wartezeit zwischen zwei Scans; τ , Wartezeit zwischen den Pulsen zur Relaxation. **Darstellung der Impulsfolge anhand des Vektormodells (unten).** Die makroskopische Magnetisierung (blauer Pfeil) wird durch den 180° -Puls (roter Pfeil) zunächst umgekehrt. Während der inkrementierten Wartezeit τ kehrt sie infolge longitudinaler Relaxation wieder in den Gleichgewichtszustand zurück. Der darauffolgende 90° -Puls lenkt die Magnetisierung anschließend in die transversale Ebene, sodass das FID-Signal gemessen werden kann (modifiziert nach Claridge, 2016). I_z , Intensität zum Zeitpunkt τ ; I_0 , maximale Intensität; T_1 , longitudinale Relaxationszeit, RF, Radiowellenfrequenz

3.5.4 Prozessierung der NMR-Spektren

Alle in dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimente erfolgten unter Verwendung von Aceton als Referenzsubstanz, das in Deuteriumoxid eine chemische Verschiebung von 2,22 ppm für ^1H und 30,89 ppm für ^{13}C aufweist (Gottlieb *et al.*, 1997). Es wurde eine automatische Basislinienkorrektur durchgeführt. Die Phasenkorrektur nullter und erster Ordnung erfolgte anschließend manuell anhand ausgewählter Korrelationssignale, die verschiedene Bereiche des Spektrums repräsentieren.

Bei der Prozessierung von NMR-Spektren kann zur Verbesserung der Spektrenqualität ein *zero filling* angewandt werden. Hierbei wird der FID* künstlich durch Datenpunkte der Amplitude Null verlängert, ohne dass dem Spektrum neue Informationen hinzugefügt werden. Durch die Erhöhung der Anzahl der Datenpunkte verbessert sich die digitale Auflösung. Darüber hinaus nimmt auch das S/N ab, da anteilmäßig weniger Rauschen vorhanden ist (Claridge, 2016).

Insbesondere bei 2D-Experimenten fällt der FID* bedingt durch die kurzen Akquisitionszeiten nicht auf null ab, weshalb hier oftmals zur Vermeidung sogenannter *truncated* FID*s ein *linear prediction* durchgeführt wird. Durch eine Linearkombination können die Werte der restlichen Datenpunkte aus den Informationen der bereits aufgenommen Datenpunkte abgeschätzt werden (Claridge, 2016). Dieses Verfahren liefert eine wesentlich bessere Annäherung als das

zero filling und wurde für beide Dimensionen verwendet. Die Wahl der Koeffizientenanzahl für die Linearkombination erfolgte in Abhängigkeit von der Anzahl an vorhandenen Signalen im Spektrum. Im Zuge des *linear prediction* wurde die Datenpunktzahl des real aufgenommenen Spektrums verdoppelt.

Durch sogenannte *window functions* werden bestimmte Bereiche des FIDs* gezielt gewichtet, um entweder die Empfindlichkeit oder die Auflösung zu verbessern. Die Anwendung einer exponentiellen Gewichtungsfunktion führt beispielsweise zu einem schnelleren Abklingen des FIDs*. Dadurch wird zwar das S/N verbessert, jedoch kommt es auch zu einer Linienverbreiterung. Da in dieser Arbeit der Fokus primär auf der Verbesserung der digitalen Auflösung lag, wurde eine quadratische Sinusfunktion (QSINE) eingesetzt, die eine glockenförmige Kurve abbildet. Der in beiden Dimensionen verwendete Wert von zwei für den *Sine Bell Shift* (SSB) bewirkt eine Phasenverschiebung der Funktion um 90° ($180^\circ/\text{SSB}$), wodurch insbesondere der mittlere Bereich des FIDs* stärker gewichtet wird, was zu einer verbesserten Auflösung führt.

3.6 Entwicklung einer HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung einer HPAEC-PAD-basierten Profilingmethode zur semiquantitativen Bestimmung enzymatisch freigesetzter (A)XOS, anhand derer Rückschlüsse auf die AX-Struktur verschiedener Getreidearten gezogen werden können. In der Literatur werden zahlreiche Anwendungsbeispiele der HPAEC-PAD zur Analyse von (A)XOS beschrieben (Bhattacharya *et al.*, 2020; Joyce *et al.*, 2023; McCleary *et al.*, 2015; Ordaz-Ortiz *et al.*, 2005). Aufgrund der variierenden PAD-Response ist die Aufnahme von Kalibrierkurven eine notwendige Voraussetzung für die zuverlässige Quantifizierung von (A)XOS (Joyce *et al.*, 2023). Derartige Ansätze beruhen jedoch meist auf einer begrenzten Auswahl an kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen, die nur bestimmte Abschnitte der AX-Struktur repräsentieren. Die isolierten AXOS-Standardsubstanzen können zur quantitativen Erfassung von bisher nicht abgebildeten Abschnitten des AX eingesetzt werden. In Anlehnung an die enzymatischen Profilingmethoden von Wefers und Bunzel (2016a) sowie Steck und Mitarbeitenden (2021) wurde daher eine dazu vergleichbare Methode für (A)XOS entwickelt, die sowohl kommerziell erhältliche als auch isolierte Standardsubstanzen umfasst. Die instrumentelle Erweiterung der HPAEC-PAD durch die simultane MS-Detektion (s. Kapitel 3.4.5) erlaubt darüber hinaus sowohl bekannte als auch unbekannte Analyten anhand derer m/z zu charakterisieren. Neben dem m/z wurden zu weiteren Identifizierung auch relative Retentionszeiten (RRT, engl. *Relative Retention Time*) der (A)XOS in Bezug zu einer Ist bestimmt, die im Gegensatz zu Retentionszeiten stabil gegen einen Fließmittelwechsel oder eine zeitliche Änderung des Fließmittelzustands sein sollten. Da insbesondere die isolierten und aufgereinigten AXOS nur in geringen Mengen (wenige Milligramm) vorlagen, wurden für die Quantifizierung der (A)XOS RRF unter Verwendung der Ist ermittelt. Die Profilingmethode wurde dazu genutzt, (A)XOS, die durch enzymatische Hydrolyse der Getreide-BS (UBS und LBS) mit XYL₁₀ und XYL₁₁ freigesetzt wurden, sowohl qualitativ als auch quantitativ zu erfassen. Aus den molaren Anteilen der OS konnten schließlich Informationen über die Feinstruktur der enthaltenen AX abgeleitet werden. Eine detailliertere Methodenentwicklung und -validierung wird in Kapitel 4.2 beschrieben.

4 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln wird zunächst auf die Isolierung und strukturelle Charakterisierung der AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen eingegangen, die für die Entwicklung der chromatographischen und NMR-spektroskopischen Profilingmethode notwendig waren. Im Anschluss werden die Entwicklung, Validierung und Anwendung der HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode zur strukturellen Charakterisierung verschiedener Getreide-AX dargestellt, wodurch tiefere Einblicke in das Substitutionsmuster der AX mit Araf-Einheiten gewonnen werden konnten. Zuletzt werden notwendige Schritte zur Etablierung eines HSQC-basierten Profilings verschiedener Strukturelemente des AX dokumentiert und die Ergebnisse mit denen der HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode und der Methylierungsanalyse verglichen.

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

4.1.1 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien

Zur Charakterisierung der für die Isolierung der AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen verwendeten Ausgangsmaterialien (s. Kapitel 3.1 und 3.4) wurden die enthaltenen Polysaccharidstrukturen mittels Monosaccharid- und Methylierungsanalyse untersucht. Da es sich bei dem alkalisch extrahierten Weizen-AX um ein lösliches PS handelte, wurde zur Bestimmung der monomeren Zusammensetzung eine Methanolyse verwendet. Die PS in den UBS aus Roggen und Mais wurden mit Hilfe einer Schwefelsäurehydrolyse gespalten. Da die Mais-UBS für eine bessere Enzymzugänglichkeit zunächst durch eine milde TFA-Hydrolyse vorhydrolysiert wurden (Schäfer, 2023), erfolgte im Zuge der Methylierungsanalyse eine getrennte Betrachtung der Bindungspositionen vor und nach der TFA-Hydrolyse. Dadurch konnte besser abgeschätzt werden, inwiefern enthaltene Seitenkettenstrukturen bereits abgebaut worden sind. Die Ergebnisse der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung sowie der Bindungspositionen sind in Abbildung 19 bzw. Tabelle 2 zusammengefasst.

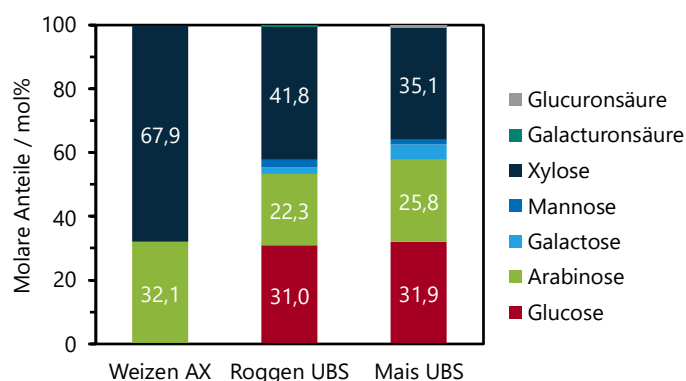


Abbildung 19: Monosaccharidzusammensetzung (mol%, n = 3) der zur Isolierung von Standardsubstanzen eingesetzten Ausgangsmaterialien nach Methanolyse bzw. Schwefelsäurehydrolyse. Bei den Ergebnissen der UBS aus Mais handelt es sich um unveröffentlichte Daten aus der Promotionsarbeit von Daniela Schäfer (2023). AX, Arabinoxylan; UBS, unlösliche Ballaststoffe

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2: Ergebnisse der Methylierungsanalyse der für die Isolierung von Standardsubstanzen eingesetzten Ausgangsmaterialien (mol% $\pm$ Range/2, n = 2). Die mit milder Säurehydrolyse vorbehandelten, unlöslichen Ballaststoffe (UBS) aus Mais sind mit einem „*“ markiert. Araf, Arabinofuranose; Arap, Arabinopyranose; AX, Arabinoxylan; Galp, Galactopyranose; Glcp, Glucopyranose; Manp, Mannopyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Xylp, Xylopyranose

	PMAA	Weizen AX	Roggen UBS	Mais UBS	Mais UBS*
Ara	t-Araf	26,5 $\pm$ 0,3	12,3 $\pm$ 0,0	16,1 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1
	1,2-Araf	1,3 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,0	1,3 $\pm$ 0,1
	1,3-Araf	0,2 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,1
	1,5-Araf/1,4-Arap	0,7 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0
	1,2,3,5-Araf	0,2 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	Summe	28,9 $\pm$ 0,3	16,5 $\pm$ 0,6	21,1 $\pm$ 0,1	11,6 $\pm$ 0,3
Xyl	t-Xylp	2,1 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,1
	1,4-Xylp	39,9 $\pm$ 0,9	26,7 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,0	14,1 $\pm$ 0,4
	1,2,4-Xylp	1,4 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 0,0	3,3 $\pm$ 0,1
	1,3,4-Xylp	13,1 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,3	12,1 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,4
	1,2,3,4-Xylp	14,3 $\pm$ 0,0	5,1 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2
	Summe	70,8 $\pm$ 1,5	42,0 $\pm$ 1,5	28,9 $\pm$ 0,4	32,0 $\pm$ 1,2
Glc	t-Glcp	0,1 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,1
	1,3-Glcp	0,1 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2
	1,4-Glcp	0,1 $\pm$ 0,0	27,5 $\pm$ 0,7	37,1 $\pm$ 0,1	42,5 $\pm$ 1,3
	1,4,6-Glcp	-	1,2 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,0	2,7 $\pm$ 0,1
	Summe	0,3 $\pm$ 0,0	35,1 $\pm$ 1,4	42,9 $\pm$ 0,3	49,0 $\pm$ 1,7
Gal	t-Galp	0,1 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,1
	1,3-Galp	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0
	1,4-Galp	-	1,9 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,1
	1,6-Galp	-	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
	1,3,6-Galp	-	0,6 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
	Summe	0,2 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,2
Man	t-Manp	-	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	1,4-Manp	-	2,4 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,1
	Summe	-	2,7 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,1

Weizenarabinoxylan

Der Methanolyse zufolge ist das Weizen-AX ausschließlich aus Ara (32,1 mol%) und Xyl (67,9 mol%) aufgebaut (s. Abbildung 19). Weitere monomere Bestandteile aus eventuell mitextrahierten PS konnten nicht nachgewiesen werden, was auf eine hohe Reinheit des PS hindeutet. Das ermittelte A/X-Verhältnis von 0,47 spricht für einen geringen Substitutionsgrad entlang des AX-Rückgrats. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Gruppen *et al.* (1992a), die von einem A/X von 0,52 für ein mit Bariumhydroxid extrahiertes AX aus Weizenmehl berichten. Die Bestimmung der glykosidischen Bindungspositionen mit Hilfe der Methylierungsanalyse vermittelte einen tieferen Einblick in die Struktur des Weizen-AX (s. Tabelle 2). Aus der Summe der molaren Anteile der Bindungspositionen von Araf- und Xylp-Einheiten (28,9 mol% bzw. 70,8 mol%) ergibt sich ein A/X von 0,41, was in Einklang mit den Ergebnissen der Monosaccharidanalyse steht. Der Großteil der Xylp-Einheiten liegen unsubstituiert (etwa 60 %) vor, wohingegen die restlichen Xylp-Einheiten in etwa gleichen

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

Anteilen mono- bzw. disubstituiert auftreten. Das Substitutionsmuster ist mit alkalisch extrahierten AX aus Weizenkleie vergleichbar, die zu 53 % aus uXylp, 20 % mXylp und 18 % dXylp bestehen (Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999). Während der überwiegend Anteil der Araf terminal gebunden vorliegt, kommen auch geringe Mengen an 1,2-, 1,3- und 1,5-Araf vor. Zwar wurden (1→2)-gebundene Arabinobiose-Seitenketten bereits in Sorghum- und Rutenhirse nachgewiesen (Mazumder & York, 2010; Verbruggen *et al.*, 1995), für das hier untersuchte Weizen-AX erscheint jedoch ein anderer Ursprung wahrscheinlicher. Demnach könnte die 1,2-Araf aus einer FAX-Seitenkette (vgl. Kapitel 1.2.2.3) stammen, bei der die estergebundene FS im Zuge der alkalischen Extraktion abgespalten wurde. Das Vorkommen von 1,3-Araf lässt sich durch die nativ vorkommende, oligomere Seitenkette α -D-Xylp-(1→3)-L-Ara erklären, deren Existenz in Weizen bereits experimentell belegt worden ist (Schendel & Bunzel, 2025). Strukturen mit (1→5)-glykosidisch gebundener Araf könnten ebenfalls aus oligomeren Seitenketten hervorgehen (Izydorczyk & Biliaderis, 1993), diese konnten jedoch bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Neben PMAA der Araf und Xylp konnten geringe Mengen aus Glcp- und Galp-Einheiten identifiziert werden. 1,3-Glcp und 1,4-Glcp stammen vermutlich aus mitextrahierten MLG (vgl. Kapitel 1.1.4), wobei diese nur eine untergeordnete Rolle in Weizen spielen (Lazaridou & Biliaderis, 2007).

Unlösliche Roggenballaststoffe

Die Monosaccharidzusammensetzung der PS aus den Roggen-UBS wird hauptsächlich durch Glc, Xyl und Ara dominiert (s. Abbildung 19). Der hohe Glc-Anteil (31,0 mol%) ist vermutlich auf Cellulose zurückzuführen. Obwohl keine Rha nachgewiesen wurde, sprechen die geringen Anteile an GalA (0,5 mol%) und Gal (2,0 mol%) für das Vorkommen unlöslicher Pektinstrukturen. Darüber hinaus weisen die Roggen-UBS Mannane auf, was sich im molaren Anteil der Mannose von 2,5 mol% in Kombination mit den Daten aus der Methylierungsanalyse widerspiegelt. Das geringe A/X von 0,53 deutet darauf hin, dass die enthaltenen AX ebenfalls schwach substituiert vorliegen. Die Arbeitsgruppe um Verwimp (2007) berichten von einem variablen A/X für WUAX aus Roggen zwischen 0,40 und 1,04. Die Annahme, dass das AX größere Abschnitte an unsubstituierten Bereichen besitzt, konnte auch durch die Ergebnisse der Methylierungsanalyse bestätigt werden, in der fast zwei Drittel (~ 64 %) der enthaltenen PMAA aus Xyl auf 1,4-Xylp zurückgeführt werden können. Der durch die Methylierungsanalyse ermittelte Wert für A/X von 0,40 ist kleiner als bei der Monosaccharidanalyse. Im Gegensatz zum Weizen-AX sind die O3-monosubstituierten Xylp-Einheiten (~ 16 %) etwas stärker vertreten als die dXylp-Einheiten (~ 12 %) bezogen auf die Gesamtanteile an PMAA aus Xyl. Kleinere molare Anteile an tXylp-Einheiten (2,4 mol%) könnten wie die 1,2-Araf (0,8 mol%) aus der FAX-Seitenketten hervorgegangen sein, jedoch ist eine Abstammung aus dem terminalen Ende der AX oder aus vorkommenden Xyloglucanen ebenfalls denkbar. Neben den AX lassen sich auch die vermuteten Pektine näher charakterisieren. Die Methylierungsdaten legen das Vorkommen überwiegend linearer 1,5-verknüpfter Arabinane nahe (1,7 mol% 1,5-Araf). Der

4 Ergebnisse und Diskussion

geringe Anteil an 1,2,3,5-Araf (0,6 mol %) könnte auf Verzweigungen hinweisen, kann jedoch auch auf eine partielle Untermethylierung während der Derivatisierung zurückzuführen sein. Darüber hinaus deutet das Auftreten von 1,3-, 1,4-, 1,6- und 1,3,6-Galp auf Arabinogalactanstrukturen des Typ I und II hin. Die großen Anteile an 1,4-Glcp (27,4 mol%) resultieren vermutlich überwiegend aus der Cellulose.

Unlösliche Maisballaststoffe (vor und nach der milden TFA-Hydrolyse)

Das Monosaccharidprofil der Mais-UBS ist durch dominante Anteile an Glc, Ara und Xyl gekennzeichnet (vgl. Abbildung 2). Das ermittelte A/X von 0,81 entspricht näherungsweise dem für alkalisch extrahierte AX aus Maisfasern berichteten Wert (0,73), stellt jedoch aufgrund des verstärkten Vorkommens komplexer, FS-haltiger Seitenketten, die auch Xyl enthalten können, keinen geeigneten Indikator für den DS der Mais-AX dar (Kang *et al.*, 2019; Schendel *et al.*, 2016a). FS-haltige AX aus Mais enthalten auch geringe Mengen an Uronsäuren (Akshatha *et al.*, 2024), was durch den Nachweis der GlcA (0,9 mol%) experimentell bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse vermittelten ein detaillierteres Bild der komplexen Struktur des Mais-AX und wie diese im Zuge der milden TFA-Hydrolyse abgebaut wurde. Der beobachtete Rückgang des molaren Anteils an t-Araf von 16,1 mol% auf 7,5 mol% bei gleichzeitiger Erhöhung des 1,4-Xylp-Anteils von 6,0 mol% auf 14,1 mol% stellt ein erstes Indiz für eine Abnahme des DS der AX dar. In Mais-AX liegen die Xylp-Einheiten vermehrt in der O3-Position monosubstituiert und weniger disubstituiert vor (Kang *et al.*, 2019), was auch in den untersuchten UBS der Fall ist (42 % bzw. 21 %). Auffällig ist, dass bis zu zwei Drittel der O3-monosubstituierten Xylp und über die Hälfte der dXylp durch die milde TFA-Hydrolyse abgebaut worden sind. Dagegen kommt es zu einer Erhöhung der O2-Monosubstitution von 8 % auf 10 %, was darauf schließen lässt, dass die TFA-Hydrolyse zu einer bevorzugten Abspaltung von 1,3-glykosidisch gebundenen Araf-Einheiten führt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die milde TFA-Hydrolyse zu einer deutlichen Abnahme der Arabinosesubstitution entlang des Rückgrats der AX führte, wodurch die Zugänglichkeit für *endo*-Xylanasen verbessert werden sollte. Eine präzise Aussage über das Ausmaß des Abbaus der komplexen, FS-haltigen Seitenketten lässt sich jedoch nicht ableiten.

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

4.1.2 Isolierung der Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen

Für die Freisetzung von AXOS aus dem alkalisch extrahierten AX aus Weizenmehl wurden zwei getrennte präparative Inkubationsansätze mit XYL₁₀ und XYL₁₁ durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.1). Da in beiden Ansätzen nach Zugabe von Ethanol zur Inaktivierung der Enzyme keine sichtbare Präzipitatbildung vorhanden war, ist davon auszugehen, dass das AX jeweils vollständig zu niedermolekular löslichen Bestandteilen abgebaut worden ist. Dementsprechend konnten die eingedampften und getrockneten Hydrolysate direkt zur SEC-Trennung der (A)XOS nach ihrem DP eingesetzt werden. In Abbildung 20 sind die

RI-Chromatogramme der BioGel-P2-Trennung der durch enzymatische Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁ freigesetzten (A)XOS zu sehen. Insgesamt zeigten beide Chromatogramme eine große Ähnlichkeit, jedoch resultierte die Hydrolyse mit XYL₁₀ in einer höheren Anzahl an unterscheidbaren Fraktionen (8) als bei XYL₁₁ (7). Zudem ist der relative Anteil an höhermolekularen (A)XOS, die einer weiteren enzymatischen Spaltung nicht zugänglich waren, bei GH11 deutlich größer. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass

GH11-Xylanasen eine geringere Anzahl an potenziellen Spaltstellen nutzen können als GH10-Xylanasen, was ihre limitierte Hydrolysekapazität erklärt (Pollet *et al.*, 2010). Die jeweiligen BioGel-Fraktionen wurden mittels HPAEC-PAD/MS analysiert und die Retentionszeiten sowie die *m/z*-Werte mit denen kommerziell erhältlicher (A)XOS-Standardsubstanzen abgeglichen. Dadurch konnte bereits eine Auswahl einzelner Fraktionen getroffen werden, um weitere Aufreinigungsschritte überwiegend an bisher unbekannten Substanzen vorzunehmen. Insbesondere die Fraktionen 7 und 8 (XYL₁₀) sowie 6 und 7 (XYL₁₁) bestanden größtenteils aus X₂ und X₃ wurden daher für eine weitere Aufreinigung nicht in Betracht gezogen. Zudem waren die höhermolekularen Fraktionen mit DP > 9 (XYL₁₀: 1; XYL₁₁: 1, 2) für eine chromatographische Trennung zu groß und konnten daher nicht weiter aufgearbeitet werden. Ausgewählte BioGel-P2-Fraktionen wurden anschließend mit Hilfe der semipräparativen HPLC und HPAEC aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.4.1 und Tabelle A1). Hierzu wurden primär HILIC- und PGC-Phasen verwendet und der überwiegende Anteil der AXOS-Standardsubstanzen ließ sich erst durch eine Kombination beider Trennverfahren ausreichend aufreinigen. Bei einzelnen, wenigen Fraktionen musste zusätzlich die HPAEC eingesetzt werden, da diese eine deutlich höhere Trennschärfe der Signale aufwies und somit eine bessere Fraktionierung zeitlich eng aufeinander eluierender Substanzen ermöglichte. Unter Berücksichtigung der fünf kommerziell erhältlichen AXOS konnten damit

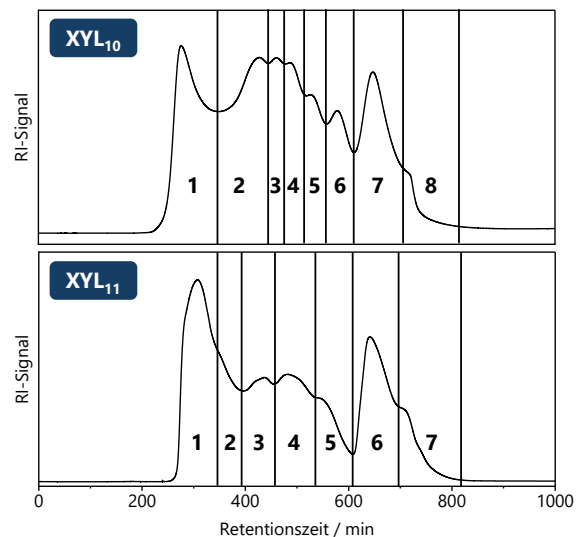


Abbildung 20: RI-Chromatogramme der BioGel-P2-Trennung der enzymatischen Hydrolysate des Weizenarabinoxylans mit XYL₁₀ (GH10-Xylanase, oben) und XYL₁₁ (GH11-Xylanase, unten)

4 Ergebnisse und Diskussion

neun zusätzliche AXOS-Standardsubstanzen in ausreichenden Mengen (mg-Bereich) aus den präparativen Ansätzen nach Verdau mit XYL₁₀ und XYL₁₁ isoliert und aufgereinigt werden. Die AXOS weisen eine mittels HPAEC-PAD bestimmte Reinheit von mindestens 90 %, teilweise auch über 95 % auf (s. Tabelle A1) und konnten daher für die Methodenentwicklung eingesetzt werden. Die insgesamt 14 AXOS-Standardsubstanzen sind in Abbildung 21 dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung und des *m/z*, sowie die NMR-spektroskopischen Daten, die zur strukturellen Aufklärung der Substanzen führten, näher beschrieben.

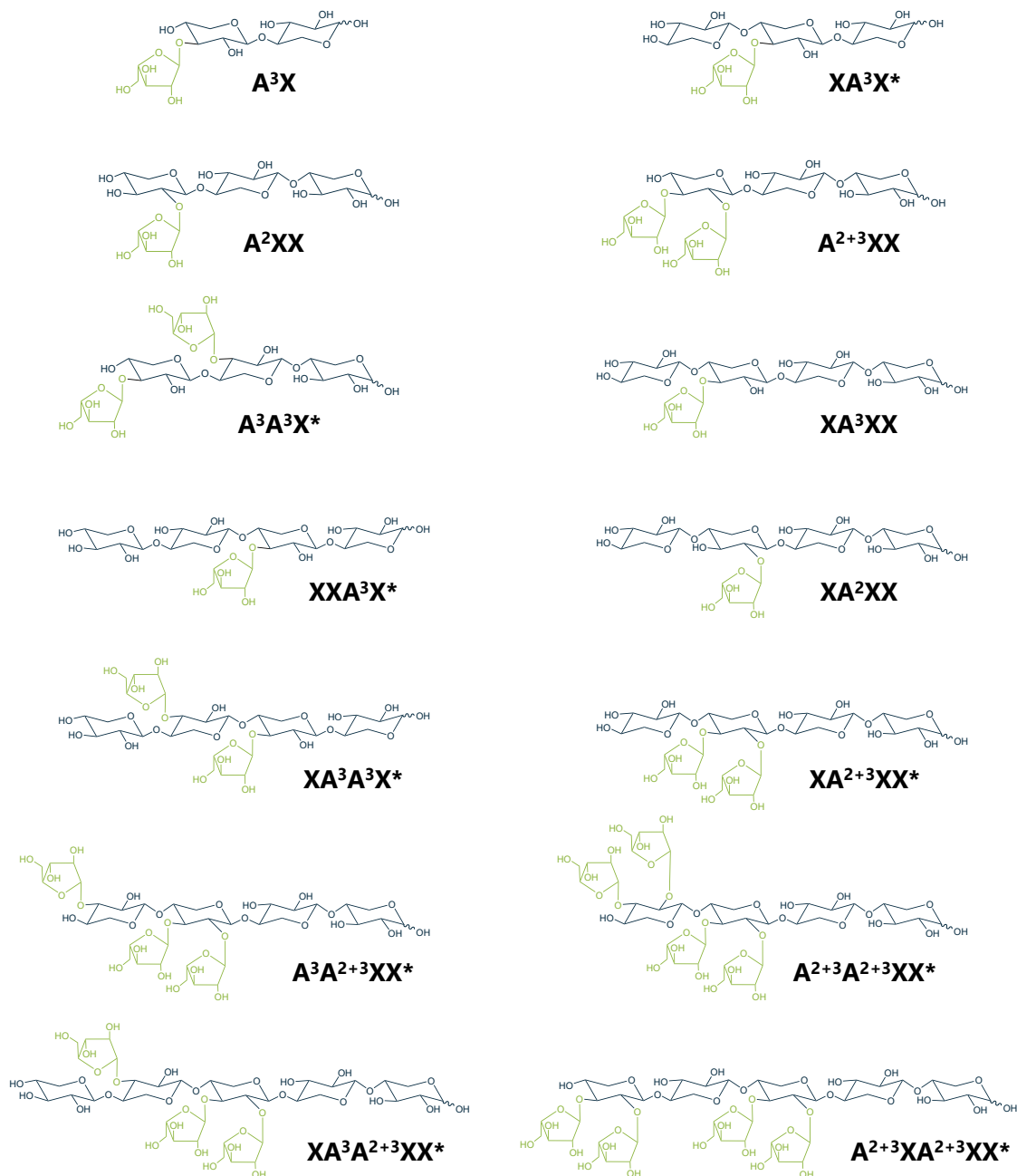


Abbildung 21: Strukturen der Arabinoxylooligosaccharid (AXOS)-Standardsubstanzen. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten AXOS sind mit einem „*“ markiert. Die Nomenklatur der AXOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). Arabinofuranosen sind in grün und Xylopyranosen in schwarz dargestellt.

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

4.1.3 Strukturaufklärung der Arabinoxylooligosaccharid-Standardsubstanzen

Auf Basis des durch die Monosaccharidanalyse bestimmten A/X konnte in Kombination mit den jeweiligen m/z -Werten auf die Anzahl der in den isolierten AXOS-Standardsubstanzen enthaltenen Xylp- und Araf-Einheiten geschlossen werden (s. Tabelle 3). Beispielsweise wurde für A^3A^3X ein Quasimolekülionen mit einem m/z von 685 ($[M+Li]^+$) mittels HPAEC-PAD/MS-Analyse detektiert, was fünf Pentosen entspricht. Aus dem ermittelten A/X von 0,70 kann ein Verhältnis an Araf- und Xylp-Einheiten von 2 : 3 abgeleitet werden. Trotz kleinerer Abweichungen in den Monosaccharidverhältnissen der Ara und Xyl, die vermutlich auf geringe Verunreinigungen oder auf einen partiellen Abbau der Monomere durch die TFA-Hydrolyse zurückgeführt werden kann, konnte diese Vorgehensweise auf alle isolierten AXOS-Standardsubstanzen angewandt werden. Weiter auffällig war, dass es bei AXOS ab einem DP von sechs zu einer verstärkten Bildung von zweifachen Lithiumaddukten kommt. So wurde für $A^{2+3}XA^{2+3}XX$, welche das größte isolierte AXOS mit neun Pentosen darstellt, ein Quasimolekülion mit einem m/z von 611 ($M+2\cdot Li^{2+}$) nachgewiesen. Es lässt sich festhalten, dass die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung und des Molekulargewichts der AXOS wertvolle strukturelle Informationen darstellen, die auch die nachfolgenden NMR-spektroskopischen Analysen zur Bestimmung der Bindungspositionen vereinfachen.

Tabelle 3: Auflistung der Monosaccharidzusammensetzungen, der Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), der Molekulargewichte (MG), der Arabinose-zu-Xylose-Verhältnisse (A/X) sowie der daraus abgeleiteten Anzahl an Arabinose (Ara)- und Xylose (Xyl)-Einheiten der isolierten Arabinoxylooligosaccharide (AXOS). Die Nomenklatur der AXOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

AXOS	m/z [M+Li] ⁺	m/z [M+2·Li] ²⁺	MG / g/mol	Monosaccharidanalyse / mol%		A/X	Anzahl Ara : Xyl
				Ara	Xyl		
XA³X	553	-	547	26,9	73,1	0,37	1 : 3
XXA³X	685	-	679	21,6	78,4	0,28	1 : 4
XA²⁺³XX	-	412	811	33,9	66,1	0,51	2 : 4
XA³A³X	-	412	811	34,6	65,4	0,53	2 : 4
A³A³X	685	-	679	41,1	58,9	0,70	2 : 3
XA³A²⁺³XX	-	544	1074	39,2	61,8	0,63	3 : 5
A³A²⁺³XX	-	478	942	43,8	56,2	0,78	3 : 4
A²⁺³XA²⁺³XX	-	611	1206	45,6	54,4	0,84	4 : 5
A²⁺³A²⁺³XX	-	544	1074	47,7	52,3	0,91	4 : 4

Zur vollständigen Strukturaufklärung der isolierten AXOS-Standardsubstanzen, insbesondere im Hinblick auf die glykosidische Verknüpfung der einzelnen Monomere, wurden ¹H-NMR- und verschiedene 2D-NMR-Experimente durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1). Unter Verwendung von bereits publizierten Daten (Gruppen *et al.*, 1992c; McCleary *et al.*, 2015) sowie vorhandener Vergleichsspektren kommerziell erhältlicher XOS (X₂ bis X₆) und AXOS (A³X, A²XX, XA²XX, XA³XX und A²⁺³XX) konnten die ¹H, ¹³C-Korrelationssignale der isolierten AXOS-Standardsubstanzen schrittweise zugeordnet werden. Die zugehörigen ¹H-NMR- und HSQC-Spektren isolierter und

4 Ergebnisse und Diskussion

kommerziell erhältlicher (A)XOS einschließlich der Tabellen mit zugeordneten Korrelationssignalen sind im Anhang dargestellt (s. Abbildung A1 - A19 und Tabelle A2 - A20).

Aufgrund der zahlreichen Signalüberlagerungen ist der chemische Verschiebungsbereich der Ringprotonen in den eindimensionalen ^1H -NMR-Spektren der (A)XOS ($\delta_{\text{H}} = 3,20 - 4,40$ ppm) wenig aussagekräftig und Signalzuordnungen sind nur bedingt möglich. Konkretere Aussagen ließen sich dagegen durch die Betrachtung der anomeren Protonensignale treffen, die im Vergleich zu den übrigen Ringprotonen deutlich ins Tieffeld ($\delta_{\text{H}} = 4,40 - 5,40$ ppm) verschoben sind (s. Abbildung 22). Das reduzierende Ende der (A)XOS wird infolge der α/β -Mutarotation durch zwei getrennte Dublettsignale repräsentiert. Unter Einbeziehung der Karplus-Beziehung (Karplus, 1963) kann mit Hilfe der ermittelten vicinalen Kopplungskonstanten ($^3J_{\text{H,H}}$) das Signal bei 5,18 ppm dem α -Anomer ($^3J_{\text{H,H}} = 3,59 - 3,69$ Hz) und das Signal bei 4,58 ppm dem β -Anomer ($^3J_{\text{H,H}} = 7,83 - 7,97$ Hz) der Xylp-Einheit am reduzierenden Ende der (A)XOS zugeordnet werden. In den von der Arbeitsgruppe um McCleary (2015) bereitgestellten ergänzenden Daten wird ebenfalls eine Kopplungskonstante von $^3J_{\text{H,H}} = 7,80 - 7,90$ Hz für β -konfigurierte Xylp-Einheiten angegeben. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustands liegen die (A)XOS in wässriger Lösung überwiegend in der β -Konfiguration vor, was sich aus dem Integralverhältnis der anomeren Protonensignale der α - und β -Xylp-Einheit ($\sim 1 : 2$) ableiten lässt. Die Zuordnung der weiteren Xylp-Einheiten und die damit verbundene Bestimmung ihrer anomeren Konfiguration ist jedoch nur eingeschränkt möglich. Während bei linearen XOS die Protonensignale der tXylp- und internen Xylp-Einheiten im Bereich von 4,40 - 4,50 ppm überlagern, führt die Arabinosesubstitution in den AXOS üblicherweise zu einer Verschiebung dieser Signale. Dadurch wird in einigen Fällen eine Zuordnung der Xylp-Einheiten ermöglicht. Beispielsweise erscheinen die anomeren Protonensignale einer internen dXylp-Einheit (β -Xylp_{II}, $\delta_{\text{H}} = 4,63 - 4,64$ ppm) separiert von den restlichen Signalen (s. Abbildung 22). Die Signale der Araf-Substituenten sind am weitesten ins Tieffeld verschoben ($\delta_{\text{H}} = 5,20 - 5,40$ ppm). In Folge der schwachen Kopplung zwischen dem H1 und H2 der Araf-Einheiten ähneln die Signale mehr einer (verbreiterten) Singulettstruktur. Eine Bestimmung der Kopplungskonstante war daher aufgrund der geringen Signalaufspaltung nicht möglich. Die anomere Konfiguration der Araf-Einheiten kann daher lediglich durch Abgleich der chemischen Verschiebungen mit Literaturdaten bestimmt werden (Gruppen *et al.*, 1992c; McCleary *et al.*, 2015). Aus den chemischen Verschiebungen der Arabinosesignale lassen sich zudem Bindungspositionen der Araf-Einheiten am Xyloserückgrat ableiten. Demnach führt beispielsweise die O3-Monosubstitution einer internen oder einer terminalen Xylp-Einheit zu einer Tieffeldverschiebung der Protonensignale (α -Araf_{O3(I/II/III)}, $\delta_{\text{H}} = 5,38 - 5,39$ ppm bzw. α -Araf_{O3(t)}, $\delta_{\text{H}} = 5,32 - 5,33$ ppm). Auch die Signale der Araf, die in O2-Position einer mXylp-Einheit gebunden vorliegen, weisen charakteristische chemische Verschiebungen auf (α -Araf_{O2(t)}, $\delta_{\text{H}} = 5,27$ ppm bzw. α -Araf_{O2(II)}, $\delta_{\text{H}} = 5,28$ ppm). Des Weiteren ist auffällig, dass die Arabinosesignale einer dXylp am terminalen Ende der AXOS-Standardsubstanzen (α -Araf_{O2+O3(t)}, $\delta_{\text{H}} = 5,23 - 5,25$ ppm) überlagern, während sie bei einer internen dXylp, mit Ausnahme von

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

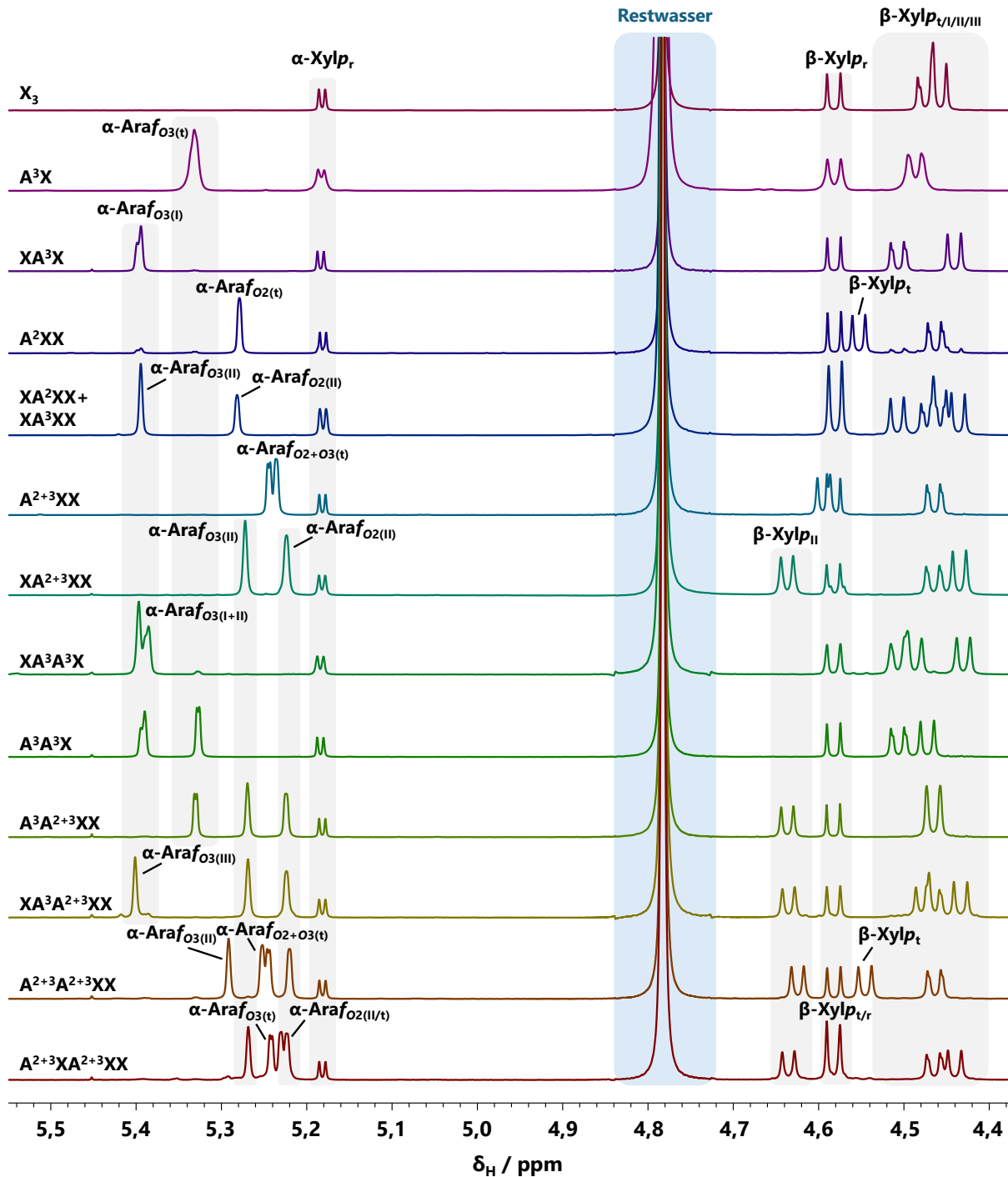


Abbildung 22: ^1H -NMR-Spektren ausgewählter Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS). Die Ausschnitte zeigen den Bereich der anomeren Protonensignale. Die Spektren wurden in D_2O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und gegen die chemische Verschiebung von Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm) kalibriert. Vollständige Spektren der isolierten AXOS sind im Anhang (Abbildung A2) zu sehen. Die Nomenklatur der (A)XOS folgt den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). Die Positionen der Xylopyranose (Xylp)-Einheiten im Molekül werden im Subskript von rechts nach links, ausgehend vom reduzierenden Ende (r) bis zum terminalen Ende (t) mit römischen Ziffern (I-III) beschriftet. Bei den Arabinofuranosen (Araf) ist im Subskript die Bindungsposition zur entsprechenden Xylp-Einheit (in Klammern) angegeben.

$\text{A}^{2+3}\text{XA}^{2+3}\text{XX}$, getrennt voneinander erscheinen ($\alpha\text{-Araf}_{\text{O2(II)}}$, $\delta_{\text{H}} = 5,22$ ppm bzw. $\alpha\text{-Araf}_{\text{O3(II)}}$, $\delta_{\text{H}} = 5,26 - 5,29$ ppm). Zuletzt kann zur Bestätigung der Ergebnisse der Monosaccharidanalyse noch die Anzahl an vorhandenen Monomeren mit Hilfe der Integralverhältnisse abgeschätzt

4 Ergebnisse und Diskussion

werden. Dies setzt jedoch voraus, dass die jeweilige Einheit ein separiertes Signal erzeugt, was nicht immer der Fall ist. Beispielsweise kann anhand der Integrale die Identität von $\text{XA}^3\text{A}^3\text{X}$ bestätigt werden, dessen Arabinosesignale ($\alpha\text{-Araf}_{\text{O3(l+ll)}}$, $\delta_{\text{H}} = 5,38 - 5,39 \text{ ppm}$) aufgrund der symmetrischen Struktur stark überlagern und daher fälschlicherweise als ein Signal interpretiert werden könnten. Da das Integral in etwa doppelt so groß ist wie das der *Xylp*-Einheiten kann daraus abgeleitet werden, dass zwei Protonen und damit zwei *Araf*-Einheiten zu diesem Signal beitragen.

Aus den eindimensionalen ^1H -NMR-Spektren der isolierten AXOS-Standardsubstanzen konnten bereits grundlegende strukturelle Informationen, wie die Position der glykosidischen Bindungen sowie die anomere Konfiguration, gewonnen werden. Die eindeutige Zuordnung der einzelnen Resonanzsignale wurde jedoch durch die Durchführung heteronuklearer 2D-Korrelationsexperimente wesentlich erleichtert. Darüber hinaus ließ sich die exakte Sequenz sowie die Verknüpfung der einzelnen Monomereinheiten innerhalb des Moleküls ausschließlich mithilfe der eingesetzten 2D-NMR-Experimente eindeutig bestimmen. Von großer Hilfe bei der Zuordnung der ^1H , ^{13}C -Kreuzssignale war die Beobachtung, dass identische Strukturelemente in unterschiedlichen AXOS vergleichbare chemische Verschiebungen aufweisen. Beispielsweise halfen bereits zugeordnete Signale der O3-monosubstituierten *tXylp*-Einheit in A^3X sowie der *dXylp*-Einheit in XA^{2+3}XX bei der Interpretation der 2D-Spektren von $\text{A}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$. In Abbildung 23 ist das HSQC-Spektrum von $\text{A}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$ mit den zugeordneten ^1H , ^{13}C -Korrelationssignalen dargestellt. Die Erweiterung des Protonenspektrums um die zusätzliche ^{13}C -Dimension hat einen erheblichen Einfluss auf die spektrale Auflösung. Am stärksten wird dieser Effekt im Verschiebungsbereich der Ringprotonen ($\delta_{\text{H/C}} = 3,20 - 4,40 \text{ ppm}/55,80 - 85,00 \text{ ppm}$) deutlich, die nun überwiegend als separierte Signale erscheinen. Auch der Bereich der anomeren Protonen erscheint im HSQC-Spektrum noch stärker von den übrigen Signalen getrennt, wobei die C1H1-Signale der *Araf*-Einheiten die größte Tieffeldverschiebung aufweisen ($\delta_{\text{H/C}} = 5,22 - 5,32 \text{ ppm}/108,78 - 109,35 \text{ ppm}$). Bei der Interpretation der entsprechenden HSQC-TOCSY- und H2BC-Spektren bildeten die C1H1-Signale auch stets den Ausgangspunkt für die Identifizierung der C2H2- bis C5H5-Signale einer Monomereinheit. Demnach erscheinen im HSQC-TOCSY-Spektrum alle Kreuzsignale, die einer bestimmten Monomereinheit (Spinsystem) angehören, in einer waagrechten Linie zum dem dazugehörigen anomeren Protonensignal. Durch die im H2BC-Spektrum sichtbaren $^2J_{\text{H,C}}$ -Kopplungen konnten dagegen ausgehend vom C1H1-Signal einer Monomereinheit schrittweise die direkten Nachbarn identifiziert werden. Weiterhin grenzen sich im HSQC-Spektrum (s. Abbildung 23) auch die Kreuzsignale der CH_2 -Gruppen aufgrund ihrer geringeren ^{13}C -chemischen Verschiebung ($\delta_{\text{C}} = 59,40 - 65,60 \text{ ppm}$) von den restlichen Ringprotonen ab. Da in der C5-Position der Pentosen zwei Protonen gebunden vorliegen, werden folglich auch zwei Signale erzeugt, die aufgrund der gemeinsamen ^{13}C -chemischen Verschiebung eine waagrechte Linie bilden. Bei der Aufnahme eines multiplizitätseditierten HSQC-Experiments (vgl. Kapitel 3.5.2) weisen die CH_2 -Gruppen zudem eine gegensätzliche Phase (unterschiedliche

[illegible]

Vorzeichen) auf, was ein zusätzliches Unterscheidungsmerkmal darstellt. Bei Betrachtung der Ringprotonen der Araf-Einheiten fällt auf, dass die C2H2-Kreuzsignale ($\delta_{H/C} = 4,14 - 4,17$ ppm/ 81,64 - 81,88 ppm) trotz der räumlichen Nähe zur glykosidischen Bindung stark überlagern, während die C3H3- und C4H4-Kreuzsignale getrennt voneinander vorliegen. Weiterhin kann im HSQC-Spektrum der Einfluss der glykosidischen Bindung auf die chemische Verschiebung der beteiligten Bindungspositionen nachverfolgt werden. Beispielsweise ist das C3H3-Kreuzsignal der tXylp-Einheit in A³A²⁺³XX im Vergleich zu AXOS mit einer uXylp-Einheit am terminalen Ende ($\delta_{H/C} = 3,41 - 3,42/76,24$ ppm, vgl. Tabelle A8, A10 und A13) infolge der Substitution mit einer Araf-Einheit in Position O3 verschoben ($\delta_{H/C} = 3,58/82,20$ ppm). Dieses Kreuzsignal ist zusammen mit dem anomeren Protonensignal der Araf-Einheit ($\delta_{H/C} = 5,32/108,78$ ppm) charakteristisch für O3-monosubstituierte tXylp-Einheiten und kommt ausschließlich in diesem Strukturelement vor. In Kapitel 4.3.1 wird im Zuge der HSQC-basierten Profilingmethode näher auf derartige Markersignale eingegangen, die auch für andere Strukturelemente zu beobachten sind. Nach Auswertung der HSQC-, H2BC- und HSQC-TOCSY-Spektren konnten mit Hilfe des HMBC-Spektrums die glykosidischen Verknüpfungen der einzelnen Monomere identifiziert werden. Abbildung 23 zeigt die überlagerten HSQC- und HMBC-Spektren von A³A²⁺³XX. Die intensiven Kreuzsignale bei

4 Ergebnisse und Diskussion

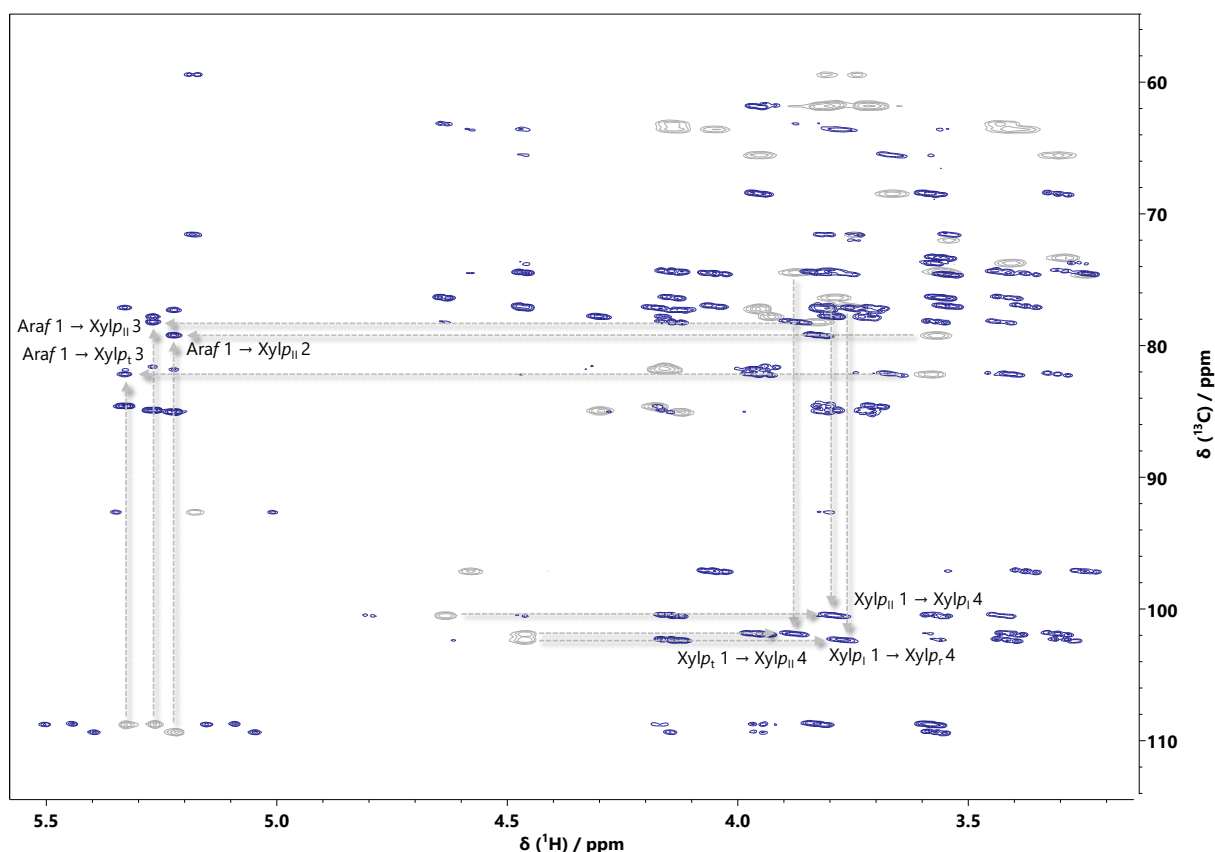


Abbildung 24: HMBC-Spektrum des isolierten Arabinoxylooligosaccharids $A^3A^{2+3}XX$, aufgenommen in D_2O mit einem 500 MHz Spektrometer, kalibriert auf die chemische Verschiebung von Aceton ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das HSQC-Spektrum ist zusätzlich in grau hinterlegt. Die Bezeichnungen der Korrelationssignale, die die glykosidische Bindungspositionen zwischen den Monomeren anzeigen, entsprechen denen in Abbildung 21 und 22.

$\delta_{H/C} = 3,88/101,87$ ppm ($Xylp_t 4 \rightarrow Xylp_{II} 1$), $\delta_{H/C} = 3,80/100,45$ ppm ($Xylp_{II} 1 \rightarrow Xylp_I 4$) und $\delta_{H/C} = 3,76/102,38$ ppm ($Xylp_I 1 \rightarrow Xylp_r 4$) werden durch die β -(1→4)-glykosidischen Bindungen zwischen den $Xylp$ -Einheiten im Rückgrat erzeugt. Schließlich können durch die Signale bei $\delta_{H/C} = 5,33/82,16$ ppm ($Araf 1 \rightarrow Xylp_t 3$), $\delta_{H/C} = 5,27/78,19$ ppm ($Araf 1 \rightarrow Xylp_{II} 3$) und $\delta_{H/C} = 5,22/79,21$ ppm ($Araf 1 \rightarrow Xylp_{II} 2$) die Bindungspositionen der $Araf$ -Einheiten mit dem Rückgrat nachgewiesen werden.

Obwohl das aus Weizenmehl extrahierte AX vergleichsweise schwach substituiert ist (vgl. Kapitel 4.1.1), konnte durch die Isolierung und Strukturaufklärung teilweise komplexer AXOS mit bis zu vier $Araf$ -Substituenten (s. Abbildung 21) gezeigt werden, dass das Weizen-AX auch höher substituierte Bereiche enthält. Diese waren bis zu einem bestimmten Ausmaß zugänglich für eine enzymatische Hydrolyse mit XYL_{10} und XYL_{11} . Basierend auf den isolierten Strukturen kann abgeleitet werden, dass XYL_{10} mindestens zwei und XYL_{11} mindestens drei aufeinanderfolgende $uXylp$ -Einheiten zur Spaltung des Xyloserückgrats benötigt (Biely *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010). Zwar wurde aus den BioGel-Fractionen von XYL_{11} lediglich $XA^3A^{2+3}XX$ isoliert, jedoch zeigte die HPAEC-PAD/MS-Analyse, dass neben dem Hauptprodukt XA^3XX auch größere Mengen an $XA^{2+3}XX$ durch eine enzymatische Hydrolyse mit XYL_{11} entstehen. Demnach enthalten die durch XYL_{11} freigesetzten AXOS am terminalen, nicht-reduzierenden

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

Ende jeweils eine α -Xylp-Einheit. Das Produktspektrum des XYL₁₀-Hydrolysats war dagegen vielfältiger. Demnach konnten sowohl die isolierten als auch die kommerziell erhältlichen AXOS-Standardsubstanzen im XYL₁₀-Hydrolysat des Weizen-AX nachgewiesen werden. Weiterhin stimmen die Strukturen der isolierten AXOS mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse des Weizen-AX überein (vgl. Kapitel 4.1.1.). Insbesondere in den höher substituierten Bereichen des Weizen-AX, die stellvertretend durch die komplexen AXOS $A^{2+3}XA^{2+3}XX$, $A^{2+3}A^{2+3}XX$, $XA^3A^{2+3}XX$ und $A^3A^{2+3}XX$ repräsentiert werden, scheinen vermehrt α -Xylp-Einheiten vorzukommen. Postulierte Strukturmodelle zu Weizen-AX gehen ebenfalls von einer bevorzugten Disubstitution in diesen Bereichen aus (Dervilly-Pinel *et al.*, 2004; Gruppen *et al.*, 1993). Die isolierten AXOS-Standardsubstanzen stellen keine komplett neuen Strukturen dar. Hierbei sind vor allem die Arbeiten der Forschungsgruppen um Gruppen (1992c) und McCleary (2015) zu nennen, die sich mit der Aufklärung enzymatisch freigesetzter AXOS aus alkalisch extrahierten AX aus Weizenmehl beschäftigt haben. Gruppen *et al.* (1992c) verwendeten eine nicht näher spezifizierte *endo*- β -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylanase aus *Aspergillus awamori* zur enzymatischen Spaltung des AX, bei der die beschriebenen AXOS ebenfalls freigesetzt worden sind. Sie konnten darüber hinaus ein zusätzliches AXOS mit einem DP von zehn identifizieren und strukturell charakterisieren. In der Studie von McCleary *et al.* (2015) kam neben einer GH10-Xylanase aus *Cellvibrio japonicus* auch die im Rahmen dieser Arbeit verwendete XYL₁₁ zum Einsatz. Die enzymatisch freigesetzten Strukturen stimmen größtenteils mit den isolierten AXOS überein, jedoch zeigten die XYL₁₁-Produkte im Vergleich ein um eine Einheit verlängertes Xyloserückgrat. Demnach konnten beispielsweise AXOS wie $XA^{2+3}XXX$ oder XA^3A^3XX identifiziert und strukturell charakterisiert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Produkte ebenfalls bei der Hydrolyse des Weizen-AX mit XYL₁₁ entstanden sind. Wie bereits erwähnt, wurde der Großteil der AXOS aus den BioGel-Fractionen des XYL₁₀-Hydrolysats isoliert. Derartige Produkte würden durch die enzymatische Hydrolyse mit GH10-Xylanasen in der Regel nicht freigesetzt werden (McCleary *et al.*, 2015). Abschließend lässt sich festhalten, dass im Zuge der Strukturaufklärung erstmals vollständige ¹H,¹³C-NMR-Datensätze höher substituerter AXOS erhalten wurden. Dies war eine zentrale Voraussetzung zur Etablierung einer entsprechenden 2D-NMR-Profilierungsmethode.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1.4 Isolierung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen

Die Freisetzung von FAXOS erfolgte durch die enzymatische Hydrolyse von UBS aus Roggen mittels einer Driselasemischung sowie aus säurevorbehandelten Mais-UBS mithilfe der XYL_{ABV} (vgl. Kapitel 3.4.1). Obwohl die Driselasemischung bzw. die XYL_{ABV} zahlreiche Nebenaktivitäten (vgl. Kapitel 3.4.1) besitzen, konnte eine FS-Esterase-Aktivität bei beiden Enzymen nicht nachgewiesen werden (Micard *et al.*, 1994; Schäfer, 2023). Aus diesem Grund waren die Enzyme für die Freisetzung der FAXOS geeignet. In beiden Fällen konnten die FAXOS durch Adsorption an das Amberlite-XAD-2-Material vom restlichen Hydrolysat abgetrennt werden. Die in der Wasserfraktion enthaltenen FS-freien OS bestanden neben Monosacchariden und (A)XOS überwiegend aus Cellooligosacchariden, deren Bildung wahrscheinlich auf die Cellulase-Nebenaktivität der Enzyme zurückzuführen ist. Nach dem Eindampfen und Trocknen wurden die Wasser/Methanol-Fractionen (50:50) der Roggen- und Maishydrolysate zur Vorfractionierung der FAXOS auf eine Sephadex-LH-20-Säule aufgegeben. Die Isolierung der aus Mais freigesetzten FAXOS bis einschließlich der Sephadex-Trennung wurde, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, im Rahmen der Promotionsarbeit von Daniela Schäfer (2023) durchgeführt. Alle weiteren chromatographischen Aufreinigungsschritte erfolgten im Zuge dieser Arbeit. Abbildung 25 zeigt die UV-Chromatogramme (325 nm) der Sephadex-LH20-Trennung der jeweiligen Wasser/Methanol-Fractionen aus dem Roggen- und Maishydrolysat. In beiden Chromatogrammen ist zu erkennen, dass ein großer Anteil des Hydrolysats (jeweils die erste Fraktion) nicht aufgetrennt werden konnte. Im Gegensatz zur Isolierung der AXOS wurde in beiden Fällen kein Ethanol zur Inaktivierung der Enzyme hinzugegeben. Demzufolge wurden höher-molekulare, lösliche Bestandteile nicht ausgefällt und verblieben im Hydrolysat. Die einzelnen Sephadex-Fractionen wurden zunächst durch eine LC-UV/MS-Analyse auf vorkommende Molekülmassen untersucht. Mit Ausnahme von Fraktion 6 aus dem Roggenhydrolysat (s. Abbildung 25A), die bereits eine hohe Reinheit aufwies und einem FAXOS mit drei Pentoseeinheiten entsprach, waren in allen Fraktionen mehrere FAXOS mit unterschiedlichen Molekülmassen vorhanden. Dies ist vermutlich auf die geringe chromatographische Auflösung und auf die zusätzlichen Adsorptions- und Verteilungseffekte auf dem Sephadex-LH20-Material zurückzuführen (vgl. Kapitel 3.4.4). Den dominierenden Molekülmassen zufolge wurden FAXOS mit einem DP von 3 bis 7 getrennt. Im Maishydrolysat wurden zudem in stärkerem Ausmaß

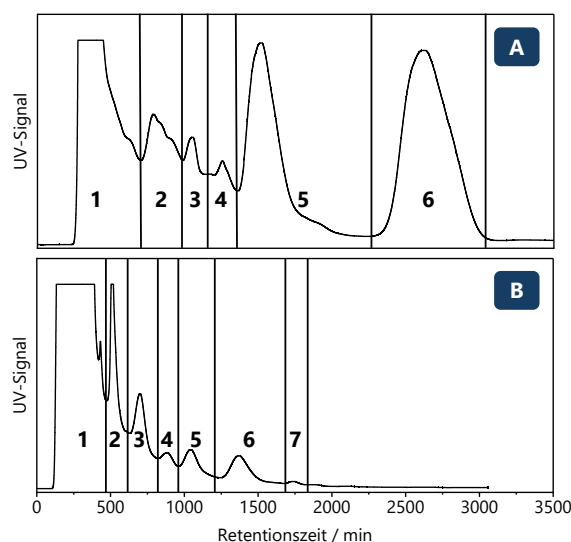


Abbildung 25: UV-Chromatogramme (325 nm) der Sephadex-LH20-Trennung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharide aus dem Roggen- (A) und Maishydrolysat (B)

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

Massen festgestellt, die acetylierten FAXOS entsprechen. Insbesondere in AX aus Mais kommen größere Mengen an ester gebundenen Acetylgruppen vor (vgl. Kapitel 1.2.2.1). Ausgewählte Sephadex-Fractionen wurden anschließend mittels semipräparativer HPLC auf einer C18- sowie einer HILIC-Phase weiter aufgereinigt (vgl. Kapitel 3.4.4). Insgesamt konnten aus den Hydrolysaten von Roggen und Mais neun FAXOS-Standardsubstanzen im mg-Bereich isoliert werden. Die mittels HPLC-UV (325 nm) bestimmte Reinheit betrug in allen Fällen mehr als 85 % (s. Tabelle A20). Ein FAXOS (XA^{5f3}X) konnte sowohl aus dem Roggen- als auch aus dem Maishydrolysat gewonnen werden. Die Strukturen der FAXOS sind in Abbildung 26 dargestellt.

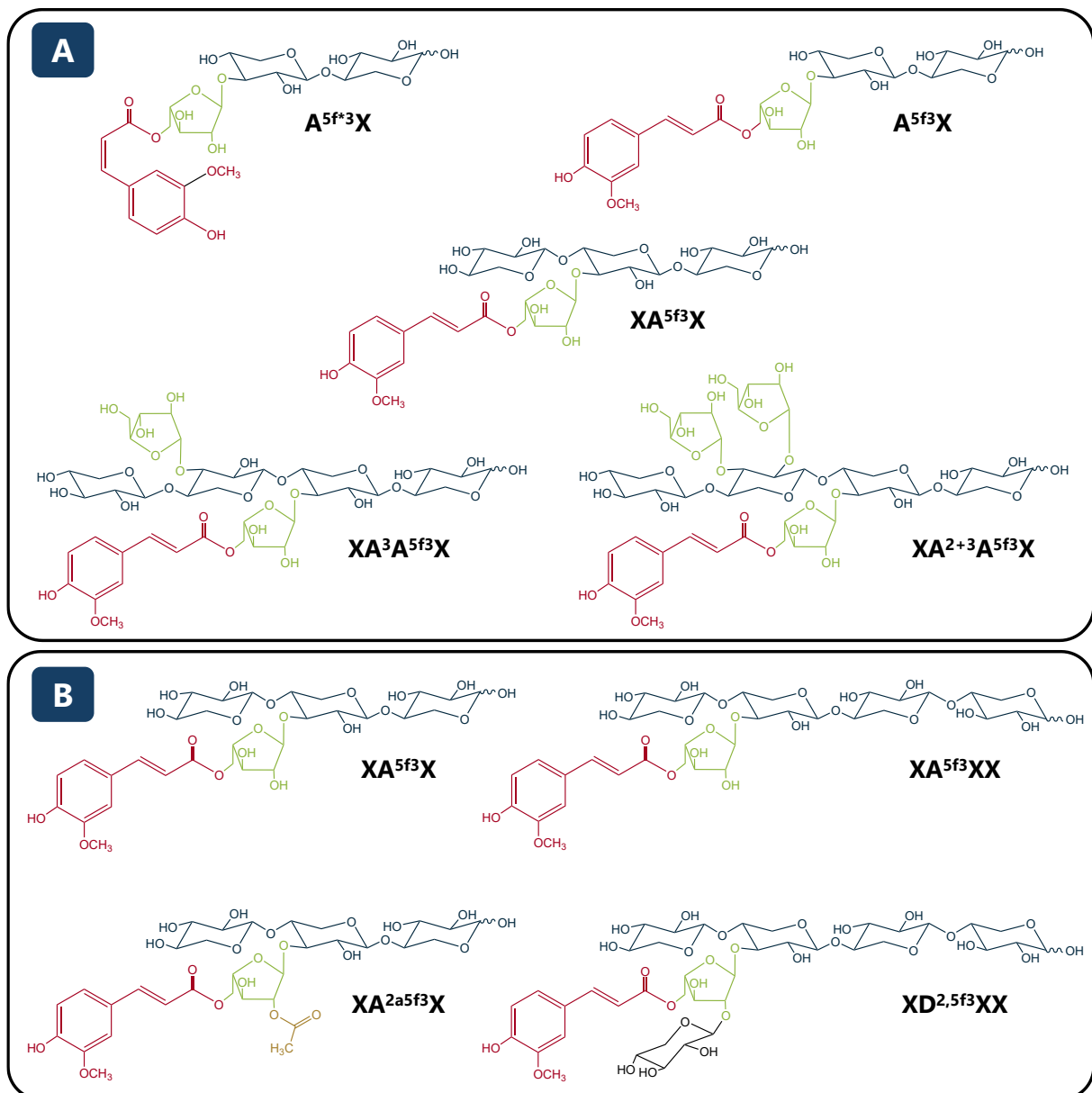


Abbildung 26: Strukturen der isolierten Standardsubstanzen ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide (FAXOS) aus Roggen (A) und Mais (B). Die Nomenklatur der FAXOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). Zur Unterscheidung der *cis*- von der *trans*-Ferulasäure (rot markiert) wurde im Superskript zusätzlich ein „*“ eingefügt. Arabinofuranose: grün, Xylopyranose: schwarz, Acetylgruppe: braun

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1.5 Strukturaufklärung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen

Neben der Monosaccharidanalyse wurden die isolierten FAXOS-Standardsubstanzen für eine erste strukturelle Charakterisierung in ein lineares Ionenfallen-Massenspektrometer injiziert (vgl. Kapitel 3.4.5). Dadurch konnte nicht nur das Molekulargewicht bestimmt werden, sondern zusätzlich über eine stufenweise Fragmentierung Hinweise auf glykosidische Bindungen und vorhandene Substituenten gewonnen werden. Die dazugehörigen *Full-Scan*-Massenspektren der FAXOS im positiven Modus nach Fragmentierung (bis MS^4) sind im Anhang (Abbildung A20 - A25) einzusehen. Aus den ermittelten m/z -Werten der Quasimolekülonen mit Natrium ($[M+Na]^+$) konnte mit den Ergebnissen der Monosaccharidanalyse in Analogie zu den AXOS auf die Anzahl der vorhandenen Ara f - und Xyl p -Einheiten geschlossen werden (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Auflistung der Monosaccharidzusammensetzungen, der Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), der Molekulargewichte (MG), der Arabinose-zu-Xylose-Verhältnisse (A/X) sowie der daraus abgeleiteten Anzahl an Arabinose (Ara)- und Xylose (Xyl)-Einheiten der Standardsubstanzen isolierter ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide (FAXOS). Die Nomenklatur der FAXOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). Zur Unterscheidung der *cis*- von der *trans*-Ferulasäure (rot markiert) wurde im Superskript zusätzlich ein „*“ eingefügt (vgl. Abbildung 26).

	m/z $[M+Na]^+$	MG / g/mol	Monosaccharidanalyse / mol%		A/X	Anzahl Ara : Xyl
			Ara	Xyl		
A^{5f3}X	613	590	33,7	66,3	0,51	1 : 2
A^{5f*3}X	613	590	35,4	64,6	0,55	1 : 2
XA^{5f3}X (R)	745	722	23,8	76,2	0,31	1 : 3
XA^{2a5f3}X	787	764	25,6	74,4	0,34	1 : 3
XA^{5f3}XX	877	854	17,4	82,6	0,21	1 : 4
XD^{2,5f3}XX	1009	986	16,6	83,4	0,20	1 : 5
XA³A^{5f3}X	1009	986	34,4	65,6	0,52	2 : 4
XA²⁺³A^{5f3}X	1141	1118	45,3	54,7	0,83	3 : 4

(R) FAXOS-Standardsubstanz wurde aus Roggen und aus Mais isoliert; die hier dargestellten Daten beziehen sich auf das FAXOS aus Roggen.

Ausgehend von den Quasimolekülonen mit Natrium wurden an den isolierten FAXOS gezielt Fragmentierungsreaktionen durchgeführt. Unter den entstehenden Tochterionen wurden einzelne Spezies ausgewählt und anschließend erneut fragmentiert. Abbildung 27 zeigt exemplarisch den Fragmentierungsweg von XA^{2a5f3}X, beginnend am reduzierenden Ende. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass FAXOS im ESI positiven Modus grundsätzlich vom reduzierenden als auch vom nicht-reduzierenden Ende aus fragmentieren können (Akshatha *et al.*, 2024). Aus diesem Grund ist die eindeutige Bestimmung der exakten Position von Seitenketten nur in seltenen Fällen möglich. Das Quasimolekülion von XA^{2a5f3}X mit einem m/z ($[M+Na]^+$) von 787 lässt bereits darauf schließen, dass es sich bei dem isolierten FAXOS um ein OS aus vier Pentosen mit einer veresterten FS sowie einer Acetylgruppe handelt. Die Abspaltung einer Pentoseeinheit (jeweils ohne glykosidische Bindung) ist ein bei FAXOS häufig zu beobachtender Massenübergang ($\Delta (m/z) = 132$) (Akshatha *et al.*, 2024). Darüber hinaus

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

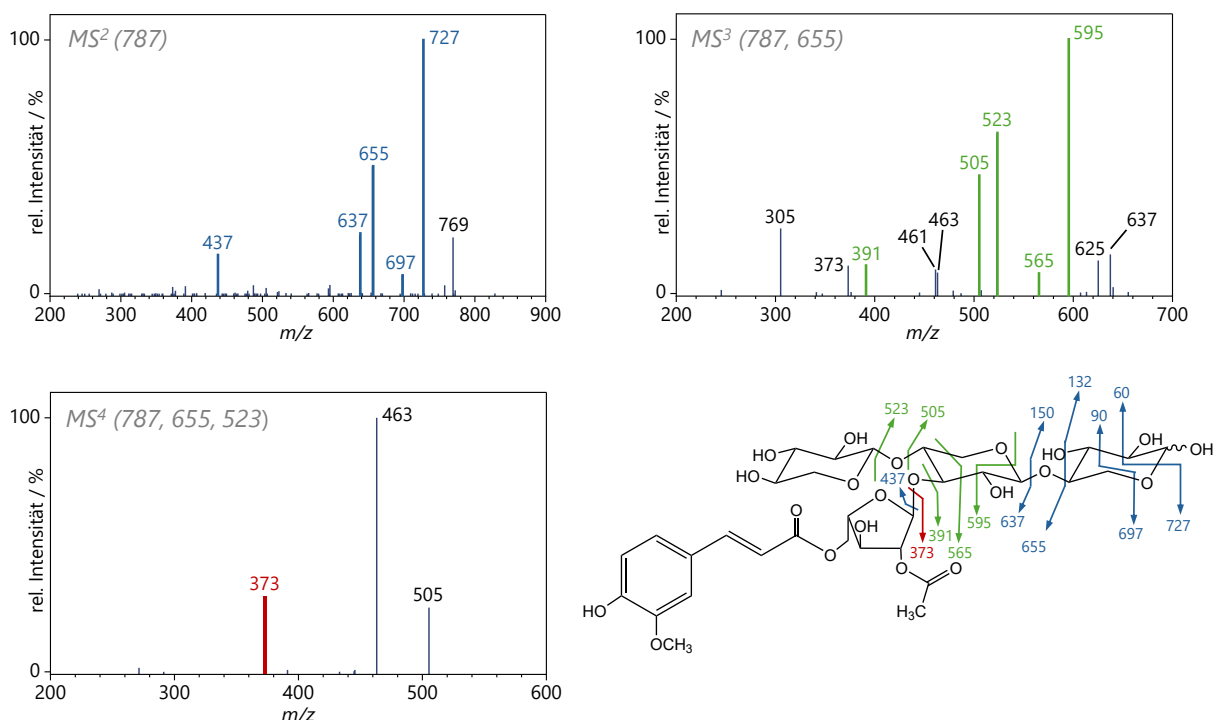


Abbildung 27: Exemplarischer Fragmentierungsweg des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids XA^{2a5f3}X mit den dazugehörigen ESI(+)-MSⁿ-Spektren

resultieren auftretende Massendifferenzen von $\Delta(m/z) = 18$ aus der Abspaltung von Wasser. Die in allen MSⁿ-Spektren von XA^{2a5f3}X dominierende Crossring-Fragmentierung mit einem Massenverlust von $\Delta(m/z) = 60$ ist charakteristisch für β -(1→4)-glykosidisch verbundene Pentoseeinheiten (Akshatha *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2009). Zudem wird das Crossring-Fragment mit einer Massendifferenz von $\Delta(m/z) = 90$ ebenfalls häufig beobachtet, jedoch in geringerem Ausmaß. Anhand der Massenspektren kann die Position der Acetylgruppe auf die FA-Seitenkette eingegrenzt werden. Demnach entsprechen die im MS³- und MS⁴-Spektrum (s. Abbildung 27) vorkommenden Fragmente mit einem m/z von 373 bzw. 391 der Abspaltung einer FA-Seitenkette und einer Acetylgruppe. Dies deutet daraufhin, dass die Acetylgruppe an die Ara der FA-Seitenkette und nicht an das Xyloserückgrat gebunden vorliegt. Hingegen beschreibt das Fragment mit einem m/z von 437 im MS²-Spektrum das nach Abspaltung der acetylierten FA-Seitenkette zurückbleibende Rückgrat aus drei Xylp-Einheiten. Mit steigendem DP und Verzweigungsgrad der FAXOS wurde es jedoch zunehmend schwieriger, konkrete Aussagen zu treffen. Ungeachtet dessen konnte durch die stufenweise Fragmentierung der isolierten FAXOS-Standardsubstanzen sowohl das Vorkommen der FA- bzw. FAX-Seitenkette bestätigt als auch erste Hinweise auf vorliegende Bindungstypen gewonnen werden.

Die vollständige Aufklärung der Struktur der isolierten FAXOS-Standardsubstanzen wurde schließlich durch die Interpretation der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren (vgl. Kapitel 3.5.1) ermöglicht. Die bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung der AXOS gewonnenen Erkenntnisse (vgl. Kapitel 4.1.3) lieferten eine wertvolle Grundlage für die Interpretation der ¹H-NMR- und HSQC-Spektren der FAXOS. Darüber hinaus konnten zur

4 Ergebnisse und Diskussion

Zuordnung der ^1H , ^{13}C -Korrelationssignale ergänzend Literaturdaten herangezogen werden (Appeldoorn *et al.*, 2013; Bunzel *et al.*, 2002; Ishii, 1991; Schendel *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2016b; Wende & Fry, 1997a). Die zugehörigen ^1H -NMR- und HSQC-Spektren der isolierten FAXOS einschließlich der Tabellen mit zugeordneten Korrelationssignalen sind im Anhang dargestellt (s. Abbildung A26 - A32 und Tabelle A21 - A28).

Bei der Betrachtung der eindimensionalen ^1H -NMR-Spektren der FAXOS-Standardsubstanzen fällt zunächst das Protonensignal der FS zugehörigen Methoxygruppe auf. Dieses erscheint infolge dreier chemisch äquivalenter Protonen als intensives Singulett ($\delta_{\text{H}} = 3,85 - 3,92$ ppm) und lässt sich dadurch eindeutig von den Ringprotonensignalen abgrenzen. Die weiteren Protonensignale der estergebundenen FS sind ins Tieffeld verschoben ($\delta_{\text{H}} = 5,93 - 7,75$ ppm). In Abbildung 28 ist der Bereich der anomeren Protonensignale der Araf-Einheiten sowie der restlichen Protonensignale der FS dargestellt. Hierbei hat die *trans/cis*-Konfiguration der estergebundenen FS einen großen Einfluss auf die chemische Verschiebung der Signale, wie anhand der ^1H -NMR-Spektren von A^{5f3}X und A^{5f*3}X zu erkennen ist. Dies macht sich vor allem bei den Signalen der an der Doppelbindung der FS beteiligten Protonen bemerkbar. Demnach erscheinen die Protonensignale in Position 7 und 8 um etwa 0,50 - 0,60 ppm verschoben. Durch die Esterbindung zur FS in Position O5 der Araf-Einheit erfahren die entsprechenden Ringprotonensignale (H2 bis H5) eine Tieffeldverschiebung, die sich bis in Bereich der anomeren Protonensignale der Xylp-Einheiten erstreckt. Dadurch ist der Bereich zwischen 4,30 und 4,60 ppm durch viele Signalüberlagerungen gekennzeichnet (s. Abbildung A26), die eine konkrete Zuordnung erschweren. Weiterhin weisen die anomeren Protonensignale der FS-tragenden Araf-Einheiten (s. Abbildung 28), die über eine (1→3)-glykosidische Bindung an mXylp ($\alpha\text{-Araf}(+\text{FS})_{\text{O3(t/l/II)}}$) gebunden sind, keine oder nur eine geringfügige Verschiebung gegenüber den korrespondierenden Signalen in AXOS-Spektren (vgl. Tabelle A7 - A19) auf. Somit erlaubt die chemische Verschiebung dieser Signale keinen Rückschluss auf das Vorliegen einer estergebundenen FS, liefert jedoch Hinweise auf die jeweilige Bindungsposition der Araf-Einheit. Dagegen wird die chemische Verschiebung der anomeren Protonensignale von Araf-Einheiten, die in direkter Nachbarschaft zur FA-Seitenkette vorkommen, durch die Anwesenheit der estergebundenen FS beeinflusst. Beispielsweise erscheinen die H1-Signale der in O2- und O3-Position der dXylp-Einheit gebundenen Araf in $\text{XA}^{2+3}\text{A}^{5f3}\text{X}$ bei 4,95 ppm ($\alpha\text{-Araf}_{\text{O2(III)}}$) bzw. 5,35 ppm ($\alpha\text{-Araf}_{\text{O3(III)}}$), während sie in strukturell vergleichbaren AXOS wie XA^{2+3}XX oder $\text{XA}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$ bei 5,22 ppm ($\alpha\text{-Araf}_{\text{O2(II)}}$) bzw. 5,26/5,27 ppm ($\alpha\text{-Araf}_{\text{O3(III)}}$) auftreten (vgl. Tabelle A13 bzw. A17). Schließlich konnte anhand charakteristischer Verschiebungen in den ^1H -NMR-Spektren von X^{2a5f3}X und $\text{XD}^{2,5f3}\text{XX}$ das Vorhandensein einer zusätzlichen Acetylgruppe bzw. einer Xylp-Einheit in O2-Position der Araf-Einheit nachgewiesen werden. Analog zur Methoxygruppe der FS bildet die Acetylgruppe aufgrund der drei äquivalenten Protonen ein Singulettssignal bei $\delta_{\text{H}} = 2,10$ ppm. Die Protonensignale der Araf-Einheit werden durch die zusätzliche Esterbindung zur Acetylgruppe noch weiter ins Tieffeld verschoben. Dieser Effekt zeigt sich besonders ausgeprägt beim H2-Signal der Araf, das nun im Bereich der

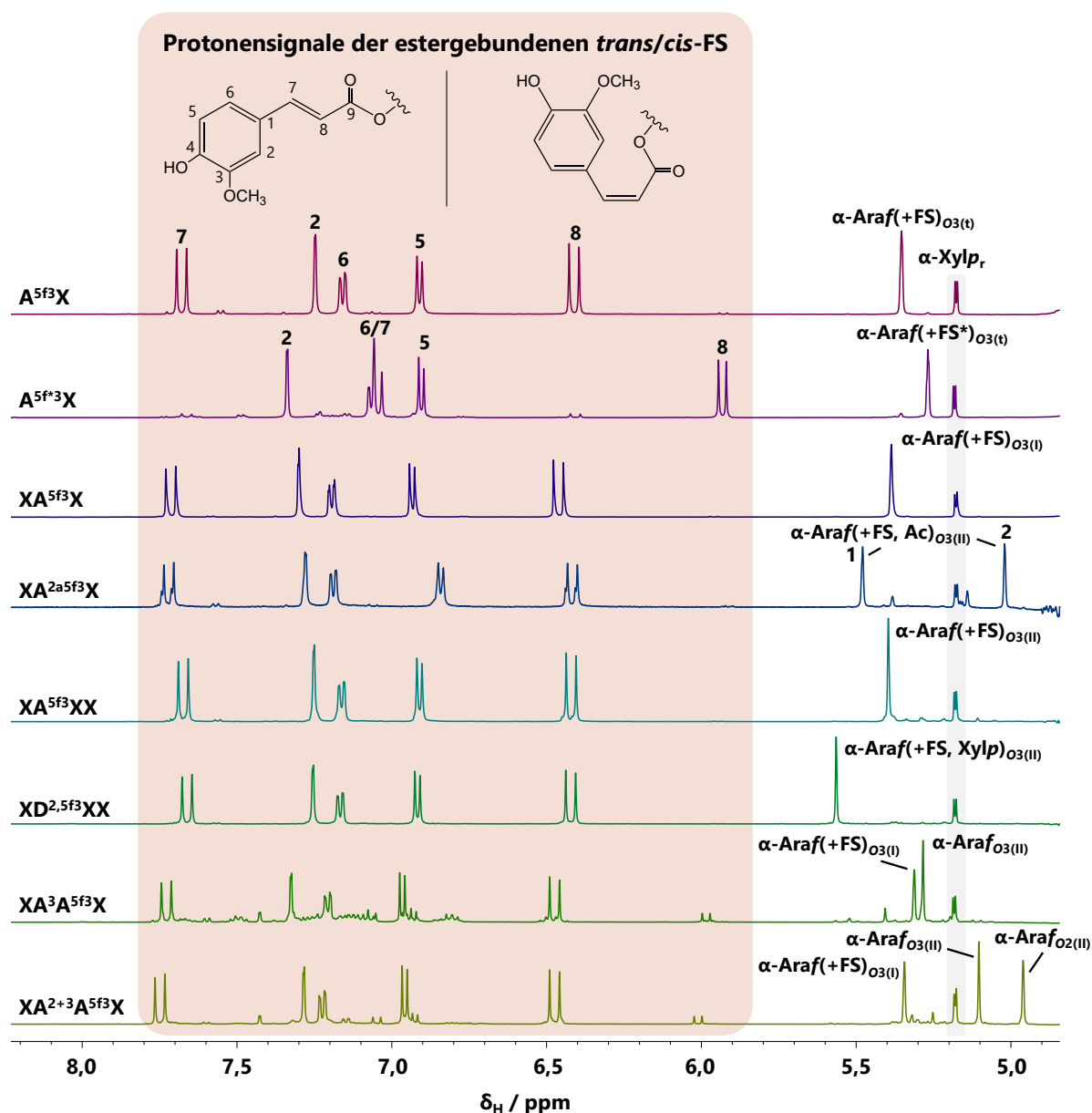


Abbildung 28: Eindimensionale ^1H -NMR-Spektren der aus Roggen und Mais isolierten ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharide (FAXOS). Die Ausschnitte zeigen den Bereich der anomeren Protonensignale der Arabinofuranosen (Araf) sowie die Protonensignale der estergebundenen *trans*-Ferulasäure (FS) und *cis*-FS (mit „*“ markiert). Die Spektren wurden in D_2O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und gegen die chemische Verschiebung von Aceton ($\delta_H = 2,22$ ppm) kalibriert. Vollständige Spektren der isolierten FAXOS sind im Anhang (s. Abbildung A26) zu sehen. Die Nomenklatur der FAXOS folgt den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). Die Bezeichnungen entsprechen denen in Abbildung 22. Ac, Acetylgruppe; Xylp, Xylopyranose

anomeren Protonensignale erscheint ($\delta_H = 5,02$ ppm; s. Abbildung 28). Interessanterweise zeigt das H1-Signal der Araf-Einheit in $\text{XD}^{2,5\text{f3}}\text{XX}$ durch die zusätzliche Xylp-Einheit in der Seitenkette von allen anomeren Protonensignalen die größte chemische Verschiebung ($\delta_H = 5,57$ ppm). Ein zur Acetylgruppe vergleichbarer Verschiebungseffekt auf das Protonensignal der an der glykosidischen Bindung beteiligten Position ($\delta_H = 4,29$ ppm) kann jedoch nicht beobachtet werden. Trotz einer Signalüberlagerung mit dem H4-Signal der Araf-Einheit ($\delta_H = 5,56$ ppm) ist das anomere Protonensignal der Xylp-Einheit in der Seitenkette deutlich als Dublettstruktur ($\delta_H = 4,55$ ppm) zu erkennen. Dementsprechend konnte durch die

4.1 Isolierung und Charakterisierung von Standardsubstanzen

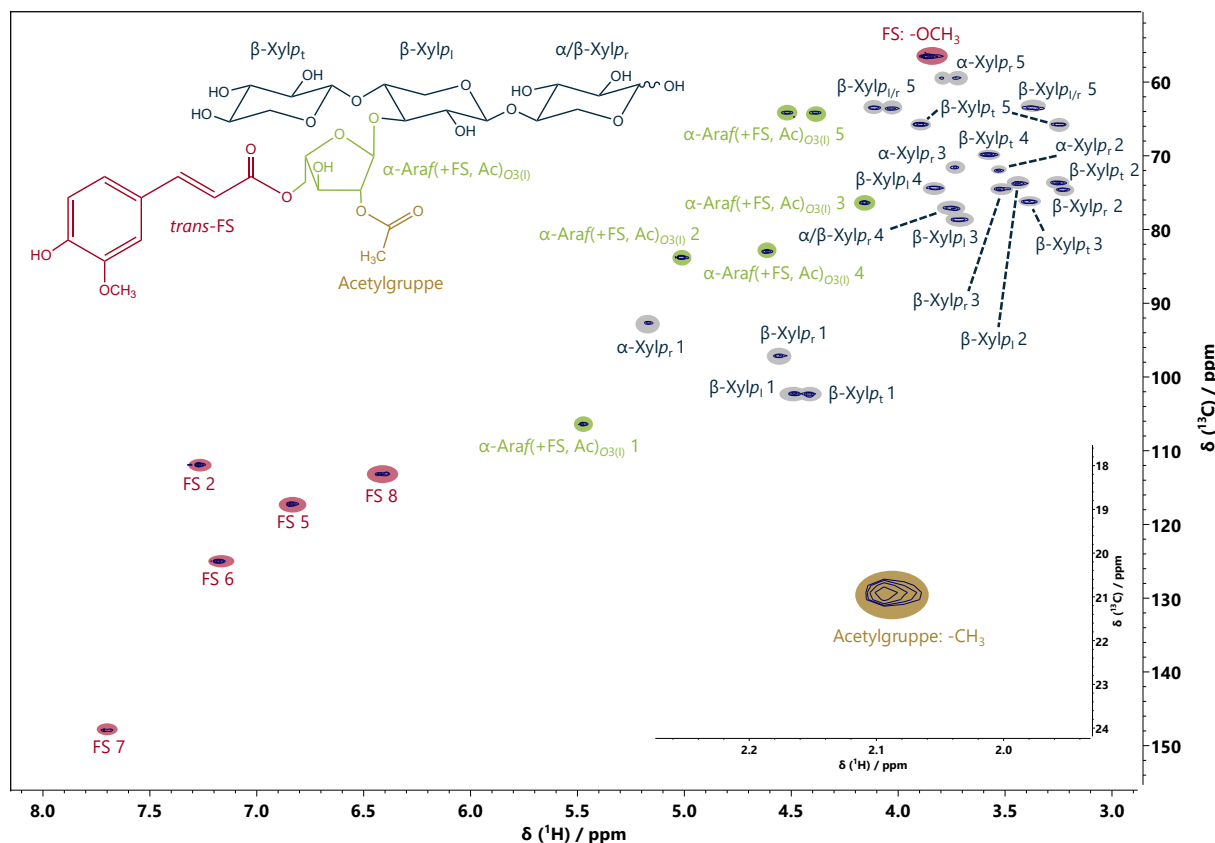


Abbildung 30: HSQC-Spektrum des aus Mais isolierten ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids XA^{2a5f3}X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und gegen die chemische Verschiebung des Acetonsignals ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm) kalibriert. Die Bezeichnungen der Korrelationssignale der Arabinofuranosen (Araf, grün), der Xylopyranosen (Xylp, schwarz), der estergebundenen Ferulasäure (FS, rot) sowie der Acetylgruppe (Ac, braun) entsprechen denen aus Abbildung 28 und sind zusätzlich durch die dargestellte Struktur beschrieben.

Verschiebung dieser Signale zu beeinflussen. Der eindeutige Nachweis, dass die FS tatsächlich an die O5-Position der Araf gebunden vorliegt, gelang schließlich durch die Aufnahme der HMBC-Spektren der FAXOS. Dabei sind stets zwei Korrelationssignale zwischen der C5H5-Position der Araf-Einheit und der Carbonylgruppe an Position 9 der FS ($\delta_C \sim 169 - 170$ ppm) zu sehen. Des Weiteren sind die chemischen Verschiebungen der C2H2- bis C4H4-Signale der FS-tragenden Araf von der jeweiligen Bindungsposition der FA-Seitenkette abhängig. Dementsprechend ergeben sich unterschiedliche Korrelationssignale für eine FA-Seitenkette, die am terminalen Ende oder im Inneren des Xyloserückgrats der FAXOS gebunden vorliegt. Anhand der HSQC-Spektren von XA^{25f3}X (s. Abbildung 30, Tabelle A24) und XD^{2,5f3}XX (s. Abbildung A31, Tabelle A26) lässt sich zudem der starke Einfluss eines zusätzlichen Substituenten innerhalb der FS-haltigen Seitenkette auf die chemische Verschiebung der Arabinosesignale nachvollziehen. Folglich erscheint das C2H2-Kreuzsignal der Araf-Einheit in XD^{2,5f3}XX bei $\delta_{H/C} = 4,29/89,49$ ppm, wohingegen es beispielsweise in XA^{5f3}X bei $\delta_{H/C} = 4,20/81,44$ ppm auftritt. Durch die Auswertung der jeweiligen HMBC-Spektren von XA^{2a5f3}X und XD^{2,5f3}XX konnte schließlich die Bindungsposition der zusätzlichen Substituenten in der FS-haltigen Seitenkette identifiziert werden. So sind auf der Höhe der jeweiligen

4 Ergebnisse und Diskussion

C2H2-Position der Araf und dem CH₃-Signal der Acetylgruppe ($\delta_{H/C} = 2,10 \text{ ppm}/20,90 \text{ ppm}$; s. Abbildung 30) bzw. dem anomeren Protonensignal der seitenkettengebundenen tXylp-Einheit ($\delta_H = 4,55 \text{ ppm}/103,55 \text{ ppm}$) Korrelationssignale zu erkennen. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass die übrigen Korrelationssignale der tXylp-Einheit der FAX-Seitenkette chemische Verschiebungen aufweisen, die denen der Xylp-Einheiten des Rückgrats stark ähneln. Zusammenfassend lassen sich durch die Esterbindung zur FS sowie durch weitere Substituenten charakteristische ¹H,¹³C-Kreuzsignale der Araf-Einheiten beobachten, die eine Unterscheidung zu den Korrelationssignalen der unsubstituierten Araf-Einheiten ermöglichen.

Durch eine enzymatische Hydrolyse von UBS aus mehrjährigem Weizengras (*Thinopyrum intermedium*) mit Hilfe einer Driselasemischung konnten Schendel und Mitarbeitende (2015) FAXOS-Standardsubstanzen isolieren, die mit den aus Roggen freigesetzten Strukturen vergleichbar sind. Demzufolge stellen A^{5f3}X und XA^{5f3}X stets die Hauptprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Getreide-BS mit Driselase dar. Des Weiteren werden beim Driselaseverdau ausschließlich FAXOS freigesetzt, bei der die FA-Seitenkette in direkter Nachbarschaft zum reduzierenden Ende vorkommt. Neben dem bereits gezeigten XA^{3A}^{5f3}X (Schendel *et al.*, 2015) konnte im Rahmen dieser Arbeit eine bis dato noch nicht gezeigte Struktur XA^{2+3A}^{5f3}X isoliert werden. Demnach können *endo*- β -1,4-Xylanasen auch FS-haltige Strukturen freisetzen, in denen mXylp- oder dXylp-Einheiten in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer mit einer FA-Seitenkette substituierten Xylp-Einheit vorliegen. *Cis*-konfigurierte FS kommt in der Regel nicht in nativer Form vor, da Pflanzen fast ausschließlich das energetisch stabilere *trans*-Isomer bilden. Die Bildung von A^{5f*3}X ist vermutlich auf äußere Lichteinflüsse im Zuge des Isolierungsprozesses zurückzuführen, bei der es zu einer Isomerisierung der Doppelbindung gekommen ist (Moni *et al.*, 2021).

Die aus Mais-UBS durch XYL_{ABV} freigesetzten FAXOS-Standardsubstanzen entsprechen dem typischen Spaltungsmuster einer GH11-Xylanase (Biely *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010). Folglich besitzen alle FAXOS eine terminale uXylp-Einheit sowie ein oder zwei uXylp-Einheiten am reduzierenden Ende. Dagegen konnte kein A^{5f3}X im Hydrolysat von XYL_{ABV} nachgewiesen werden. Obwohl die Strukturabfolge von XD^{2,5f3}XX vermutlich erst durch die milde TFA-Hydrolyse der Mais-UBS entstand (vgl. Kapitel 3.4.1), lieferte die Isolierung und Strukturcharakterisierung dieser FAXOS-Standardsubstanz wertvolle NMR-Daten zur an das Xylanrückgrat gebundenen FAX-Seitenkette, die ubiquitär in Getreidepflanzen vorkommt (Schendel *et al.*, 2016a). Bei dem ebenfalls aus Mais isolierten FAXOS XA^{2a5f3}X, dessen FA-Seitenkette acetyliert vorliegt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese im Zuge einer intramolekularen Umesterungsreaktion gebildet wurde (vgl. Kapitel 1.2.2.1). Nichtsdestotrotz wurde eine O2-Acetylierung der Araf-Einheit in FS-haltigen Seitenketten bisher ausschließlich für vegetative Strukturen von Gräsern beschrieben, nicht jedoch für AX aus Zellwänden von Getreidekaryopsen (Azuma *et al.*, 1990; Ishii, 1991).

4.2 Entwicklung und Anwendung einer HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode

In Vorversuchen mit XYL₁₀ und XYL₁₁ zeigte sich, dass die Enzyme auch zur Hydrolyse der AX-Struktur in den BS anderer Getreidearten geeignet sind. In den enzymatischen Hydrolysaten der Getreide-BS konnten sowohl bekannte als auch die im Rahmen dieser Arbeit isolierten AXOS-Standardsubstanzen identifiziert werden. Durch die Bestimmung der molaren Anteil der freigesetzten (A)XOS können Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Feinstruktur der in den Getreide-BS enthaltenen AX gezogen werden. Vor diesem Hintergrund wurde eine Profilingmethode basierend auf der HPAEC-PAD mit MS-Kopplung entwickelt, die sowohl eine semiquantitative Bestimmung kommerziell verfügbarer XOS (X₂ - X₆) und AXOS (A³X, A²XX, XA³XX, A²⁺³XX) sowie der zusätzlich isolierten und strukturell aufgeklärten AXOS (vgl. Abbildung 21 in Kapitel 4.1.2) ermöglicht.

Der erste Schritt in der Entwicklung der Profilingmethode lag in der Suche nach einem passenden Gradientenprogramm, mit dem eine vollständige Trennung der (A)XOS in einer möglichst kurzen Zeit erzielt werden konnte. Da die Methode in die Abteilung für Lebensmittel- und Phytochemie integriert werden sollte, wurde mit vorgemischten Fließmitteln aus Wasser, Natronlauge und Natriumacetat gearbeitet. Als analytische Säule kam eine CarboPac PA200 (ThermoFisher Scientific) zum Einsatz, die bereits in zahlreichen Studien erfolgreich zur Trennung von (A)XOS sowie weiteren, aus der pflanzlichen Zellwand stammenden OS angewendet wurde (Bhattacharya *et al.*, 2020; Joyce *et al.*, 2023; McCleary *et al.*, 2015; Steck *et al.*, 2021; Wefers & Bunzel, 2016a). Darüber hinaus wird in Kapitel 4.2.2 eine alternative Anionenaustauschersäule (SweetSep AEX200, Antec Scientific) vorgestellt, welche ebenfalls eine Trennung der (A)XOS ermöglicht. Bei der Optimierung des Gradientenprogramms konnte auf Vorarbeiten einer vorausgegangenen Masterarbeit (Sitter, 2022) zurückgegriffen werden, in der ein Gradient entwickelt wurde, bei der die kommerziell verfügbaren (A)XOS vollständig voneinander getrennt vorlagen. Die Elutionskraft des anfänglichen Gradienten war für die Elution der höher substituierten AXOS mit größerem DP > 6 zu gering, weshalb sich dafür entschieden wurde, mit einem stärkeren Acetatgradienten zu arbeiten. Hierbei musste jedoch darauf geachtet werden, die Acetatkonzentration im Fließmittel nicht mehr als erforderlich zu steigern, da eine zu hohe Salzbelastung die potenziell gekoppelte MS-Detektion beeinträchtigen kann. Des Weiteren zeigten XXA³X und XA³XX ein identisches Retentionsverhalten, weshalb hier keine Trennung erreicht werden konnte. Im Gegensatz zu XA³XX ist XXA³X ein geringfügig auftretendes Nebenprodukt in GH10- und GH11-Hydrolysaten. Beide Xylanasen setzen typischerweise keine AXOS frei, deren zweite Xylp-Einheit ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende unsubstituiert bleibt (Biely *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde XXA³X in der weiteren Methodenentwicklung nicht berücksichtigt. Die spätere Identifizierung und Quantifizierung der (A)XOS erfolgte mit Hilfe RRT bzw. RRF in Bezug zu einer Ist (vgl. Kapitel 3.6). Ein geeigneter Ist sollte eine hohe Reinheit

4 Ergebnisse und Diskussion

besitzen und zugleich kostengünstig in ausreichender Menge verfügbar sein. Darüber hinaus sollte er den Analyten strukturell ähneln, natürlicherweise nicht in den untersuchten Pflanzenmaterialien vorkommen und sich ohne Beeinträchtigung in die chromatographische Trennung der (A)XOS integrieren lassen. In diesem Zusammenhang erwies sich die Isomaltotriose (IMT), die bereits in der Masterarbeit (Sitter, 2022) zur quantitativen Bestimmung der kommerziell erhältlichen (A)XOS eingesetzt wurde, auch für das erweiterte Profiling als passender Ist. Neben der IMT wurden weitere OS als Ist getestet. Dabei erzeugte die Laminaritriose (LT) ebenfalls ein von den (A)XOS getrenntes Signal, eluierte jedoch zu deutlich späteren Retentionszeiten. Da es insbesondere während des steilen Acetatgradienten, in dessen Verlauf die größeren und höher substituierten AXOS eluieren, zu Verschiebungen der Retentionszeiten kommen kann, wurde LMT als zusätzlicher Bezugspunkt zur Identifizierung der AXOS über RRT mitgeführt. Die HPAEC-Trennung der insgesamt 17 (A)XOS-Standardsubstanzen sowie der beiden Ist IMT und LT sind in Abbildung 31 dargestellt. Der dazugehörige Gradient sowie alle weiteren chromatographischen Bedingungen der HPAEC können in der Arbeitsvorschrift 8.9 nachgelesen werden.

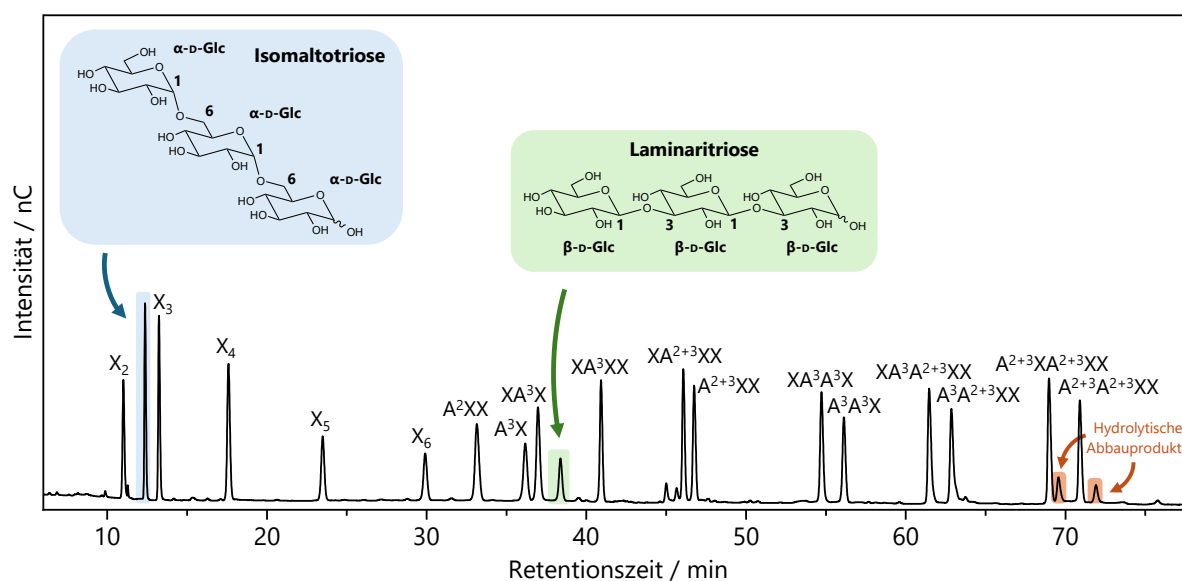


Abbildung 31: Chromatogramm der Trennung der kommerziell erhältlichen Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS) sowie der isolierten AXOS und internen Standardsubstanzen (Ist) mit Hilfe des entwickelten Gradienten der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie. Die Strukturen der Ist Isomaltotriose (blau markiert) und Laminaritriose (grün markiert) sind ebenfalls dargestellt. Hydrolytische Abbauprodukte der AXOS, die aus dem *alkaline peeling* resultieren und bei der Bestimmung der relativen Responsefaktoren mitberücksichtigt wurden, sind rot markiert. Die Nomenklatur der (A)XOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). Glc, Glucose

Mit dem optimierten Gradienten erfolgt eine vollständige Basislinientrennung der 17 (A)XOS sowie der beiden Ist. Während die XOS in aufsteigender Reihenfolge nach ihrem DP vor den AXOS eluieren, hängt das Retentionsverhalten der AXOS sowohl von der Länge des Xyloserückgrats als auch von der Anzahl und Position der AraF-Substituenten ab. Außerdem ist auffällig, dass strukturell ähnliche AXOS, beispielsweise $XA^{2+3}XX$ und $A^{2+3}XX$ oder XA^3A^3X und

4.2 Entwicklung und Anwendung einer HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode

A^3A^3X , jeweils „paarweise“ in engen zeitlichen Abständen eluieren. Mit Ausnahme von A^3X und XA^3X eluieren jedoch die AXOS zuerst, die die größere Anzahl an Xylp-Einheiten im Rückgrat enthalten. Des Weiteren ist bei größeren AXOS mit einem $DP > 6$ nach etwa 60 min eine zunehmende Verbreiterung der Peakform bis hin zur Ausbildung von Doppelpeaks (etwa im Verhältnis 80 : 20) zu beobachten. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass es sich hierbei vermutlich um hydrolytische Abbauprodukte handelt, die im Zuge der chromatographischen Trennung entstanden sind. Demnach dominiert beispielsweise im Massenspektrum des $A^{2+3}XA^{2+3}XX$ das entsprechende m/z des zweifachen Lithiumaddukts ($[M+2\cdot Li]^{2+}$) von 611, während in geringerer Intensität das um eine Pentoseeinheit kleinere Lithiumaddukt mit einem m/z von 544 zu sehen ist. In Kapitel 3.2.2 wurde bereits auf das *alkaline peeling* eingegangen, bei dem es zu einem Abbau der AX unter alkalischen Bedingungen kommt. Ausgehend vom reduzierenden Ende der AX wird das Xyloserückgrat unter Abspaltung einer monomeren Xylp-Einheit sukzessive abgebaut (Henriksson *et al.*, 2024). Da insbesondere die spät eluierenden AXOS über einen längeren Zeitraum den stark alkalischen Bedingungen der HPAEC ausgesetzt sind, erscheint ein *alkaline peeling* als mögliche Ursache plausibel, wodurch das Retentionsverhalten der betreffenden AXOS beeinflusst wird. Bei der Bestimmung der RRF dieser AXOS-Standardsubstanzen wurde jedoch der Anteil des hydrolytischen Abbauprodukts bei der Integration der Signale stets mitberücksichtigt.

4.2.1 Bestimmung relativer Responsefaktoren und Validierung

Zur Bestimmung von RRF der verschiedenen (A)XOS-Standardsubstanzen wurden zunächst Stammlösungen mit definierter Konzentration benötigt. Aufgrund des hygroskopischen Charakters der (A)XOS wurde auf eine gravimetrische Mengenbestimmung verzichtet und stattdessen die Konzentration mittels 1H -NMR-Spektroskopie unter Einsatz von Acetanilid als Ist ermittelt (vgl. Kapitel 3.5.2). Die Quantifizierung der Analyten erfolgte relativ zum CH_3 -Signal des Acetanilids ($\delta_H = 2,17$ ppm) durch Integration ausgewählter 1H -Resonanzsignale der (A)XOS, die möglichst separiert vorlagen und einer definierten Anzahl an Protonen zugeordnet werden konnten. Mit Ausnahme von X_2 , bei dem das anomere Protonensignal der tXylp-Einheit ($\delta_H = 4,45$ ppm) zur Quantifizierung herangezogen wurde, traten bei allen XOS ($X_3 - X_6$) ausschließlich die anomeren Protonensignale der reduzierenden Xylp-Einheit isoliert auf. Dementsprechend wurde für deren Konzentrationsbestimmung die Summe der Integrale aus dem Signal des α -Anomers ($\delta_H = 5,18$ ppm) und des β -Anomers ($\delta_H = 4,58$ ppm) verwendet. Zur Quantifizierung der AXOS eigneten sich die anomeren Protonensignale der Araf-Einheiten im chemischen Verschiebungsbereich von $\delta_H = 5,20 - 5,40$ ppm. In Fällen, in denen die Arabinosesignale nicht vollständig voneinander getrennt vorlagen, wurden überlagerte Resonanzen gemeinsam integriert und die zugrunde liegende Protonenanzahl bei der Berechnung berücksichtigt. Auf diese Weise konnten alle isolierten AXOS-Standardsubstanzen zuverlässig quantifiziert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Aus den mittels ^1H -NMR bestimmten Standardlösungen der (A)XOS wurden anschließend Stammlösungen mit definierter Konzentration (1 mM) hergestellt. Die Bestimmung der RRF erfolgte anhand einer Kalibrierreihe der jeweiligen (A)XOS in sechs aufsteigenden, äquidistanten Konzentrationsschritten (0,1; 6; 12; 18; 24 und 30 μM) sowie einer festen Konzentration (10 μM) der Ist IMT und LT. Aufgrund der zu erwartenden geringen Freisetzungsmengen im Zuge der enzymatischen Hydrolyse wurde der Konzentrationsbereich für die beiden XOS X_5 und X_6 entsprechend angepasst (0,1; 3; 6; 9; 12 und 15 μM). Jeder Kalibrierpunkt wurde dreifach mittels HPAEC-PAD bestimmt. Das Produkt aus der Peakfläche der IMT mit der Konzentration des entsprechenden XOS bzw. AXOS (x) wurde gegen das Produkt aus der Peakfläche der XOS bzw. AXOS mit der Konzentration der IMT (y) aufgetragen. Die Steigung daraus resultierenden Regressionsgeraden entspricht dem RRF der (A)XOS. Die Regressionsgeraden wiesen eine Pearson-Korrelation zwischen 0,99800 und 0,99999 auf, was auf eine gute Linearität des Analyseverfahrens schließen lässt (s. Tabelle A29). Des Weiteren wurden Verfahrensvariationskoeffizienten von unter 10 % ermittelt, die wiederum eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen innerhalb des eingesetzten Konzentrationsbereichs der (A)XOS widerspiegeln (s. Tabelle A29). In Tabelle 5 sind die ermittelten RRF sowie weitere Validierungsparameter der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode zusammengefasst. Die Konzentration der (A)XOS in einer wässrigen Lösung kann unter Verwendung folgender Gleichung berechnet werden (9):

$$c_{(A)XOS} = \text{RRF} \cdot c_{\text{IMT}} \cdot \frac{A_{(A)XOS}}{A_{\text{IMT}}} \quad (9)$$

Hierbei stehen $c_{(A)XOS}$ bzw. c_{IMT} für die Konzentrationen und $A_{(A)XOS}$ bzw. A_{IMT} für die Peakflächen der (A)XOS und der IMT. Bei der Verwendung der RRF muss darauf geachtet werden, dass diese nur in den dafür angegebenen linearen Konzentrationsbereichen gelten. Bei höheren Konzentrationen der (A)XOS in den Proben müssen diese daher entsprechend verdünnt werden. Die Anwendung der ermittelten RRF erübrigt in Zukunft die Notwendigkeit von Standardsubstanzen sowie die Aufnahme einer Kalibrierung, die mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden ist. Bei identischen chromatographischen Bedingungen sollten die RRF zudem auf andere HPAEC-Systeme übertragbar sein. Durch die Bildung des Quotienten aus der RT der (A)XOS sowie der RT der Ist wurden zudem RRT bestimmt, die primär zur Identifizierung der (A)XOS eingesetzt worden sind (s. Tabelle 5). Dabei wurde jene (A)XOS, die vor der LT eluieren in Relation zur IMT gesetzt, während die LT als Referenz für die restlichen, später eluierenden AXOS verwendet wurde. Die RRT der (A)XOS sollten stabil gegen einen Fließmittelwechsel oder eine zeitliche Änderung des Fließmittelzustands sein. Durch eine optionale, simultane MS-Detektion können nach Anpassung des zeitlichen Versatzes zwischen dem PAD und der MS zusätzlich die Molekülmassen der eluierenden Substanzen analysiert werden. Die dabei detektierten m/z der Lithiumaddukte der (A)XOS (s. Tabelle 5) liefern ein zusätzliches Identitätskriterium, insbesondere wenn neben den Zielanalyten weitere unbekannte Verbindungen in der Probe vorhanden sind.

4.2 Entwicklung und Anwendung einer HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode

Tabelle 5: Auflistung der von der entwickelten Profilingmethode umfassten Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS) mit ihren relativen Retentionszeiten (RRT) in Bezug auf Isomaltotriose (IMT) und Laminaritriose (LT), ihren relativen Responsefaktoren (RRF), ihren Masse-zu-Ladungsverhältnissen (m/z), ihren bevorzugt gebildeten Lithiumaddukten, ihren Molekülmassen, den Konzentrationsbereichen sowie den Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ). Die Nomenklatur der (A)XOS erfolgt nach den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

(A)XOS	RRT	RRF	m/z	Quasi-molekülion	Molekülmassen / g/mol	Konzentrationsbereich / μM	LOD / μM	LOQ / μM
X₂	0,889 ^{IMT}	1,571	289	[M+Li] ⁺	282	0,1 - 30	0,01	0,05
X₃	1,069 ^{IMT}	1,122	421	[M+Li] ⁺	414	0,1 - 30	0,01	0,05
X₄	1,421 ^{IMT}	1,056	553	[M+Li] ⁺	547	0,1 - 30	0,025	0,075
X₅	1,898 ^{IMT}	1,041	685	[M+Li] ⁺	679	0,1 - 15	0,025	0,075
X₆	2,418 ^{IMT}	1,221	412	[M+2·Li] ²⁺	811	0,1 - 15	0,025	0,05
A²XX	2,677 ^{IMT}	1,220	553	[M+Li] ⁺	547	0,1 - 30	0,025	0,05
A³X	2,922 ^{IMT}	1,691	421	[M+Li] ⁺	414	0,1 - 30	0,025	0,075
XA³X	2,986 ^{IMT}	1,135	553	[M+Li] ⁺	547	0,1 - 30	0,01	0,025
XA³XX	1,066 ^{LT}	1,242	685	[M+Li] ⁺	679	0,1 - 30	0,01	0,05
XA²⁺³XX	1,199 ^{LT}	1,237	412	[M+2·Li] ²⁺	811	0,1 - 30	0,01	0,05
A²⁺³XX	1,217 ^{LT}	1,281	685	[M+Li] ⁺	679	0,1 - 30	0,025	0,05
XA³A³X	1,425 ^{LT}	1,168	412	[M+2·Li] ²⁺	811	0,1 - 30	0,01	0,05
A³A³X	1,461 ^{LT}	1,478	685	[M+Li] ⁺	679	0,1 - 30	0,05	0,1
XA³A²⁺³XX	1,600 ^{LT}	1,005	544	[M+2·Li] ²⁺	1074	0,1 - 30	0,01	0,05
A³A²⁺³XX	1,637 ^{LT}	1,085	478	[M+2·Li] ²⁺	942	0,1 - 30	0,025	0,05
A²⁺³XA²⁺³XX	1,796 ^{LT}	0,845	611	[M+2·Li] ²⁺	1206	0,1 - 30	0,025	0,05
A²⁺³A²⁺³XX	1,846 ^{LT}	1,058	544	[M+2·Li] ²⁺	1074	0,1 - 30	0,025	0,05

Als weiterer Validierungsparameter wurden Nachweisgrenzen (LOD, engl. *Limit of Detection*) und Bestimmungsgrenzen (LOQ, engl. *Limit of Quantification*) für die Bestimmung der (A)XOS ermittelt. Die Stammlösungen wurden hierzu schrittweise verdünnt, bis die Signalhöhen dem Dreifachen bzw. dem Zehnfachen des Rauschens entsprachen. Die Betrachtung der für die jeweiligen (A)XOS bestimmten LOD- und LOQ-Werte unterstreicht erneut die hohe Empfindlichkeit der HPAEC-PAD. Mit Hilfe der entwickelten Profilingmethode lassen sich die (A)XOS bis in einen Konzentrationsbereich von etwa 10 bis 50 nM zuverlässig erfassen. Zudem zeigen die ermittelten LOD und LOQ eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten für die kommerziell erhältlichen (A)XOS (Joyce *et al.*, 2023).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.2.2 Trennung auf einem alternativen Säulenmaterial

Neben der CarboPac-200-Säule (ThermoFisher Scientific) wurde zur chromatographischen Trennung der (A)XOS-Standardsubstanzen zusätzlich eine SweetSep-AEX200-Säule des Herstellers Antec Scientific getestet. Diese Säule fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls Anwendung bei der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der PS in den untersuchten Getreide-BS (s. Kapitel 3.3.1 und Arbeitsvorschrift 8.3.1). Den Herstellerangaben zufolge ist die Säule sowohl für die Trennung von Monosacchariden als auch von OS bis hin zu PS geeignet. Da die Säule als Alternative zur CarboPac-200 eingesetzt werden soll, wurde mit gleichen Fließmittelzusammensetzungen gearbeitet. Der zuvor entwickelte Gradient war insbesondere zur Elution der höher substituierten AXOS zu schwach. Aus diesem Grund wurden höhere Anteile an Natronlauge sowie ein steilerer Acetat-Gradient eingesetzt. Schließlich konnte mit Hilfe der SweetSep-AEX-200-Säule eine vollständige Trennung der (A)XOS und der Ist IMT und LT in zur CarboPac-200 vergleichbaren Analysezeiten erreicht werden (s. Abbildung 32). Ausnahmen bildeten lediglich A^3X und XA^3X sowie $XA^{2+3}XX$ und $A^{2+3}XX$ für die keine vollständige Basislinientrennung erzielt werden konnte. Das angepasste Gradientenprogramm ist in der Arbeitsvorschrift 8.9 (s. Tabelle V20) beschrieben. Die Elutionsreihenfolge der (A)XOS entspricht derjenigen auf der CarboPAC-200. Weiterhin wurde überprüft, ob die ermittelten RRF (s. Kapitel 4.2.1) auch zur Bestimmung der (A)XOS auf der SweetSep-AEX200 eingesetzt werden können. Hierzu wurden Mischungen der (A)XOS in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert, die den zur Bestimmung der RRF eingesetzten Konzentrationen entsprachen (s. Kapitel 4.2.1). Mit wenigen Ausnahmen lag die Abweichung zwischen theoretischer und experimentell ermittelter Konzentration der (A)XOS innerhalb von $\pm 10\%$. Dementsprechend sind die RRF auch zur Quantifizierung der (A)XOS auf der SweetSep-AEX200 geeignet. Alle weiteren Kenndaten wie RRT sowie die LOD und LOQ zur Bestimmung der (A)XOS sind im Anhang (s. Tabelle A30) aufgelistet.

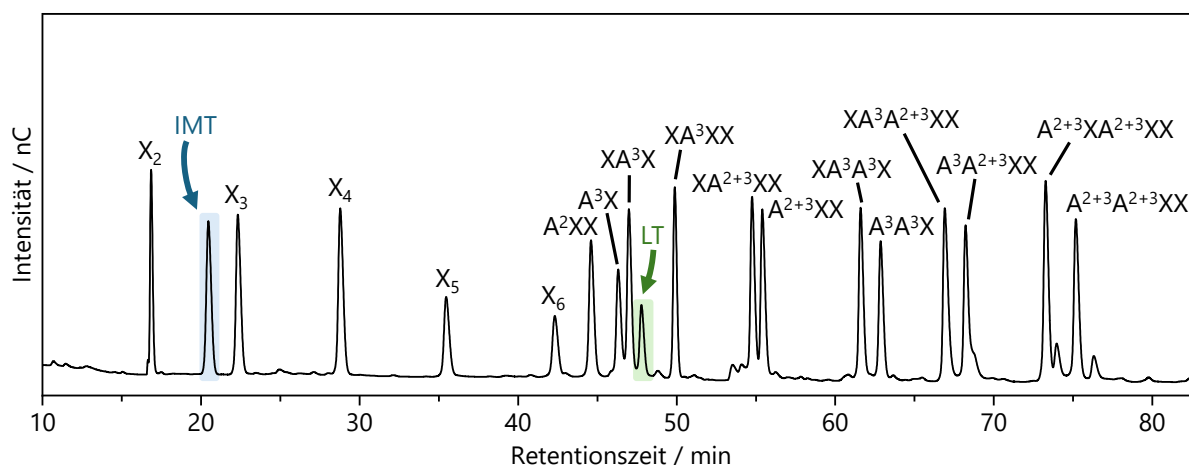


Abbildung 32: Chromatogramm der Trennung der kommerziell erhältlichen Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS) sowie der isolierten AXOS und internen Standardsubstanzen auf einer SweetSep-200-Säule der Firma Antec Scientific mit Hilfe des angepassten Gradientenprogramms der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie. Die Isomaltotriose (IMT) ist blau und die Laminaritriose (LT) grün markiert. Die Nomenklatur der (A)XOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

4.2.3 Anwendung der Methode zur Untersuchung der Arabinoxylanfeinstruktur auf verschiedene Getreideballaststoffe

Die entwickelte Profilingmethode wurde zur Untersuchung der Arabinosesubstitution der AX in den UBS und LBS verschiedener Getreidearten (vgl. Kapitel 3.1) eingesetzt. Durch den Einsatz der ermittelten RRF (s. Kapitel 4.2.1) lassen sich die molaren Konzentrationen bzw. die relative Zusammensetzung der durch enzymatische Hydrolyse der BS mit XYL₁₀ und XYL₁₁ freigesetzten (A)XOS bestimmen. Die Auswahl der Inkubationsbedingungen für die enzymatische Hydrolyse der UBS und LBS mit XYL₁₀ und XYL₁₁ orientierte sich an den für die präparative Isolierung der AXOS-Standardsubstanzen aus Weizen-AX gewählten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.4.1). Demnach wurde sowohl für die Inkubation der UBS als auch der LBS eine Enzymmenge von 0,56 U XYL₁₀/mg BS bzw. 2,00 U XYL₁₁/mg BS bei einer Temperatur von 75 °C (XYL₁₀) bzw. 50 °C (XYL₁₁) eingesetzt. Des Weiteren wurde anhand des enzymatischen Verdaus von UBS und LBS aus Roggen untersucht, ob durch eine Veränderung der Inkubationsdauer größere Mengen an (A)XOS freigesetzt werden können. Hierbei erwies sich eine 24-stündige Inkubation als am besten geeignet. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde Ethanol bis zu einer Volumenkonzentration von 80 % (v/v) hinzugegeben. Obwohl bereits bei einer Ethanolkonzentration von 50 % (v/v) keine Enzymaktivität mehr nachweisbar ist, wurden zur gleichzeitigen Präzipitation der höhermolekularen, wasserlöslichen Komponenten größere Ethanolmengen eingesetzt. Dies diente insbesondere dem Schutz des HPAEC-Systems vor möglichen Verunreinigungen. Sowohl die Gesamtmenge als auch die relativen Anteile der durch die Profilingmethode erfassten (A)XOS mit einem DP < 9 in der niedermolekularen, löslichen Fraktion des Hydrolysats blieben dadurch unbeeinflusst. Der eingedampfte Überstand konnte im Anschluss direkt nach Zugabe der Ist IMT und LT vermessen werden (s. Arbeitsvorschrift 8.9). Die molaren Anteile der freigesetzten und erfassten XOS und AXOS nach enzymatischer Hydrolyse der UBS und LBS untersuchter Getreideproben mit XYL₁₀ und XYL₁₁ sind in Abbildung 33 dargestellt. Die vollständigen Daten können im Anhang in den Tabellen A31 - A32 nachgelesen werden. Die Analysen wurden jeweils in Doppelbestimmung mit einer zusätzlichen enzymfreien Kontrollprobe durchgeführt. Des Weiteren sind in Abbildung A33 im Anhang beispielhaft die Chromatogramme der enzymatischen Hydrolysate der UBS und LBS aus Roggen und Emmer zu sehen. Aus der Anzahl der vorkommenden Ara- und Xylp-Einheiten in den freigesetzten (A)XOS sowie deren jeweiligen Anteilen im Hydrolysat konnte zudem das A/X nach enzymatischer Hydrolyse berechnet werden (s. Tabelle 6). Zusätzlich wurde das im Zuge der Monosaccharidanalyse nach saurer Hydrolyse bestimmte A/X angegeben (s. Kapitel 3.3.1 und Tabelle A33). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die durch saure Hydrolyse freigesetzten Ara grundsätzlich auch aus anderen Zellwand-PS wie Arabinanen oder Arabinogalactanen (s. Kapitel 1.1.5) stammen können. Um tendenzielle Aussagen über dominierende Bindungspositionen in den verschiedenen Getreiden treffen zu können, sind in Tabelle 6 ergänzend die aus den Ergebnissen der Methylierungsanalyse (vgl. Kapitel 3.3.2) ermittelten Verhältnisse der PMAA der Xylp-Einheiten aufgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

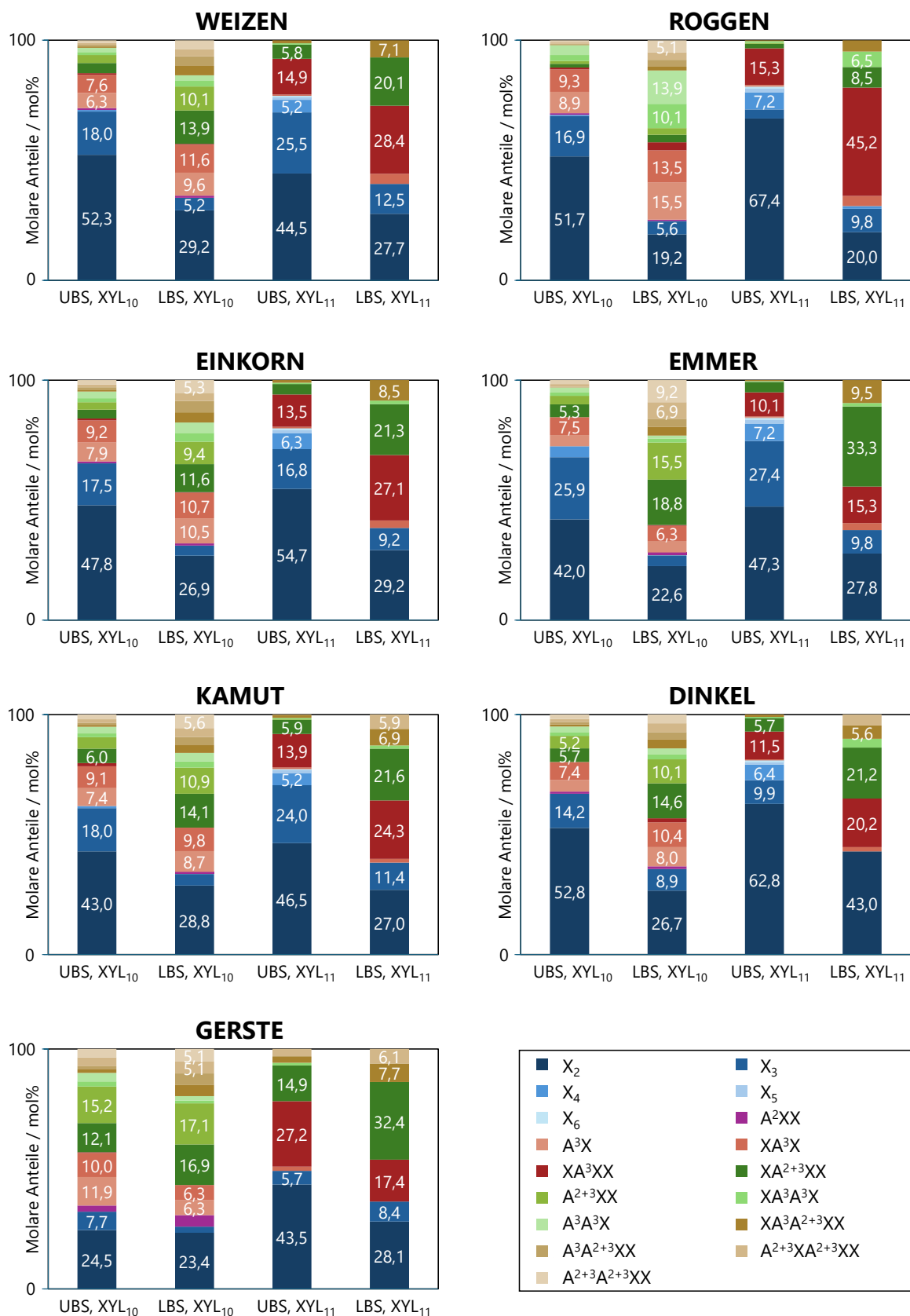


Abbildung 33: Molare Anteile (in mol%, n = 2) der aus unlöslichen und löslichen Ballaststoffen (UBS, LBS) verschiedener Getreide freigesetzten Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS) nach enzymatischer Hydrolyse mit den endo-β-1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁), bestimmt mittels der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Die Nomenklatur der (A)XOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

Tabelle 6: Arabinose-zu-Xylose-Verhältnisse in den unlöslichen und löslichen Ballaststoffen (UBS, LBS) der untersuchten Getreidearten nach saurer Hydrolyse (A/X_s , $n = 3$) und nach enzymatischer Hydrolyse (A/X_E , $n = 2$) mit den *endo*- β -1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁). Zudem sind die mittels Methylierungsanalyse bestimmten prozentualen Anteile der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) der Xylopyranoseeinheiten (Xylp) angegeben. Die Anteile wurden in mol% ($n = 2$) aus den insgesamt bestimmten PMAA der Xylp-Einheiten ermittelt. Aufgrund von Rundungen kann die Summe der Werte leicht von 100 % abweichen. Die vollständigen Daten der Methylierungsanalyse sind in den Tabellen A34 - A35 im Anhang aufgeführt.

		Weizen	Roggen	Einkorn	Emmer	Kamut	Dinkel	Gerste	
UBS	A/X _S	0,60	0,53	0,55	0,54	0,62	0,51	0,70	
	A/X _E	XYL ₁₀	0,19	0,18	0,23	0,18	0,25	0,24	0,44
		XYL ₁₁	0,11	0,09	0,10	0,08	0,11	0,10	0,26
	t-Xylp	3,9	5,7	4,8	4,0	4,5	4,6	4,9	
	1,4-Xylp	68,5	63,6	63,3	66,7	62,4	62,4	50,3	
	1,2,4-Xylp	2,5	2,3	2,8	2,6	3,0	2,7	5,6	
	1,3,4-Xylp	12,8	16,4	13,6	12,6	14,3	14,3	12,0	
	1,2,3,4-Xylp	12,4	12,2	15,5	14,1	15,8	16,0	27,2	
LBS	A/X _S	0,65	0,52	0,79	1,16	0,79	0,91	0,65	
	A/X _E	XYL ₁₀	0,43	0,46	0,47	0,53	0,46	0,42	0,50
		XYL ₁₁	0,28	0,27	0,30	0,34	0,34	0,33	0,37
	t-Xylp	2,5	1,3	3,4	2,6	3,0	2,5	2,1	
	1,4-Xylp	65,7	50,2	59,1	56,0	60,4	67,7	58,7	
	1,2,4-Xylp	1,7	2,0	1,7	2,7	2,2	2,1	3,7	
	1,3,4-Xylp	10,2	31,5	12,5	8,8	11,2	9,8	7,5	
	1,2,3,4-Xylp	19,9	15,0	23,3	29,8	23,2	17,9	28,1	

Bei der Betrachtung der relativen Zusammensetzung der (A)XOS in den XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolysaten der Weizen-BS (s. Abbildung 33) zeigt sich zunächst, dass das Verhältnis der aus UBS und LBS freigesetzten, aufsummierten Anteile an XOS bzw. AXOS zwischen beiden Enzymen vergleichbar ist. Während aus den UBS vermehrt XOS mit einem Gesamtanteil von 71,0 mol% (XYL₁₀) bzw. 76,9 mol% (XYL₁₁) freigesetzt werden, dominieren in den LBS-Hydrolysaten die AXOS mit jeweils 65,6 mol% (XYL₁₀) und 59,8 mol% (XYL₁₁). Demnach weisen die AX der UBS größere Bereiche an uXylp-Einheiten auf, während die AX der LBS stärker mit Araf substituiert sind, was zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit beitragen kann (vgl. Kapitel 1.2.1). Dies spiegelt sich auch in den ermittelten A/X_E -Werten wider (s. Tabelle 6), die bei den UBS mit 0,19 (XYL₁₀) bzw. 0,11 (XYL₁₁) deutlich niedriger ausfallen als bei den LBS mit 0,43 (XYL₁₀) bzw. 0,28 (XYL₁₁). Bei den freigesetzten XOS ist stets X₂ am häufigsten vertreten, gefolgt von X₃. Im XYL₁₁-Hydrolysat der UBS konnte zusätzlich größere Anteile an X₄ mit 5,2 mol%, sowie geringe Mengen an X₅ und X₆ (~ 1,0 mol%) nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die strukturelle Variation der durch XYL₁₀ freigesetzten AXOS größer als bei XYL₁₁. Demnach konnten sowohl im XYL₁₀-Hydrolysat der UBS als auch der LBS alle AXOS einschließlich der strukturell komplexeren Strukturen mit DP > 7 quantitativ erfasst werden. Demzufolge machen beispielsweise die AXOS XA³A²⁺³XX, A³A²⁺³XX sowie A²⁺³XA²⁺³XX und A²⁺³A²⁺³XX in Summe 3,1 mol% in den UBS- und 14,6 mol% in den LBS-Hydrolysaten der XYL₁₀ aus. Von den beschriebenen AXOS konnte lediglich XA³A²⁺³XX in den XYL₁₁-Hydrolysaten mit Anteilen von

4 Ergebnisse und Diskussion

1,2 mol% (UBS) bzw. 7,1 mol% (LBS) bestimmt werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass GH10-Xylanasen mehr Spaltstellen für die Hydrolyse des Xyloserückgrats nutzen können. Demnach sind für eine Spaltung mit XYL_{10} lediglich zwei aufeinanderfolgende uXylp-Einheiten notwendig, während XYL_{11} im Allgemeinen drei uXylp-Einheiten benötigt (Biely *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010). Aus den molaren Anteilen der PMAA der Xylp-Einheiten aus Weizen-UBS (s. Tabelle 6) lässt sich ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der O3-Monosubstitution und der Disubstitution ableiten. In den stärker substituierten AX der Weizen-LBS treten hingegen vermehrt dXylp-Einheiten auf. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse korrespondieren grundsätzlich mit den Strukturmerkmalen der durch XYL_{10} und XYL_{11} aus Weizen freigesetzten AXOS, wenngleich in den enzymatisch abbaubaren Bereichen der AX tendenziell vermehrt O3-monosubstituierte Strukturen vorkommen. Beispielsweise bildet XA^3XX das dominierende AXOS in den XYL_{11} -Hydrolysaten der UBS (14,9 mol%) und LBS (27,1 mol%), während XA^{2+3}XX in kleineren Mengen (5,8 mol% bzw. 20,1 mol%) vorkommt.

Neben dem Weichweizen wurden weitere Vertreter der Gattung *Triticum*, darunter Einkorn, Emmer, Kamut sowie Dinkel, hinsichtlich ihrer AX-Struktur untersucht. Infolge ihrer phylogenetisch engen Verwandtschaft zeigen die Hydrolysate der analysierten Weizenarten (A)XOS-Profile, die größtenteils mit denen des Weizens übereinstimmen. Lediglich die LBS aus Emmer stellen eine Ausnahme dar. Wie bereits beim Weizen beobachtet werden konnte, sind in den UBS-Proben vermehrt XOS vorzufinden. Dies zeigt sich insbesondere am Beispiel der XYL_{11} -Hydrolysate des Emmers und Dinkels, bei denen der Gesamtanteil an XOS über 80 mol% beträgt (s. Abbildung 33). Im Gegensatz dazu dominieren in den LBS die AXOS-Anteile. Den Methylierungsdaten zufolge (s. Tabelle 6) treten in den AX der LBS vermehrt dXylp-Einheiten auf. Insbesondere in den LBS aus Emmer konnten molare Anteile an 1,2,3,4-Xylp von 29,8 mol% nachgewiesen werden. Der hohe Grad an Disubstitution spiegelt sich auch in den aus Emmer freigesetzten AXOS wider. Demnach wurden aus den AX der LBS vermehrt AXOS freigesetzt, die ausschließlich dXylp-Einheiten enthalten. Beispielsweise bildet XA^{2+3}XX das dominierende AXOS mit molaren Anteilen von 33,3 mol% im XYL_{11} -Hydrolysat. Dagegen kommen im XYL_{10} -Hydrolysat auch größere Mengen der AXOS, die zwei dXylp-Einheiten enthalten, vor (insgesamt 16,1 mol%). Durch Vergleich der A/X nach enzymatischer und saurer Hydrolyse der verschiedenen Weizenarten (s. Tabelle 6) zeigt sich jedoch, dass insbesondere in den LBS höher substituierte Bereiche vorkommen, die durch die Enzyme nicht hydrolysiert werden können. So beträgt beispielsweise das durch die Monosaccharidanalyse bestimmte A/X der LBS aus Dinkel 0,92, während das aus den AXOS-Anteilen ermittelte A/X bei 0,42 bzw. 0,33 liegt. Mithilfe der Profilingmethode konnten dennoch wichtige Erkenntnisse zur Feinstruktur der AX dieser Weizensorten gewonnen werden, die in der Literatur bislang nur unzureichend beschrieben sind.

Zuletzt wurde die Profilingmethode auch zur Analyse von Getreidearten aus anderen Gattungen wie Roggen (*Secale cereale*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) eingesetzt. Aus den

4.2 Entwicklung und Anwendung einer HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode

Methylierungsdaten (s. Tabelle 6) geht hervor, dass die AX-Struktur der Roggen-BS, insbesondere in den LBS, maßgeblich durch O3-Monosubstitution bestimmt wird. Gleiches zeigt sich auch in den von XYL₁₀ und XYL₁₁ freigesetzten AXOS-Strukturen. XA³XX ist das dominierende AXOS in den XYL₁₁-Hydrolysaten mit molaren Anteilen von 15,3 mol% in den UBS bzw. von 45,2 mol% in den LBS. Die dazu korrespondierenden AXOS A³X und XA³X sind nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ ebenfalls zu größeren Anteilen von 8,9 und 9,3 mol% in den UBS sowie von 15,5 und 13,5 mol% in den LBS vertreten. In den von beiden Enzymen erzeugten LBS-Hydrolysaten wurden zudem vermehrt AXOS-Strukturen mit aufeinanderfolgenden O3-monosubstituierten Xylp-Einheiten nachgewiesen. Während XYL₁₀ sowohl XA³A³X als auch A³A³X mit einem molaren Gesamtanteil von 24,0 mol % freisetzt, wurde im XYL₁₁-Hydrolysat ausschließlich XA³A³X (6,5 mol %) identifiziert. Für die Gerste zeichnet sich dagegen eine zu Weizen und Roggen deutlich unterschiedliche AX-Struktur ab. Zunächst ist auffällig, dass der aus den UBS der Gerste freigesetzte Gesamtanteil an AXOS sowohl bei XYL₁₀ (67,8 mol%) als auch bei XYL₁₁ (50,8 mol%) denjenigen der XOS übersteigt. Demnach fallen die Bereiche an uXylp-Einheiten in den AX der UBS vergleichsweise klein aus. Die ermittelten PMAA-Verhältnisse (s. Tabelle 6), wonach etwa die Hälfte der Xylp in den UBS substituiert vorliegt, bestätigen diese Annahme. Neben einer dominierenden Disubstitution weisen die AX aus Gerste auch höhere Anteile O2-monosubstituierten Xylp-Einheiten von 5,6 mol% bzw. 3,7 mol% auf. Demnach konnten in den XYL₁₀-Hydrolysaten der UBS und LBS kleinere Mengen an A²XX von 2,6 mol% bzw. 4,7 mol% nachgewiesen werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die O2-monosubstituierten Xylp-Einheiten überwiegend in den enzymresistenten Bereichen von Gersten-AX vorkommen und demnach für eine Hydrolyse mit XYL₁₀ bzw. XYL₁₁ möglicherweise unzugänglich sein könnten (Viëtor *et al.*, 1994). Mit Ausnahme des XYL₁₁-Hydrolysats der UBS, in dem XA³XX den größten Anteil (27,2 mol %) ausmacht, wurden unter den freigesetzten AXOS verstärkt Strukturen mit dXylp-Einheiten nachgewiesen. Die aus den Anteilen der mittels XYL₁₀ freigesetzten (A)XOS berechneten A/X-Werte von 0,44 (UBS) bzw. 0,50 (LBS) unterscheiden sich nur geringfügig von den Werten der Monosaccharidanalyse (0,70 für UBS bzw. 0,65 für LBS). Dies deutet darauf hin, dass die für XYL₁₀ unzugänglichen Abschnitte des Gersten-AX nur geringfügig stärker substituiert vorliegen. Vermutlich treten in den für Xylanasen unzugänglichen Bereichen sowohl uXylp-Einheiten als auch substituierte Xylp-Einheiten auf, jedoch liegen die Araf-Substituenten derart verteilt vor, dass keine Spaltstellen für Xylanasen zur Verfügung stehen. Dies steht im Einklang mit postulierten Strukturmodellen zu AX aus Gerste (Viëtor *et al.*, 1994).

Durch die Untersuchung von Getreide aus verschiedenen Gattungen bzw. verschiedener Arten konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Profilingmethode zur Analyse der Substitutionsmuster mit Araf in enzymatisch zugänglichen Bereiche der AX geeignet ist. Dabei konnte die Profilingmethode sowohl zur strukturellen Charakterisierung der AX aus UBS als auch aus LBS erfolgreich angewendet werden. Zudem beträgt die aus der Doppelstimmung resultierende relative Spannweite („Range/2“) der bestimmten Anteile der (A)XOS nur in

4 Ergebnisse und Diskussion

einzelnen Fällen über 10 %, wonach die Präzision der Profilingmethode als ausreichend bewertet wird. Aufgrund grundlegender methodischer Unterschiede ist ein direkter Vergleich zwischen der Methylierungsanalyse, die ausschließlich relative Anteile von Bindungspositionen erfasst, jedoch keine Aussagen zur Verteilung der Substituenten erlaubt, und dem im Zuge der Profilingmethode gewählten enzymatischen Ansatz nur eingeschränkt möglich. Dennoch korreliert die relative Zusammensetzung der freigesetzten (A)XOS mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse, wodurch die Aussagekraft der Profilingmethode zusätzlich gestützt wird. Bei der Interpretation der Analysenergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die Profilingmethode ausschließlich AX-Strukturen abbildet, die durch Xylanasen der GH-Familien 10 und 11 hydrolysiert werden. Stärker mit Araf-Einheiten substituierte Abschnitte des AX bleiben folglich unberücksichtigt. Neben der Arabinosesubstitution hat auch das Vorkommen von Acetylgruppen (vgl. Kapitel 1.3) oder FS-Crosslinks (vgl. Kapitel 1.2.3) Einfluss auf die Zugänglichkeit der AX-Struktur für Xylanasen. Dies äußerte sich auch in den freigesetzten Gesamtmengen an (A)XOS aus den unterschiedlichen Getreide-BS, wonach teilweise Konzentrationsunterschiede von bis zu zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden konnten. Sowohl XYL_{10} als auch XYL_{11} setzen auch FAXOS aus Getreide-BS frei (vgl. Kapitel 4.3.4). Aufgrund der stark alkalischen Bedingungen der HPAEC werden sowohl estergebundene FS als auch Acetylgruppen abgespalten, weshalb diese Strukturen nur indirekt miterfasst werden. Beispielsweise werden die nach enzymatischer Hydrolyse mit Xylanasen dominierenden FAXOS-Strukturen $A^{5f3}X$ und $XA^{5f3}X$, die auch im Rahmen dieser Arbeit als Standardsubstanzen isoliert werden konnten (vgl. Kapitel 4.1.2), entsprechend als A^3X und XA^3X bestimmt. Insbesondere in den Hydrolysaten der LBS konnten zudem weitere pentosebasierte OS nachgewiesen werden, die vermutlich zusätzliche, von der Profilingmethode nicht erfasste AXOS-Strukturen darstellen. Auch größere Fragmente mit einem DP > 9, die innerhalb eines chromatographischen Laufs nicht detektiert werden, könnten im Hydrolysat enthalten sein.

Trotz der beschriebenen Limitierungen der Methode lässt sich festhalten, dass der entwickelte Profilingansatz basierend auf der HPAEC-PAD mit simultaner MS-Detektion ein empfindliches und schnelles, wenngleich semiquantitatives Analyseverfahren darstellt. Die Bestimmung der molaren Verhältnisse der durch spezifische *endo*- β -1,4-Xylanasen freigesetzten (A)XOS erlaubt differenzierte Aussagen zur Anzahl, Position und Verteilung der Araf-Substituenten in AX unterschiedlichen pflanzlichen Ursprungs. Damit ist die Profilingmethode nicht nur als Ergänzung zu etablierten Verfahren wie der Monosaccharidanalyse oder Methylierungsanalyse anzusehen, sondern bietet darüber hinaus tiefere Einblicke in die Feinstruktur der AX.

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

Im Zuge der NMR-spektroskopischen Strukturaufklärung der isolierten Standardsubstanzen wurde beobachtet, dass die chemischen Verschiebungen der Protonen und Kohlenstoffe der AXOS (vgl. Kapitel 4.1.2) sowohl von der Art als auch von den Bindungspositionen der jeweiligen Monomereinheiten abhängig sind. Dabei erzeugen strukturell unterschiedliche AXOS, die jedoch das gleiche Strukturelement enthalten, vergleichbare ^1H , ^{13}C -Kreuzsignale im HSQC-Spektrum. Die chemischen Verschiebungen dieser Signale sind größtenteils unabhängig von der jeweiligen Kettenlänge der AXOS sowie von den benachbarten Monomereinheiten. Aus diesem Grund ist es möglich, spezifische Markersignale in den HSQC-Spektren von (A)XOS als auch von FAXOS zu identifizieren, die ausschließlich ein bestimmtes Strukturelement repräsentieren. Durch Volumenintegration der charakteristischen Korrelationssignale können semiquantitative Aussagen über das relative Vorkommen bestimmter Strukturelemente des AX getroffen werden (vgl. Kapitel 3.5.2). In Anlehnung an das von Wefers und Bunzel (2016b) entwickelte HSQC-basierte Profiling verschiedener Strukturelemente von Arabinanen und Galactanen wurde ein dazu entsprechendes Verfahren für AX entwickelt. Analog zur entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode (s. Kapitel 4.2.3) wurden *endo*- β -1,4-Xylanasen eingesetzt, um AXOS und FAXOS aus Getreide-BS freizusetzen, die anschließend mittels HSQC-NMR analysiert werden können. Im Gegensatz zum chromatographischen Ansatz werden dadurch sämtliche im Hydrolysat enthaltenen OS erfasst.

4.3.1 Markersignale von Xylo- und Arabinoxyloligosacchariden

Zur Identifizierung spezifischer Markersignale der verschiedenen Strukturelemente des AX wurden die HSQC-Spektren sowohl der kommerziell erhältlichen als auch der isolierten (A)XOS-Standardsubstanzen (s. Abbildung A3 - A19) übereinander gelegt. Damit konnte festgestellt werden, ob ein Korrelationssignal ausschließlich durch ein bestimmtes Strukturelement der (A)XOS hervorgerufen wurde. In Abbildung 34 sind die für die HSQC-Profilingmethode ausgewählten Markersignale der beschriebenen Strukturelemente der XOS und AXOS mit ihren zugehörigen ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen dargestellt.

Da die reduzierenden Xylp-Einheiten der (A)XOS stets unsubstituiert vorliegen und nicht durch die übrigen Monomereinheiten beeinflusst werden, sind deren Kreuzsignale bei allen (A)XOS-Standardsubstanzen nahezu identisch. Als Markersignale (Signal 1) eignen sich die anomeren C1H1-Signale der reduzierenden Xylp in α -Konfiguration ($\delta_{\text{H/C}} = 5,18/92,75$ ppm) und β -Konfiguration ($\delta_{\text{H/C}} = 4,58/97,26$ ppm), da diese isoliert von den restlichen Signale im Spektrum vorliegen. Die Verhältnisse zwischen dem α - und β -Anomer nach Gleichgewichtseinstellung in wässriger Lösung ($\sim 1:2$) sind vergleichbar zwischen den verschiedenen (A)XOS (s. Kapitel 4.1.3). Dennoch existieren minimale Unterschiede, weshalb im

4 Ergebnisse und Diskussion

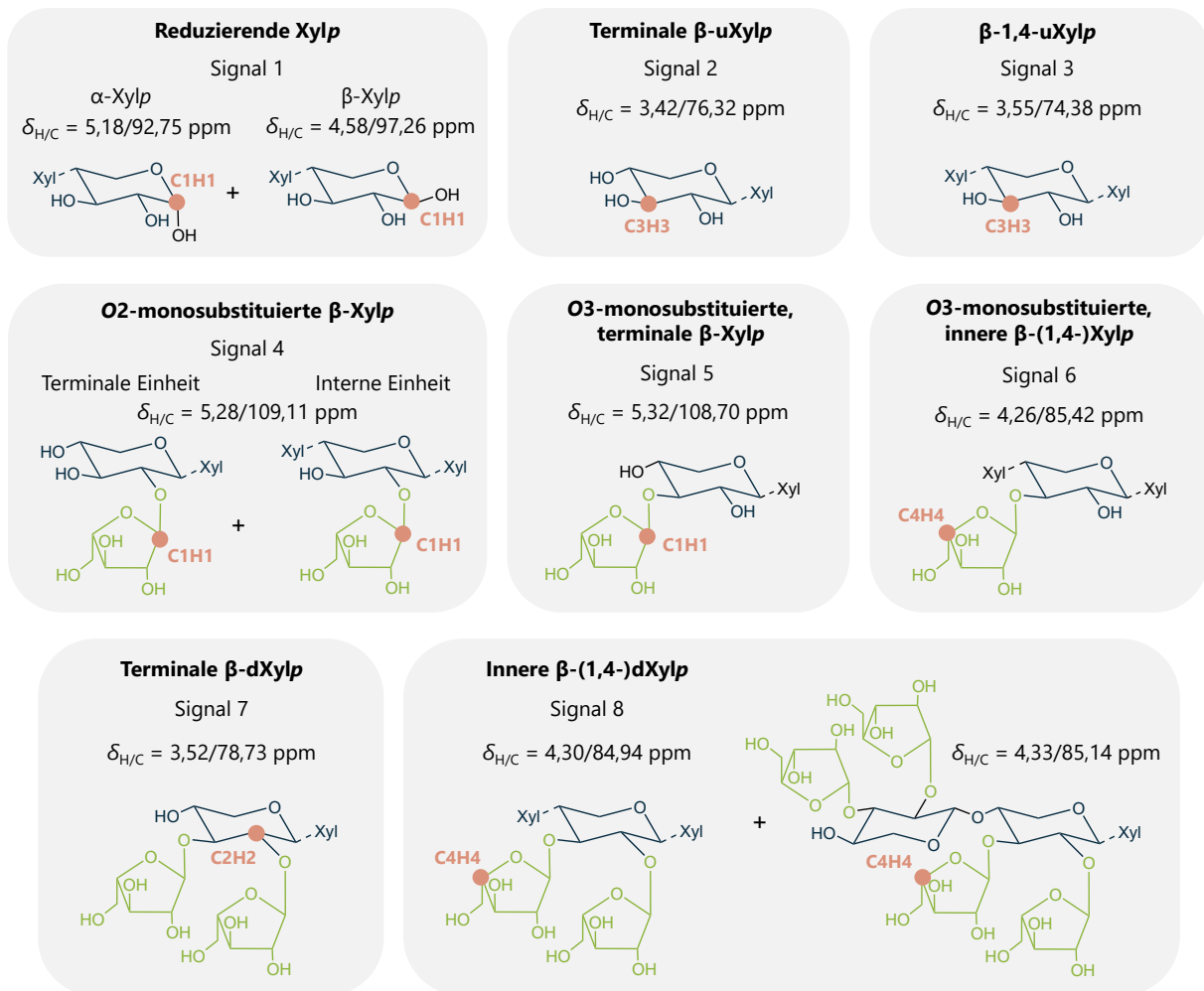


Abbildung 34: HSQC-Markersignale verschiedener Strukturelemente der (Arabino-)Xylooligosaccharide mit ihren ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen. Xylopyranosen (Xylp) sind in schwarz und Arabinofuranosen in grün dargestellt. d, disubstituiert; u, unsubstituiert; Xyl, Xylose

einem enzymatischen Hydrolysat nur das durchschnittliche Verhältnis aller vorliegenden (A)XOS angegeben werden kann. Zur korrekten Bestimmung der reduzierenden Xylp-Einheiten wurde daher die Summe der Volumenintegrale der α - und β -Signale ermittelt. Damit werden die reduzierenden Enden aller beschriebenen (A)XOS erfasst. Für terminale uXylp-Einheiten konnten ebenfalls separierte Korrelationssignale identifiziert werden. Demzufolge zeigen sowohl das C3H3- ($\delta_{H/C} = 3,42/76,32$ ppm) als auch das C4H4-Kreuzsignal ($\delta_{H/C} = 3,61/69,87$ ppm) keine Überlappung mit anderen Signalen der (A)XOS. Somit sind grundsätzlich beide Signale zur Bestimmung terminaler uXylp-Einheiten geeignet. Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Überlappung mit möglicherweise im Hydrolysat vorhandener monomerer Xylp vorliegt. Dabei erwies sich das C3H3-Kreuzsignal als besser geeignet, da es im Gegensatz zum C4H4-Kreuzsignal eine deutlich klarere Abtrennung vom Signal der monomeren Xylp aufweist. Aus diesem Grund wurde das C3H3-Signal als Markersignal (Signal 2) für terminale uXylp-Einheiten ausgewählt. Die Identifizierung eines geeigneten Korrelationssignals zur Bestimmung der β -1,4-glykosidisch gebundenen uXylp-Einheiten im Xyloserückgrat von (A)XOS erwies sich aufgrund der Nähe bzw. teilweisen Überlappung mit den Signalen der

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

reduzierenden β -Xylp-Einheit bzw. terminalen uXylp-Einheit als schwierig. Bei der Auswahl eines geeigneten Kreuzsignals wurde die Bedeutung der HSQC-Parameter, insbesondere der für die Signalauflösung entscheidenden Datenpunktanzahl, deutlich (vgl. Kapitel 4.3.3). Durch die Aufnahme von 1024 Inkrementen in der ^{13}C -Dimension sowie die Anwendung von *linear prediction* und *window functions* (quadratische Sinusfunktion) im Zuge der Datenprozessierung (vgl. Kapitel 3.5.4) erscheinen die C3H3-Signale der inneren, 1,4-gebundenen uXylp-Einheiten und der reduzierenden β -Xylp-Einheiten annähernd aufgelöst (s. Abbildung 35). Infolgedessen kann das C3H3-Signal ($\delta_{\text{H/C}} = 3,55/85,42 \text{ ppm}$) mit den genannten Parameter als Markersignal (Signal 3) für 1,4-glykosidisch gebundene uXylp herangezogen werden.

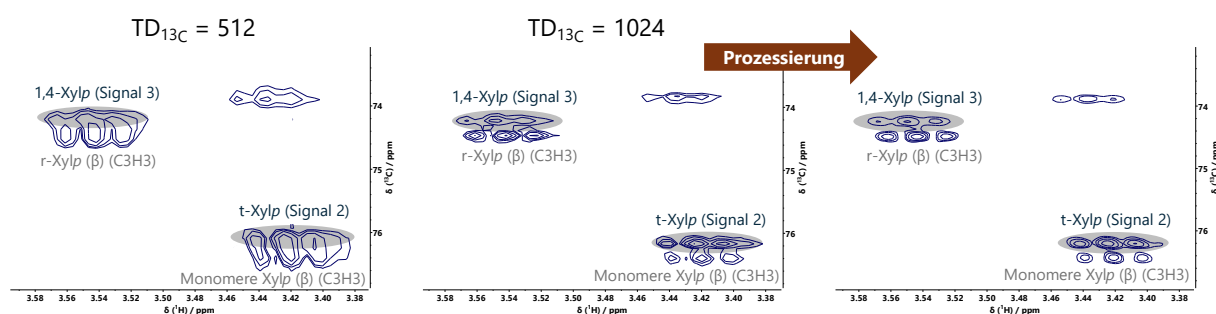


Abbildung 35: Ausschnitte aus den HSQC-Spektren eines enzymatischen Roggenhydrolysats (XYL₁₁) mit verschiedener Inkrementzahl in der ^{13}C -Dimension ($\text{TD}_{13\text{C}}$). Die Ausschnitte zeigen die Bereiche der ausgewählten Markersignale für die terminale (t-) und 1,4-glykosidisch gebundene Xylopyranose (Xylp)-Einheit. Durch die Verdopplung der Datenpunktzahl in der ^{13}C -Dimension sowie die anschließenden Prozessierungsschritte (vgl. Kapitel 3.5.4) erscheinen beide Markersignale separiert von den Signalen der reduzierenden β -Xylp-Einheit bzw. der monomeren β -Xylp.

In den AX der untersuchten Getreideproben überwiegt grundsätzlich die O3-Monosubstitution oder die Disubstitution. Dennoch ließen sich geringe Anteile O2-monosubstituierter Xylp nachweisen, im Fall der Gersten-UBS traten erhöhte Anteile auf (vgl. Tabelle 6 in Kapitel 4.2.3). Vor diesem Hintergrund erschien die Bestimmung eines Markersignals für O2-monosubstituierte Xylp ebenfalls sinnvoll. Hierfür wurden die HSQC-Spektren von A^2XX (s. Abbildung A10) und XA^2XX (in einer Mischung mit XA^3XX , s. Abbildung A11) herangezogen. Die C2H2-Kreuzsignale der terminalen, substituierten Xylp von A^2XX ($\delta_{\text{H/C}} = 3,40/78,77 \text{ ppm}$) sowie der substituierten Xylp im Inneren des Xyloserückgrats von XA^2XX ($\delta_{\text{H/C}} = 3,44/78,61 \text{ ppm}$) weisen charakteristische chemische Verschiebungen auf. Die C2H2-Kreuzsignale von A^2XX bzw. XA^2XX liegen isoliert unterhalb des restlichen Ringprotonenbereichs, zeigen jedoch eine leichte Überlappung untereinander. Weiterhin ist auffällig, dass die Kreuzsignale der in O2-Position gebundenen Araf-Einheit bei beiden AXOS vergleichbar sind. Demnach erscheint z. B. das Kreuzsignal der anomeren Position der Araf-Einheit in beiden AXOS bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H/C}} = 5,28/109,11 \text{ ppm}$. Da zum Zeitpunkt der Methodenentwicklung lediglich A^2XX zur Ermittlung des RRF zur Verfügung stand und der zu erwartende Anteil an O2-monosubstituierter Xylp im Hydrolysat

4 Ergebnisse und Diskussion

dennoch als gering eingeschätzt wird, wurde sich für das gemeinsame C1H1-Signal der Araf von A²⁺³XX und XA²⁺³XX als Markersignal (Signal 4) für die O2-Monosubstitution entschieden.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei den Korrelationssignalen O3-monosubstituierter Xylp am terminalen Ende der AXOS sowie bei den entsprechenden Signalen der 1,3-glykosidisch gebundenen Araf-Einheit. Das C3H3-Kreuzsignal der O3-monosubstituierten tXylp ist gegenüber dem der unsubstituierten tXylp entlang der ¹³C-Dimension in Richtung höherer Werte verschoben und erscheint bei $\delta_{H/C} = 3,58/82,20$ ppm (vgl. Kapitel 4.1.3). Aufgrund der separierten Lage eignet sich als Markersignal (Signal 5) für die O3-Monosubstitution an tXylp-Einheiten dennoch das C1H1-Signal der 1,3-gebundenen Araf-Einheit ($\delta_{H/C} = 5,32/108,70$ ppm) am besten, das ebenfalls charakteristisch für dieses Strukturelement ist. Als Markersignal (Signal 6) für die O3-Monosubstitution einer inneren Xylp-Einheit wurde hingegen das C4H4-Signal der Araf bei $\delta_{H/C} = 4,26/85,42$ ppm ausgewählt.

Bei der Betrachtung der HSQC-Spektren der AXOS mit einer dXylp-Einheit am terminalen, nicht-reduzierenden Ende (A²⁺³XX, A²⁺³A²⁺³XX, A²⁺³XA²⁺³XX) konnte ein Markersignal (Signal 7) für das entsprechende Strukturelement identifiziert werden. Dabei handelt es sich um das C2H2-Signal der terminalen dXylp-Einheit ($\delta_{H/C} = 3,52/78,73$ ppm), das in allen AXOS mit terminaler dXylp-Einheit konsistent vorkommt. Als Markersignal (Signal 8) für eine Disubstitution im Inneren des Xylp-Rückgrats der AXOS wurde das C4H4-Signal der in O3-Position der dXylp-Einheit gebundenen Araf-Einheit verwendet ($\delta_{H/C} = 4,30/84,94$ ppm). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es bei zwei aufeinanderfolgenden dXylp-Einheiten, wie in A²⁺³A²⁺³XX, zu einer leichten Verschiebung des Markersignals ($\delta_{H/C} = 4,33/85,14$ ppm) kommt. Demzufolge werden beim gleichzeitigen Auftreten beider Signale in den HSQC-Spektren der Getreidehydrolysate beide Signalvolumina integriert und aufsummiert, um alle internen dXylp-Einheiten zu erfassen.

4.3.2 Markersignale zur qualitativen Analyse von ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosacchariden

Zur qualitativen Analyse der durch XYL₁₀ und XYL₁₁ aus den BS der Getreide freigesetzten FAXOS wurden die HSQC-Spektren der isolierten FAXOS-Standardsubstanzen (vgl. Kapitel 4.1.4) auch auf charakteristische Kreuzsignale hin untersucht. Diese sollten Rückschlüsse auf das Vorhandensein bestimmter FS-haltiger Seitenketten sowie deren Umgebung erlauben. Zudem konnte in den HSQC-Spektren der aus dem enzymatischen Hydrolysat abgetrennten FAXOS (vgl. Kapitel 4.3.4) zum Teil auch die für (A)XOS ermittelten Markersignale identifiziert werden. Diese werden an dieser Stelle nicht nochmal aufgeführt, können jedoch zusätzlich zur strukturellen Charakterisierung der FAXOS beitragen. In Abbildung 36 sind die für verschiedene FS-haltige Seitenketten der FAXOS ausgewählten charakteristischen HSQC-Markersignale dargestellt.

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

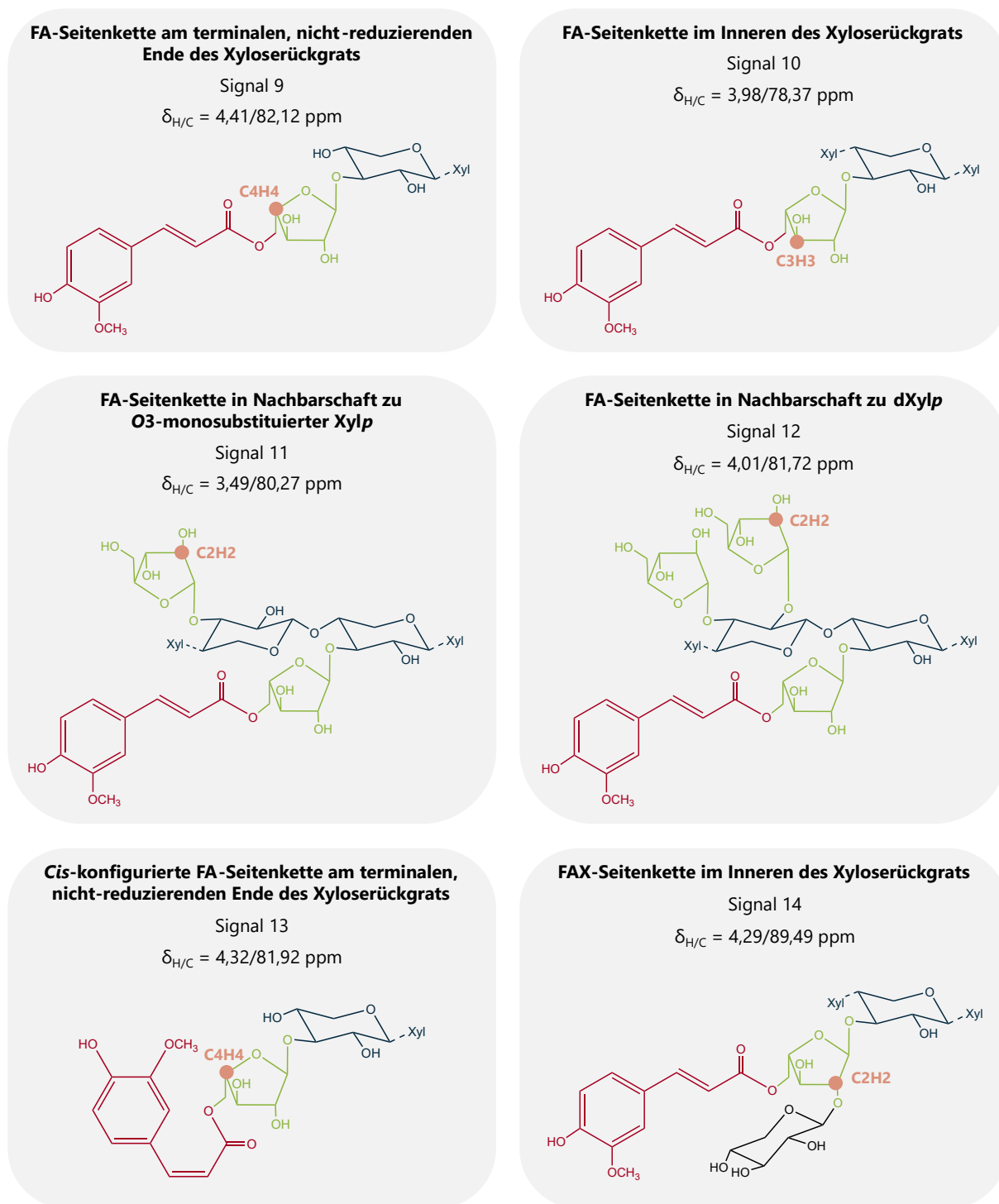


Abbildung 36: HSQC-Markersignale der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharide mit ihren ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen. Die Ferulasäure (rot) ist dabei stets in O5-Position der Arabinofuranose (Araf, grün) gebunden, welche über eine 1,3-glykosidische Bindung mit dem Xylopyranose (Xylp, schwarz)-Rückgrat verknüpft ist (FA-Seitenkette). Im Falle der FAX-Seitenkette tritt eine zusätzliche Xylp-Einheit in O2-Position der Araf-Einheit auf. Je nach Substitution der zur FA-Seitenkette benachbarten Xylp-Einheit werden unterschiedliche Korrelationssignale erzeugt. d, disubstituiert; u, unsubstituiert; Xyl, Xylose

Die ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen der Kreuzsignale der über eine 1,3-glykosidische Bindung mit dem Xyloserückgrat verknüpften FA-Seitenkette (vgl. Kapitel 1.2.2.3) hängen sowohl von deren Position als auch von der Substitution der dazu benachbarten Xylp-Einheiten

4 Ergebnisse und Diskussion

ab. Liegt die FA-Seitenkette am terminalen, nicht-reduzierenden Ende der FAXOS gebunden vor, erzeugt die C4H4-Position der Araf-Einheit ein charakteristisches Kreuzsignal bei $\delta_{H/C} = 4,41/82,12$ ppm (Signal 9), das ausschließlich in diesem Strukturelement vorkommt. Bei einer inneren Position der FA-Seitenkette im Xyloserückgrat der FAXOS kann das Korrelationssignal bei $\delta_{H/C} = 3,98/78,37$ ppm (C3H3-Position der Araf) als charakteristisches Markersignal (Signal 10) herangezogen werden. Letzteres gilt jedoch nur für FA-Seitenketten, in deren Nachbarschaft ausschließlich uXylp-Einheiten vorkommen. Im Falle einer benachbarten O3-monosubstituierten Xylp- oder dXylp-Einheit verschieben sich die Kreuzsignale der FA-Seitenkette. Zudem zeigen die Araf-Einheiten, die nicht mit FS substituiert sind, im Vergleich zu den korrespondierenden Substitutionen in AXOS ebenfalls abweichende Korrelationssignale. Dementsprechend kann das C2H2-Signal der unsubstituierten Araf-Einheit (Signal 11, $\delta_{H/C} = 3,49/80,27$ ppm) als Marker für eine O3-Monosubstitution neben der FA-Seitenkette verwendet werden. Zur Identifizierung einer benachbarten Disubstitution diene das C2H2-Signal der in der O2-Position der dXylp gebundenen Araf-Einheit (Signal 12, $\delta_{H/C} = 4,01/81,72$ ppm). Darüber hinaus führt die *cis/trans*-Konfiguration der estergebundenen FS zu einer Verschiebung der Korrelationssignale der FA-Seitenkette, weshalb hier ebenfalls charakteristische Signale im HSQC-Spektrum identifiziert werden konnten. Insbesondere die Verschiebung der Kreuzsignale der an der Doppelbindung beteiligten Position 7 und 8 der FS (s. Abbildung 28 in Kapitel 4.1.5) deuten auf das Auftreten der *cis*-Konfiguration hin. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Signale auch durch freie *cis*-FS im Hydrolysat erzeugt werden. Demnach wurde sich für ein Arabinosesignal (C4H4 der Araf) bei $\delta_{H/C} = 4,32/81,92$ ppm als Markersignal (Signal 13) für eine *cis*-konfigurierte FA-Seitenkette am terminalen, nicht-reduzierenden Ende des Xyloserückgrats entschieden. Da keine FAXOS-Standardsubstanz mit einer *cis*-konfigurierten FA-Seitenkette, die an eine innere Xylp-Einheit gebunden ist, isoliert werden konnte, können hierzu keine Aussagen getroffen werden. Zuletzt wurde ein Markersignal (Signal 14) für die FAX-Seitenkette (s. Kapitel 1.2.2.3) identifiziert. Hier bietet sich die an der 1,2-glykosidischen Bindung zur Xylp beteiligte C2H2-Position der Araf an, deren Kreuzsignal bei $\delta_{H/C} = 4,29/89,49$ ppm deutlich von den restlichen Signalen getrennt vorliegt.

4.3.3 Auswahl der HSQC-Aufnahmeparameter für die Quantifizierung und Bestimmung relativer Responsefaktoren

Die identifizierten HSQC-Markersignale der XOS und AXOS ermöglichen eine semiquantitative Abschätzung der relativen Anteile der verschiedenen Strukturelemente im enzymatischen Hydrolysat von Getreide-BS. Im Gegensatz zu eindimensionalen NMR-Methoden hängt die Signalintensität im HSQC-Spektrum von zahlreichen proben- und pulssequenzspezifischen Faktoren ab (s. Kapitel 3.5.2), weshalb die Signalvolumina nicht direkt ins Verhältnis gesetzt werden können. Demnach unterscheiden sich beispielsweise die $^1J_{CH}$ -Kopplungen der Protonen

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

und ^{13}C -Kerne sowohl zwischen verschiedenen (A)XOS als auch zwischen verschiedenen Positionen innerhalb eines Moleküls. Bei der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten, phasensensitiven HSQC-Pulssequenz ist der INEPT-Transferdelay ($\Delta = 1/(4J_{\text{C,H}})$) standardmäßig auf eine durchschnittliche Kopplungskonstante von $^1J_{\text{CH}} = 145 \text{ Hz}$ eingestellt (s. Kapitel 3.5.2). Daraus ergeben sich abhängig vom jeweiligen (A)XOS und der betrachteten Position unterschiedliche Signalvolumina, sodass eine Korrektur der HSQC-Response erforderlich ist. Die Aufnahme einer externen Kalibrierkurve wäre hierfür wünschenswert. Dies erfordert jedoch große Mengen an (A)XOS-Standardsubstanzen. Da es sich hier um ein semiquantitatives Verfahren handelt, bei dem keine absoluten Konzentrationen einzelner Analyten bestimmt werden, sondern relative Anteile verschiedener Markersignale erfasst werden, wurde auf eine Kalibrierung verzichtet. Stattdessen erfolgte die Korrektur der HSQC-Response durch die Bestimmung von RRF der Markersignale in Bezug auf ein Referenzsignal einer Ist mit konstanter Konzentration. In ihrer Masterarbeit untersuchte Johanna Braun (2023) verschiedene Substanzen, die sich als Ist zur HSQC-basierten Quantifizierung von (A)XOS eignen. Idealerweise sollten diese nicht in der pflanzlichen Zellwand vorkommen und zu den (A)XOS unterscheidbare Signale im Spektrum erzeugen. Neben strukturähnlichen Sacchariden wie Lactose, Saccharose, Trehalose, 2-Desoxy-D-Glucose und Methyl- α -D-Glucopyranosid (MeGlc) wurde auch Koffein als mögliche Ist getestet. Letzteres wurde beispielsweise in dem von Schendel und Bunzel (2022) entwickelten HSQC-basierten Profiling verschiedener FS-haltiger Seitenketten von AX als Ist eingesetzt, erwies sich jedoch für die vorliegende Fragestellung als nicht geeignet. Aufgrund der drei äquivalenten Protonen der in der anomeren Position vorkommenden Methoxygruppe, die ein intensives, isoliert vorliegendes Singulettsignal erzeugen, wurde sich für MeGlc als Ist entschieden (s. Abbildung 37). Das Kreuzsignal der Methoxygruppe liegt separiert oberhalb des Ringprotonenbereichs der (A)XOS bei $\delta_{\text{H/C}} = 3,40/55,67 \text{ ppm}$ und konnte daher für die Bestimmung der RRF der Markersignale eingesetzt werden. Der Einsatz der MeGlc als Ist diente ferner dazu, während der Messung auftretende instrumentelle Schwankungen bis zu einem bestimmten Maß zu kompensieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-spektroskopischen Messungen

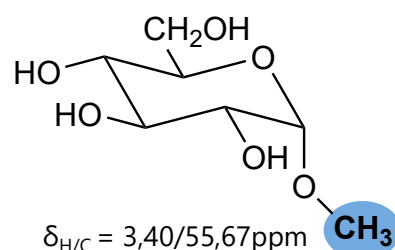


Abbildung 37: Struktur des als interne Standardsubstanz eingesetzten Methyl- α -D-Glucopyranosids (MeGlc). Die ^1H , ^{13}C -chemische Verschiebung des verwendeten Referenzsignals der Methoxygruppe des MeGlc (blau markiert) sind ebenfalls mit angegeben.

erfolgten an einem 500 MHz-Spektrometer, das mit einem stickstoffgekühlten *Prodigy*-Kyroprobenkopf ausgestattet ist. Durch die kryogene Kühlung (10 - 15 K) der in der Sonde befindlichen Spulen wird das thermisch induzierte Rauschen vermindert. Dies hat zur Folge, dass die Sensitivität im Vergleich zu einem herkömmlichen, ungekühlten Breitbandprobenkopf deutlich erhöht wird, wobei das S/N um etwa das Zwei- bis Dreifache verbessert wird. Die Sensitivitätssteigerung ist bei zunehmend leitfähigen, salzigen Proben jedoch eingeschränkt, da deren Leitfähigkeit das Rauschen erhöht, was wiederum die Vorteile der Kryokühlung

4 Ergebnisse und Diskussion

mindert (Robosky *et al.*, 2007). Darüber hinaus kann bereits ein geringfügiger Verlust des für die thermische Isolation der Sonde essenziellen Vakuums zu einer Beeinflussung der Leistungsfähigkeit des Kryoprobenkopfs führen. Bei der Aufnahme der HSQC-Spektren wurden wiederholt ausgeprägte „Rauschspitzen“ im FID*-Signal beobachtet, die die Signalintensität im resultierenden Spektrum erheblich beeinträchtigten und in einzelnen Fällen zum vollständigen Signalverlust führten. Bei dem als *arcing* bezeichneten Phänomen kommt es innerhalb der Sonde zu kurzzeitigen, elektrischen Spannungsüberschlägen. Begünstigt wird dieses Ereignis insbesondere durch die während der Detektionsphase eines HSQC-Experiments angewandte kontinuierliche Hochfrequenzbestrahlung zur Aufhebung der J_{CH} -Kopplung (s. Kapitel 3.5.2). Die hierfür erforderlichen hohen Impulsleistungen führen zu starken elektrischen Feldstärken in der Spule, wodurch das Risiko elektrischer Durchschläge, insbesondere bei einer unzureichenden Evakuierung des Sondenraums, erhöht wird. Vor diesem Hintergrund wurde MeGlc neben seiner Funktion als Ist auch zusätzlich zur Kontrolle und Sicherstellung der Signalstabilität mitgeführt.

Im nächsten Schritt wurden für die Quantifizierung geeignete Aufnahmeparameter des phasensensitiven HSQC-Experiments („hsqcedetgp“) festgelegt. In Kapitel 4.3.1 wurde bereits die Bedeutung einer erhöhten Inkrementzahl in der indirekten Dimension für die digitale Auflösung der Markersignale der (A)XOS diskutiert. Eine ausreichende digitale Auflösung ist entscheidend, um die Signale voneinander zu trennen. Allerdings geht einer Erhöhung der Datenpunktzahl in der indirekten Dimension mit einer Erhöhung der Messzeit einher. Für die Aufnahme des HSQC-Experiments wurden dennoch für eine bessere Signalauflösung 1024 Datenpunkte in beiden Dimensionen gewählt, wobei die dadurch verlängerte Messzeit akzeptiert wurde.

Um eine ausreichende Empfindlichkeit der Messung zu gewährleisten, kann die Scanzahl des HSQC-Experiments gesteigert werden. In Vorversuchen mit kommerziell erhältlichen (A)XOS-Standardsubstanzen in gleichbleibender Konzentration wurde beobachtet, dass das S/N mit der Wurzel der Scanzahl zunimmt. Die aus den Korrelationssignalen der (A)XOS und des Ist gebildeten Integralverhältnisse blieben dabei weitgehend konstant. Daher sollte die Anzahl der Scans individuell an die Konzentration der freigesetzten (A)XOS im Hydrolysat angepasst werden. Da im phasensensitiven HSQC-Experiment ein 8-stufiger Phasenzyklus verwendet wird (s. Kapitel 3.5.2), sollten pro Inkrement dennoch mindestens acht Scans aufgenommen werden, um alle Phasen vollständig abzudecken und dadurch unerwünschte Kohärenzen, die zur Artefaktbildung führen können, zu unterdrücken.

Für eine korrekte Quantifizierung sollten die Kernspins der zu analysierenden (A)XOS vor jeder Anregung vollständig in den Gleichgewichtszustand zurückgekehrt sein. Ein vollständige Relaxation der Spins wird durch einen ausreichend langen D_1 -Delay zwischen aufeinanderfolgenden Scans (s. Kapitel 3.5.2) erreicht, welcher dem Fünffachen der T_1 -Relaxationszeit der (A)XOS entsprechen sollte (Giraudeau, 2014). Dies führt jedoch zu einer erheblichen Verlängerung der Messzeit, sodass meist ein Kompromiss zwischen einem

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

möglichen Signalverlust und Analysendauer gefunden werden muss. Die durch das *Inversion-Recovery*-Experiment ermittelten T_1 -Relaxationszeiten der (A)XOS (s. Kapitel 3.5.3) betragen zwischen 0,7 und 3,0 s (s. Tabelle A36). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass sich die T_1 -Zeiten sowohl zwischen den einzelnen (A)XOS als auch zwischen unterschiedlichen Positionen im Molekül unterscheiden. So wurden beispielsweise für die anomere Position des reduzierenden Endes der (A)XOS in α -Konfiguration T_1 -Zeiten zwischen 2,1 und 3,0 s ermittelt. Die Werte der β -konfigurierten, reduzierenden Xylp lagen hingegen nur bei 1,1 bis 1,5 s. Auch die anomeren Protonen der Araf in den AXOS besitzen T_1 -Zeiten zwischen 1,0 und 1,5 s, während die übrigen Xylp-Einheiten teilweise Werte von unter 1,0 s aufweisen. Aus diesem Grund wurde sich für den standardmäßig eingesetzten D_1 -Delay von 1,5 s entschieden. Obwohl insbesondere bei der Quantifizierung des α -Anomers der reduzierenden Xylp-Einheit aufgrund eines D_1 -Delays von 1,5 s geringfügige Signalverluste nicht vollständig auszuschließen sind, wurde dieser Umstand im Hinblick auf eine praktikable Messdauer bewusst akzeptiert. Eine Verlängerung des D_1 -Delays auf 3,0 s hätte eine Verdopplung der Experimentdauer zur Folge gehabt. Unter den gewählten Messbedingungen (1024 Datenpunkte in beiden Dimensionen, 8 Scans, ein D_1 -Delay von 1,5 s sowie ein NUS-Anteil von 50 % (vgl. Kapitel 3.5.4)) ergibt sich eine Gesamtexperimentdauer von etwa 2 Stunden. Bei der semiquantitativen Bestimmung der relativen Anteile einzelner Strukturelemente der (A)XOS werden potenziell im Hydrolysat vorkommende höhermolekulare Fragmente ebenfalls berücksichtigt, sofern sie das entsprechende Strukturelement aufweisen. Mit zunehmendem DP der Moleküle nimmt jedoch die molekulare Beweglichkeit ab, wodurch die Relaxation der Kernspins beeinflusst wird. Demzufolge führt eine zunehmende Molekülgröße neben einer erhöhten Viskosität der Messlösung zu abnehmenden Relaxationszeiten. Eine reduzierte transversale Relaxationszeit (T_2 -Zeit, s. Kapitel 3.5) kann zu einer Signalverbreiterung und damit zu einer Beeinträchtigung der spektralen Auflösung führen (Claridge, 2016). Der Einfluss der Signalverbreiterung durch abnehmende T_2 -Zeiten der (A)XOS auf die Quantifizierung der Strukturelemente lässt sich nicht zuverlässig abschätzen, sollte jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die RRF der ausgewählten Markersignale wurden im Anschluss durch Dreifachmessung von 5 mM Lösungen der (A)XOS mit MeGlc in Deuteriumoxid ermittelt. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen dem Volumenintegral des Markersignals und des Referenzsignals der MeGlc (s. Abbildung 37) gebildet. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Anzahl an Protonen ((A)XOS: 1, MeGlc: 3), die zu den Signalvolumina beitragen, können basierend auf den ermittelten Signalverhältnissen die RRF der einzelnen Markersignale berechnet werden. Dabei zeigte sich, dass die RRF verschiedener (A)XOS, die sich auf das gleiche Strukturelement beziehen, vergleichbar sind. Daher wurden die RRF der verschiedenen Markersignale über alle (A)XOS gemittelt, womit sich acht verschiedene RRF (je ein RRF pro Markersignal) ergaben. Dennoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass dies zu Abweichungen führen kann, wenn lediglich ein Teil der (A)XOS, die zur RRF-Ermittlung herangezogen wurden, im Hydrolysat

4 Ergebnisse und Diskussion

enthalten ist. Diese Abweichungen sollten jedoch aufgrund der ähnlichen RRF vergleichsweise gering sein, sodass eine semiquantitative Bestimmung der Strukturelemente der (A)XOS möglich sein sollte. Die für das HSQC-Profilung verwendeten RRF der verschiedenen Markersignale sind in Tabelle A37 im Anhang aufgeführt. Die Bestimmung der „molaren Konzentration“ eines Strukturelements im enzymatischen Hydrolysat der Getreide-BS erfolgte schließlich durch folgende Formel (10):

$$C_{\text{Strukturelement}} = \text{RRF} \cdot c_{\text{ISt}} \cdot \frac{V_{\text{Markersignal}}}{V_{\text{ISt}}} \cdot \frac{n_{\text{H,ISt}}}{n_{\text{H,x}}} \quad (10)$$

Hierbei bezeichnet c_{ISt} die Konzentration der MeGlc (5 mM), $V_{\text{Markersignal}}$ und V_{ISt} die entsprechenden Volumenintegrale sowie $n_{\text{H,ISt}}$ bzw. $n_{\text{H,x}}$ die Anzahl an Protonen, die zu den jeweiligen Signalvolumina beitragen.

4.3.4 Enzymatische Freisetzung und Trennung ferulasäurehaltiger und -freier Oligosaccharide

Für das HSQC-basierte Profiling der verschiedenen Strukturelemente der (A)XOS in den enzymatischen Hydrolysaten der Getreide-BS ist eine ausreichend hohe Konzentration der (A)XOS in Lösung erforderlich. Im Falle der UBS wurde nach dem enzymatischen Verdau durch XYL₁₀ und XYL₁₁ zusätzlich eine chromatographische Trennung der FS-freien und -haltigen OS durchgeführt, weshalb erhöhte Ausgangsmengen von 300 - 400 mg UBS für die enzymatische Hydrolyse eingesetzt wurden. Für die LBS reichten dagegen aufgrund der insgesamt höheren Ausbeuten an freigesetzten (A)XOS bereits 100 mg für die enzymatische Hydrolyse aus. Im Vergleich zur HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode wurden die eingesetzten Enzymmengen von XYL₁₀ bzw. XYL₁₁ entsprechend der höheren BS-Einwaage angepasst. Während der Inkubation der Ballaststofflösungen bzw. -suspensionen ($c \sim 10$ mg/mL) mit XYL₁₀ und XYL₁₁ wurde auf eine ausreichende Durchmischung durch Schütteln oder 360°-Drehung der Gefäße geachtet. Da durch die NMR-spektroskopische Analyse der freigesetzten OS auch größere Moleküle erfasst werden, ist eine vollständige Spaltung zu den Endprodukten des enzymatischen Verdau mit XYL₁₀ und XYL₁₁ nicht zwingend erforderlich. Die Inaktivierung der Xylanasen erfolgte durch die Zugabe von Ethanol bis zu einer Volumenkonzentration von 50 %. Die zugesetzte Ethanolmenge wurde dabei so gewählt, dass einerseits eine zuverlässige Inaktivierung der Enzyme gewährleistet ist, andererseits jedoch möglichst viele (A)XOS, einschließlich der größeren Moleküle, in Lösung verbleiben. Bei der Analyse der LBS diente die Ethanolzugabe ferner dazu, weitere gelöste Zellwand-PS zu präzipitieren und so die Viskosität der Lösungen zu reduzieren. Dies war insbesondere bei den LBS aus Gerste relevant, da diese größere Mengen an gelösten MLG enthielten, welche die nachfolgende Probenaufarbeitung und -messung erschweren würden. Nach Abzentrifugieren des Rückstands wurde ein möglichst großes Aliquot des Überstands entnommen und eingedampft. Der eingedampfte Überstand wurde anschließend direkt in Deuteriumoxid unter Zugabe von MeGlc in fester Konzentration

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

analysiert bzw. in einem möglichst kleinen, genau definierten Volumen an Reinstwasser für die chromatographische Trennung der (A)XOS und FAXOS gelöst (s. Arbeitsvorschrift 8.10.2).

Zur separaten HSQC-Analyse der Strukturelemente der aus den UBS freigesetzten FAXOS wurden diese zuerst mittels semipräparativer RP-HPLC unter Verwendung einer Phenyl-Hexyl-Phase von den (A)XOS abgetrennt (s. Kapitel 3.4.3). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich von Junker und Bunzel (2024) zur Trennung von FS-haltigen und -freien Arabino- und Galactooligosacchariden angewandt. Die chromatographische Trennung wurde durch den kombinierten Einsatz eines ELSD als universellen Detektor für nichtflüchtige Analyten sowie eines UV-Detektors überwacht. Mit Hilfe der UV-Detektion bei 325 nm konnte gezielt die Elution der FAXOS erfasst werden, da die (A)XOS kein UV-Signal aufweisen. Abbildung 38 zeigt die UV- und ELSD-detektierten Chromatogramme der semipräparativen Trennung der im enzymatischen Hydrolysat von Weizen-UBS enthaltenen FS-haltigen und -freien OS nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁.

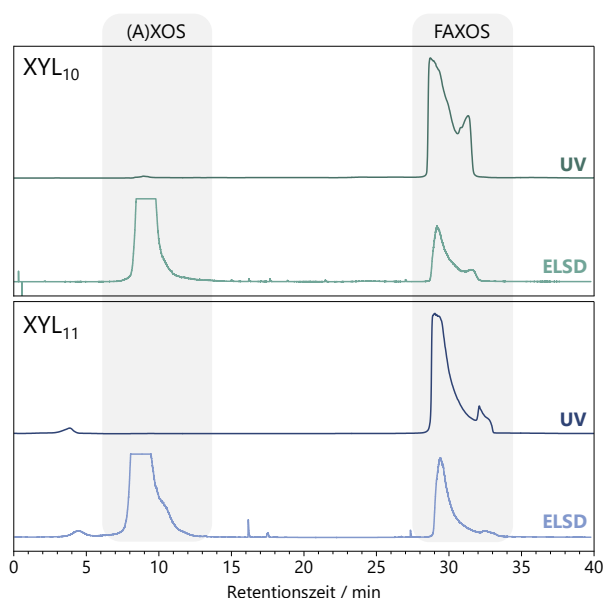


Abbildung 38: UV- und ELSD-detektierte Chromatogramme der Trennung von ferulasäurefreien (Arabino-) Xylooligosacchariden ((A)XOS) und ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosacchariden (FAXOS), die durch die enzymatische Hydrolyse unlöslicher Weizenballaststoffe mit den spezifischen *endo*- β -1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁) freigesetzt wurden. Die Trennung erfolgte auf einer semipräparativen Phenyl-Hexyl-Säule unter Anwendung eines Wasser/Methanol-Gradienten.

Die Hydrolysate ließen sich in zwei Fraktionen auftrennen. Die erste Fraktion (8,0 - 13,0 min), die den FS-freien OS zuzuordnen ist, erzeugte ein intensives Signal im ELSD bei gleichzeitig schwacher UV-Absorption. Die zweite Fraktion (28,0 - 34,0 min) hingegen wies sowohl im UV- als auch im ELSD-Chromatogramm intensive Signale auf, was auf die Elution der FS-haltigen OS hindeutet. Die Anpassung der chromatographischen Bedingungen (s. Arbeitsvorschrift 8.10.2, Tabelle V22) für die Trennung erfolgte anhand ausgewählter Standardsubstanzen der (A)XOS und FAXOS, die sich ausschließlich durch die FS-Substitution unterscheiden. Demnach eluierte sowohl A³X als auch XA³A³X innerhalb des beschriebenen Zeitraums der ersten Fraktion, während die entsprechenden FAXOS A^{5f3}X und XA³A^{5f3}X das

4 Ergebnisse und Diskussion

Elutionsverhalten der zweiten Fraktion zeigten. Im Anschluss an die chromatographische Trennung mittels semipräparativer RP-HPLC wurden die jeweiligen Fraktionen des XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolysats durch ein nachgeschaltetes Fraktionierventil im präparativen Maßstab zu den beiden genannten Elutionszeiträumen gesammelt und zur Aufkonzentrierung getrocknet. Das gravimetrisch ermittelte Verhältnis beider Fraktionen variierte in Abhängigkeit des untersuchten Getreides zwischen 5:1 und 11:1, wonach die (A)XOS die FAXOS deutlich überwogen.

Basierend auf der massenspektrometrischen Analyse der isolierten FAXOS-Standardsubstanzen (s. Kapitel 3.4.5) wurden die beiden erhaltenen Fraktionen am Beispiel der Weizen-UBS durch Direktinjektion in ein lineares Ionenfallen-Massenspektrometer untersucht, um Kenntnisse über die Molekülmassen der vorkommenden OS zu erlangen. Dabei wurde der ersten Fraktion Lithiumchlorid zur besseren Ionisierung der in Wasser gelösten, FS-freien OS zugesetzt. Die Injektion der zweiten Fraktion, die die FS-haltigen OS enthielt, erfolgte hingegen in einem Gemisch aus Wasser und Methanol. Das Massenspektrum der ersten Fraktion der XYL₁₀- bzw. XYL₁₁-Hydrolysate zeigt die charakteristischen m/z -Werte von Quasimolekülionen $[M+Li]^+$ pentosebasierter, FS-freier OS. Die Signale unterscheiden sich um $\Delta(m/z) = 132$, was jeweils einer Pentoseeinheit entspricht. Sowohl in der (A)XOS-Fraktion des XYL₁₀- als auch des XYL₁₁-Hydrolysats wurden Molekülmassen von OS mit zwei bis zehn Pentoseeinheiten detektiert, wobei das Signal bei einem m/z von 289 in beiden Fällen die höchste Intensität aufwies. Letzteres ist vermutlich auf die in den enzymatischen Getreidehydrolysaten in größeren Mengen vorkommende Xylobiose zurückzuführen. Die ermittelten Molekülmassen der OS korrelieren mit den m/z -Werten der aus Weizen-UBS freigesetzten (A)XOS, die durch die HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode erfasst wurden (s. auch Kapitel 4.2.3). Zudem konnten Molekülmassen acetylierter, pentosebasierter OS identifiziert werden, die durch eine Massendifferenz von $\Delta(m/z) = 42$ im Vergleich zu nicht-acetylierten OS gekennzeichnet sind. Diese konnten aufgrund der alkalischen Bedingungen der HPAEC bislang nicht im Hydrolysats der Weizen-UBS nachgewiesen werden.

Auch die direkte Injektion der zweiten Fraktionen aus den Weizenhydrolysaten mit XYL₁₀ und XYL₁₁ in die ESI-Quelle (positiver Modus) der linearen Ionenfallen-MS ergab Massenspektren, in denen die intensivsten Signale einen Massenunterschied von jeweils $\Delta(m/z) = 132$ zeigten (s. Abbildung A34 im Anhang). Die dominierenden Quasimolekülionen mit Natrium ($[M+Na]^+$) entsprechen pentosebasierten OS, die mit einem FS-Rest sowie gegebenenfalls mit ein oder zwei zusätzlichen Acetylgruppen verestert vorliegen. Während im Massenspektrum des XYL₁₀-Hydrolysats FS-haltige OS mit einem DP von drei bis zehn beobachtet wurden, enthielten die OS im XYL₁₁-Hydrolysats zwischen vier und zwölf Pentoseeinheiten. Das im Massenspektrum der zweiten Fraktion des XYL₁₀-Hydrolysats dominierende m/z -Signal bei 613 ist vermutlich auf $A^{5f3}X$ zurückzuführen, das auch als Hauptprodukt bei der enzymatischen Hydrolyse von Roggen-UBS mit XYL₁₀ isoliert werden konnte (vgl. Tabelle 4 in Kapitel 4.1.5). Dagegen hat das m/z -Signal von 877 die höchste Intensität im Massenspektrum des XYL₁₁-Hydrolysats. Hierbei

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

könnte es sich beispielsweise um $\text{XA}^{5\text{F}3}\text{XX}$ handeln, welches als Standardsubstanz aus dem Maishydrolysat isoliert werden konnte (s. Kapitel 4.1.5). Die dabei eingesetzte XYL_{ABV} weist ebenfalls eine GH11-Aktivität auf.

Im Zuge der Methodenentwicklung wurde die Trennung in (A)XOS und FAXOS auch an hydrolysierten LBS aus Getreide getestet, jedoch zeigte sich hier keine ausreichende Trennung in eine UV-aktive und eine UV-inaktive Fraktion. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass in den LBS vermehrt höhermolekulare FAXOS-Strukturen vorkommen, die trotz FS-Substitution nicht ausreichend vom Säulenmaterial retardiert werden und daher zusammen mit den FS-freien OS eluieren. Dennoch konnte anhand der UBS-Hydrolysate gezeigt werden, dass eine Trennung beider Fraktionen bis zu einem DP der OS von zwölf möglich ist. Daher lässt sich festhalten, dass die ursprünglich von Junker und Bunzel (2024) entwickelte und im Rahmen dieser Arbeit adaptierte semi-präparative RP-HPLC-Methode mit einer Phenyl-Hexyl-Phase geeignet ist, (A)XOS und FAXOS aus enzymatischen Hydrolysaten von UBS aus Getreide zu trennen. Die Methode wurde erfolgreich auf ausgewählte Getreidearten wie Weizen, Roggen, Emmer und Gerste angewandt.

4.3.5 Anwendung der Methode zur Analyse der in Getreidehydrolysaten vorkommenden Strukturelemente

Mithilfe der ausgewählten HSQC-Markersignale sowie der ermittelten RRF wurden die relativen Anteile der verschiedenen Strukturelemente der durch enzymatische Hydrolyse mit XYL_{10} und XYL_{11} aus Getreide-BS freigesetzten (A)XOS bestimmt. Während bei den UBS eine getrennte Analyse der (A)XOS und FAXOS erfolgte, wurde die Zusammensetzung der hydrolysierten LBS ohne vorherige Trennung der (A)XOS und FAXOS untersucht. Im Gegensatz zur Methylierungsanalyse, die die Anteile der Bindungspositionen im gesamten AX abbildet, erfasst die HSQC-Profilingmethode nur die enzymatisch freigesetzten OS. Da jedoch bei beiden Methoden die relativen Verhältnisse einzelner Strukturelemente bestimmt werden, bietet sich ein Vergleich mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse an. Dabei ist zu beachten, dass bei der HSQC-Methode ein Großteil der tXylp -Einheiten im Zuge der enzymatischen Hydrolyse mit XYL_{10} und XYL_{11} gebildet wird. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen der Methylierungsanalyse wurde daher die Summe der Anteile der uXylp -Einheiten ermittelt. Zu diesen zählen neben den tXylp -Einheiten auch die Xylp -Einheiten am reduzierenden Ende sowie die 1,4-glykosidisch gebundenen uXylp -Einheiten. Des Weiteren werden für die mittels der HSQC-Profilingmethode ermittelten Anteile an O2- und O3-monosubstituierten Xylp - sowie an dXylp -Einheiten ebenfalls Summenwerte angegeben. Alle Analysen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die halbe Spannweite („Range/2“) der ermittelten Anteile der verschiedenen Strukturelemente betrug in den meisten Fällen weniger als 10 %, lag jedoch vereinzelt über 20 %. Eine geringere Präzision der Bestimmung wurde insbesondere bei Strukturelementen beobachtet, die im Hydrolysat in geringen Mengen (< 5 mol%) vorlagen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Trotz eines einheitlichen Vorgehens bei der Prozessierung der Spektren (s. Kapitel 3.5.4) und der Verwendung von Integrationsmasken zur vergleichbaren Integration der Marksignale können geringfügige Abweichungen auftreten, die die Quantifizierung der Strukturelemente beeinflussen können. Die Präzision kann für ein semiquantitatives Verfahren dennoch als ausreichend angesehen werden.

4.3.5.1 (Arabino-)Xylooligosaccharide aus unlöslichen Ballaststoffen

Die relative Zusammensetzung der Strukturmerkmale der enzymatisch aus UBS verschiedener Getreidearten freigesetzten (A)XOS wird von uXylp-Einheiten dominiert, deren Anteil zwischen 74,3 und 86,1 mol% liegt (s. Tabelle 7). Die hohen Anteile lassen sich überwiegend auf die Freisetzung von XOS zurückführen, die nach den Ergebnissen der chromatographischen Profilingmethode zu etwa zwei Dritteln im Vergleich zu den AXOS aus UBS freigesetzt werden (s. Kapitel 4.2.3). Mit Ausnahme der UBS aus Emmer (gleicher Anteil) weisen die XYL₁₁-Hydrolysate stets einen höheren Anteil an uXylp-Einheiten auf als die XYL₁₀-Hydrolysate. Grundsätzlich sind die ermittelten Anteile verschiedener Strukturelemente nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁ vergleichbar. Jedoch setzte XYL₁₁ fast ausschließlich (A)XOS frei, deren terminales, nicht-reduzierendes Ende unsubstituiert vorliegt. In Übereinstimmung dazu konnten keine Anteile von substituierten tXylp wie 1,3-Xylp oder 1,2,3-Xylp in den XYL₁₁-Hydrolysaten nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Molare Anteile (mol%, n = 2) der in den unlöslichen Ballaststoffen von Getreide vorkommenden Strukturelemente ferulasäurefreier (Arabino-)Xylooligosaccharide nach enzymatischer Hydrolyse mit endo-β-1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁). Die Bezeichnung der Strukturelemente orientiert sich an der der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA), deren molaren Anteile (mol%, n = 2) ebenfalls angegeben sind. Xylp, Xylopyranose; u, unsubstituiert; r, reduzierend; t, terminal; Σ, Summe der molaren Anteile

Signal	Strukturelement	Weizen		Roggen		Emmer		Gerste	
		XYL ₁₀	XYL ₁₁	XYL ₁₀	XYL ₁₁	XYL ₁₀	XYL ₁₁	XYL ₁₀	XYL ₁₁
1	r-Xylp (α+β)	33,7	27,3	38,3	34,4	40,3	33,9	29,0	27,0
2	t-Xylp	35,1	32,6	33,4	33,7	26,7	30,5	27,6	25,5
3	1,4-Xylp	11,7	24,2	5,9	18,0	18,9	20,7	17,7	25,8
	uXylp = Σ r-, t-, 1,4-Xylp	80,5	84,1	77,6	86,1	85,9	85,1	74,3	78,3
4	1,2-/1,2,4-Xylp	1,0	-	0,7	-	1,2	0,7	-	-
5	1,3-Xylp	4,4	-	8,5	-	1,8	-	-	-
6	1,3,4-Xylp	5,2	10,1	10,0	11,7	4,3	6,6	11,9	8,9
	Σ 1,3-/1,3,4-Xylp	9,6	10,1	18,5	11,7	6,1	6,6	11,9	8,9
7	1,2,3-Xylp	2,4	-	0,9	-	1,2	-	-	-
8	1,2,3,4-Xylp	6,5	5,9	2,3	2,2	5,5	7,5	13,9	12,9
	Σ 1,2,3/1,2,3,4-Xylp	8,9	5,9	3,2	2,2	6,7	7,5	13,9	12,9
PMAA	t-Xylp	3,9		5,7		4,0		4,9	
	1,4-Xylp	68,5		63,6		66,7		50,3	
	1,2,4-Xylp	2,5		2,3		2,6		5,6	
	1,3,4-Xylp	12,8		16,4		12,6		12,0	
	1,2,3,4-Xylp	12,4		12,2		14,1		27,2	

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

Weiterhin ist der Anteil an 1,4-Xylp in den durch XYL₁₁ freigesetzten (A)XOS höher, was auf die unterschiedlichen Spaltungsmuster der *endo*-Xylanasen zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz zu XYL₁₀ setzt XYL₁₁ aus den UBS von Getreide erhöhte Mengen an X₄, das zwei 1,4-glykosidisch gebundene uXylp-Einheit enthält, frei (vgl. Kapitel 4.2.3). Zudem wurden beim enzymatischen Verdau mit XYL₁₁ bevorzugt AXOS wie XA³XX bzw. XA²⁺³XX freigesetzt, deren zweite Xylp-Einheit ausgehend vom reduzierenden Ende unsubstituiert vorliegt. Idealerweise sollte der ermittelte Anteil der Summe an terminalen, (un-)substituierten Xylp-Einheiten sowie der Anteil an reduzierenden Enden in den freigesetzten (A)XOS vergleichbar sein. Mit Ausnahme der XYL₁₀-Hydrolysate der Weizen- und Emmer-UBS, bei denen größere Abweichungen auftreten, trifft dies bei allen Getreidearten annähernd zu. Größere Differenzen können auf eine Über- oder Unterbestimmung eines einzelnen Strukturelements hindeuten. Beispielsweise könnte eine vorliegende Acetylierung der terminalen, (un-)substituierten Xylp-Einheiten (vgl. Kapitel 1.2.2.1) zu einer Verschiebung der Kreuzsignale im HSQC-Spektrum führen, wonach diese durch die Markersignale der terminalen uXylp- sowie dXylp-Einheiten nicht vollständig erfasst werden können.

Obwohl bei der NMR-spektroskopischen Profilingmethode lediglich Strukturelemente enzymatisch abbaubarer Bereiche der AX bestimmt werden und freigesetzte FAXOS aufgrund der chromatographischen Trennung nicht berücksichtigt werden, sind die Ergebnisse mit den Daten der Methylierungsanalyse vergleichbar (vgl. Tabelle 7). Demnach weisen die ermittelten Anteile in Weizen- oder Emmer-UBS ein weitgehend ausgeglichenes Verhältnis von O3-monosubstituierten und dXylp-Einheiten in den (A)XOS auf, was sich ebenfalls in den molaren Anteilen der entsprechenden PMAA widerspiegelt. Auch das häufige Vorkommen einer O3-Monosubstitution in den aus Roggen-UBS freigesetzten AXOS (XYL₁₀: 18,5 mol%; XYL₁₁: 11,7 mol%) korreliert mit dem erhöhten Anteil des entsprechenden PMAA (16,4 mol%). Dennoch scheinen dXylp-Einheiten vermehrt in den enzymatisch weniger zugänglichen Bereichen der AX in den Roggen-UBS vorzuliegen. In der Methylierungsanalyse wurde für Roggen-UBS ein Anteil von 12,2 mol% an PMAA aus dXylp-Einheiten bestimmt, der deutlich über den aus dem HSQC-Profilung abgeleiteten Gesamtanteilen liegt (3,2 mol% für XYL₁₀ bzw. 2,2 mol% für XYL₁₁). Als mögliche Ursachen für die größere Abweichung kommen neben einer eingeschränkten enzymatischen Zugänglichkeit der AX auch eine Untermethylierung während der Probenaufarbeitung im Rahmen der Methylierungsanalyse in Betracht. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für die AX in den Gersten-UBS. Trotz eines erhöhten Anteils an 1,2,4-Xylp in der Methylierungsanalyse (5,6 mol%) ließ sich in der HSQC-Analyse der Gersten-UBS keine O2-Monosubstitution in den AXOS nachweisen. Damit wird die aus dem chromatographischen (A)XOS-Profilung abgeleitete Hypothese gestützt, dass O2-monosubstituierte Xylp-Einheiten in Gersten-AX vorwiegend in enzymatisch unzugänglichen Bereichen lokalisiert sind. Dennoch konnten im XYL₁₀-Hydrolysat der Gersten-UBS geringe Anteile an A²XX mittels HPAEC-PAD nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.2.3), dessen Signale im entsprechenden HSQC-Spektrum jedoch nicht beobachtet wurden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3.5.2 Lösliche Ballaststoffe

Neben den UBS verschiedener Getreidearten wurde die HSQC-Profilierungsmethode auch auf die enzymatischen Hydrolysate der LBS nach einer 50%-Ethanol-fällung angewendet. In den LBS-Hydrolysaten treten neben den durch XYL₁₀ und XYL₁₁ freigesetzten (A)XOS und FAXOS auch zahlreiche weitere niedermolekulare, lösliche Verbindungen auf. Folglich sind die entsprechenden HSQC-Spektren durch eine hohe Anzahl an Signalen gekennzeichnet. In Abbildung 39 ist beispielhaft das HSQC-Spektrum des XYL₁₀-Hydrolysats der Emmer-LBS mit den dazugehörigen Markersignalen der (A)XOS dargestellt.

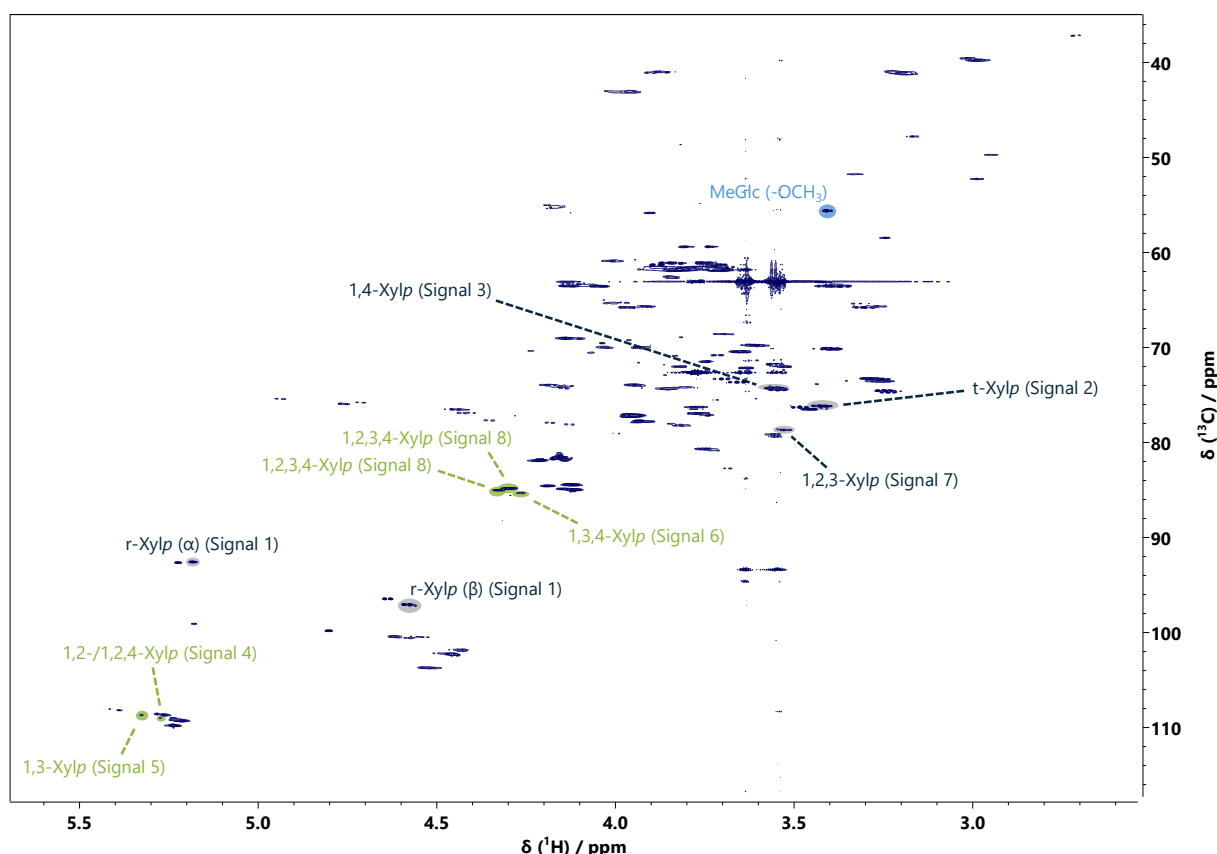


Abbildung 39: HSQC-Spektrum des enzymatischen Hydrolysats von löslichen Emmerballaststoffen nach Behandlung mit einer *endo*- β -1,4-Xylanase der GH-Familie 10 und anschließender 50 %-Ethanol-fällung (v/v). Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und gegen die chemische Verschiebung des Acetonsignals ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm) kalibriert. Markersignale von Positionen in Arabinofuranose-Einheiten sind grün, die von Xylopyranose-(Xylp-)Einheiten schwarz markiert. Die Bezeichnungen der Markersignale entsprechen denen in Tabelle 8. Das Referenzsignal der internen Standardsubstanz Methyl- α -D-Glucopyranosid (MeGlc) ist zusätzlich blau hervorgehoben.

Da hier keine vorherige Trennung der (A)XOS und FAXOS stattgefunden hat, sollten die Signale freigesetzter FAXOS aus den LBS ebenfalls im Spektrum zu sehen sein. Jedoch konnten weder in den XYL₁₀- noch in den XYL₁₁-Hydrolysaten der LBS Markersignale für FS-haltige Seitenketten beobachtet werden. Zwar traten in einzelnen Hydrolysaten Kreuzsignale im Bereich von $\delta_{H/C} = 6,5 - 8,0/110 - 135$ ppm auf, diese ließen sich jedoch nicht eindeutig den

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

Signalen einer estergebundenen *trans*-FS zuordnen. Auch das charakteristische und intensive Kreuzsignal der Methoxygruppe der *trans*-FS bei etwa $\delta_{H/C} = 3,85 - 3,92/56,00 - 57,00$ ppm konnte nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Konzentration der enthaltenen FAXOS für eine NMR-spektroskopische Analyse zu gering war oder dass durch die XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolyse der LBS keine FAXOS freigesetzt wurden. Möglicherweise weisen die mit FA-Seitenketten substituierten Bereiche der AX aus den LBS zusätzliche eine hohe Substitution mit Araf-Einheiten auf, wodurch keine ausreichenden Spaltstellen für XYL₁₀ oder XYL₁₁ vorhanden sind. Allerdings konnten in den HSQC-Spektren der LBS-Hydrolysate die Markersignale der (A)XOS identifiziert und die Strukturelemente in den (A)XOS mit Hilfe der RRF semiquantitativ bestimmt werden.

Tabelle 8 zeigt die molaren Verhältnisse der einzelnen Strukturelemente in den aus LBS freigesetzten (A)XOS nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁. Im Vergleich zu den UBS kommen in den XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolysaten der LBS vermehrt AXOS vor (vgl. Kapitel 4.2.3). Demzufolge sind in den LBS-Hydrolysaten eine geringere Anzahl an uXylp-Einheiten vorzufinden (XYL₁₀: 49,6 - 64,7 mol%; XYL₁₁: 54,1 - 63,9 mol%). In Analogie zu den UBS zeichnen sich die durch XYL₁₁ freigesetzten (A)XOS durch einen höheren Anteil an 1,4-Xylp (21,0 - 27,1 mol%) im Vergleich zu den durch XYL₁₀ freigesetzten (A)XOS (8,8 - 17,7 mol%) sowie durch eine geringe Anzahl an reduzierenden Enden aus. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der HPAEC-PAD/MS-Profilingmethode, wonach XYL₁₀ aufgrund der höheren Anzahl möglicher Spaltstellen ein größeres Spektrum an strukturell unterschiedlichen AXOS aus den LBS freisetzt als XYL₁₁. Folglich ist der relative Anteil der reduzierenden Xylp-Einheit im Vergleich zu anderen Strukturmerkmalen nach Hydrolyse mit XYL₁₀ höher als nach Hydrolyse mit XYL₁₁. Auch in den (A)XOS der LBS-Hydrolysate lassen sich vergleichbare Werte für die Summe terminaler, (un-)substituierter Xylp-Einheiten und für den Anteil reduzierender Enden feststellen. Darüber hinaus zeigen die mittels HSQC-Profilingmethode nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁ ermittelten Anteile der O3-monosubstituierten Xylp- und der dXylp-Einheiten eine gute Übereinstimmung untereinander. Da die HSQC-Profilingmethode auch höhermolekulare bzw. höhersubstituierte AXOS erfasst und durch die 50 %-Ethanol-fällung lediglich ein kleiner Teil des hydrolysierten AX nicht im HSQC-Spektrum abgebildet wird, spiegeln die relativen Verhältnisse der Strukturmerkmale in den LBS die Ergebnisse der Methylierungsanalyse noch deutlicher wider. Lediglich im Roggenhydrolysat konnten größere Abweichungen zwischen dem ermittelten Anteil der O3-monosubstituierten Xylp (XYL₁₀: 39,4 mol%; XYL₁₁: 41,1 mol%) und dem Anteil des PMAA von 1,3,4-Xylp (31,5 mol%) festgestellt werden. Gleichzeitig wurde in den Roggen-LBS im Vergleich zur Methylierungsanalyse ein geringerer Anteil an dXylp-Einheiten nachgewiesen. Möglicherweise kam es auch hier zu einer Untermethylierung des Probenmaterials im Zuge der Methylierungsanalyse, die infolgedessen zu einer Überbestimmung des Anteils an dXylp-Einheiten geführt haben könnte.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 8: Molare Anteile (mol%, n = 2) der in den löslichen Ballaststoffen von Getreide vorkommenden Strukturelemente von (Arabino-)Xylooligosacchariden nach enzymatischer Hydrolyse mit *endo*- β -1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁). Die Bezeichnung der Strukturelemente orientiert sich an der der partiell methylierten Alditolacetate (PMAA), deren molare Anteile (mol%, n = 2) ebenfalls angegeben sind. Xylp, Xylopyranose; r, reduzierend; t, terminal; Σ , Summe der molaren Anteile

Signal	Strukturelement	Weizen		Roggen		Emmer		Gerste	
		XYL ₁₀	XYL ₁₁	XYL ₁₀	XYL ₁₁	XYL ₁₀	XYL ₁₁	XYL ₁₀	XYL ₁₁
1	r-Xylp ($\alpha+\beta$)	33,6	23,5	24,4	12,8	25,2	19,4	29,7	21,7
2	t-Xylp	22,1	19,4	16,4	14,2	15,5	15,6	12,8	10,3
3	1,4-Xylp	9,0	21,0	8,8	27,1	17,7	22,6	17,0	24,8
	Σ r-, t-, 1,4-Xylp	64,7	63,9	49,6	54,1	58,4	57,6	59,5	56,8
4	1,2-/1,2,4-Xylp	1,1	-	1,2	-	2,0	-	3,7	2,7
5	1,3-Xylp	6,5	-	12,2	-	2,8	-	5,0	-
6	1,3,4-Xylp	8,0	13,6	27,2	41,1	4,0	5,9	4,3	6,0
	Σ 1,3-/1,3,4-Xylp	14,5	13,6	39,4	41,1	6,8	5,9	9,3	6,0
7	1,2,3-Xylp	2,6	-	0,6	-	4,5	-	5,3	-
8	1,2,3,4-Xylp	17,0	22,5	8,6	4,8	28,2	36,5	22,2	34,5
	Σ 1,2,3/1,2,3,4-Xylp	19,6	22,5	9,2	4,8	32,7	36,5	27,5	34,5
PMAA	t-Xylp	2,5		1,3		2,6		2,1	
	1,4-Xylp	65,7		50,2		56,0		58,7	
	1,2,4-Xylp	1,7		2,0		2,7		3,7	
	1,3,4-Xylp	10,2		31,5		8,8		7,5	
	1,2,3,4-Xylp	19,9		15,0		29,8		28,1	

Abschließend kann festgehalten werden, dass die entwickelte HSQC-Profilierungsmethode zur semiquantitativen Bestimmung der Strukturmerkmale in enzymatisch freigesetzten (A)XOS aus unlöslichen sowie Getreide-LBS geeignet ist. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den molaren Verhältnissen der Strukturmerkmale nach XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolyse. Bei genauerer Betrachtung traten auch Unterschiede zwischen den Hydrolyseprodukten beider Xylanasen hervor. Jedoch standen die ermittelten Anteile der verschiedenen Strukturmerkmale im Einklang mit den dominierenden (A)XOS-Strukturen, die durch die HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode wurden. Die HSQC-Profilierungsmethode erwies sich insbesondere für die Untersuchung der Strukturmerkmale in LBS als vorteilhaft. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass in dieser Fraktion ein größerer Anteil der AX in gelöster Form vorliegt, wodurch auch strukturelle Bereiche erfasst werden können, die enzymatisch nur begrenzt zugänglich sind. Bei den UBS hingegen stellt die eingeschränkte enzymatische Zugänglichkeit der AX einen limitierenden Faktor dar, wonach die AX nicht vollständig hydrolysiert und in Lösung überführt werden können. Im Hinblick auf den erforderlichen Arbeitsaufwand erweist sich die HSQC-Profilierungsmethode dennoch als wertvolle Alternative zur Methylierungsanalyse, da sie in kurzer Zeit Einblicke in das Vorkommen verschiedener Bindungspositionen innerhalb der AX ermöglicht.

4.3 NMR-spektroskopisches Profiling von Strukturelementen in Arabinoxylanen

4.3.5.3 Qualitative Analyse ferulasäurehaltiger Arabinoxylooligosaccharide aus unlöslichen Weizenballaststoffen

Zur Identifizierung verschiedener FA- bzw. FAX-Seitenketten in den HSQC-Spektren der aus Getreide-UBS durch XYL_{10} - bzw. XYL_{11} -Hydrolyse freigesetzten FAXOS wurden die in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Markersignale herangezogen. Außerdem wurde überprüft, ob Strukturelemente der (A)XOS durch entsprechende Markersignale im HSQC-Spektrum der FAXOS nachweisbar sind. Im Folgenden wird dies am Beispiel der FAXOS aus Weizen-UBS erklärt. Abbildung 40 zeigt das HSQC-Spektrum der im XYL_{10} -Hydrolysat enthaltenen FAXOS.

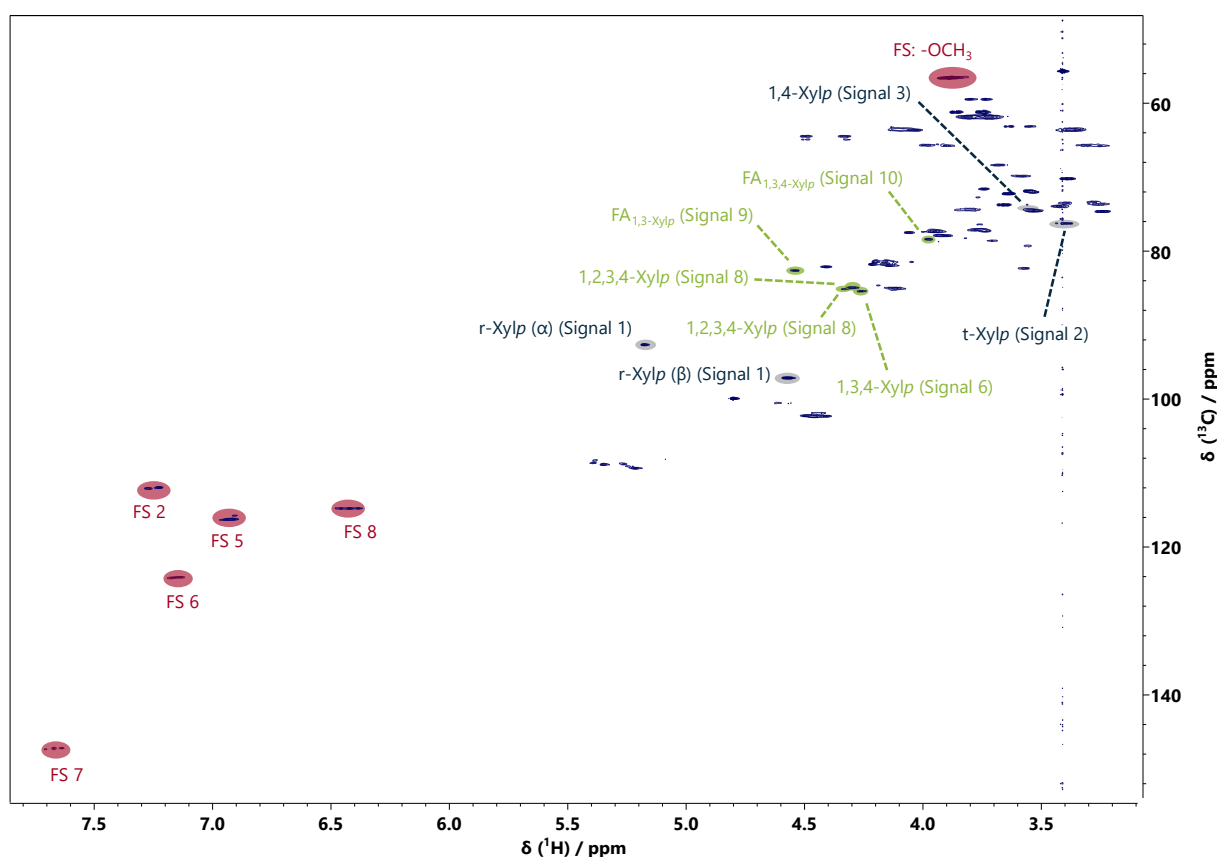


Abbildung 40: HSQC-Spektrum der aus unlöslichen Weizenballaststoffen durch enzymatische Hydrolyse mit der GH10-Xylanase freigesetzten ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharide. Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und gegen die chemische Verschiebung des Acetonsignals ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm) kalibriert. Die zugeordnete Markersignale der verschiedenen Strukturelemente sind farblich markiert. Dabei sind die Signale von Arabinofuranose-Einheiten in grün, diejenigen von Xylopyranosen (Xylp)-Einheiten schwarz hervorgehoben. Die Kreuzsignale der ester gebundenen *trans*-Ferulasäuren (FS) sind ebenfalls farblich (rot) markiert. Bei den Bezeichnungen der Markersignale einer FA-Seitenkette wurde der Bindungstyp der dazugehörigen Xylp zusätzlich im Subskript angegeben.

Die chemischen Verschiebungen der FS-Signale deuten darauf hin, dass, im Rahmen der Nachweisempfindlichkeit der HSQC-Profilierungsmethode, die FAXOS ausschließlich *trans*-konfigurierte FS-Substituenten aufweisen. Im Einklang dazu ist im HSQC-Spektrum auch kein Markersignal (Signal 13) für *cis*-konfigurierte FS am terminalen, nicht-reduzierenden Ende zu erkennen. Während in den durch XYL_{10} freigesetzten FAXOS sowohl FA-Seitenketten am

4 Ergebnisse und Diskussion

terminalen Ende (Signal 9) als auch im Inneren des Xyloserückgrats (Signal 10) auftreten, enthalten die im XYL₁₁-Hydrolysat vorkommenden FAXOS ausschließlich FA-Seitenketten (s. Abbildung A35 im Anhang), die an eine innere Xylp-Einheit gebunden sind. Die Markersignale für eine FA-Seitenkette in Nachbarschaft zu einer O3-monosubstituierten Xylp- (Signal 11) bzw. dXylp-Einheit (Signal 12) ließen sich dagegen in den HSQC-Spektren der FAXOS aus den XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolysaten der Weizen-UBS nicht nachweisen. In Kapitel 1.2.2.3 wurde bereits erwähnt, dass in AX aus Weizenkleie und mehrjährigem Weizengras mXylp-Einheiten in direkter Nachbarschaft zu mit FA-Seitenketten substituierten Xylp-Einheiten vorkommen können, wenngleich Weizengras zwar eng mit dem heutigen Weichweizen verwandt ist, jedoch einer anderen Gattung (*Thinopyrum*) angehört (Schendel *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2016b). Des Weiteren konnte keine FAX-Seitenkette in den FAXOS identifiziert werden. Dies könnte auf das geringe Vorkommen von FAX-Seitenketten in Weizen-UBS zurückzuführen sein (vgl. Tabelle 1 in Kap. 1.2.2.3). Zwar wurde beispielsweise XD^{2,5f3}XX als Hydrolyseprodukt der XYL_{ABV} aus Mais-UBS isoliert und strukturell bestätigt (vgl. Kapitel 4.1.5), jedoch bedeutet dies nicht, dass identische oder dazu vergleichbare Strukturen auch durch XYL₁₀ bzw. XYL₁₁ freigesetzt werden können. Zudem unterscheidet sich die AX-Struktur in Weizen deutlich von der in Mais (vgl. Kapitel 1.2.1 und 1.2.2.3). Sowohl die durch XYL₁₀ als auch die durch XYL₁₁ freigesetzten FAXOS weisen ein intensives Markersignal (Signal 2) für eine terminale uXylp-Einheit auf. Dies steht im Einklang mit den bisher beschriebenen Ergebnissen zu den Hydrolyseprodukten der XYL₁₀ und XYL₁₁, wonach XYL₁₁ ausschließlich AXOS mit uXylp am terminalen, nicht-reduzierenden Ende freisetzen, während XYL₁₀ auch solche mit substituiertem Ende bilden. Die entsprechenden Markersignale für eine dXylp oder mXylp am terminalen Ende konnten jedoch im HSQC-Spektrum der FAXOS aus dem XYL₁₀-Hydrolysat nicht nachgewiesen werden, wonach sich eine mögliche Substitution der tXylp-Einheit auf die FA-Seitenkette beschränkt. Darüber hinaus weisen die FAXOS im XYL₁₁-Hydrolysat (s. Abbildung A35) ein intensiveres Markersignal (Signal 3) für 1,4-glykosidisch gebundene uXylp-Einheiten auf. Sowohl durch XYL₁₀ als auch durch XYL₁₁ wurden FAXOS freigesetzt, die O3-monosubstituierte (Signal 6) sowie dXylp-Einheiten (Signal 8) im Inneren des Rückgrats enthalten. Im XYL₁₀-Hydrolysat (s. Abbildung 40) wurde zudem eine Verschiebung des Markersignals der dXylp-Einheiten (Signal 8) beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass in den durch XYL₁₀ freigesetzten FAXOS-Strukturen sowohl interne dXylp-Einheiten in Nachbarschaft zu uXylp- und/oder O3-monosubstituierten Xylp-Einheiten als auch zu weiteren dXylp-Einheiten vorkommen. Da keine mit FA-Seitenketten substituierten Xylp-Einheiten in unmittelbarer Nachbarschaft zu mXylp- oder dXylp-Einheiten nachgewiesen wurden, ist anzunehmen, dass die mit Araf substituierten Xylp-Einheiten im Rückgrat der FAXOS mindestens durch eine unsubstituierte Xylp von der FA-substituierten Monomereinheit getrennt sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Markersignale zur strukturellen Charakterisierung der FAXOS in Getreidehydrolysaten nach vorheriger chromatographischer Abtrennung der (A)XOS geeignet sind. Dementsprechend

konnten einige der Strukturmerkmale der isolierten AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen in den von XYL₁₀ und XYL₁₁ aus Getreide-BS freigesetzten Strukturen wiedergefunden werden. Zwar können allgemeine Aussagen über die Positionen der FA-Seitenketten oder Araf-Substituenten getroffen werden, jedoch ist für eine detaillierte Bestimmung der Substituentenverteilung sowie für eine zuverlässige Quantifizierung der Strukturmerkmale die Isolierung der entsprechenden FAXOS-Standardsubstanzen notwendig. In der Praxis ist dies aufgrund der geringen enzymatischen Freisetzung dieser Strukturen meist nur schwer realisierbar.

4.4 Zusammenfassende Diskussion

Für die Analyse der in verschiedenen getreidebasierten Ausgangsmaterialien enthaltenen PS-Strukturen wurden konventionelle Verfahren wie die Monosaccharid- und Methylierungsanalyse eingesetzt. Die untersuchten Materialien dienten als Ausgangspunkt für die Isolierung von (A)XOS- und FAXOS-Standardsubstanzen, welche die Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Profilingmethoden zur strukturellen Charakterisierung von AX bildeten. Trotz einer nachgewiesenen geringen Substitution mit Araf wurde das kommerzielle AX-Präparat aus Weizenmehl als geeignetes Ausgangssubstrat für die Freisetzung von AXOS mit Hilfe von *endo*- β -1,4-Xylanasen befunden, da es eine hohe Reinheit und Löslichkeit aufwies sowie enzymatisch gut zugänglich war. Während sich das Vorkommen FS-haltiger Seitenketten in Roggen-UBS überwiegend auf FA beschränkt (Schendel *et al.*, 2016a), treten in Mais-UBS auch erhöhte Anteile an komplexeren FS-haltigen Seitenkettenstrukturen auf. Aus diesem Grund wurden die UBS beider Getreidearten zur Isolierung von FAXOS-Standardsubstanzen genutzt. Im Gegensatz zu Roggen-UBS war jedoch bei den Mais-UBS eine Vorhydrolyse mit TFA notwendig, um die darin enthaltenen AX enzymatisch zugänglich zu machen. Durch die Charakterisierung der AX-Struktur vor und nach milder TFA-Hydrolyse der Mais-UBS konnte eine deutliche Abnahme der Substitution mit Ara, insbesondere der O3-gebundenen Araf-Einheiten, festgestellt werden. Darüber hinaus gaben die Daten der Methylierungsanalyse Hinweise auf einen möglichen Abbau komplexer, FS-haltiger Seitenketten. Neben AX wurden sowohl in den Roggen- als auch in den Mais-UBS höhere Anteile an Cellulose sowie geringere Mengen an weiteren Hemicellulosen, beispielsweise Mannanen, und Pektinen nachgewiesen.

Durch die enzymatische Hydrolyse des kommerziellen AX-Präparats aus Weizenmehl mit Hilfe spezifischer *endo*- β -1,4-Xylanasen, die unterschiedlichen GH-Familien (XYL₁₀ und XYL₁₁) angehören, wurden im präparativen Maßstab AXOS freigesetzt. Die Isolierung und Aufreinigung der AXOS-Standardsubstanzen erfolgte chromatographisch unter Einsatz mehrerer Trennmethode, darunter eine BioGel-P-2-basierte SEC sowie semipräparative HPLC. Während die SEC lediglich eine Vorfraktionierung der AXOS nach ihrem DP bzw. hydrodynamischen Volumen ermöglichte, konnte durch die kombinierte Anwendung von

4 Ergebnisse und Diskussion

HILIC- und PGC-Phasen ein Großteil der AXOS in ausreichenden Mengen isoliert und aufgereinigt werden. In Einzelfällen wurde zusätzlich die semipräparative HPAEC eingesetzt, die aufgrund des erhöhten Kosten- und Arbeitsaufwands selten in der Isolierung von Standardsubstanzen aus pflanzlichen Zellwandmaterialien zum Einsatz kommt. Aufgrund ihrer höheren Trennschärfe eignete sich die semipräparative HPAEC besonders für die Fraktionierung zeitlich eng eluierender AXOS-Standardsubstanzen, die auf HILIC- und PGC-Phasen keine ausreichende Trennung aufwiesen. Auf diese Weise konnten neben den bereits fünf kommerziell erhältlichen AXOS-Standardsubstanzen neun weitere AXOS-Standardsubstanzen aus dem XYL₁₀- und XYL₁₁-Hydrolysat des Weizen-AX isoliert und strukturell charakterisiert werden. Anhand der isolierten AXOS-Standardsubstanzen konnte gezeigt werden, dass Weizen-AX auch höher substituierte Bereiche aufweisen, die in gewissem Umfang durch die eingesetzten *endo*- β -1,4-Xylanasen XYL₁₀ und XYL₁₁ hydrolysiert werden konnten (s. Abbildung 41A). Folglich werden auch Bereiche der AX mit aufeinanderfolgenden mXylp- und/oder dXylp-Einheiten abgebaut, sofern gleichzeitig eine ausreichende Anzahl an uXylp-Einheiten zur Spaltung vorhanden ist (Biely *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010). Obwohl die isolierten AXOS bereits in früheren Studien in enzymatischen Hydrolysaten von Weizen-AX identifiziert wurden (Gruppen *et al.*, 1992c; McCleary *et al.*, 2015), konnten sie im Rahmen dieser Arbeit in größeren Mengen isoliert und durch die Anwendung massenspektrometrischer Methoden sowie ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente umfassend charakterisiert werden. In Kombination mit den NMR-Daten kommerzieller (A)XOS-Standardsubstanzen wurden vollständige ¹H- und ¹³C-NMR-Datensätze zu verschiedenen in AX vorkommenden Strukturelementen erhalten, welche eine zentrale Voraussetzung für die Entwicklung der HSQC-Profilierungsmethode darstellten.

Bei der chromatographischen Isolierung der FAXOS-Standardsubstanzen erwies sich die Cellulase-Nebenaktivität der eingesetzten Driselase-Mischung sowie der XYL_{ABV} als vorteilhaft, da sie zu einer höheren Ausbeute an FAXOS führte, ohne die Aufreinigung durch freigesetzte Nebenprodukte in stärkerem Ausmaß zu beeinträchtigen. Anhand der isolierten und strukturell charakterisierten FAXOS-Standardsubstanzen konnten Rückschlüsse auf die Spaltmuster der eingesetzten *endo*- β -1,4-Xylanasen gezogen werden. Neben den bereits bekannten FAXOS wurden auch neue Strukturen identifiziert, bei denen mit FA-Seitenketten substituierte Monomereinheiten direkt benachbart zu dXylp-Einheiten auftreten (s. Abbildung 41B). Aufgrund der Vorhydrolyse der Mais-UBS lassen sich die daraus isolierten FAXOS-Standardsubstanzen jedoch nicht auf die Struktur des nativen Polymers zurückführen. Dennoch lieferte die NMR-spektroskopische Charakterisierung wertvolle ¹H- und ¹³C-Datensätze zu den in AX vorkommenden FAX-Seitenketten sowie zu einer möglichen O₂-Acetylierung der Araf-Einheit in den FS-haltigen Seitenketten (s. Abbildung 41C).

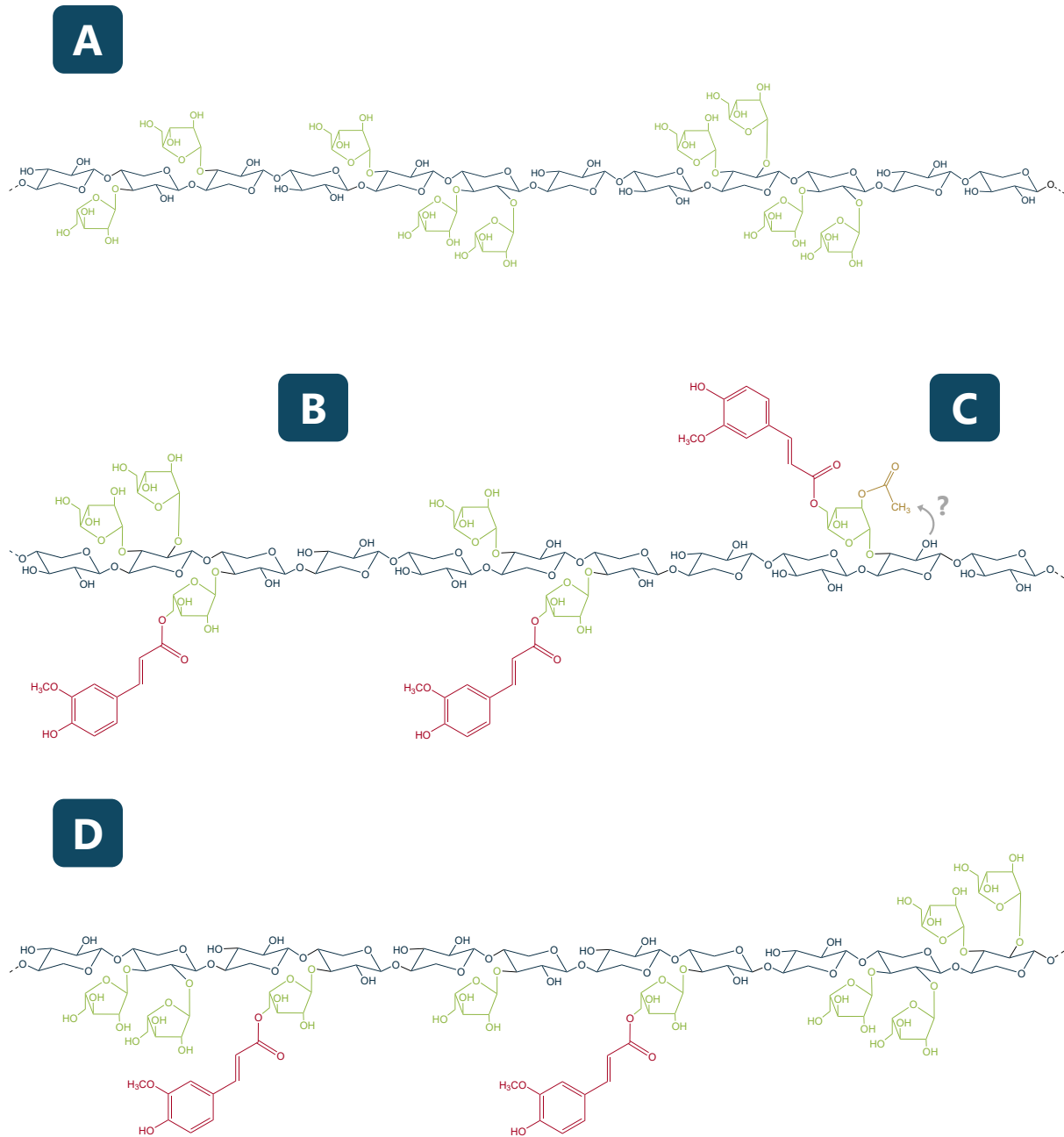


Abbildung 41: In dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse zur Struktur von Arabinoxylanen (AX). A: Die entwickelten Profilingmethoden ermöglichten Einblicke in höhersubstituierte Bereiche der AX verschiedener Getreidearten mit aufeinanderfolgenden O3-monosubstituierten und/oder disubstituierten Xylopyranose (Xylp)-Einheiten. B: Aus Roggen isolierte ferulasäurehaltige Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen zeigten, dass 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (FA)-Seitenketten auch in direkter Nachbarschaft zu mono- oder disubstituierten Xylp-Einheiten vorkommen können. C: Acetylgruppen können in der O2-Position der zur FA-Seitenkette gehörenden Arabinofuranose-Einheit auftreten, möglicherweise infolge einer intramolekularen Umesterungsreaktion. D: In AX aus Weizen liegen FA-substituierte Xylp-Einheiten durch mindestens eine unsubstituierte Xylp-Einheit von substituierten Xylp-Einheiten getrennt vor. Zudem treten aufeinanderfolgende, disubstituierte Xylp-Einheiten in den FA-substituierten Bereichen der Weizen-AX auf.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die neu etablierte HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode erlaubt durch die semiquantitative Bestimmung von insgesamt 17 verschiedenen (A)XOS-Standardsubstanzen unter Verwendung ermittelter RRF einen schnellen und umfassenden Einblick in die Verteilung von Araf-Substituenten in AX aus verschiedenen Getreide-BS. Demnach konnten Unterschiede in der Feinstruktur der AX sowohl zwischen verschiedenen Getreidegattungen als auch zwischen Getreidearten nachgewiesen werden. Limitiert wird der Ansatz jedoch dadurch, dass ausschließlich niedermolekulare Produkte der enzymatischen Spaltung erfasst werden können. Die Analyse der entstehenden (A)XOS ermöglicht daher keine vollständige Abbildung der zugrunde liegenden Struktur der PS. Im Zuge der enzymatischen Hydrolyse der Getreide-BS zeigten sich deutliche Unterschiede in den durch XYL₁₀ und XYL₁₁ freigesetzten Mengen an (A)XOS. Zudem bilden die eingesetzten (A)XOS-Standardsubstanzen nahezu ausschließlich Strukturen mit O3-monosubstituierten Xylp- und/oder dXylp-Einheiten ab (s. Abbildung 41A). Daher können insbesondere bei der Analyse von Getreidearten mit erhöhter O2-Monosubstitution, beispielsweise Gerste, Strukturen auftreten, die von der Profilingmethode nicht erfasst werden. Durch die optionale MS-Kopplung können unbekannte, im Hydrolysat vorkommende Verbindungen hinsichtlich ihrer Molekülmasse charakterisiert werden. Aufgrund der alkalischen Bedingungen der HPAEC werden Strukturen, die Substitutionen mit Acetyl- oder FS-Resten aufweisen, nicht direkt erfasst, sondern nur indirekt über die (A)XOS, die nach Abspaltung der estergebundenen Substituenten vorliegen. Die für das qualitative HSQC-Profilierung der freigesetzten FAXOS adaptierte chromatographische Trennmethode auf Basis einer Phenyl-Hexyl-Säule könnte auch dafür genutzt werden, um FAXOS-Strukturen mittels HPAEC-PAD/MS zu analysieren (Junker & Bunzel, 2024). Dies setzt jedoch voraus, dass die Strukturen, die nach der Abtrennung der FS-Substituenten vorliegen, weitestgehend durch die eingesetzten AXOS repräsentiert werden. Mit Ausnahme der FAXOS-Strukturen $XA^{2+3}A^{5f3}X$ und $XD^{2,5f3}XX$ steht für jede isolierte FAXOS-Standardsubstanz eine entsprechende FS-freie AXOS-Standardsubstanz zur Verfügung, wodurch eine Analyse mittels HPAEC-PAD/MS möglich wäre.

Im Gegensatz zum chromatographischen Ansatz werden durch die entwickelte HSQC-basierte Profilingmethode die Strukturelemente aller gelösten OS erfasst. Dies ist möglich, da für jedes einzelne Strukturelement ein spezifisches Markersignal in den NMR-Datensätzen der (A)XOS-Standardsubstanzen identifiziert werden konnte. Bei der Auswahl der Markersignale wurde darauf geachtet, dass keine Überlappung mit anderen vorkommenden Signalen auftreten. Eine Beeinflussung der Markersignale durch benachbarte Signale konnte jedoch trotz erhöhter Inkrementzahl in der indirekten Dimension nicht immer vollständig ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden in den enzymatischen Hydrolysaten Signale beobachtet, deren ¹H- und ¹³C-chemische Verschiebungen einzelnen Markersignalen ähnelten, sich jedoch anhand der verfügbaren NMR-Datensätze der (A)XOS-Standardsubstanzen keinem spezifischen Strukturelement eindeutig zuordnen ließen. Möglicherweise handelt es sich dabei um strukturell verwandte, bislang nicht charakterisierte (A)XOS-Strukturen. Insbesondere der

Einfluss benachbarter O²-monosubstituierter Xylp-Einheiten sowie von Acetylgruppen lässt sich ohne entsprechende Standardsubstanzen lediglich vermuten. Daher ist davon auszugehen, dass die ausgewählten Markersignale zwar nicht alle Strukturelemente des AX repräsentieren, jedoch die dominierenden Einheiten abbilden. Die ermittelten RRF in Bezug zu einem Referenzsignal einer ISt ermöglichten eine semiquantitative Abschätzung des Vorkommens der verschiedenen Strukturelemente im enzymatischen Hydrolysat. Obwohl die Profilingmethode eine ausreichende Präzision und Reproduzierbarkeit aufwies, kam es insbesondere bei der Bestimmung selten vorkommender Strukturelemente zu größeren Abweichungen. Um auch Signale, die sich nur schwach vom Rauschen abheben, zuverlässig zu erfassen, sollte das HSQC-Experiment daher stets mit einer angemessenen Anzahl an Scans durchgeführt werden. Die ermittelten Anteile der Strukturelemente zeigten eine gute Übereinstimmung mit den dominanten (A)XOS-Strukturen, die mittels HPAEC-PAD/MS nachgewiesen wurden. Beide Methoden stellen eine ideale Ergänzung dar und liefern somit ein möglichst umfassendes Bild zur Position und Verteilung von Araf-Substituenten in AX. Während die HPAEC-PAD/MS vor allem lineare und enzymatisch gut zugängliche Bereiche der AX erfasst, erlaubt die 2D-NMR-Spektroskopie zusätzlich die Identifizierung stärker verzweigter und enzymatisch weniger zugänglicher Regionen, sofern diese infolge der enzymatischen Hydrolyse in Lösung übergehen.

Die qualitative HSQC-Analyse der nach enzymatischer Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁ aus Weizen-UBS freigesetzten FAXOS lieferte neue Strukturinformationen. Demnach treten sowohl mXylp- als auch dXylp-Einheiten in FA-substituierten Bereichen der Weizen-AX auf. Die im Rahmen dieser Arbeit aus Roggen-UBS isolierten FAXOS-Standardsubstanzen XA²⁺³A^{5f3}X und XA³A^{5f3}X konnten im enzymatischen Hydrolysat der Weizen-UBS nicht nachgewiesen werden. Demzufolge liegen die mXylp- und dXylp-Einheiten in mit FA-Seitenketten substituierten Bereichen der Weizen-AX stets durch mindestens eine uXylp-Einheit von der FA-substituierten Xylp-Einheit getrennt vor (s. Abbildung 41D). Nichtsdestotrotz ist das Strukturelement einer in Nachbarschaft zur FA-Seitenkette befindlichen O³-monosubstituierten Xylp-Einheit nicht ausschließlich in AX aus Roggen zu finden, sondern tritt auch in weiteren Vertretern der Süßgräser (Poaceae) auf, wie anhand isolierter FAXOS-Strukturen aus mehrjährigem Weizengras (*Thinopyrum intermedium*) gezeigt werden konnte (Schendel *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnten FAXOS-Strukturen mit aufeinanderfolgenden dXylp-Einheiten im enzymatischen Hydrolysat der Weizen-UBS mit Hilfe der HSQC-basierten Profilingmethode identifiziert werden (s. Abbildung 41D). Um künftig auch quantitative Aussagen über das Vorkommen dieser Strukturelemente in den FAXOS treffen zu können, ist die Isolierung und Charakterisierung weiterer Standardsubstanzen erforderlich.

Beim Vergleich der HPAEC-PAD/MS- und NMR-basierten Profilingansätze mit der Methylierungsanalyse müssen die methodischen Unterschiede und Einschränkungen der jeweiligen Verfahren berücksichtigt werden. Wie bereits erwähnt, werden bei den auf enzymatischer Hydrolyse basierenden Profilingmethoden ausschließlich jene Strukturelemente

4 Ergebnisse und Diskussion

der AX erfasst, die durch die eingesetzten Enzyme in lösliche OS überführt werden können. Bereiche des PS, die aufgrund ihrer Einbindung in die Zellwandmatrix oder einer besonders hohen strukturellen Komplexität enzymatisch nur schwer zugänglich sind, bleiben daher weitgehend unberücksichtigt. Ungeachtet der methodischen Unterschiede zeigten die entwickelten Profilingmethoden und die Methylierungsanalyse vergleichbare Tendenzen hinsichtlich der dominierenden Bindungspositionen in den AX der untersuchten Getreidearten. Insbesondere beim Vergleich des NMR-spektroskopischen Profilings von LBS-Hydrolysaten korrelierten die ermittelten Anteile eng mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse. Anders als bei der Analyse der UBS lagen in den LBS-Hydrolysaten auch jene Bereiche des AX, die stärker substituiert und daher enzymatisch nur schwer zugänglich sind, in Lösung vor und konnten von der NMR-Profilierungsmethode erfasst werden. Eine direkte Analyse der LBS ohne vorherige enzymatische Behandlung wäre grundsätzlich ebenfalls möglich, sofern eine ausreichende Solubilisierung der Polymere gewährleistet ist. Die Solubilisierung hoher PS-Konzentrationen in Deuteriumoxid geht jedoch mit einer deutlichen Erhöhung der Lösungsviskosität einher. Gleichzeitig führt die zunehmende Molekülgröße der PS zu einer reduzierten molekularen Beweglichkeit und damit zu veränderten Relaxationseigenschaften der Kernspins. Verkürzte transversale Relaxationszeiten (T_2) führen zu einer Signalverbreiterung und damit zu einer geringeren spektralen Auflösung. Vor diesem Hintergrund wurden die AX in den LBS ebenfalls einer enzymatischen Hydrolyse mit XYL₁₀ und XYL₁₁ unterzogen, um (A)XOS zu generieren, welche anschließend NMR-spektroskopisch analysiert wurden. Im Gegensatz zu den entwickelten, enzymatischen Profilingmethoden schließt die Methylierungsanalyse sämtliche PS der pflanzlichen Zellwand ein, wodurch neben AX auch andere Zellwand-PS, beispielsweise Hemicellulosen, in die strukturelle Betrachtung mit einbezogen werden. Gleichzeitig sind aufgrund der sauren Hydrolyse zu monomeren Bausteinen der PS auch hier Einschränkungen der Methode zu berücksichtigen, wonach beispielsweise keine Aussagen über die Verteilung der Araf-Substituenten gezogen werden können. Durch den enzymatischen Ansatz in den Profilingmethoden können beispielsweise Strukturelemente mit aufeinanderfolgenden mXylp- und/oder dXylp-Einheiten analysiert werden, was durch die Methylierungsanalyse nicht möglich ist. Zudem tritt insbesondere bei der Methylierungsanalyse von unlöslichem Zellwandmaterial häufig eine Untermethylierung des Probenmaterials auf, wodurch die ermittelten Anteile glykosidischer Bindungspositionen in den vorkommenden Zellwand-PS potenziell verfälscht werden können. Weitere Vorteile der entwickelten Profilingmethoden liegen in einem deutlich geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand sowie dem Verzicht auf gesundheitlich bedenkliche Chemikalien.

5 Zusammenfassung

Arabinoxylane (AX) zählen zu den dominierenden Polysacchariden in der pflanzlichen Zellwand von Getreide und tragen entscheidend zu deren mechanischen Stabilität und strukturellen Integrität bei. Die Struktur der AX basiert auf einem Xylopyranose (Xylp)-Rückgrat, an das in unterschiedlichen Positionen Arabinofuranose (Araf)-Einheiten gebunden sind. Darüber hinaus liegen die Araf-Einheiten partiell mit Ferulasäure verestert vor, wodurch kovalente Vernetzungen innerhalb der Zellwandmatrix ermöglicht werden, die wiederum maßgeblich zu den funktionellen Eigenschaften der AX beitragen. Neben ihrer Rolle in der pflanzlichen Zellwand besitzen AX zudem als Ballaststoffkomponenten eine hohe ernährungsphysiologische Relevanz. Hierbei ist insbesondere die präbiotische Wirkung der AX hervorzuheben, die eng mit der Struktur der AX zusammenhängt. Darüber hinaus nehmen AX Einfluss auf verschiedene Verarbeitungsprozesse während der Lebensmittelherstellung. Beispielsweise führt die hohe Wasserbindefähigkeit der AX zu einer erhöhten Teigviskosität und Gasretention während des Backprozesses, was sich wiederum positiv auf Brotvolumen und Krumenstruktur auswirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue analytische Verfahren entwickelt, die eine detaillierte Beschreibung der Feinstruktur der AX in Bezug auf Anzahl und Verteilung der Araf-Substituenten ermöglichen sollen. Hierbei beruhen die entwickelten Profilingmethoden auf einem enzymatischen Verdau der in Getreideballaststoffen vorkommenden AX mit Hilfe von *endo*-Xylanasen, die das Xylp-Rückgrat an spezifischen Positionen spalten. Durch die Analyse der dabei freigesetzten Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS) sowie – beim Vorkommen von Ferulasäure-Substituenten – der ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharide (FAXOS), können Rückschlüsse auf die native Struktur der AX gezogen werden.

Eine zentrale Voraussetzung für die Etablierung enzymatischer Profilingmethoden stellte die Gewinnung repräsentativer, kommerziell nicht verfügbarer AXOS- und FAXOS-Standardsubstanzen aus geeigneten, getreidebasierten Ausgangsmaterialien dar. Hierfür wurden ein kommerziell erhältliches und aufgereinigtes AX-Präparat zur Isolierung von AXOS sowie unlösliche Roggen- und Maisballaststoffe für die Isolierung von FAXOS ausgewählt. Zur Verbesserung der enzymatischen Zugänglichkeit wurden die Maisballaststoffe zuvor einer milden Säurehydrolyse unterzogen. Zur orientierenden Charakterisierung der in den eingesetzten Materialien vorkommenden Polysaccharidstrukturen wurde die Monosaccharidzusammensetzung mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD, engl. *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) sowie die Position und Verteilung der glykosidischen Bindungspositionen mittels Methylierungsanalyse bestimmt. So konnte beispielsweise für das AX-Präparat aus Weizenmehl ein niedriger Substitutionsgrad mit

5 Zusammenfassung

Araf-Einheiten sowie ein für Weizen-AX typisches, ausgeglichenes Verhältnis an mono- und disubstituierten Xylp-Einheiten nachgewiesen werden. Ebenso ließ sich eine Reduktion der Substitution mit Araf in den mit Säure vorbehandelten Mais-AX beobachten.

Mithilfe verschiedener *endo*-Xylanasen konnten aus den ausgewählten Ausgangsmaterialien im präparativen Maßstab AXOS und FAXOS gewonnen werden, die anschließend durch eine Kombination unterschiedlicher chromatographischer Trennmethoden isoliert und aufgereinigt wurden. Dabei wurde stets eine Vorfraktionierung der Substanzen mittels Größenausschlusschromatographie durchgeführt, während die anschließende Aufreinigung dieser Fraktionen über semipräparative Verfahren der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*) und HPAEC erfolgte. Auf diesem Wege konnten neun, nicht kommerziell erhältliche AXOS-Standardsubstanzen aus dem AX-Präparat sowie neun FAXOS-Standardsubstanzen aus den unlöslichen Roggen- und Maisballaststoffen isoliert werden. Durch Anwendung massenspektrometrischer (MS) Methoden sowie ein- und zweidimensionaler Kernspinresonanz (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)-Experimente wurden die Substanzen umfassend charakterisiert. Auch wenn die isolierten AXOS-Standardsubstanzen keine völlig unbekannten Strukturen widerspiegeln, erlaubt ihre Einbindung in die entwickelten Profilingmethoden künftig Rückschlüsse auf stärker substituierte Bereiche von AX. So konnten beispielsweise höhersubstituierte AXOS mit aufeinanderfolgenden mono- und disubstituierten Xylp-Einheiten gewonnen werden. Des Weiteren konnte durch die Isolierung einer entsprechenden FAXOS-Struktur aus unlöslichen Roggenballaststoffen erstmals gezeigt werden, dass disubstituierte Xylp-Einheiten auch in direkter Nachbarschaft zu einer Xylp-Einheit, die mit einer ferulasäurehaltigen Araf-Seitenkette substituiert ist, vorkommen können.

Unter Verwendung kommerziell erhältlicher und isolierter (A)XOS-Standardsubstanzen wurde eine HPAEC-PAD/MS-basierte Profilingmethode entwickelt, die neben einer Trennung der Analyten auch deren semiquantitative Bestimmung über relative Responsefaktoren ermöglichte. Durch enzymatische Hydrolyse von unlöslichen (UBS) und löslichen Ballaststoffen (LBS) aus verschiedenen *Triticum*-Arten sowie Getreide aus anderen Gattungen wie Roggen und Gerste wurden mit Hilfe der *endo*-Xylanasen (A)XOS freigesetzt, die anschließend mittels HPAEC-PAD analysiert wurden. Die zusätzliche MS-Kopplung ermöglichte die Bestimmung der Molekülmassen und diente der Absicherung der Analyten sowie der vorläufigen Identifizierung weiterer, bisher unbekannter (A)XOS. Die aus der semiquantitativen Bestimmung abgeleiteten Verhältnisse der (A)XOS erlaubten Aussagen über die Position und Verteilung der Araf-Substituenten sowie über die vorherrschenden Strukturelemente der AX in den UBS und LBS der verschiedenen Getreide.

Ein weiterer Ansatz für die Analyse der in AX vorkommenden Strukturelemente beruhte auf der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie. Das *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment, bei welchem Korrelationen zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen über eine Bindung gemessen werden, zeichnet sich durch eine erhöhte Signalauflösung im Vergleich zu

eindimensionalen NMR-Methoden aus. In den HSQC-Spektren der (A)XOS und FAXOS war es daher möglich, Korrelationssignale zu identifizieren, die ausschließlich ein bestimmtes Strukturelement der Oligosaccharide repräsentieren. Nach Korrektur der HSQC-Response konnten durch Volumenintegration der spezifischen Markersignale die relativen Anteile der Strukturelemente in enzymatischen Hydrolysaten von Getreideballaststoffen ermittelt werden. Die Quantifizierung basierte dabei ausschließlich auf den für (A)XOS bestimmten Markersignalen. Dadurch wurden auch im Hydrolysat vorkommende, höhermolekulare (A)XOS erfasst, sofern sie das entsprechende Strukturelement aufwiesen. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber chromatographischen Methoden wie der HPAEC-PAD dar, deren Anwendungsbereich größtenteils auf die niedermolekulare (A)XOS-Fraktion im enzymatischen Hydrolysat beschränkt ist. Für die qualitative Analyse der aus UBS freigesetzten FAXOS wurde zusätzlich eine HPLC-Methode etabliert, die eine separate Untersuchung der (A)XOS und FAXOS erlaubte. Die mit der HSQC-Profilingmethode ermittelten relativen Anteile der Strukturelemente in den (A)XOS aus UBS und LBS korrelierten mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse. Darüber hinaus ermöglichte die Profilingmethode die Identifizierung von Strukturelementen, die mit der Methylierungsanalyse nicht erfasst werden können.

Zusammenfassend erlauben die entwickelten Profilingmethoden eine schnelle und effiziente Analyse der AX-Strukturen in pflanzlichen Zellwänden von Getreide. Insbesondere im Hinblick auf die Substitution mit Araf-Einheiten liefern sie deutlich detailliertere Informationen als konventionelle Verfahren wie die Methylierungsanalyse, bei gleichzeitig vereinfachter Durchführung. Dadurch eröffnen sie neue Möglichkeiten, Zusammenhänge zwischen den AX-Strukturen verschiedener Getreidegattungen bzw. -arten und deren pflanzenphysiologischen, ernährungsphysiologischen sowie technologischen Eigenschaften zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Agger, J., Viksø-Nielsen, A., & Meyer, A. S. (2010).** Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6141-6148.
- Agrawal, P. K. (1992).** NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330.
- Aguedo, M., Fournies, C., Dermience, M., & Richel, A. (2014).** Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained. *Carbohydrate Polymers*, 105, 317-324.
- Akshatha, S., Gnanesh Kumar, B. S., Mazumder, K., & Eligar, S. M. (2024).** Structural characterization and bioactivities of maize bran feruloylated arabinoxylan and oligosaccharides obtained by a combined hydrothermal and enzymatic pre-treatment. *Food Bioscience*, 60, 104417.
- 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., Schatz, P. F., Gniechwitz, D., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2005).** Isolation and structural identification of di-arabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. *Phytochemistry*, 66(1), 113-124.
- Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2006).** Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry*, 67(12), 1276-1286.
- Anderson, C., & Simsek, S. (2019).** Mechanical profiles and topographical properties of films made from alkaline extracted arabinoxylans from wheat bran, maize bran, or dried distillers grain. *Food Hydrocolloids*, 86, 78-86.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009).** Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188-205.
- Andersson, A. A. M., Lampi, A.-M., Nyström, L., Piironen, V., Li, L., Ward, J. L., Gebruers, K., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Boros, D., Fraš, A., Dynkowska, W., Rakszegi, M., Bedő, Z., Shewry, P. R., & Åman, P. (2008).** Phytochemical and dietary fiber components in barley varieties in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9767-9776.
- Antoine, C., Peyron, S., Mabilhe, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., & Rouau, X. (2003).** Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2026-2033.
- 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.
- Appeldoorn, M. M., Kabel, M. A., Van Eylen, D., Gruppen, H., & Schols, H. A. (2010).** Characterization of oligomeric xylan structures from corn fiber resistant to pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11294-11301.
- Azuma, J.-i., Kato, A., Koshijima, T., & Okamura, K. (1990).** Arabinosylxylotriose mixedly esterified with acetic and ferulic acids from sugar cane bagasse. *Agricultural and biological chemistry*, 54(8), 2181-2182.
- Barghahn, S., Arnal, G., Jain, N., Petutschnig, E., Brumer, H., & Lipka, V. (2021).** Mixed linkage β -1,3/1,4-glucan oligosaccharides induce defense responses in *Hordeum vulgare* and *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 682439.
- Bauer, S. (2012).** Mass spectrometry for characterizing plant cell wall polysaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1-6.
- Bender, D., Nemeth, R., Wimmer, M., Götschhofer, S., Biolchi, M., Török, K., Tömösközi, S., D'Amico, S., & Schoenlechner, R. (2017).** Optimization of arabinoxylan isolation from rye bran by adapting extraction solvent and use of enzymes. *Journal of Food Science*, 82(11), 2562-2568.
- Benítez-Páez, A., Kjølbaek, L., Pulgar, E. M. G. d., Brahe, L. K., Astrup, A., Matysik, S., Schött, H.-F., Krautbauer, S., Liebisch, G., Boberska, J., Claus, S., Rampelli, S., Brigidi, P., Larsen, L. H., & Sanz, Y. (2019).** A multi-omics approach to unraveling the microbiome-mediated effects of arabinoxylan oligosaccharides in overweight humans. *mSystems*, 4(4), 1-16.
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012).** Quantitative ^1H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5-26.
- Bhattacharya, A., Ruthes, A., Vilaplana, F., Karlsson, E. N., Adlecreutz, P., & Stålbrand, H. (2020).** Enzyme synergy for the production of arabinoxyloligosaccharides from highly substituted arabinoxylan and evaluation of their prebiotic potential. *LWT - Food Science and Technology*, 131, 109762.
- Biely, P., Csiszárová, M., Uhliaríková, I., Agger, J. W., Li, X.-L., Eijssink, V. G. H., & Westereng, B. (2013).** Mode of action of acetylxylosterases on acetyl glucuronoxylan and acetylated oligosaccharides generated by a GH10 endoxylanase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(11), 5075-5086.
- Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016).** Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260-1274.
- Björndal, H., Hellerqvist, C. G., Lindberg, B., & Svensson, S. (1970).** Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 9(8), 610-619.
- Björndal, H., Lindberg, B., & Svensson, S. (1967).** Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydrate research*, 5(4), 433-440.

- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J., & Stone, B. A. (1983).** A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate research*, 113(2), 291-299.
- Bostock, M., & Nietlispach, D. (2017).** Compressed sensing: Reconstruction of non-uniformly sampled multidimensional NMR data. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 46(2), e21438.
- Bowman, M. J., Dien, B. S., Hector, R. E., Sarath, G., & Cotta, M. A. (2012).** Liquid chromatography–mass spectrometry investigation of enzyme-resistant xylooligosaccharide structures of switchgrass associated with ammonia pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation. *Bioresource Technology*, 110, 437-447.
- Braun, J. (2023).** Entwicklung einer NMR-spektroskopischen Screeningmethode für (Arabino)xylan-Oligosaccharide. Masterarbeit. *Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W., & Delcour, J. A. (2011).** Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-Oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(2), 178-194.
- Bubb, W. A. (2003).** NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: An Educational Journal*, 19(1), 1-19.
- Buksa, K., Ziobro, R., Nowotna, A., & Gambuś, H. (2013).** The influence of native and modified arabinoxylan preparations on baking properties of rye flour. *Journal of Cereal Science*, 58(1), 23-30.
- Bunzel, M. (2001).** Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. Dissertation. *Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg*.
- Bunzel, M. (2010).** Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 47-64.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Ralph, J., & Steinhart, H. (2008).** Cross-linking of arabinoxylans via 8-8-coupled diferulates as demonstrated by isolation and identification of diarabinosyl 8-8 (cyclic)-dehydrodiferulate from maize bran. *Journal of Cereal Science*, 47(1), 29-40.
- Bunzel, M., Allerdings, E., Sinwell, V., Ralph, J., & Steinhart, H. (2002).** Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. *European Food Research and Technology*, 214(6), 482-488.
- Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P., & Steinhart, H. (2006).** Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6409-6418.
- Bunzel, M., Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Ralph, S. A., Marita, J. M., Hatfield, R. D., & Steinhart, H. (2003).** Sinapate dehydrodimers and sinapate–ferulate heterodimers in cereal dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1427-1434.

- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D., & Steinhart, H. (2001).** Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(7), 653-660.
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012).** Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231-247.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., & Sultan, M. T. (2008).** Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 22-31.
- CCRC, Complex Carbohydrate Research Center (2007).** The CCRC spectral database for PMAA's. <https://glygen.crc.uga.edu/ccrc/specdb/ms/pmaa/pframe.html>, Letzter Zugriff am 05.09.2025.
- Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2004).** Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 211-215.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984).** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate research*, 131(2), 209-217.
- Claridge, T. D. (2016).** High-resolution NMR techniques in organic chemistry. *Elsevier*, 27.
- Cleemput, G., van Oort, M., Hessing, M., Bergmans, M. E. F., Gruppen, H., Grobe, P. J., & Delcour, J. A. (1995).** Variation in the degree of D-Xylose substitution in arabinoxylans extracted from a European wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 22(1), 73-84.
- Consonni, R., & Cagliani, L. R. (2019).** The potentiality of NMR-based metabolomics in food science and food authentication assessment. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 57(9), 558-578.
- Correia, M. A., Mazumder, K., Brás, J. L., Firbank, S. J., Zhu, Y., Lewis, R. J., York, W. S., Fontes, C. M., & Gilbert, H. J. (2011).** Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22510-22520.
- Costes, C., Le Bot, L., Alvarado, C., Daniel, S., Sanz, S. N., Calatayud, C., Soriano, A., Guillon, F., Mameri, H., Terrier, N., Saulnier, L., & Francin-Allami, M. (2025).** Polysaccharide distribution and cell wall deposition in the endosperm and outer layers of developing sorghum grains. *Journal of Cereal Science*, 124, 104239.
- Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (1998).** Physicochemical and bread-making properties of low molecular weight wheat-derived arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4066-4073.
- Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2001).** Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Journal of Cereal Science*, 33(3), 301-312.
- Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2002).** Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 225-243.
- Courtin, C. M., Swennen, K., Broekaert, W. F., Swennen, Q., Buyse, J., Decuypere, E., Michiels, C. W., De Ketelaere, B., & Delcour, J. A. (2008).** Effects of dietary inclusion of xylooligosaccharides, arabinoxyloligosaccharides and soluble arabinoxylan on the microbial composition of caecal contents of chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(14), 2517-2522.

- Damen, B., Cloetens, L., Broekaert, W. F., Francois, I., Lescroart, O., Trogh, I., Arnaut, F., Welling, G. W., Wijffels, J., Delcour, J. A., Verbeke, K., & Courtin, C. M. (2012).** Consumption of breads containing in situ-produced arabinoxylan oligosaccharides alters gastrointestinal effects in healthy volunteers. *The Journal of Nutrition*, 142(3), 470-477.
- Damen, B., Verspreet, J., Pollet, A., Broekaert, W. F., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2011).** Prebiotic effects and intestinal fermentation of cereal arabinoxylans and arabinoxylan oligosaccharides in rats depend strongly on their structural properties and joint presence. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(12), 1862-1874.
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997).** Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557-559.
- de la Vega-Hernández, K., & Antuch, M. (2015).** The heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) experiment: vectors versus product operators. *Journal of Chemical Education*, 92(3), 482-487.
- de Menezes, E. W., Giuntini, E. B., Dan, M. C. T., Sardá, F. A. H., & Lajolo, F. M. (2013).** Codex dietary fibre definition – Justification for inclusion of carbohydrates from 3 to 9 degrees of polymerisation. *Food Chemistry*, 140(3), 581-585.
- de Neef, J. (1969).** Quantitative determination of mixtures of monosaccharides, disaccharides and alditols as their trimethylsilyl ether derivatives by gas-liquid chromatography. *International Journal of Clinical Chemistry*, 26(3), 485-490.
- De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., & Rombouts, F. M. (1992).** Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry*, 207(1), 176-185.
- de Vries, J. A., Voragen, A. G. J., Rombouts, F. M., & Pilnik, W. (1981).** Extraction and purification of pectins from Alcohol Insoluble Solids from ripe and unripe apples. *Carbohydrate Polymers*, 1(2), 117-127.
- Dervilly-Pinel, G., Rimsten, L., Saulnier, L., Andersson, R., & Åman, P. (2001).** Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involvement in gel formation. *Journal of Cereal Science*, 34(2), 207-214.
- Dervilly-Pinel, G., Tran, V., & Saulnier, L. (2004).** Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. *Carbohydrate Polymers*, 55(2), 171-177.
- Dervilly, G., Leclercq, C., Zimmermann, D., Roue, C., Thibault, J. F., & Saulnier, L. (2002).** Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. *Carbohydrate Polymers*, 47(2), 143-149.
- Dervilly, G., Saulnier, L., Roger, P., & Thibault, J.-F. (2000).** Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 270-278.

- DGE, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, ÖGE, Österreichische Gesellschaft für Ernährung (2025).** Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 3. Auflage, 1. Ausgabe.
- DeVries, J. W. (2003).** On defining dietary fibre. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 37-43.
- Dobberstein, D., & Bunzel, M. (2010a).** Identification of ferulate oligomers from corn stover. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1802-1810.
- Dobberstein, D., & Bunzel, M. (2010b).** 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(16), 8927-8935.
- Domon, B., & Costello, C. E. (1988).** A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5(4), 397-409.
- El Rassi, Z. (1996).** Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. *Journal of Chromatography A*, 720(1), 93-118.
- Escarnot, E., Aguedo, M., Agneessens, R., Wathelet, B., & Paquot, M. (2011).** Extraction and characterization of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans from spelt bran: Study of the hydrolysis conditions for monosaccharides analysis. *Journal of Cereal Science*, 53(1), 45-52.
- 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(6), 533-537.
- Fels, L. (2021).** Optimierung und Anwendung ^1H - ^{13}C -korrelierter Experimente der Kernspinresonanzspektroskopie zur Quantifizierung lebensmittelrelevanter Mono- und Oligosaccharide. Dissertation. *Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- Ford, C. W., & Hartley, R. D. (1989).** GC/MS characterisation of cyclodimers from *p*-coumaric and ferulic acids by photodimerisation—a possible factor influencing cell wall biodegradability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46(3), 301-310.
- Fry, S. C. (1989).** The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*, 40(1), 1-11.
- Fu, D. T., & Oneill, R. A. (1995).** Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 227(2), 377-384.
- Funk, C., Braune, A., Grabber, J. H., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2007).** Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2418-2423.
- Ganguli, N. K., & Turner, M. A. (2008).** A simplified method for extracting water-extractable arabinoxylans from wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 1905-1910.

- Gebruers, K., Dornez, E., Boros, D., Fraś, A., Dynkowska, W., Bedő, Z., Rakszegi, M., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2008).** Variation in the content of dietary fiber and components thereof in wheats in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9740-9749.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., & Cani, P. D. (2017).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Giraudeau, P. (2014).** Quantitative 2D liquid-state NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 52(6), 259-272.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005).** Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1), 12-30.
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., & Nudelman, A. (1997).** NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *The Journal of organic chemistry*, 62, 7512-7515.
- Gruppen, H., Hamer, R. J., & Voragen, A. G. J. (1991).** Barium hydroxide as a tool to extract pure arabinoxylans from water-insoluble cell wall material of wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 13(3), 275-290.
- Gruppen, H., Hamer, R. J., & Voragen, A. G. J. (1992a).** Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 1. Extraction of polymers with alkali. *Journal of Cereal Science*, 16(1), 41-51.
- Gruppen, H., Hamer, R. J., & Voragen, A. G. J. (1992b).** Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 16(1), 53-67.
- Gruppen, H., Hoffmann, R. A., Kormelink, F. J. M., Voragen, A. G. J., Kamerlin, J. P., & Vliegenthart, J. F. G. (1992c).** Characterisation by ¹H NMR spectroscopy of enzymically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. *Carbohydrate Research*, 233, 45-64.
- Gruppen, H., Kormelink, F. J. M., & Voragen, A. G. J. (1993).** Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 3. A structural model for arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 18(2), 111-128.
- Guo, X.-N., Yang, S., & Zhu, K.-X. (2018).** Impact of arabinoxylan with different molecular weight on the thermo-mechanical, rheological, water mobility and microstructural characteristics of wheat dough. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 2150-2158.
- Hamann, P. R. V., & Noronha, E. F. (2022).** Xylan-breakdown apparatus of *Clostridium thermocellum*. *Cellulose*, 29(14), 7535-7553.

- Hartley, R. D., Morrison III, W. H., Himmelsbach, D. S., & Borneman, W. S. (1990).** Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry*, 29(12), 3705-3709.
- He, X., Yu, B., He, J., Huang, Z., Mao, X., Zheng, P., Luo, Y., Luo, J., Wang, Q., Wang, H., Yu, J., & Chen, D. (2020).** Effects of xylanase on growth performance, nutrients digestibility and intestinal health in weaned piglets. *Livestock Science*, 233, 103940.
- Henriksson, G., Germgård, U., & Lindström, M. E. (2024).** A review on chemical mechanisms of kraft pulping. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 39(3), 297-311.
- Hipsley, E. H. (1953).** Dietary "fibre" and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 2(4833), 420-422.
- Hopkins, M. J., Englyst, H. N., Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G. T., & McBain, A. J. (2003).** Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6354-6360.
- Hsieh, Y. S. Y., & Harris, P. J. (2009).** Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. *Molecular Plant*, 2(5), 943-965.
- Huisman, M. M. H., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2000).** Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 43(3), 269-279.
- Ishii, T. (1991).** Acetylation at O-2 of arabinofuranose residues in feruloylated arabinoxylan from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 30(7), 2317-2320.
- Ishii, T., & Matsunaga, T. (2001).** Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, 57(6), 969-974.
- Ishii, T., & Tobita, T. (1993).** Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls. *Carbohydrate Research*, 248, 179-190.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1992).** Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers*, 17(3), 237-247.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1993).** Structural heterogeneity of wheat endosperm arabinoxylans. *Cereal Chemistry*, 70(6), 641-646.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1994).** Studies on the structure of wheat-endosperm arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 24(1), 61-71.
- Janker-Obermeier, I., Sieber, V., Faulstich, M., & Schieder, D. (2012).** Solubilization of hemicellulose and lignin from wheat straw through microwave-assisted alkali treatment. *Industrial Crops and Products*, 39, 198-203.
- Jiang, Y., Bai, X., Lang, S., Zhao, Y., Liu, C., & Yu, L. (2019).** Optimization of ultrasonic-microwave assisted alkali extraction of arabinoxylan from the corn bran using response surface methodology. *International Journal Biological Macromolecules*, 128, 452-458.
- Jilek, M. L., & Bunzel, M. (2013).** Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal Flours. *Cereal Chemistry*, 90(5), 507-514.

- Joyce, G. E., Kagan, I. A., Flythe, M. D., Davis, B. E., & Schendel, R. R. (2023).** Profiling of cool-season forage arabinoxylans via a validated HPAEC-PAD method. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1-13.
- Junker, F., & Bunzel, M. (2024).** Chromatography based profiling of feruloylated arabinans and galactans. *Carbohydrate Research*, 538, 109076.
- Juvonen, M., Kotiranta, M., Jokela, J., Tuomainen, P., & Tenkanen, M. (2019).** Identification and structural analysis of cereal arabinoxylan-derived oligosaccharides by negative ionization HILIC-MS/MS. *Food Chemistry*, 275, 176-185.
- Kabel, M. A., Carneiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J. C., Gírio, F. M., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2002).** Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 50(1), 47-56.
- Kang, J., Guo, Q., & Shi, Y.-C. (2019).** NMR and methylation analysis of hemicellulose purified from corn bran. *Food Hydrocolloids*, 94, 613-621.
- Karlsson, G., Winge, S., & Sandberg, H. (2005).** Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1092(2), 246-249.
- Karplus, M. (1963).** Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 85(18), 2870-2871.
- Kiemle, S. N., Zhang, X., Esker, A. R., Toriz, G., Gatenholm, P., & Cosgrove, D. J. (2014).** Role of (1,3)(1,4)- β -glucan in cell walls: interaction with cellulose. *Biomacromolecules*, 15(5), 1727-1736.
- 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(2), 646-653.
- Köhnke, T., Östlund, Å., & Brelid, H. (2011).** Adsorption of arabinoxylan on cellulosic surfaces: influence of degree of substitution and substitution pattern on adsorption characteristics. *Biomacromolecules*, 12(7), 2633-2641.
- Korge, M., Alaru, M., Keres, I., Khaleghdoust, B., Möll, K., Altosaar, I., & Loit, E. (2023).** The influence of cropping system, weather conditions and genotype on arabinoxylan content in wheat and barley grains. *Journal of Cereal Science*, 110, 103650.
- Kouzounis, D., Sun, P., Bakx, E. J., Schols, H. A., & Kabel, M. A. (2022).** Strategy to identify reduced arabinoxylooligosaccharides by HILIC-MSⁿ. *Carbohydrate Polymers*, 289, 119415.
- Lagaert, S., Pollet, A., Courtin, C. M., & Volckaert, G. (2014).** β -Xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnology Advances*, 32(2), 316-332.
- Langenaeken, N. A., De Schutter, D. P., & Courtin, C. M. (2020).** Arabinoxylan from non-malted cereals can act as mouthfeel contributor in beer. *Carbohydrate Polymers*, 239, 116257.

- Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2007).** Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science*, 46(2), 101-118.
- Lee, C. J., Horsley, R. D., Manthey, F. A., & Schwarz, P. B. (1997).** Comparisons of β -glucan content of barley and oat. *Cereal Chemistry*, 74(5), 571-575.
- Lee, Y. C. (1990).** High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Analytical Biochemistry*, 189(2), 151-162.
- Li, W., Lu, J., Ju, Y., Lv, Y., & Li, J. (2025).** Structural analysis of arabinoxylan and its effect on beer foam: A comparison of three arabinoxylans with different viscosity. *Food Hydrocolloids*, 163, 111117.
- Lin, S., Brask, J., Munk, L., Holck, J., Krogh, K. B., Meyer, A. S., Wittrup Agger, J., & Wilkens, C. (2022).** Enzymatic cleavage of diferuloyl cross-links in corn bran arabinoxylan by two bacterial feruloyl esterases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(41), 13349-13357.
- Maes, C., & Delcour, J. A. (2002).** Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 315-326.
- Marcotuli, I., Hsieh, Y. S. Y., Lahnstein, J., Yap, K., Burton, R. A., Blanco, A., Fincher, G. B., & Gadaleta, A. (2016).** Structural variation and content of arabinoxylans in endosperm and bran of durum wheat (*Triticum turgidum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(14), 2883-2892.
- Mazumder, K., & York, W. S. (2010).** Structural analysis of arabinoxylans isolated from ball-milled switchgrass biomass. *Carbohydrate research*, 345(15), 2183-2193.
- McCleary, B. V., De Vries, J. W., Rader, J. I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D. C., Champ, M., Okuma, K., & Collaborators. (2019).** Determination of total dietary fiber (CODEX Definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(1), 221-233.
- McCleary, B. V., McKie, V. A., Draga, A., Rooney, E., Mangan, D., & Larkin, J. (2015).** Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabinoxyloligosaccharides by β -xylanase, α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase. *Carbohydrate Research*, 407, 79-96.
- McCleary, B. V., & McLoughlin, C. (2022).** Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods using a rapid integrated procedure of enzymatic-gravimetric-liquid chromatography: first action 2022.01. *Journal of AOAC International*, 106(1), 127-145.
- 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(4), 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(2), 133-150.

- Mellen, P. B., Walsh, T. F., & Herrington, D. M. (2008).** Whole grain intake and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(4), 283-290.
- Mendonça, M., Barroca, M., & Collins, T. (2023).** Endo-1,4- β -xylanase-containing glycoside hydrolase families: characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*, 65, 108148.
- Micard, V., Renard, C., & Thibault, J.-F. (1994).** Studies on enzymic release of ferulic acid from sugar-beet pulp. *LWT-Food Science and Technology*, 27(1), 59-66.
- Mnich, E., Bjarnholt, N., Eudes, A., Harholt, J., Holland, C., Jørgensen, B., Larsen, F. H., Liu, M., Manat, R., & Meyer, A. S. (2020).** Phenolic cross-links: building and deconstructing the plant cell wall. *Natural Product Reports*, 37(7), 919-961.
- Moni, L., Banfi, L., Basso, A., Mori, A., Risso, F., Riva, R., & Lambruschini, C. (2021).** A thorough study on the photoisomerization of ferulic acid derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, 2021(11), 1737-1749.
- Nandini, C. D., & Salimath, P. V. (2001).** Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapati/roti (Indian flat bread) making quality. *Food Chemistry*, 73(2), 197-203.
- Nishantha, M. D. L. C., Zhao, X., Jeewani, D. C., Bian, J., Nie, X., & Weining, S. (2018).** Direct comparison of β -glucan content in wild and cultivated barley. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2218-2228.
- Nordberg Karlsson, E., Schmitz, E., Linares-Pastén, J. A., & Adlercreutz, P. (2018).** Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9081-9088.
- Nunes, F. M., Reis, A., Silva, A. M., Domingues, M. R. M., & Coimbra, M. A. (2008).** Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans. *Phytochemistry*, 69(7), 1573-1585.
- O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., & Darvill, A. G. (2004).** Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 109-139.
- O'Sullivan, A. C. (1997).** Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- Ordaz-Ortiz, J. J., Devaux, M.-F., & Saulnier, L. (2005).** Classification of wheat varieties based on structural features of arabinoxylans as revealed by endoxylanase treatment of flour and grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8349-8356.
- Ordaz-Ortiz, J. J., & Saulnier, L. (2005).** Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 119-125.
- Ostrowski, W., Swarczewicz, B., Nolka, M., & Stobiecki, M. (2016).** Differentiation of phenylpropanoid acids cyclobutane- and dehydrodimers isomers in barley leaf cell walls with LC/MS/MS system. *International Journal of Mass Spectrometry*, 407, 77-85.
- Palmer, M. R., Suiter, C. L., Henry, G. E., Rovnyak, J., Hoch, J. C., Polenova, T., & Rovnyak, D. (2015).** Sensitivity of nonuniform sampling NMR. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(22), 6502-6515.

- Pan, J., Yin, J., Zhang, K., Xie, P., Ding, H., Huang, X., Blachier, F., & Kong, X. (2019).** Dietary xylooligosaccharide supplementation alters gut microbial composition and activity in pigs according to age and dose. *AMB Express*, 9(1), 134.
- Parker, M. L., Ng, A., & Waldron, K. W. (2005).** The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2539-2547.
- 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(18), 2480-2488.
- Peaucelle, A., Braybrook, S., & Höfte, H. (2012).** Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Frontiers in Plant Science*, 3, 121.
- Petersen, B. O., Vinogradov, E., Kay, W., Würtz, P., Nyberg, N. T., Duus, J. Ø., & Sørensen, O. W. (2006).** H2BC: a new technique for NMR analysis of complex carbohydrates. *Carbohydrate research*, 341(4), 550-556.
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., & Bacic, A. (2012).** Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, 7(9), 1590-1607.
- Piber, M., & Koehler, P. (2005).** Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5276-5284.
- Pollet, A., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2010).** Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 176-191.
- Pollet, A., Van Craeyveld, V., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2012).** *In vitro* fermentation of arabinoxylan oligosaccharides and low molecular mass arabinoxylans with different structural properties from wheat (*Triticum aestivum* L.) bran and psyllium (*Plantago ovata* Forsk) seed husk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(4), 946-954.
- Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., Devries, J. W., Schweizer, T. F., & Harland, B. F. (1985).** Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68(4), 677-679.
- Puchart, V., & Biely, P. (2015).** Redistribution of acetyl groups on the non-reducing end xylopyranosyl residues and their removal by xylan deacetylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3865-3873.
- Puchart, V., Poláková, M., & Bella, M. (2025).** Spontaneous acetyl group migration between xylose and arabinose in arabinoxylan-derived oligosaccharide. *Journal of Molecular Structure*, 1321, 140209.
- Ralet, M.-C., André-Leroux, G., Quémener, B., & Thibault, J.-F. (2005).** Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry*, 66(24), 2800-2814.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Grabber, J. H., & Steinhart, H. (2004).** Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*, 3, 79-96.

- Ralph, J., Grabber, J. H., & Hatfield, R. D. (1995).** Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate research*, 275(1), 167-178.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Quideau, S., Helm, R. F., Grabber, J. H., & Jung, H.-J. G. (1994a).** Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 116(21), 9448-9456.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H., & Hatfield, R. D. (1994b).** Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 23, 3485-3498.
- Rao, R. S. P., & Muralikrishna, G. (2007).** Structural characteristics of water-soluble feruloyl arabinoxylans from rice (*Oryza sativa*) and ragi (finger millet, *Eleusine coracana*): Variations upon malting. *Food Chemistry*, 104(3), 1160-1170.
- Rebaque, D., del Hierro, I., López, G., Bacete, L., Vilaplana, F., Dallabernardina, P., Pfrengle, F., Jordá, L., Sánchez-Vallet, A., Pérez, R., Brunner, F., Molina, A., & Mérida, H. (2021).** Cell wall-derived mixed-linked β -1,3/1,4-glucans trigger immune responses and disease resistance in plants. *The Plant Journal*, 106(3), 601-615.
- Reis, S. F., Coelho, E., Coimbra, M. A., & Abu-Ghannam, N. (2015).** Influence of grain particle sizes on the structure of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 130, 222-226.
- Robosky, L. C., Reily, M. D., & Avizonis, D. (2007).** Improving NMR sensitivity by use of salt-tolerant cryogenically cooled probes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2), 529-532.
- Rohrer, J. (2012).** Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (hpae-pad). *Thermo Fisher Scientific, Technical Note*, 20(1), 1-12.
- Rundlöf, T., McEwen, I., Johansson, M., & Arvidsson, T. (2014).** Use and qualification of primary and secondary standards employed in quantitative ^1H NMR spectroscopy of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 93, 111-117.
- Ruthes, A. C., Martínez-Abad, A., Tan, H.-T., Bulone, V., & Vilaplana, F. (2017).** Sequential fractionation of feruloylated hemicelluloses and oligosaccharides from wheat bran using subcritical water and xylanolytic enzymes. *Green Chemistry*, 19(8), 1919-1931.
- Sadosky, P., Schwarz, P. B., & Horsley, R. D. (2002).** Effect of arabinoxylans, β -glucans, and dextrans on the viscosity and membrane filterability of a beer model solution. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 60(4), 153-162.
- Saeman, J. F., Bubl, J. L., & Harris, E. E. (1945).** Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 17(1), 35-37.
- Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005).** Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340(4), 731-739.

- Sasaki, G. L., Guerrini, M., Serrato, R. V., Santana Filho, A. P., Carlotto, J., Simas-Tosin, F., Cipriani, T. R., Iacomini, M., Torri, G., & Gorin, P. A. J. (2014).** Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. *Carbohydrate Polymers*, 104, 34-41.
- Saulnier, L., Crépeau, M.-J., Lahaye, M., Thibault, J.-F., Garcia-Conesa, M. T., Kroon, P. A., & Williamson, G. (1999).** Isolation and structural determination of two 5, 5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydrate Research*, 320(1-2), 82-92.
- Saulnier, L., Guillon, F., & Chateigner-Boutin, A.-L. (2012).** Cell wall deposition and metabolism in wheat grain. *Journal of Cereal Science*, 56(1), 91-108.
- Saulnier, L., Sado, P.-E., Branlard, G., Charmet, G., & Guillon, F. (2007).** Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 261-281.
- Saulnier, L., Vigouroux, J., & Thibault, J.-F. (1995).** Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydrate Research*, 272(2), 241-253.
- Schäfer, D. S. (2023).** Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Analyse von Oligosacchariden in Proben aus dem Verdauungstrakt von Geflügel. Dissertation. *Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- Schendel, R. R., Becker, A., Tyl, C. E., & Bunzel, M. (2015).** Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from the perennial cereal grain intermediate wheat grass (*Thinopyrum intermedium*). *Carbohydrate Research*, 407, 16-25.
- Schendel, R. R., & Bunzel, M. (2022).** 2D-HSQC-NMR-based screening of feruloylated side-chains of cereal grain arabinoxylans. *Frontiers in Plant Science*, 13, 951705.
- Schendel, R. R., & Bunzel, M. (2025).** Cereal grain arabinoxylans contain a unique non-feruloylated disaccharide side-chain with alpha-xylose units: α -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-L-arabinose. *Carbohydrate Polymers*, 348, 122810.
- Schendel, R. R., Meyer, M. R., & Bunzel, M. (2016a).** Quantitative profiling of feruloylated arabinoxylan side-chains from graminaceous cell walls. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-11.
- Schendel, R. R., Puchbauer, A.-K., Britscho, N., & Bunzel, M. (2016b).** Feruloylated wheat bran arabinoxylans: Isolation and characterization of acetylated and O-2-monosubstituted structures. *Cereal Chemistry*, 93(5), 493-501.
- Schendel, R. R., Puchbauer, A.-K., & Bunzel, M. (2016c).** Glycoside hydrolase family 51 α -L-arabinofuranosidases from *Clostridium thermocellum* and *Cellvibrio japonicus* release O-5-feruloylated arabinose. *Cereal Chemistry*, 93(6), 650-653.
- Schmitz, E., Leontakianakou, S., Norlander, S., Karlsson, E. N., & Adlercreutz, P. (2022).** Lignocellulose degradation for the bioeconomy: The potential of enzyme synergies between xylanases, ferulic acid esterase and laccase for the production of arabinoxyloligosaccharides. *Bioresource Technology*, 343, 126114.
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (1999).** Structural features of (glucurono)arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. *Journal of Cereal Science*, 29(1), 63-75.

- Shewry, P. R., Piironen, V., Lampi, A.-M., Edelman, M., Kariluoto, S., Nurmi, T., Fernandez-Orozco, R., Andersson, A. A. M., Åman, P., Fraš, A., Boros, D., Gebruers, K., Dornez, E., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Ravel, C., Charmet, G., Rakszegi, M., Bedo, Z., & Ward, J. L. (2010).** Effects of genotype and environment on the content and composition of phytochemicals and dietary fiber components in rye in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9372-9383.
- Shibuya, N., & Iwasaki, T. (1985).** Structural features of rice bran hemicellulose. *Phytochemistry*, 24(2), 285-289.
- 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.
- Singla, V., & Chakkaravarthi, S. (2017).** Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food Science and Technology International*, 23(8), 649-667.
- Sitter, L. (2022).** Entwicklung eines Screenings für (Arabino-)Xylan-Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD. Masterarbeit. *Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Phytochemie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- Sørensen, I., Pettolino, F. A., Wilson, S. M., Doblin, M. S., Johansen, B., Bacic, A., & Willats, W. G. T. (2008).** Mixed-linkage (1→3),(1→4)-β-D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of *Equisetum arvense* cell walls. *The Plant Journal*, 54(3), 510-521.
- Statista. (2025).** Erntemenge von Getreide weltweit in den Jahren 2008/09 bis 2025/26. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/180674/umfrage/weltweite-getreideproduktion-seit-2008-09/>, Letzter Zugriff am 02.04.2026.
- 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(31), 8838-8849.
- Steinhart, H., & Bunzel, M. (2003).** Separation techniques in the structural analysis of dietary fiber polysaccharides. *Chromatographia*, 57, S359-S361.
- Storsley, J. M., Izydorczyk, M. S., You, S., Biliaderis, C. G., & Rossnagel, B. (2003).** Structure and physicochemical properties of β-glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 831-844.
- Subba Rao, M. V. S. S. T., & Muralikrishna, G. (2004).** Structural analysis of arabinoxylans isolated from native and malted finger millet (*Eleusine coracana*, ragi). *Carbohydrate Research*, 339(14), 2457-2463.
- 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(2), 217-225.
- Tian, L., Gruppen, H., & Schols, H. A. (2015).** Characterization of (glucurono)arabinoxylans from oats using enzymatic fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(50), 10822-10830.

- Van Craeyveld, V., Swennen, K., Dornez, E., Van de Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., Delaedt, Y., Onagbesan, O., Decuypere, E., & Buyse, J. (2008).** Structurally different wheat-derived arabinoxyloligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in Rats¹. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2348-2355.
- Verbruggen, M. A., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (1995).** The selective extraction of glucuronoarabinoxylans from sorghum endosperm cell walls using barium and potassium hydroxide solutions. *Journal of Cereal Science*, 21(3), 271-282.
- Verbruggen, M. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J., & Hollemans, M. (1993).** Water-unextractable cell wall material from sorghum: Isolation and characterization. *Journal of Cereal Science*, 17(1), 71-82.
- Verbruggen, M. A., Spronk, B. A., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G., Thomas, J. R., Kamerling, J. P., & Vliegenthart, J. F. (1998).** Structures of enzymically derived oligosaccharides from sorghum glucuronoarabinoxylan. *Carbohydrate Research*, 306(1-2), 265-274.
- Verherbruggen, Y., Falourd, X., Sterner, M., Guillon, F., Girousse, C., Foucat, L., Le Gall, S., Chateigner-Boutin, A.-L., & Saulnier, L. (2019).** Challenging the putative structure of mannan in wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *Carbohydrate Polymers*, 224, 115063.
- Verwimp, T., Van Craeyveld, V., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2007).** Variability in the structure of rye flour alkali-extractable arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1985-1992.
- Viëtor, R. J., Kormelink, F. J. M., Angelino, S. A. G. F., & Voragen, A. G. J. (1994).** Substitution patterns of water-unextractable arabinoxylans from barley and malt. *Carbohydrate Polymers*, 24(2), 113-118.
- Vinkx, C., Delcour, J., Verbruggen, M., & Gruppen, H. (1995).** Rye water-soluble arabinoxylans also vary in their 2-monosubstituted xylose content. *Cereal chemistry*, 72, 227-227.
- Virkki, L., Johansson, L., Ylinen, M., Maunu, S., & Ekholm, P. (2005).** Structural characterization of water-insoluble nonstarchy polysaccharides of oats and barley. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 357-366.
- Vogel, J. (2008).** Unique aspects of the grass cell wall. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 301-307.
- Voragen, A. G., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009).** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263-275.
- Wang, J., Yuan, X., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Wang, C. (2009).** On-line separation and structural characterisation of feruloylated oligosaccharides from wheat bran using HPLC-ESI-MSⁿ. *Food Chemistry*, 115(4), 1529-1541.
- Wefers, D., & Bunzel, M. (2016a).** Arabinan and galactan oligosaccharide profiling by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4656-4664.
- Wefers, D., & Bunzel, M. (2016b).** NMR spectroscopic profiling of arabinan and galactan structural elements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9559-9568.

- Wefers, D., Gmeiner, B. M., Tyl, C. E., & Bunzel, M. (2015).** Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.). *Phytochemistry*, 116, 320-328.
- Wefers, D., Tyl, C. E., & Bunzel, M. (2014).** Novel arabinan and galactan oligosaccharides from dicotyledonous plants. *Frontiers in Chemistry*, 2, 1-9.
- Wende, G., & Fry, S. C. (1997a).** 2-O- β -D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry*, 44(6), 1019-1030.
- Wende, G., & Fry, S. C. (1997b).** O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. *Phytochemistry*, 44(6), 1011-1018.
- Westphal, Y., Kühnel, S., de Waard, P., Hinz, S. W. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., & Gruppen, H. (2010).** Branched arabinooligosaccharides isolated from sugar beet arabinan. *Carbohydrate Research*, 345(9), 1180-1189.
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H., Hemming, J., & Holmbom, B. (2009).** Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products*, 29(2), 571-580.
- Wilson, S. M., Burton, R. A., Collins, H. M., Doblin, M. S., Pettolino, F. A., Shirley, N., Fincher, G. B., & Bacic, A. (2012).** Pattern of deposition of cell wall polysaccharides and transcript abundance of related cell wall synthesis genes during differentiation in barley endosperm. *Plant Physiology*, 159(2), 655-670.
- Yadav, M. P., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. (2007).** Structural characterization of corn fiber gums from coarse and fine fiber and a study of their emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6366-6371.
- Ye, E. Q., Chacko, S. A., Chou, E. L., Kugizaki, M., & Liu, S. (2012).** Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *The Journal of Nutrition*, 142(7), 1304-1313.
- Zarghi, H. (2018).** Application of xylanase and β -glucanase to improve nutrient utilization in poultry fed cereal base diets: Used of enzymes in poultry diet. *Insights in Enzyme Research*, 2(1), 11-17.
- Zhan, Y., Liu, X., Huang, C., Zhou, X., Lyu, Y., Lin, Y., Huang, C., Ma, W., Xie, Z., Fang, G., & Ragauskas, A. J. (2024).** Investigation of the alkaline hydrogen peroxide pretreatment: From cellulose saccharification to lignin isolation. *Industrial Crops and Products*, 214, 118533.
- Zhang, L., Gao, C., Gao, Y., Yang, H., Jia, M., Wang, X., Zhang, B., & Zhou, Y. (2025).** New insights into plant cell wall functions. *Journal of Genetics and Genomics*, 52(11), 1308-1324.

7 Chemikalien und Instrumente

7.1 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller, Reinheit	GHS- Pikto- gramme	H-Sätze	P-Sätze
1-Methylimidazol	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	05, 06	302, 311, 314	280, 301+312+330, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
2-Desoxy-D-Glucose	Sigma-Aldrich, > 99 %	-	-	-
2³-α-L-Arabinofuranosyl- xylotriase (A²XX)	Megazyme, > 90 %	-	-	-
2³, 3³-di-α-L-Arabinofuranosyl- xylotriase (A²⁺³XX)	Megazyme, > 95 %	-	-	-
3²-α-L-Arabinofuranosyl- xylobiose (A³X)	Megazyme, > 95 %	-	-	-
3³-α-L-Arabinofuranosyl- xylotetraose (XA³XX)	Megazyme, > 95 %	-	-	-
3³-α-L- plus 2³-α-L- Arabinofuranosyl-xylotetraose (XA³XX/XA²XX) Mischung	Megazyme, > 95 %	-	-	-
Acetanilid	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	07	302	301+312, 330
Aceton	VWR, ≥ 99,8 %	02, 07	225, 319, 336	210, 233, 305+351+338
Acetonitril	VWR, HPLC-Grade	02, 07	225, 302+312+332, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Ammoniak	Sigma-Aldrich, 25 %	05, 07, 09	314, 335, 410	261, 271, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, 99,9 %	07	302, 319	264, 270, 280, 301+312, 305+351+338
Arabinoxylan (Weizenmehl, mittlere Viskosität)	Megazyme, > 95 %	-	-	-
Deuteriumoxid	Deutero, 99,9 %/99,95%	-	-	-
D-Fructose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
D-Galactose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
D-Galacturonsäure Monohydrat	Fluka, ≥ 97 %	-	-	-
D-Glucose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,5 %	-	-	-
D-Glucuronsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %	-	-	-
Dichlormethan	VWR, ≥ 99,5 %	07, 08	315, 319, 336, 351	201, 280, 302+352, 304+340,

7 Chemikalien und Instrumente

				305+351+338, 308+311
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, ≥ 99,5 %	-	-	-
Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Merk, ≥ 99 %	-	-	-
D-Mannit	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
D-Mannose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
D-Xylose	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	-	-	-
Essigsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 99,8 %	02, 05	226, 314	210, 233, 240, 280, 303+361+353, 305+351+338
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	02, 05, 06	226, 302, 314, 330	280, 310, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 308+310
Ethanol, vergällt	VWR, 99 %	02, 07	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
Isomaltotriose	Sigma-Aldrich, Analytical Standard	-	-	-
Lactose (Monohydrat)	Sigma-Aldrich, Analytical Standard	-	-	-
Lactulose	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %	-	-	-
Laminaritriose	Megazyme, > 95 %	-	-	-
L-Arabinose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %			
L-Fucose	Alfa Aesar, ≥ 99 %	-	-	-
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %	07	302, 315, 319	264, 270, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
L-Rhamnose	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-
Methanol	VWR, HPLC-Grade	02, 06, 08	225, 311, 331, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 304+340, 308+310, 403+235
Methanolische Salzsäure	Sigma-Aldrich, 1,25 M	02, 05, 06, 08	225, 290, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
Methyl-α-D-Glucopyranosid	Sigma-Aldrich, > 99 %	-	-	-
Methyliodid	VWR, ≥ 99 %	06, 08, 09	301+331, 312, 315, 335, 351	201, 280, 301+310, 302+352, 304+340, 311

Natriumacetat	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	-	-	-	
Natriumbordeuterid	Carl Roth, ≥ 99 %	02, 05, 06, 08	260, 301, 314, 360FD	208, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 310, 402+404	
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	VWR, p. a.	-	-	-	
Natriumthiosulfat	Carl Roth, ≥ 99 %	-	-	-	
Natronlauge	Merck, 49 - 51 %	05	290, 314	280, 301+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 363	
Salzsäure	Merck, 37 %	05, 07	290, 314, 335	260, 280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310	
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, 95 - 98 %	05	290, 314	234, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %	05, 07	314, 332, 412	261, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338	
Xylobiose (X₂)	Megazyme, > 95 %	-	-	-	
Xylohexaose (X₆)	Megazyme, > 95 %	-	-	-	
Xylopentaose (X₅)	Megazyme, > 95 %	-	-	-	
Xylotetraose (X₄)	Megazyme, > 95 %	-	-	-	
Xylotriose (X₃)	Megazyme, > 90 %	-	-	-	
GHS02	GSH05	GSH06	GSH07	GSH08	GSH09
					
Entzündlich	Ätzend	Giftig	Gesundheits- schädlich	Systemische Gesundheits- gefährdung	Umwelt- gefährlich

7.2 Hergestellte Pufferlösungen und Reagenzien

Ammoniak (2 M)

- 7,46 mL Ammoniak (25%)
- 50 mL Reinstwasser

Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0)

- 12,5 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat in 1 L Reinstwasser lösen
- 11,36 g Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei) in 1 L Reinstwasser lösen
- Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat-Lösung vorlegen und mit Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung auf pH 6,0 einstellen

Natriumthiosulfat-Lösung

- 3,95 g Natriumthiosulfat
- 250 mL Reinstwasser

Trifluoressigsäure-Lösung (2 M)

- 15,4 mL Trifluoressigsäure in 100 mL-Messkolben geben
- mit Reinstwasser auffüllen

7.3 Enzyme

Enzym	Herkunft	Hersteller	EC-Nummer	Aktivität
α-Amylase (Termamyl 120L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma-Aldrich	3.2.1.1	≥ 500 U/mg Protein (Biuret)
Amyloglucosidase (AMG 300L)	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich	3.2.1.3	≥ 260 U/mL
Driselase	<i>Basidiomycetes</i> sp.	Sigma-Aldrich	-	-
endo-β-1,4-Xylanase (XYL ₁₀)	<i>Clostridium thermocellum</i>	Nzytech	3.2.1.8	1400 U/mg
endo-β-1,4-Xylanase (XYL ₁₁)	<i>Neoxallimastix patriciarum</i>	Megazyme	3.2.1.8	10000 U/mL
endo-β-1,4-Xylanase (XYL _{ABV})	<i>Trichoderma reesei</i>	AB Vista	3.2.1.8	1020000 BXU/g
Protease (Alcalase 2.4 L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sigma-Aldrich	3.4.21.62	2,4 U/g

7.4 Instrumente

Liste der verwendeten LC- bzw. GC-Säulen

Säule	Partikelgröße/Filmdicke	Maße (Länge x Innendurchmesser)	Hersteller
Bio-Gel P-2	< 45 µM	85 cm x 4,6 mm	Bio-Rad
CarboPac PA100 (semipräparativ)	8,5 µM	250 x 9 mm	ThermoFisher Scientific
CarboPac PA20	6 µM	150 x 3 mm	ThermoFisher Scientific
CarboPac PA200	6 µM	250 x 3 mm	ThermoFisher Scientific
DB-225/DB-225 (MS)	0,25 µM	30 m x 0,25 mm	Agilent Technologies
DB-5/DB-5 (MS)	0,25 µM	30 m x 0,25 mm	Agilent Technologies
Hypercarb (PGC)	5 µM	100 mm x 4,6 mm	Thermo Scientific
Luna C18(2) (semipräparativ)	5 µM	250 x 10 mm	Phenomenex
Luna Phenyl-Hexyl (semipräparativ)	5 µM	250 x 10 mm	Phenomenex
SweetSep AEX200	5 µM	200 x 4 mm	Antec Scientific
XBridge BEH Amide (semipräparativ)	5 µM	250 x 10 mm	Waters

Systeme und Anlagen

- **GC-FID**

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

- **GC-MS**

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

- **SEC-RI**

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

- **HPAEC-PAD 1**

Hersteller:	Thermo Scientific
Bezeichnung:	Dionex ICS-5000 System
Pumpe:	Dionex ICS-5000 DP
Autosampler:	Dionex AS-AP
Detektoren (PAD):	ICS-6000 DC, 2 x Electrochemical Detector
Fraktionssammler:	UltiMate AFC-3000 Multiposition Fraction Collector

- **HPAEC-PAD 2**

Hersteller:	Antec Scientific
Bezeichnung:	ALEXYS Carbohydrate Analyzer
Pumpe:	P6.1L
Autosampler:	AS 6.1L
Detektoren (PAD):	DECADE Elite

- **HPAEC-PAD/MS**

Hersteller:	Thermo Scientific
Pumpe (Eluent):	Dionex ICS-5000 DP
Pumpe (Regenerent):	Dionex AXP
Pumpe (LiCl):	Dionex AXP-MS
Autosampler:	Dionex AS-AP
Detektoren (PAD, CD):	ICS-6000 DC, Electrochemical & Conductivity Detector
Detektor (MS):	ISQ EC Mass Spectrometer
Suppressor:	Dionex AERS 500 (4 mm)

- **LXQ Linear Ion Trap-Massenspektrometer mit ESI-Ionenquelle**

Hersteller:	Thermo Scientific
-------------	-------------------

- **NMR-Spektrometer**

Hersteller:	Bruker
Bezeichnung :	Ascend 500 mit CryoProbe Prodigy Probenkopf

- **Semipräparative HPLC-UV/ELSD**

Hersteller:	Knauer
Pumpen (2x):	AZURA P2.1L
Autosampler:	Smartline Autosampler Optimas
Detektoren (UV/ELSD):	UV: AZURA UVD2.1L, ELSD: Sedex 85 (ERC)
Fraktionsventil:	AZURA V2.1S

8 Arbeitsvorschriften

8.1 Ausgangsmaterialien

Rohmaterial	Hersteller/Marke
Weizenkörner <i>Triticum aestivum</i>	dennree
Einkornvollkornmehl <i>Triticum monococcum</i>	Chiemgaukorn
Emmervollkornmehl <i>Triticum dicoccum</i>	Chiemgaukorn
Dinkelvollkornmehl <i>Triticum spelta</i>	Alnatura
Kamutvollkornmehl (Khorasan-Weizen) <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>turanicum</i>	Bäckerei Spiegelhauer
Roggenvollkornmehl <i>Secale cereale</i>	Alnatura
Gerstenkörner, entspelzt <i>Hordeum vulgare</i>	Davert
Maiskörner (Futtermittel) <i>Zea mays</i>	Dehner

8.2 Aufarbeitung der Getreideproben

8.2.1 Mahlen

- Falls kein Vollkornmehl vorhanden: Getreidekörner zuerst auf einen Durchmesser $\leq 2,5$ mm mahlen
- Dann auf $\leq 0,5$ mm

8.2.2 Entfetten

- Probenmehl in der 1,5-fachen Menge Aceton (w/v) aufschlämmen und 20 min rühren
- Bei 5000 rpm 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Waschvorgang dreimal wiederholen
- Bei 60 °C im Trockenschrank über Nacht trocknen

8.2.3 Präparative Isolierung der unlöslichen und löslichen Ballaststoffe

Unlösliche Ballaststoffe

- 30 g Probenmehl mit 400 mL Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,0) in einen 500 mL Erlenmeyerkolben geben
- Zugabe von 3 mL thermostabiler α -Amylase (Termamyl 120 L, Sigma-Aldrich)
- Inkubation für 20 min bei 92 °C im Wasserbad, alle 5 min schwenken
- Probe in Eis auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- pH-Wert mit NaOH (1 M) auf 7,5 einstellen
- Zugabe von 1,4 mL Protease (Alcalase 2.4 L, Sigma)
- Für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln inkubieren
- Probe erneut in Eis auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- pH-Wert mit HCl (1 M) auf etwa 4,5 einstellen
- Zugabe von 1,4 mL Amyloglucosidase (≥ 260 U/mL, Sigma-Aldrich)
- Inkubation für 30 min bei 60° C im Schüttelwasserbad
- Warme Lösung für 15 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand abtrennen und aufheben
- Rückstand mit 4 x 100 mL 60 °C warmem H₂O waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und mit aufgehobenem Überstand vereinigen
- Rückstand mit 2 x 100 mL Ethanol (99 %) waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand mit 2 x 100 mL Aceton waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrennen und verwerfen
- Rückstand bei 40 °C über Nacht trocknen → UBS

Lösliche Ballaststoffe

- LBS aus vereinigttem Überstand der Waschschriftte durch der vierfachen Menge Ethanol (99 %) über Nacht ausfällen
- Überstand abgießen
- Restliche Lösung für 10 min bei 5000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Rückstand mit 2 x 100 mL Ethanol (80 %) waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Rückstand mit 2 x 100 mL Ethanol (99 %) waschen, nach jedem Waschschrift zentrifugieren, Überstand abtrenne 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 → LBS

Stärkenachweis

- Spatelspitze UBS bzw. LBS in ca. 5 mL dest. H₂O aufkochen
- Abkühlen lassen
- Mit Jod-Kaliumiodid-Lösung versetzen

8.3 Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide in den Getreideballaststoffen

8.3.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Schwefelsäure-Hydrolyse

- 10 mg UBS in ein 4 mL-Vial (mit Deckel und Septum) einwiegen und mit Glasperlen versetzen
- 150 µL Schwefelsäure (12 M) zugeben und vortexen
- 30 min im Eisbad stehen lassen und alle 10 min vortexen
- 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen und alle 30 min vortexen
- Mit 975 µL Reinstwasser 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, Chromafil Xtra) filtrieren
- 100 µL Filtrat mit 75 µL NaOH (4 M) und 825 µL Reinstwasser versetzen
- In einem Schritt direkt in HPAEC-Vial verdünnen: 10 µL Probe mit 20 µL 2-Desoxy-D-glucose-Lösung (250 µM) versetzen und 170 µL Reinstwasser hinzufügen
- Messung mittels HPAEC-PAD

Methanolyse mit TFA-Hydrolyse

- Lösung der zu analysierenden Ballaststoffprobe herstellen (1 mg/mL), davon 60 µL in ein GC-Vial pipettieren und zur Trockene eindampfen
- 500 µL methanolische HCl (1,25 M) zugeben und mit geschlossenem Deckel für 16 h bei 80 °C im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator bis zur Trockne eindampfen
- 500 µL TFA-Lösung (2 M) zugeben und mit geschlossenem Deckel für 1 h bei 121 °C im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator zur Trockene eindampfen
- Zweimal je 200 µL Ethanol (99 %) hinzufügen und jeweils zur Trockene eindampfen

8 Arbeitsvorschriften

- In 200 µL Reinstwasser aufnehmen und 20 µL Probe mit 10 µL 2-Desoxy-D-glucose-Lösung (250 µM) versetzen und 70 µL H₂O hinzufügen
- Messung mittels HPAEC-PAD

Tabelle V1: Parameter der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) zur Analyse der Monosaccharide.

	HPAEC-PAD von ThermoFisher Scientific	HPAEC-PAD von Antec Scientific
Säule	Carbo-Pac PA-20 mit Vorsäule (6 µM, 30 x 3 mm, ThermoFisher Scientific)	SweetSept AEX200 mit Vorsäule (5 µm, 50 x 4 mm, Antec Scientific)
Flussrate	0,4 mL/min	0,7 mL/min
Säulenofentemperatur	25 °C	30 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)	25 µL (<i>partial loopfill</i>)
Detektionsparameter	Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)	Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)
Kalibrierung	Quadratisch (zwei 5-Punkt-Kalibrierungsreihen), 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 V2: Gradientenprogramme der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie zur Analyse der Monosaccharidzusammensetzung. ThermoFisher Scientific Anlage: Fließmittel A: Reinstwasser, Fließmittel B: 100 mM Natronlauge, Fließmittel C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat; AntecScientific Anlage: Fließmittel A: Reinstwasser, Fließmittel B: 10 mM Natronlauge, Fließmittel C: 100 mM Natronlauge + 100 mM Natriumacetat

ThermoFisher Scientific				Antec Scientific			
Zeit / min	A / %	B / %	C / %	Zeit / min	A / %	B / %	C / %
-20,0	0,0	100,0	0,0	0,0	60,0	40,0	0,0
-10,0	0,0	100,0	0,0	12,5	60,0	40,0	0,0
-9,9	90,0	10,0	0,0	18,0	0,0	0,0	100,0
0,0	90,0	10,0	0,0	24,0	0,0	0,0	100,0
1,5	97,0	3,0	0,0	24,5	60,0	40,0	0,0
22,0	97,0	3,0	0,0	59,0	60,0	40,0	0,0
27,0	0,0	100,0	0,0				
27,1	0,0	60,0	40				
37,0	0,0	60,0	40				

8.3.2 Bestimmung der Bindungsverhältnisse mittels Methylierungsanalyse

Methylierung

- Ca. 3 mg Getreide-UBS bzw. -LBS in ein Pyrexglas einwiegen
- 1 mL DMSO zugeben und 15 min im Ultraschallbad behandeln
- Über Nacht quellen lassen
- Am nächsten Tag nochmal 15 min im Ultraschallbad behandeln
- 50 mg frisch unter Stickstoff gemörserte NaOH zugeben
- Nacheinander 90 min im Ultraschallbad (Eis zugeben) und 90 min bei RT reagieren lassen
- 0,5 mL Methyliodid zugeben und nacheinander 30 min im Ultraschallbad und 30 min bei RT inkubieren
- 1,5 mL Dichlormethan zugeben
- 2,5 mL 0,1 M Natriumthiosulfatlösung zugeben und gründlich vortexen
- Obere (wässrige) Phase verwerfen
- Organische Phase 2x mit je 2,5 mL Reinstwasser waschen und wässrige Phase jeweils verwerfen
- Lösungsmittel abrotieren, ggf. kleinen Rest mit Stickstoff komplett trocknen
- Rückstand über Nacht im Vakuumtrockenschrank trocknen
- Kompletten Vorgang wiederholen und anschließend mit nächstem Schritt fortfahren

Hydrolyse

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

Reduktion

- 10 mg NaBD₄ in 0,15 mL 2 M Ammoniak zugeben (Vorsicht: Schaumbildung!)
- 1 h bei RT stehen lassen
- Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 50 µL Eisessig (Vorsicht: Schaumbildung!)

Acetylierung

- Probe auf Eis kühlen
- 225 µL 1-Methylimidazol und 1,5 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Probe auf Eis abkühlen und mit 1,5 mL Reinstwasser versetzen

8 Arbeitsvorschriften

- Abkühlen, 2,5 mL Dichlormethan zugeben und gründlich vortexen
- Obere (wässrige) Phase verwerfen
- Organische Phase 3x mit je 2,5 mL Reinstwasser waschen und wässrige Phase jeweils verwerfen
- Restwasser über Nacht im Gefrierschrank (-18 °C) ausfrieren
- Organische Phase in anderes Gefäß überführen und mittels GC-MS/GC-FID analysieren

Zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung der PMAA von 1,2,4- und 1,3,4-Xylp sowie 1,4-Galp wurde eine DB5-Trennsäule eingesetzt. Anhand der resultierenden Peakflächen konnten die prozentualen Anteile der PMAA nach Analyse mittels DB-225-Trennsäule bestimmt werden.

Tabelle V3: Gaschromatographische (GC) Bedingungen für die Bestimmung der partiell methylierten Alditolacetate. MS, Massenspektrometer; FID, Flammenionisationsdetektor; EI, Elektronenstoßionisation

	GC-MS	GC-FID
Säule	DB-225MS	DB-225
Trägergas	Helium	
Trägergasgeschwindigkeit	37 cm/s	
Injektionsvolumen	1 µL	5 µL
Injektortemperatur	220 °C	
Injektionsmethode	Split	
Split Rate	1:10	
Detektionsparameter	EI (70 eV) Scan Bereich: 41 - 350 m/z Scanzeit: 0,1 s Transferline-Temperatur: 220 °C	Detektortemperatur: 240 °C Makeup Gas: Stickstoff

Tabelle V4: Temperaturprogramm zur gaschromatographischen Analyse der partiell methylierten Alditolacetate.

Heizrate / °C/min	Endtemperatur / °C	Haltezeit / min
-	140	1
20	170	0
2	200	0
20	220	20

Tabelle V5: Gaschromatographische (GC) Bedingungen zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung der partiell methylierten Alditolacetate von 1,2,4-Xylp, 1,3,4-Xylp und 1,4-Galp. MS, Massenspektrometer; FID, Flammenionisationsdetektor; EI, Elektronenstoßionisation

	GC-MS	GC-FID
Säule	DB-5MS	DB-5
Trägergas	Helium	
Trägergasgeschwindigkeit	40 cm/s	
Injektionsvolumen	1 µL	5 µL
Injektortemperatur	250 °C	
Injektionsmethode	Split	
Split Rate	1:30	1:10
Detektionsparameter	EI (70 eV)	
	Scan Bereich: 41 - 350 m/z	Detektortemperatur: 325 °C
	Scanzeit: 0,1 s	Makeup Gas: Stickstoff
	Transferline-Temperatur: 275 °C	

Tabelle V6: Temperaturprogramm zur gaschromatographischen Analyse der partiell methylierten Alditolacetate von 1,2,4-Xylp, 1,3,4-Xylp und 1,4-Galp auf einer DB-5-Trennsäule.

Heizrate / °C/min	Endtemperatur / °C	Haltezeit / min
-	140	2
1	180	5
10	300	5

8.4 Gewinnung von Arabinoxyloligosacchariden

8.4.1 Freisetzung der Arabinoxyloligosaccharide aus Weizenarabinoxylan

- 1 g AX-Präparat (Weizenmehl, mittlere Viskosität) in 80 mL Reinstwasser lösen
- Jeweils ein Inkubationsansatz mit XYL₁₀ bzw. XYL₁₁: Zugabe von 400 µL XYL₁₀ (7 U/mL) bzw. 400 µL XYL₁₁ (50 U/mL)
- Für 4 h bei 75°C (XYL₁₀) bzw. 50°C (XYL₁₁) unter ständigem Rühren inkubieren
- Zugabe von Ethanol (60 % Endkonzentration, v/v) zur Inaktivierung der Enzyme
- Ggf. Präzipitat durch Zentrifugation abtrennen
- Lösung/Überstand einrotieren (50 °C) und Rest gefriertrocknen

8.4.2 Aufreinigung der Arabinoxylooligosaccharid-Standardsubstanzen

Fraktionierung mittels SEC-RI

- (A)XOS in Reinstwasser lösen
- Auftrennung der Hydrolysate mittels präparativer SEC-RI
- Fraktionen gemäß dem Peakmuster vereinigen und anschließend mittels HPAEC-PAD überprüfen
- Fraktionen gefriertrocknen

Tabelle V7: Bedingungen zur Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie

Säule	Bio-Gel-P2
Fließmittel	Reinstwasser, isokratisch
Flussrate	0,5 mL/min
Säulentemperatur	45 °C
Injektionsvolumen	10 mL
Detektion	RI-Detektion
Fraktionierung	Fraktionensammler im Anschluss zur Detektion, Beginn frei wählbar in Intervallen von 2,5 min

Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC-ELSD

- Trockene Bio-Gel-P2-Fraktionen in möglichst wenig Reinstwasser lösen
- Mittels HPLC-ELSD fraktionieren
- Fraktionen einrotieren und mittels HPAEC-PAD überprüfen
- Fraktionen gefriertrocknen und je nach Reinheit erneut fraktionieren

Tabelle V8: Bedingungen zur Fraktionierung mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigchromatographie

Säule	Hypercarb (PGC) mit Vorsäule (5 µM, 100 x 4,6 mm, ThermoFisher Scientific)	XBridge BEH Amide mit Vorsäule (5 µM, 250 x 10 mm, Waters)
Fließmittel	A: Reinstwasser B: Acetonitril	
Flussrate	1,0 mL/min	4,0 mL/min
Gradientenprogramm	Individuell angepasst an die Fraktion	
Säulenofentemperatur	70 °C	50 °C
Injektionsvolumen	10 - 100 µL (µL-pick-up)	
Detektion	ELSD (40 °C)	
Fraktionierung	Einstellbares Splitventil nach Säule, Verhältnis 1 : 30, programmierbares 16-Wege-Fraktionierventil parallel zur Detektion	

Fraktionierung mittels semipräparativer HPAEC-PAD

- Fraktionen in geeigneten Verdünnungen ansetzen
- Mittels semipräparativer HPAEC-PAD fraktionieren
- Fraktionen gemäß dem Peakmuster vereinigen und mit Salzsäure (0,1 M) neutralisieren
- Mittels nPGC-SPE (250 mg, 6 mL, Supelclean ENVI-Carb, Sigma Aldrich) entsalzen
 - Konditionieren
 - Acetonitril (3 x 1 mL)
 - Reinstwasser (3 x 1 mL)
 - Probe schrittweise aufgeben
 - Mit Reinstwasser (4 x 1 mL) waschen (Monosaccharide werden entfernt)
 - Oligosaccharide mit Acetonitril/Reinstwasser (50 : 50, 3 x 1 mL) eluieren
 - Rekonditionieren:
 - Acetonitril (4 x 1,5 mL)
 - Reinstwasser (4 x 1,5 mL)
 - Acetonitril (2 x 1,5 mL)
 - Zweiter Zyklus (nochmals Konditionieren, Probe aufgeben, Waschen, Eluieren) und anschließend Kartusche entsorgen
- Eluat evaporieren und gefriertrocknen

Tabelle V9: Bedingungen zur Fraktionierung mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion

Säule	Semipräparative CarboPac-100 (8,5 µM, 250 x 9 mm, ThermoFisher Scientific)
Fließmittel	A: Reinstwasser B: 100 mM Natronlauge C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat
Flussrate	2,0 mL/min
Säulenofentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	50 µL
Gradientenprogramm	Individuell angepasst an die Fraktion
Detektion	Goldelektrode (Arbeitselektrode) und Ag/AgCl-Referenzelektrode (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“)
Fraktionierung	Einstellbares Splitventil nach Säule, Verhältnis 1 : 20, programmierbarer und automatisierbarer Fraktionssammler parallel zur Detektion

8.5 Gewinnung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide

8.5.1 Freisetzung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide aus unlöslichen Ballaststoffen

Freisetzung aus unlöslichen Roggenballaststoffen

- 8 - 9 g UBS aus Roggen in 900 mL Reinstwasser suspendieren (4 Ansätze)
- Zugabe von 1 g Driselase-Mischung
- Inkubation bei 40 °C für 48 h unter sanftem Schütteln
- Suspension für 15 min bei 92 °C im Wasserbad erhitzen zur Inaktivierung des Enzyms
- Suspension zentrifugieren (5000 rpm, 20 min) und Überstand durch einen Faltenfilter filtrieren
- Filtrat bei max. 40 °C (!) auf ein Volumen < 50 mL einrotieren
- mit Reinstwasser auf 50 mL auffüllen (4 x 50 mL = 200 mL) → Amberlite XAD-2

Freisetzung aus unlöslichen Maisballaststoffen (Schäfer, 2023)

Milde TFA-Hydrolyse der UBS (gesamt 2 x 2 Durchläufe, unter Lichtausschluss)

- 20 g bzw. 25 g UBS mit 300 bzw. 375 mL TFA (50 mM) versetzen
- Für 20 min auf einer Heizplatte unter Rühren bis 95 °C erhitzen
- Auf Eis abkühlen lassen
- 1200 bzw. 1500 mL Ethanol (80 % Endkonzentration (v/v)) zugeben
- Rückstand abzentrifugieren (10 min, 5000 rpm), waschen (3 x 80% Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x Aceton) und trocknen

Enzymatische Hydrolyse (2 x 2 Durchgänge, unter Lichtausschluss)

- Ca. 15,8 g bzw. 22,2 g Rückstand nach TFA-Hydrolyse und Ethanolfällung in 300 bzw. 420 mL vollentsalztem Wasser aufnehmen
- pH mit NaOH (2 M) auf 6,3 einstellen
- 314 bzw. 439 µL XYL_{ABV} zugeben
- Im Wasserbad bei 80 °C für 6 h inkubieren, alle 30 min schwenken
- Enzym bei 100 °C inaktivieren und direkt auf Eis abkühlen
- Überstand abzentrifugieren und durch Miracloth-Filter filtrieren
- Rückstand aufschlemmen, nochmal zentrifugieren und Überstände vereinigen
- Überstand auf ca. 100 mL einrotieren (max. 40 °C (!))
- Mit 4-facher Menge Ethanol fällen und über Nacht präzipitieren lassen
- Rückstand abzentrifugieren
- Überstand auf ca. 30 mL einrotieren → Amberlite XAD-2

8.5.2 Aufreinigung der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharid- Standardsubstanzen

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

- Konditionierung des Säulenmaterials mit mehreren Säulenvolumina an MeOH (3x) und vollentsalztem Wasser (3x)
- Hydrolysate aus Roggen bzw. Mais (s. Kapitel 8.5.1) mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro Sekunde auf die Säule aufbringen
- Mit 600 mL vollentsalztem Wasser waschen (H₂O-Fraktion)
- FAXOS mit 600 mL Methanol/Wasser (50 : 50, v/v) von der Säule eluieren (MeOH/H₂O-Fraktion)
- Mit 500 - 600 mL MeOH spülen (MeOH-Fraktion)
- H₂O-Fractionen aus mehreren Ansätzen vereinigen, einengen und ggf. nochmal mittels Amberlite XAD-2 fraktionieren (falls noch ferulasäurehaltige Substanzen nachweisbar sind)
- MeOH/H₂O-Fractionen einrotieren, vereinigen und weiter einengen (Volumen < 50 mL)
- Unter Lichtausschluss gefriertrocknen (braune 50 mL-Tubes verwenden!)

Fraktionierung mittels SEC-UV

- gefriergetrocknete MeOH/H₂O-Fraktion in Reinstwasser lösen
- Auftrennung der Fraktion mittels präparativer SEC-UV
- Fraktionen gemäß dem Peakmuster vereinigen, einrotieren und mittels LC-UV/MS überprüfen
- Fraktionen einfrieren und gefriertrocknen

Tabelle V10: Bedingungen zur Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie

Säule	Sephadex LH-20
Fließmittel	Vollentsalztes Wasser, isokratisch
Flussrate	0,5 mL/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Injektionsvolumen	10 mL
Detektion	UV-Detektion (350 nm)
Fraktionierung	Fraktionensammler im Anschluss zur Detektion, Beginn frei wählbar in Intervallen von 6 min

Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC-UV/ELSD

- Trockene Sephadex-Fractionen in möglichst wenig Reinstwasser lösen
- Mittels HPLC-UV/ELSD fraktionieren
- Fraktionen einrotieren und mittels LC-UV/MS überprüfen
- Fraktionen gefriertrocknen und je nach Reinheit erneut fraktionieren

Tabelle V11: Parameter zur Fraktionierung mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigchromatographie

Säule	Luna 5u C18(2) 100 Å (5 µM, 250 x 10 mm, Phenomenex)	XBridge BEH Amide mit Vorsäule (5 µM, 250 x 10 mm, Waters)
Fließmittel	A: Reinstwasser B: Methanol	A: Reinstwasser B: Acetonitril
Flussrate	1,0 mL/min	4,0 mL/min
Gradientenprogramm	Individuell angepasst an die Fraktion	
Säulenofentemperatur	Raumtemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 - 100 µL (µL-pick-up)	
Detektion	UV-Detektion (325 nm), ELSD (40 °C)	
Fraktionierung	Einstellbares Splitventil nach Säule, Verhältnis 1 : 30, programmierbares 16-Wege-Fraktionierventil parallel zur Detektion	

8.6 Strukturcharakterisierung der isolierten Standardsubstanzen

- (A)XOS- bzw. FAXOS-Standardsubstanzen in 200 µL D₂O lösen und gefriertrocknen (2x)
- Gefriergetrocknete Probe für NMR-Messung in 550 µL D₂O lösen

8.6.1 Monosaccharidzusammensetzung nach Trifluoressigsäure-Hydrolyse

- 1 - 3 µL der NMR-Messlösung der AXOS- bzw. FAXOS-Standardsubstanz in ein 1,5 mL-Glasvial pipettieren und im Evaporator bis zur Trockene eindampfen
- 500 µL TFA-Lösung (2 M) zugeben und mit geschlossenem Deckel für 1 h bei 121 °C im Trockenschrank behandeln
- Im Evaporator zur Trockene eindampfen
- Zweimal je 200 µL Ethanol (99 %) hinzufügen und jeweils zur Trockene eindampfen
- In 200 µL Reinstwasser aufnehmen und 20 µL Probe mit 10 µL 2-Desoxy-D-glucose-Lösung (250 µM) versetzen und 70 µL H₂O hinzufügen
- Messung mittels HPAEC-PAD (s. Kapitel 8.3.1)

8.6.2 Bestimmung der Molekülmassen

HPAEC-PAD/MS-Analyse der AXOS-Standardsubstanzen

- AXOS-Proben mit ausreichender Reinheit wurden mittels HPAEC-PAD/MS analysiert

Tabelle V12: Bedingungen zur Bestimmung der Molekülmassen der isolierten Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit paralleler gepulst amperometrischer Detektion (PAD) und massenspektrometrischer Detektion (MS)

Säule	CarboPac-200 mit Vorsäule (5,5 µM, 50 x 3 mm, ThermoFisher Scientific)
Fließmittel	A: Reinstwasser B: 100 mM Natronlauge C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat
Flussrate	0,4 mL/min Split nach Säule: 0,1 mL/min (PAD), 0,3 mL/min (MS)
Säulenofentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Gradientenprogramm	Individuell angepasst an die Fraktion
Detektion	Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“) Elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser und anschließender Leitfähigkeitsdetektion zur Kontrolle der Entsalzung (20 °C) Zusatz von 0,5 mM Lithiumchlorid-Lösung (0,05 mL/min) ESI im Positivmodus: (<i>Full Scan m/z</i> : 200 - 1300)

Tabelle V13: Gradientenprogramm der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie zur Bestimmung der Molekülmassen der isolierten Arabinoxyloligosaccharid-Standardsubstanzen. ThermoFisher Scientific
Anlage: Fließmittel A: Reinstwasser, Fließmittel B: 100 mM Natronlauge, Fließmittel C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat

Zeit / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	35,0	65,0	0,0
18,0	35,0	63,5	1,5
22,0	35,0	63,5	1,5
60,0	31,0	53,0	16,0
80,0	27,0	49,0	24,0
80,1	0,0	0,0	100,0
90,0	0,0	0,0	100,0

Stufenweise Fragmentierung der FAXOS-Standardsubstanzen mittels linearer Ionenfalle

- 5 µL der NMR-Messlösung der FAXOS wurden mit 195 µL H₂O/MeOH (60 : 40) versetzt
- Von jedem FAXOS wurde ein *Full-Scan*-Spektrum aufgenommen
- Ausgewählte Ionen wurden in der linearen Ionenfalle stufenweise fragmentiert (MSⁿ)

Tabelle V14: Bedingungen zur Analyse der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharide mittels linearer Ionenfalle

Ionisierung	ESI, Positiv-Modus
Tuning	Automatischer Tune auf A ³ X, A ⁵³ X
Injektion	Spritzenpumpe mit 10 - 20 µL/min

8.6.3 NMR-Spektroskopie

- 0,5 µL Aceton zur Lösung der (A)XOS und FAXOS in D₂O zugeben
- Lösungen wurden in NMR-Röhrchen überführt und mit einem 500 MHz-Spektrometer gemessen

Tabelle V15: Parameter der für die Strukturcharakterisierung der Standardsubstanzen eingesetzten NMR-Experimente

Referenzierung	Aceton ($\delta_H = 2,22$ ppm/ $\delta_C = 30,89$ ppm)				
Pulssequenzen	Alle Experimente wurden mit den Standardparametersätzen der Firma Bruker durchgeführt.				
	Experiment	Pulsprogramm	Datenpunkte (F2xF1)	Scanzahl	NUS
	¹ H	zg30	65536	128 - 512	-
	HSQC (phasensensitiv)	hsqcetgp	1024x1024	16 - 32	50 %
	HSQC-TOCSY	hsqcetgpm1	2048x2048	16	50 %
	HMBC	hmbcgp1pndqf	2048x2048	16 - 32	50 %
	H2BC	h2bcetgpl3	2048x256	32 - 64	50 %

8.7 Quantifizierung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

- Gefriergetrocknete (A)XOS-Standardsubstanzen in 550 µL 0,5 mg/mL Acetanilid in D₂O lösen
- In NMR-Röhrchen überführt und mit einem 500 MHz-Spektrometer gemessen
- Quantifizierung anhand des Flächenverhältnisses der Methylgruppe (drei Protonen) des Acetanilids und eines Analytsignals mit bekannter Anzahl an Protonen

Tabelle V16: Aufnahmeparameter des für die Konzentrationsbestimmung der (Arabino-)xylooligosaccharide eingesetzten ^1H -NMR-Experiments

Referenzierung	Acetanilid ($\delta_{\text{H}} = 2,17$ ppm)
Aufnahmeparameter	^1H (zg30) Scanzahl: 64 Spektrale Breite / ppm: 19,9947 Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten: 65536 Akquisitionszeit / s: 3,277 D_1 -Delay: 15 s

8.8 Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten mittels *Inversion-Recovery-Experiment*

- Gefriergetrocknete (A)XOS-Standardsubstanzen in 550 μL D_2O lösen und 0,5 μL Aceton hinzugeben
- Lösungen wurden in NMR-Röhrchen überführt und mit einem 500 MHz-Spektrometer gemessen

Tabelle V17: Aufnahmeparameter des *Inversion-Recovery-Experiments* zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeiten (T_1) der (Arabino-)Xylooligosaccharide

Referenzierung	Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm)
Aufnahmeparameter	Pulsprogramm: t1ir, Anzahl der Scans: 16 Spektrale Breite / ppm: 19,9947 Anzahl an aufgenommenen FID-Datenpunkten: 16384 Akquisitionszeit / s: 0,819 D_1 -Delays / s: 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0

8.9 HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode zur Strukturcharakterisierung von Arabinoxylanen aus Getreide

- 5 mg UBS bzw. LBS aus Getreide in ein 2 mL Reaktionsgefäß einwiegen und in 400 μL Reinstwasser suspendieren/lösen
- 2 μL XYL_{10} (1400 U/mL) bzw. 1 μL XYL_{11} (10000 U/mL) zugeben und 24 h bei 75 °C (XYL_{10}) bzw. 50 °C (XYL_{11}) im Schüttelinkubator inkubieren
- Zum Abbruch der Reaktion 1,6 mL Ethanol zugeben, 1 h präzipitieren lassen und zentrifugieren (136000 rpm, 10 min)
- 500 μL Überstand abnehmen und im Evaporator bis zur Trockene eindampfen
- Trockener Rückstand in 500 μL Reinstwasser aufnehmen

8 Arbeitsvorschriften

- Lösung für HPAEC-Messung ggf. verdünnen und IMT- und LT-Lösung hinzugeben (Endkonzentration im HPAEC-Vial: jeweils 10 µM)
- Kontrollprobe: 10 mg Probenmaterial ohne Enzymzugabe mitführen und analysieren

Tabelle V18: Bedingungen zur Analyse der (Arabino-)Xylooligosaccharide mittels der entwickelten Profilingmethode basierend auf der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit paralleler gepulst amperometrischer Detektion (PAD) und massenspektrometrischer Detektion (MS)

Säule	CarboPac-200 mit Vorsäule (5,5 µM, 50 x 3 mm, ThermoFisher Scientific)
Fließmittel	A: Reinstwasser B: 100 mM Natronlauge C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat
Flussrate	0,4 mL/min Split nach Säule: 0,1 mL/min (PAD), 0,3 mL/min (MS)
Säulenofentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	25 µL (<i>full loop</i>)
Gradientenprogramm	Individuell angepasst an die Fraktion
Detektion	Goldelektrode (Arbeitselektrode) und PdH-Referenzelektrode (20 °C) mit für Kohlenhydrate angepasster Wellenform („Quad-Potential“) Elektrolytisch regenerierender Suppressor im Gegenstrom mit Reinstwasser und anschließender Leitfähigkeitsdetektion zur Kontrolle der Entsalzung (20 °C) Zusatz von 0,5 mM Lithiumchlorid-Lösung (0,05 mL/min) ESI im Positivmodus: (<i>Full Scan m/z</i> : 150 - 1000) oder SIM-Modus (<i>m/z</i> der (A)XOS in Tabelle 5)

Tabelle V19: Gradientenprogramm der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie zur Bestimmung der (Arabino-)Xylooligosaccharide mittels der entwickelten Profilingmethode. ThermoFisher Scientific Anlage: Fließmittel A: Reinstwasser, Fließmittel B: 100 mM Natronlauge, Fließmittel C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat

Zeit / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	100,0	0,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	40,0	59,0	1,0
30,0	40,0	57,0	3,0
60,0	27,0	56,0	17,0
80,0	17,0	53,0	30,0
80,1	0,0	0,0	100,0
90,0	0,0	0,0	100,0

Tabelle V20: Gradientenprogramm der Hochleistungsanionenaustauschchromatographie zur Trennung der (Arabino-)Xylooligosaccharide auf einer SweetSep-AEX200-Säule (Antec Scientific). ThermoFisher Scientific
 Anlage: Fließmittel A: Reinstwasser, Fließmittel B: 100 mM Natronlauge, Fließmittel C: 100 mM Natronlauge + 500 mM Natriumacetat

Zeit / min	A / %	B / %	C / %
-30,0	0,0	0,0	100,0
-20,0	0,0	0,0	100,0
-19,9	90,0	10,0	0,0
0,0	90,0	10,0	0,0
10,0	45,0	54,0	1,0
35,0	25,0	70,0	5,0
80,0	24,0	40,0	36,0
80,1	0,0	0,0	100,0
90,0	0,0	0,0	100,0

8.10 HSQC-Profilierungsmethode zur Bestimmung verschiedener Strukturelemente von Arabinoxylanen

8.10.1 Enzymatische Freisetzung von (Arabino-)Xylooligosacchariden aus Getreideballaststoffen

- 400 mg UBS (bei Verzicht auf die Trennung von (A)XOS und FAXOS genügen auch 200 mg UBS, jedoch muss die Enzymmenge entsprechend angepasst werden) bzw. 100 mg LBS in ein 50-mL-Tube einwiegen
- Zugabe von Reinstwasser bis zu einer Konzentration von 10 mg BS/mL
- UBS: 80 µL XYL₁₀ (1400 U/mL) bzw. 80 µL XYL₁₁ (10000 U/mL) zugeben
 LBS: 20 µL XYL₁₀ (1400 U/mL) bzw. 20 µL XYL₁₁ (10000 U/mL) zugeben
- über Nacht bei 75 °C unter 360°-Rotation (XYL₁₀) bzw. bei 50 °C (XYL₁₁) im Schüttelinkubator inkubieren
- Zum Abbruch der Reaktion Ethanol bis zu einer Volumenkonzentration von 50 % zugeben und 1 h präzipitieren lassen, UBS für Ethanolfällung auf zwei Reaktionsgefäße aufsplitten (jeweils 20 mL + 20 mL Ethanol)
- Zentrifugieren (5000 rpm, 10 min) und möglichst großes Aliquot des Überstands entnehmen und am Rotationsverdampfer eindampfen
- Wässriger Rückstand gefriertrocknen

8.10.2 Chromatographische Trennung ferulasäurefreier und -haltiger Arabinoxyloligosaccharide aus den unlöslichen Ballaststoffen

- Gefriergetrocknete Hydrolysate der UBS (s. Kapitel 8.10.1) in 1,5 mL Reinstwasser lösen, ggf. unlösliche Bestandteile abzentrifugieren (13600 rpm, 10 min)
- 1 mL Hydrolysat in ein 1,5 mL-Glasvial mit Deckel + Septum überführen
- 900 µL mittels semipräparativer RP-HPLC (s. Tabelle V21 und V22) aufreinigen (entspricht neun Läufen mit je 100 µL Injektionsvolumen)
- Fraktionen der ferulasäurefreien und -haltigen OS in lichtgeschützten Gefäßen (250 mL-Rundkolben) sammeln und am Rotationsverdampfer eindampfen
- Wässrige Rückstände gefriertrocknen

Tabelle V21: Bedingungen zur Fraktionierung der ferulasäurefreien und -haltigen Oligosaccharide mittels Hochleistungsflüssigchromatographie mit paralleler UV- und Lichtstreuungsdetektion (ELSD).

Säule	Luna Phenyl-Hexyl (5 µM, 250 x 10 mm, Phenomenex)
Fließmittel	A: Reinstwasser B: Methanol
Flussrate	1,5 mL/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Injektionsvolumen	100 µL (µL-pick-up)
Detektion	ELSD und UV-Detektion (325 nm)
Fraktionierung	Einstellbares Splitventil nach Säule, Verhältnis 1 : 30, programmierbares 16-Wege-Fraktionierventil parallel zur Detektion Ferulasäurefreie Oligosaccharide: 6,0 - 16,0 min Ferulasäurehaltige Oligosaccharide: 25,0 - 37,0 min

Tabelle V22: Gradientenprogramm der Hochleistungsflüssigchromatographie für die Auftrennung von ferulasäurefreien und -haltigen Oligosacchariden. Fließmittel A: Reinstwasser, Fließmittel B: Methanol

Zeit / min	A / %	B / %
0,0	80,0	20,0
18,0	80,0	20,0
19,0	20,0	80,0
35,0	20,0	80,0
36,0	80,0	20,0
40,0	80,0	80,0

8.10.3 Analyse mittels ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR

- Gefriergetrocknete (A)XOS- und FAXOS-Fractionen (s. Kapitel 8.10.2) bzw. Hydrolysate der LBS in 550 μL 5 mM MeGlc in D_2O lösen und 0,5 μL Aceton hinzugeben
- In NMR-Röhrchen überführt und mit einem 500 MHz-Spektrometer gemessen
- Zur semiquantitativen Abschätzung der in (A)XOS vorkommenden Strukturelemente wird der Anteil eines Strukturelements mithilfe der RRF (s. Tabelle A37) sowie der Integralverhältnisse zwischen dem Markersignal und dem Referenzsignal des MeGlc unter Anwendung der Formel (10) berechnet

Tabelle V23: Aufnahmeparameter des *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiments zur semiquantitativen Bestimmung verschiedener Strukturelemente von (Arabino-)Xylooligosacchariden sowie zur qualitativen Analyse von ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosacchariden

Referenzierung	Aceton ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm)
Aufnahmeparameter	Pulsprogramm: hsqcedetgp Anzahl der Scans: 8 - 32 Anzahl an aufgenommenen Datenpunkten: 1024x1024 (F1xF2) <i>Non-Uniform Sampling</i> : 50 % <i>D₁-Delay</i> : 1,5 s

9 Anhang

Tabelle A1: Chromatographische Aufreinigungsschritte der isolierten Arabinoxyloligosaccharide (AXOS) aus den enzymatischen Hydrolysaten des Weizenmehl-Arabinoxylans nach der BioGel-P2-Trennung. XYL₁₀, GH10-Xylanase; XYL₁₁, GH11-Xylanase; HILIC, Hydrophilie Interaktionschromatographie; PGC, Poröser, graphitierter Kohlenstoff; HPAEC-PAD, Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion

AXOS	BioGel-P2-Fraktion		Aufreinigungsschritte			HPAEC-PAD
	XYL ₁₀ Hydrolyse	XYL ₁₁ Hydrolyse	HILIC	PGC	HPAEC	Reinheit
XA³X	5	-	-	X	-	> 95 %
XXA³X	4	-	X	X	-	> 90 %
A³A³X	4	-	X	X	-	> 95 %
XA²⁺³XX	3,4	-	-	X	X	> 95 %
XA³A³X	3	-	-	X	-	> 90 %
A³A²⁺³XX	2,3	-	X	X	-	> 95 %
XA³A²⁺³XX	-	3	X	X	-	> 90 %
A²⁺³A²⁺³XX	2	-	X	X	-	> 95 %
A²⁺³XA²⁺³XX	2	-	X	X	X	> 95 %

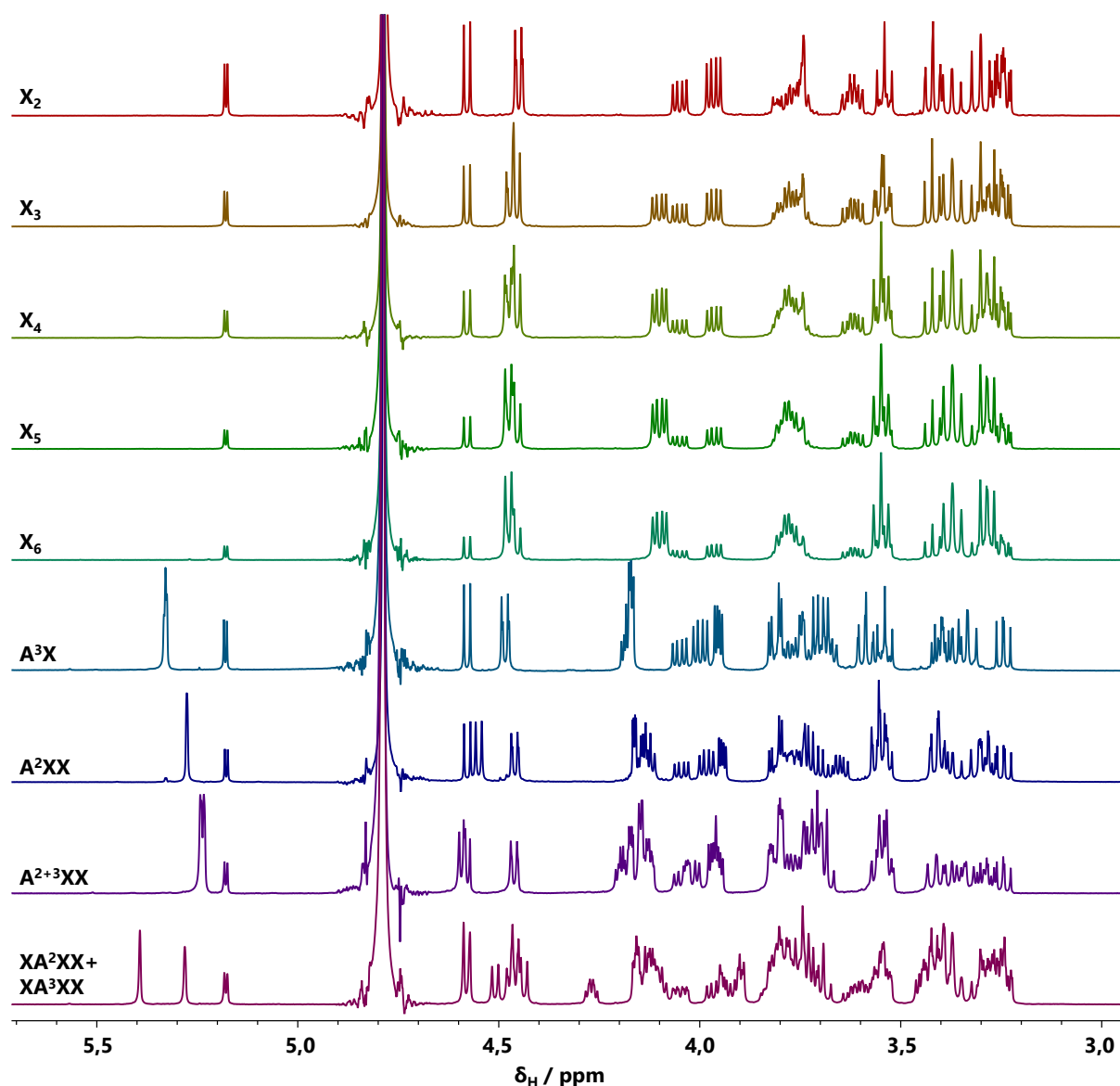


Abbildung A1: Erweiterte Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der kommerziell erhältlichen Standards der Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS). Die Ausschnitte zeigen sowohl den Bereich der Ringprotonen- als auch der anomeren Protonensignale der (A)XOS. Das intensive Signal bei $\delta_H = 4,7 - 4,9$ ppm wird durch Restwasser im Lösungsmittel hervorgerufen. Die Spektren wurden in D_2O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals kalibriert ($\delta_H = 2,22$ ppm). Die Nomenklatur der (A)XOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

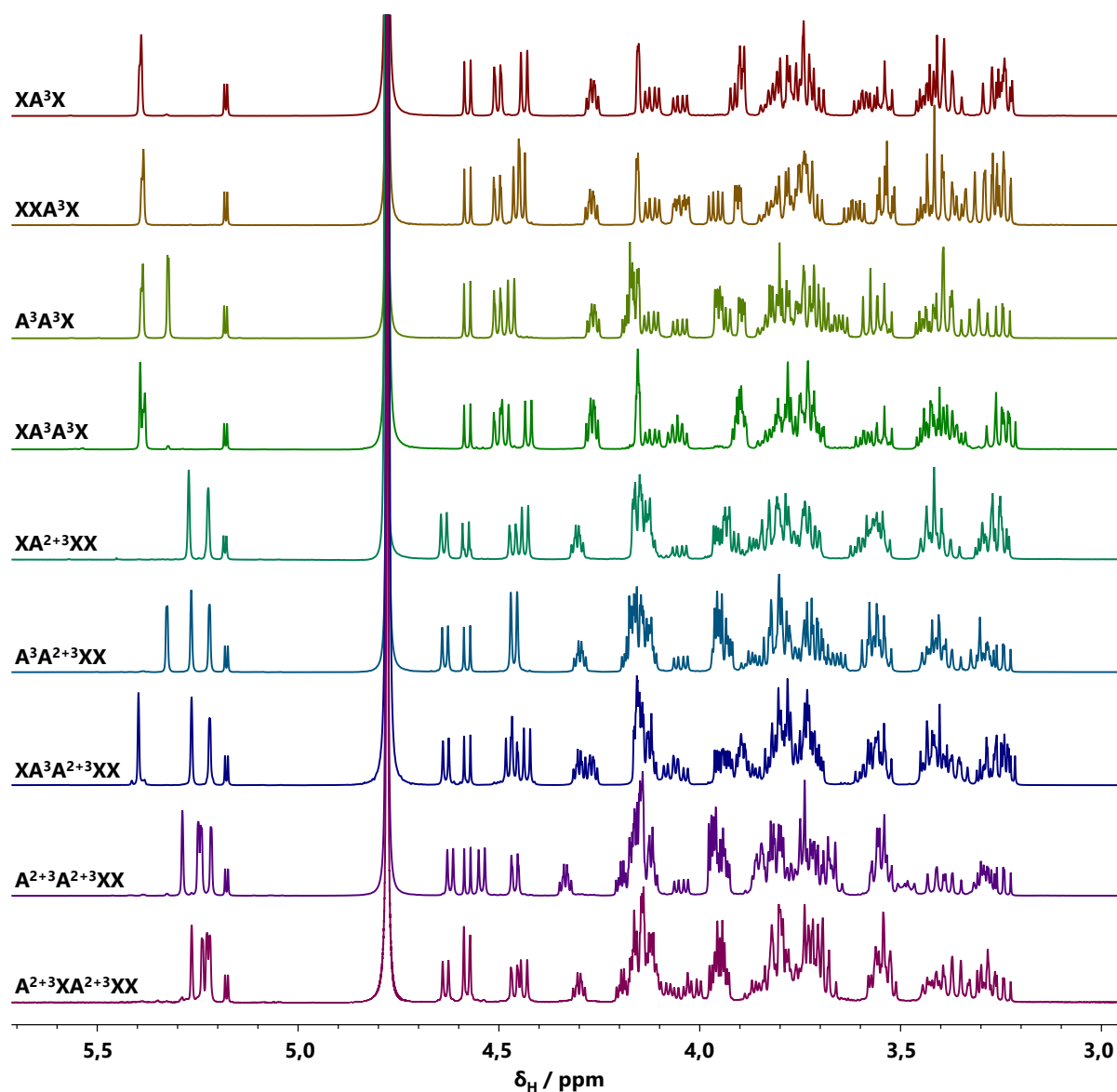


Abbildung A2: Erweiterte Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der aus Weizenmehl-Arabinoxylan isolierten Standardsubstanzen der Arabinooligosaccharide (AXOS). Die Ausschnitte zeigen sowohl den Bereich der Ringprotonensignale als auch der anomeren Protonensignale der AXOS. Das intensive Signal bei $\delta_{\text{H}} = 4,7 - 4,9$ ppm wird durch Restwasser im Lösungsmittel hervorgerufen. Die Spektren wurden in D_2O mit einem 500 MHz Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals kalibriert ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm). Die Nomenklatur der AXOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

9 Anhang

Tabelle A2: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Xylooligosaccharids X_2 , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
α -Xylp _r	5,18 (3,65)	3,53	3,75	3,74	3,80/3,74
	92,69	72,06	71,58	77,24	59,52
β -Xylp _r	4,58 (7,85)	3,24	3,54	3,77	4,05/3,37
	97,14	74,65	74,57	77,08	63,65
β -Xylp _t	4,45 (7,98)	3,24	3,42	3,62	3,96/3,30
	102,52	73,44	76,27	69,88	65,83

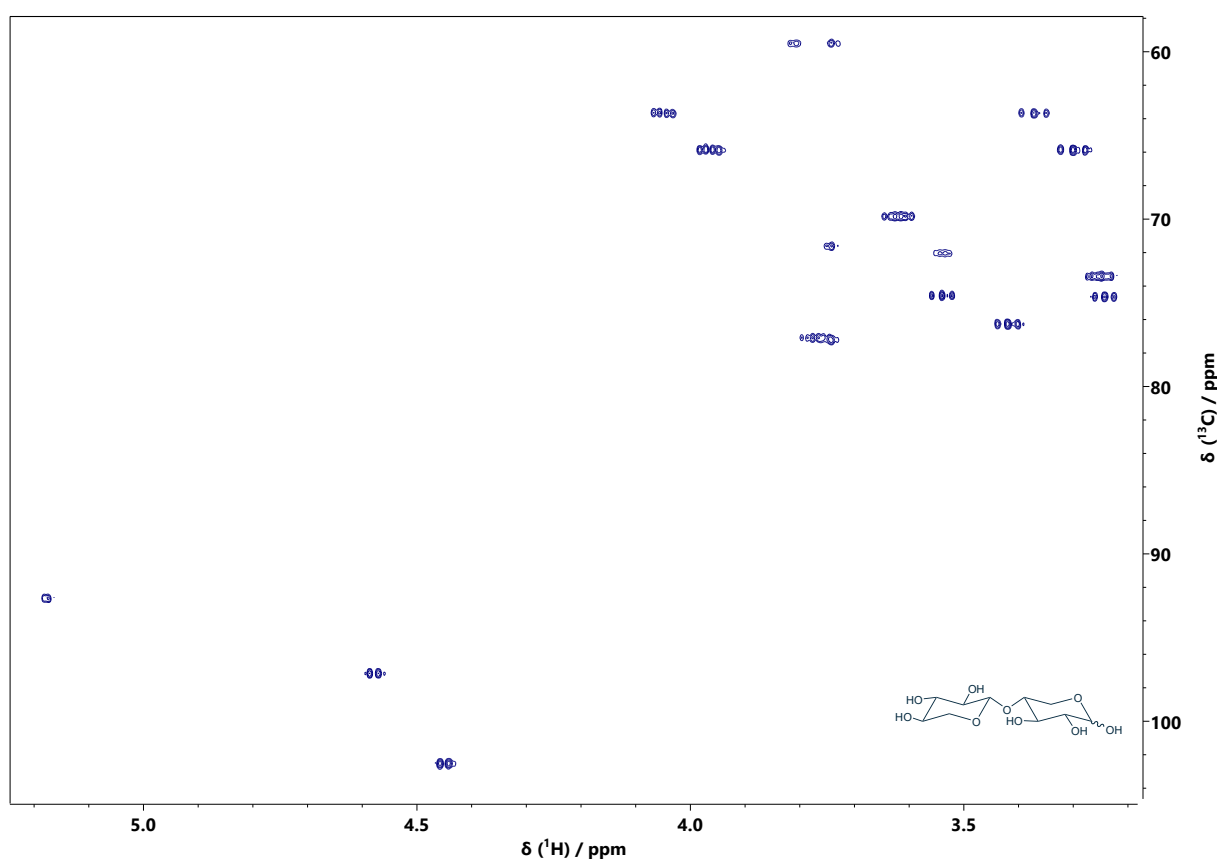


Abbildung A3: HSQC-Spektrum und Struktur des Xylooligosaccharids X_2 . Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm).

Tabelle A3: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Xylooligosaccharids X_3 , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylpr	5,18 (3,65)	3,53		3,74	3,80/3,74
	92,69	72,06	71,58	77,24	59,44
β -Xylpr	4,58 (7,90)	3,24	3,54	3,77	4,05/3,37
	97,14	74,65	74,57	76,99	63,65
β -Xylpl	4,47 (7,91)	3,28	3,55	3,78	4,10/3,37
	102,30	73,36	74,32	77,00	63,65
β -Xylpt	4,45 (7,82)	3,25	3,42	3,62	3,96/3,30
	102,48	73,44	76,27	69,88	65,87

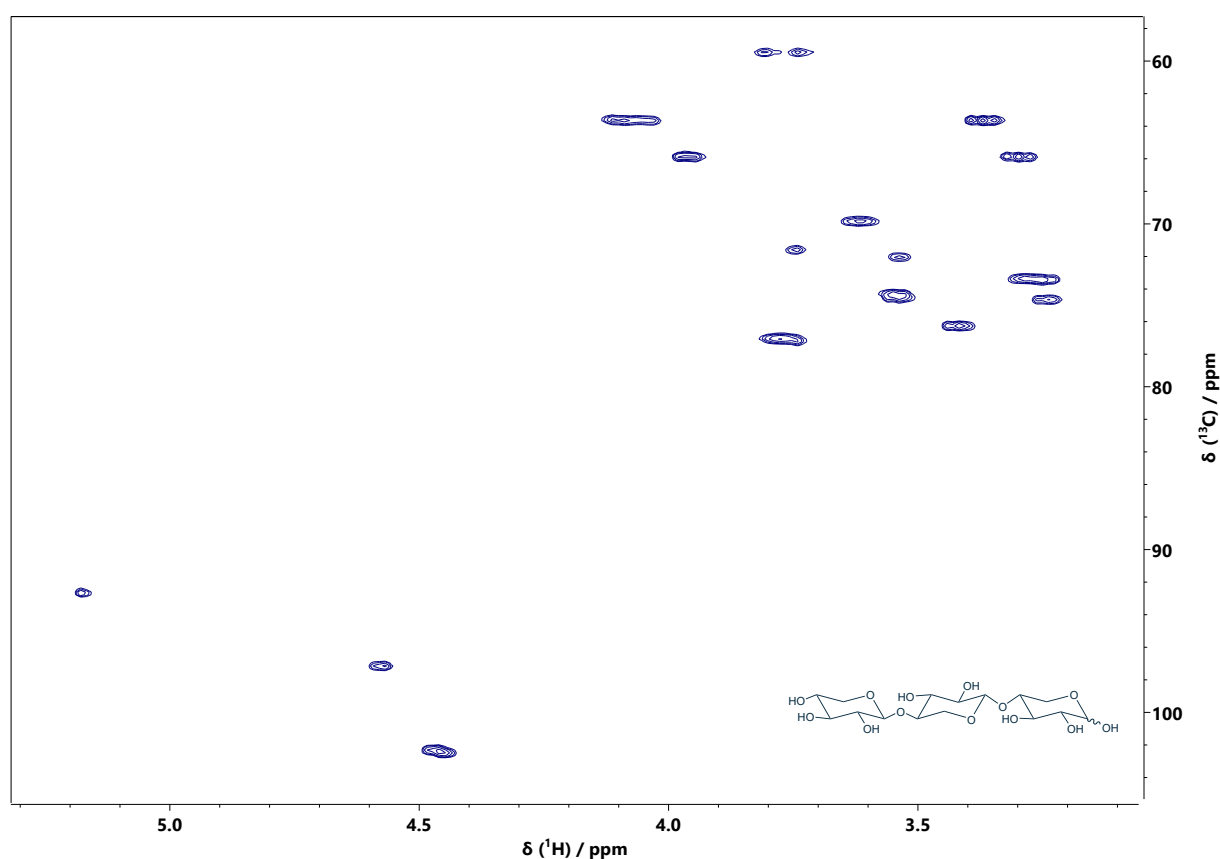


Abbildung A4: HSQC-Spektrum und Struktur des Xylooligosaccharids X_3 . Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm).

Tabelle A4: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Xylooligosaccharids X_4 , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,65) 92,69	3,53 72,06	3,75 71,58	3,74 77,24	3,80/3,74 59,44
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,90) 97,14	3,24 74,65	3,54 74,57	3,78 76,99	4,05/3,37 63,65
$\beta\text{-Xylp}_{I-II}$	4,47 102,32	3,29 73,36	3,55 74,33	3,79 76,99	4,10/3,37 63,64
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,45 (7,88) 102,48	3,25 73,44	3,42 76,27	3,62 69,88	3,96/3,30 65,87

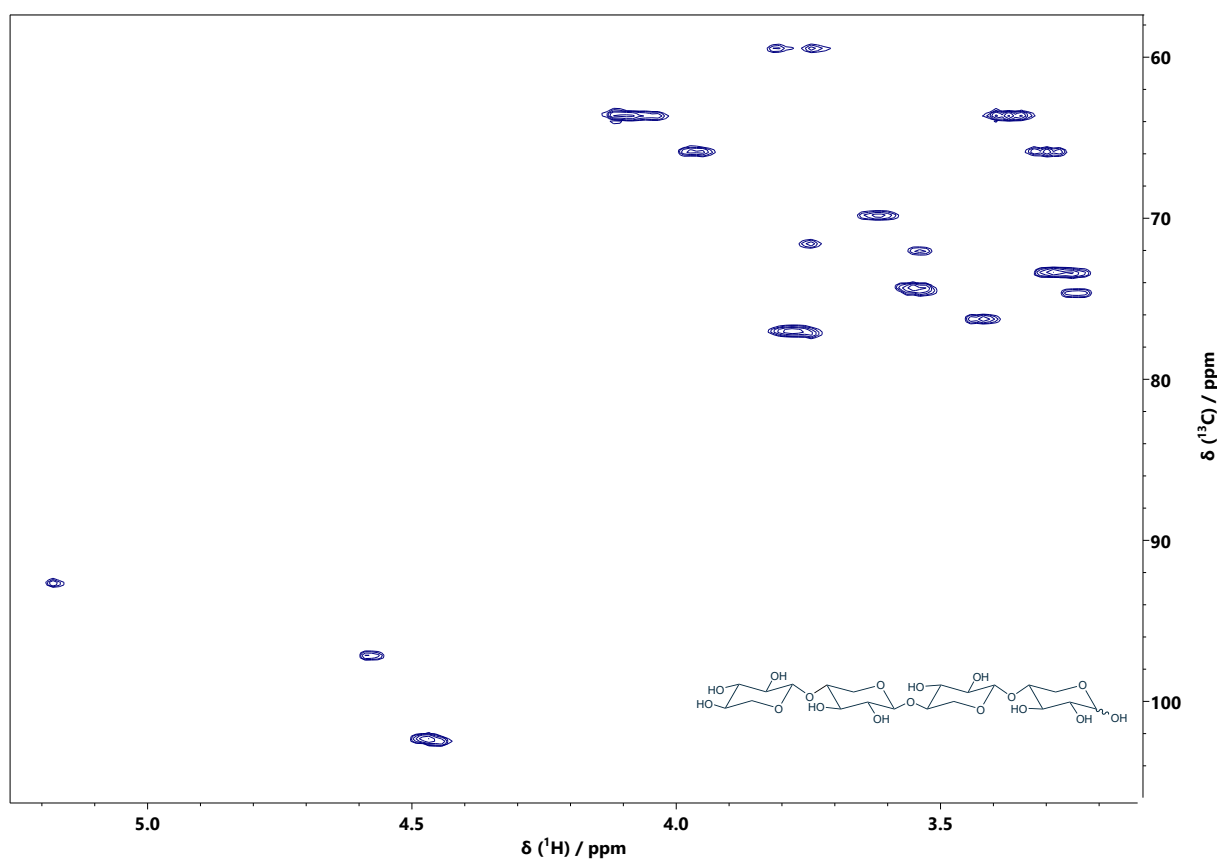


Abbildung A5: HSQC-Spektrum und Struktur des Xylooligosaccharids X_4 . Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm).

Tabelle A5: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Xylooligosaccharids X_5 , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,66) 92,69	3,54 72,06	3,74 71,58	3,74 77,24	3,81/3,74 59,44
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,90) 97,14	3,24 74,65	3,54 74,57	3,78 76,99	4,04/3,37 63,65
$\beta\text{-Xylp}_{I-III}$	4,47 102,32	3,28 73,36	3,55 74,33	3,79 77,00	4,09/3,37 63,65
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,45 (7,90) 102,49	3,25 73,44	3,42 76,27	3,62 69,87	3,96/3,30 65,90

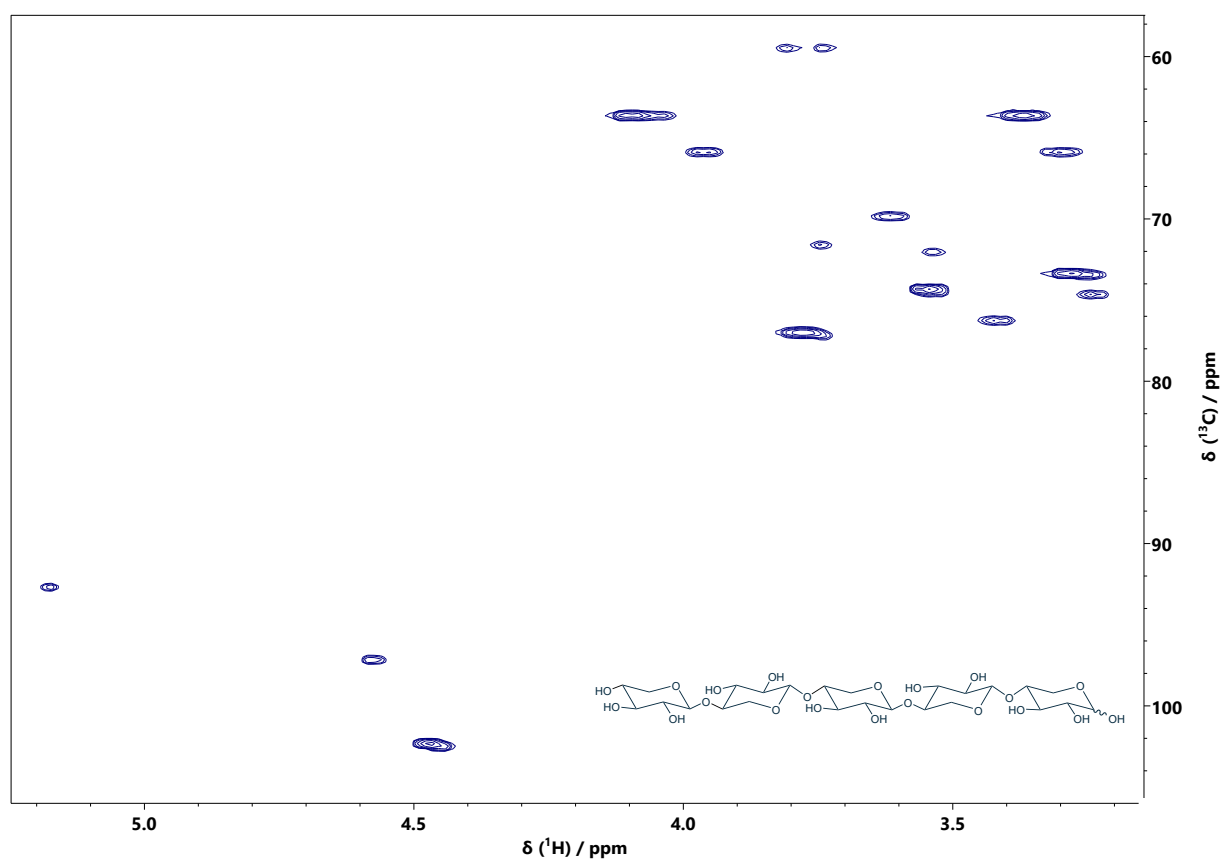


Abbildung A6: HSQC-Spektrum und Struktur des Xylooligosaccharids X_5 . Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm).

Tabelle A6: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Xylooligosaccharids X₆, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylp _r	5,18 (3,65) 92,69	3,54 72,06	3,74 71,58	3,74 77,24	3,81/3,74 59,45
β -Xylp _r	4,58 (7,87) 97,14	3,24 74,65	3,54 74,57	3,77 77,00	4,05/3,37 63,65
β -Xylp _{I-IV}	4,47 102,32	3,29 73,36	3,55 74,33	3,79 77,00	4,10/3,37 63,65
β -Xylp _t	4,45 (7,99) 102,48	3,25 73,44	3,42 76,27	3,62 69,88	3,96/3,30 65,87

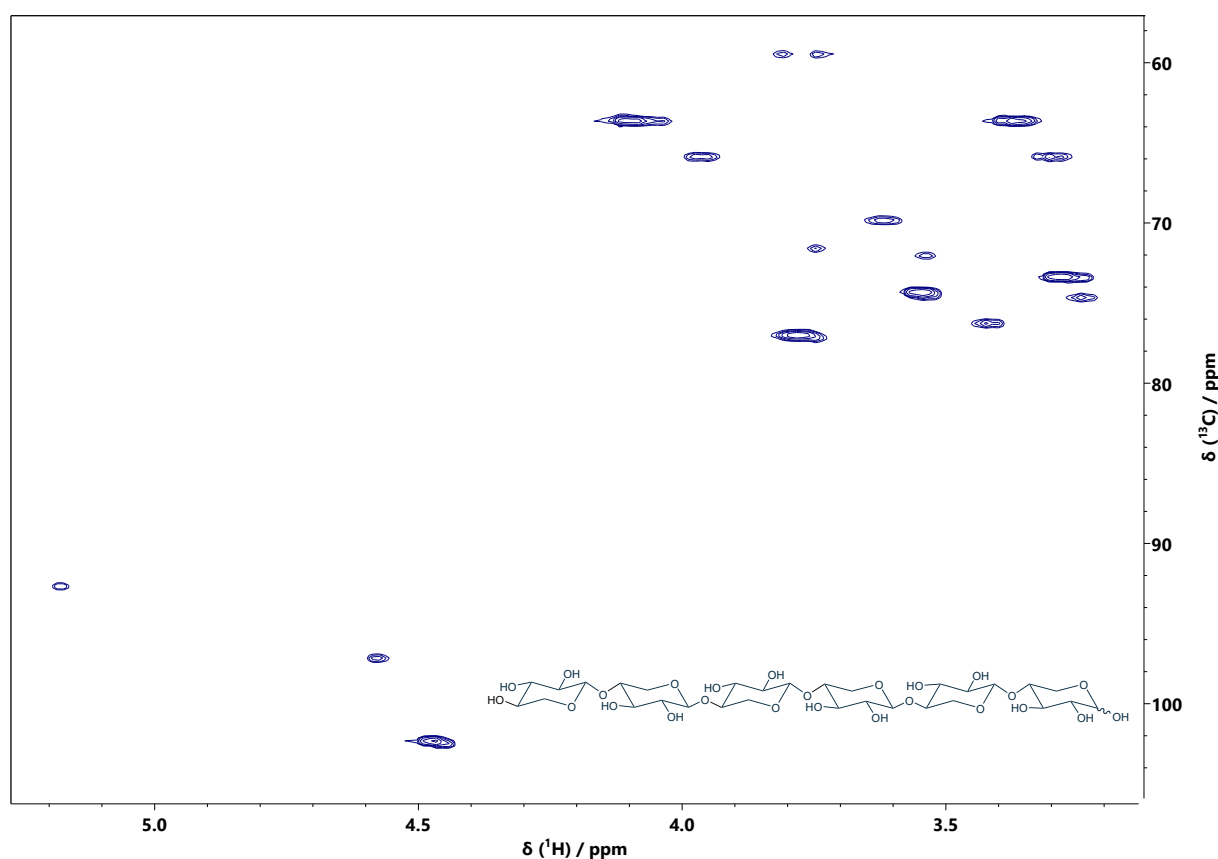


Abbildung A7: HSQC-Spektrum und Struktur des Xylooligosaccharids X₆. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm).

Tabelle A7: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids A³X, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylp _r	5,18 (3,65) 92,69	3,53 72,06	3,74 71,58	3,75 77,24	3,81/3,74 59,53
β -Xylp _r	4,58 (7,85) 97,14	3,25 74,65	3,54 74,57	3,77 77,16	4,05/3,37 63,65
β -Xylp _t	4,48 (7,88) 102,40	3,40 73,52	3,59 82,09	3,69 68,42	4,00/3,33 65,67
α -Araf _{03(t)}	5,33 108,79	4,17 81,85	3,95 77,16	4,18 84,68	3,81/3,70 61,87

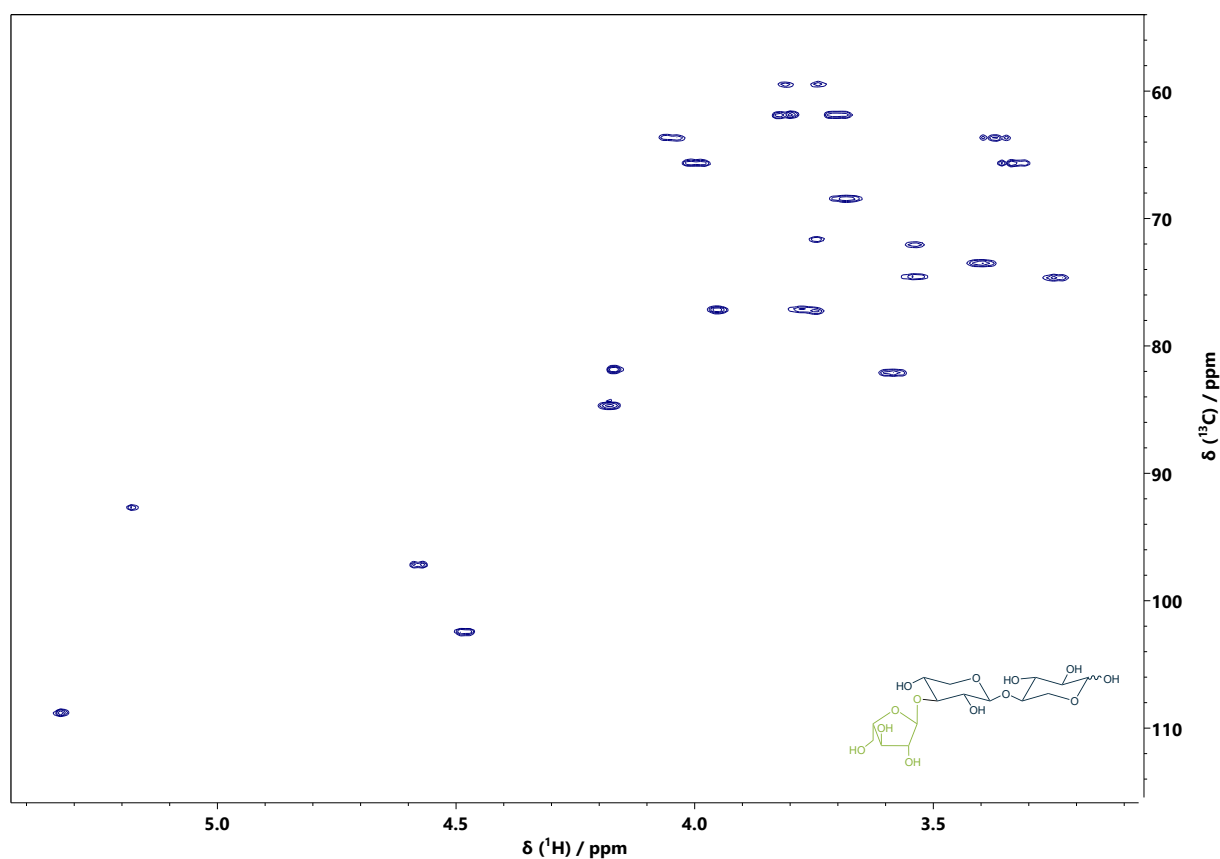


Abbildung A8: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids A³X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A8: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids XA³X, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylp _r	5,18 (3,72) 92,67	3,75 71,57	3,54 72,01	3,75 77,25	3,81/3,75 59,44
β -Xylp _r	4,58 (7,85) 97,11	3,25 74,63	3,54 74,55	3,78 77,08	4,05/3,36 63,60
β -Xylp _l	4,51 (7,72) 102,26	3,44 73,91	3,74 77,77	3,83 74,23	4,12/3,41 63,43
β -Xylp _t	4,44 (7,82) 102,10	3,24 73,58	3,41 76,24	3,59 69,80	3,91/3,27 65,75
α -Araf _{03(l)}	5,39 108,22	4,16 81,32	3,90 77,85	4,27 85,43	3,79/3,72 61,94

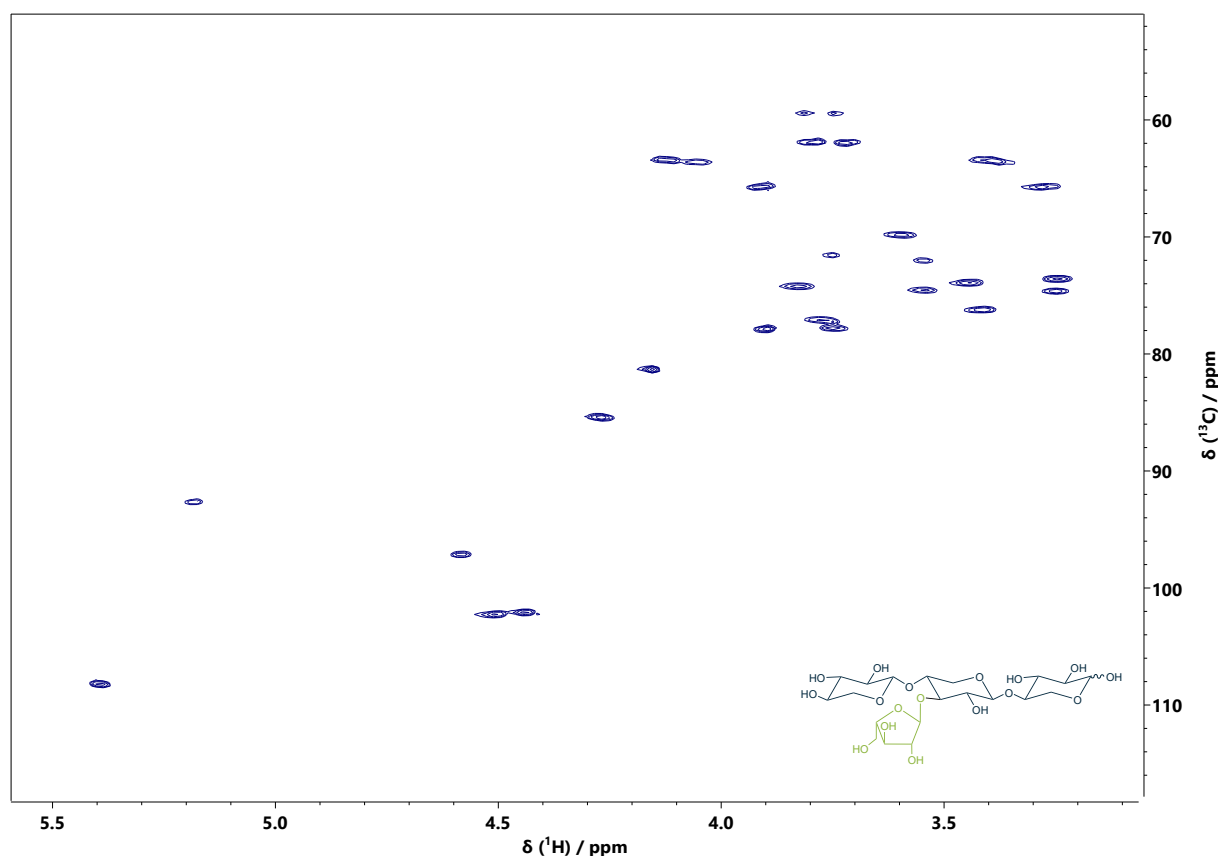


Abbildung A9: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids XA³X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A9: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids A²XX, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylp _r	5,18 (3,66) 92,69	3,54 72,06	3,74 71,58	3,74 77,16	3,80/3,74 59,44
β -Xylp _r	4,58 (7,93) 97,14	3,24 74,65	3,54 74,57	3,76 77,08	4,05/3,37 63,65
β -Xylp _i	4,46 (7,77) 102,40	3,28 73,36	3,55 74,41	3,78 76,75	4,13/3,40 63,73
β -Xylp _t	4,55 (7,51) 100,94	3,41 78,78	3,55 76,34	3,66 69,72	3,98/3,30 65,67
α -Araf _{O2}	5,27 109,11	4,16 81,69	3,94 77,32	4,14 85,25	3,81/3,71 61,95

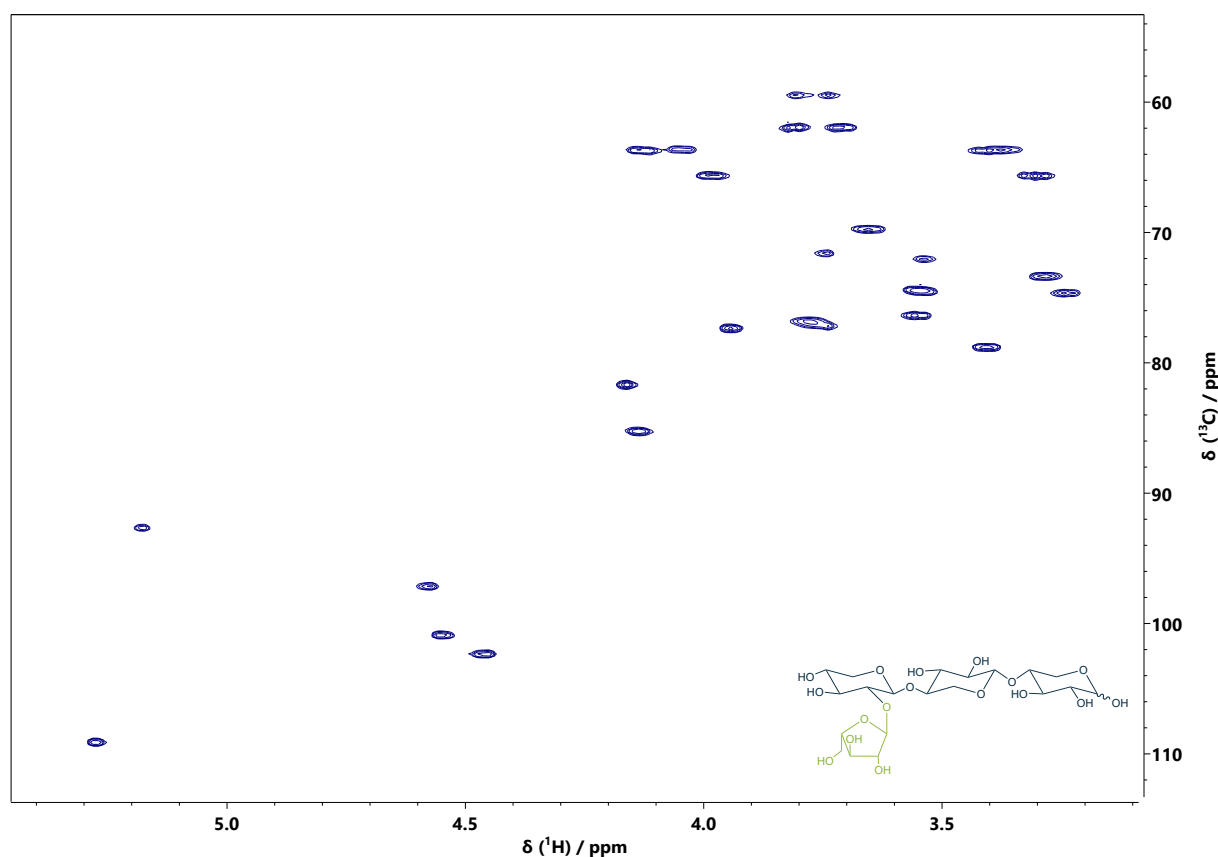


Abbildung A10: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids A²XX. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

9 Anhang

Tabelle A10: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum einer Mischung aus den Arabinoxyloligosacchariden XA^2XX und XA^3XX , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,60)	3,74	3,53	3,74	3,81/3,74
	92,69	71,58	72,06	77,24	59,45
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,85)	3,24	3,54	3,78	4,05/3,36
	97,14	74,65	74,57	77,06	63,65
$\beta\text{-Xylp}_i (\text{XA}^2\text{XX})$	4,46	3,29	3,55	3,78	4,13/3,40
	102,34	73,36	74,33	76,67	63,70
$\beta\text{-Xylp}_i (\text{XA}^3\text{XX})$	4,47	3,29	3,55	-	4,10/3,37
	102,32	73,36	74,33	-	63,65
$\beta\text{-Xylp}_{ii} (\text{XA}^2\text{XX})$	4,58	3,45	3,69	-	4,11/3,39
	100,70	78,61	74,33	-	63,45
$\beta\text{-Xylp}_{ii} (\text{XA}^3\text{XX})$	4,51 (7,79)	3,44	3,74	3,82	4,11/3,39
	102,31	73,96	77,81	74,25	63,45
$\beta\text{-Xylp}_t (\text{XA}^2\text{XX})$	4,46	3,25	3,43	3,63	3,96/3,30
	102,56	73,44	76,27	69,88	65,87
$\beta\text{-Xylp}_t (\text{XA}^3\text{XX})$	4,44	3,24	3,41	3,60	3,91/3,27
	102,15	73,60	76,27	69,89	65,75
$\alpha\text{-Araf}_{02(\text{II})}$	5,28	4,16	3,94	4,13	4,12/3,39
	109,11	81,69	77,32	85,25	63,46
$\alpha\text{-Araf}_{03(\text{II})}$	5,39	4,15	3,90	4,27	4,12/3,39
	108,22	81,36	77,89	85,41	63,46

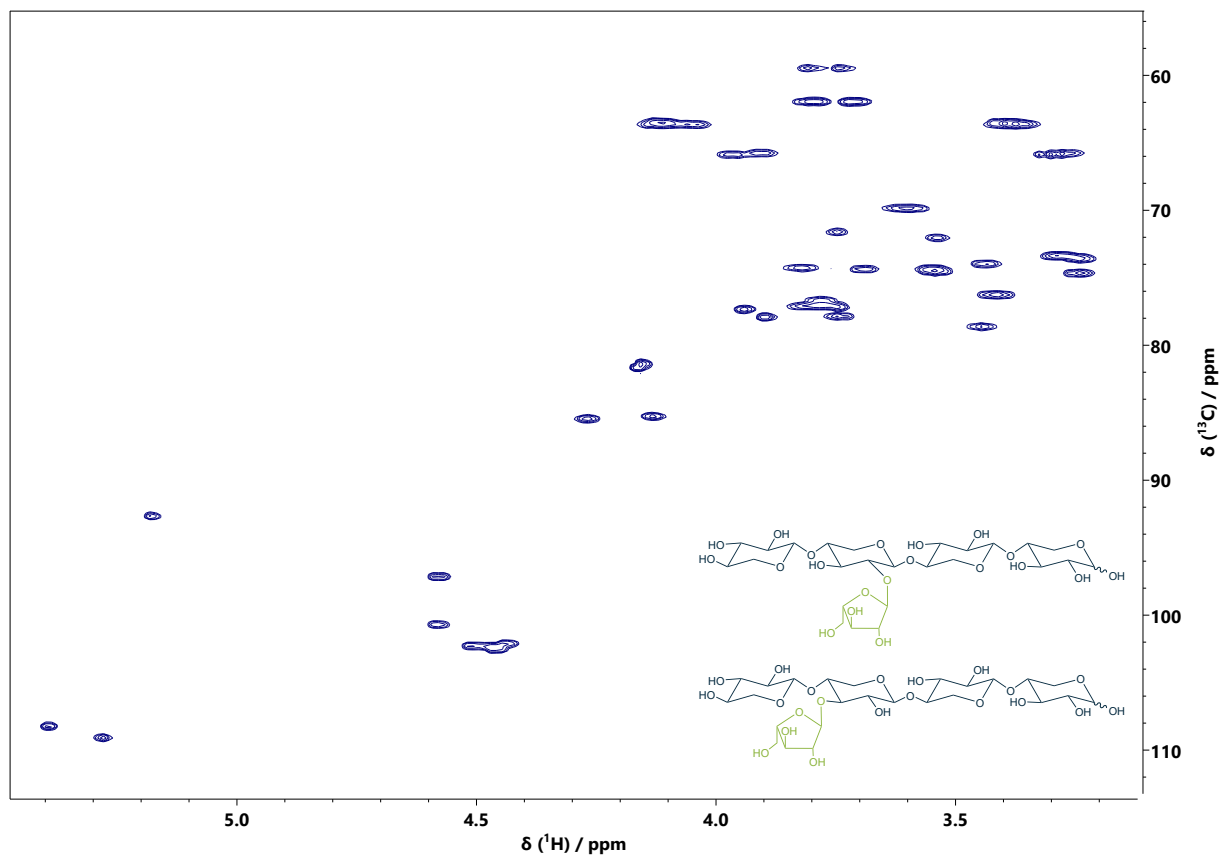


Abbildung A11: HSQC-Spektrum und Strukturen der Arabinoxyloligosaccharide XA²XX und XA³XX. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A11: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids XXA³X, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylp _r	5,18 (3,69)	3,75	3,55	3,75	3,82/3,75
	92,68	71,57	72,05	77,29	59,46
β -Xylp _r	4,59 (7,84)	3,25	3,54	3,78	4,05/3,37
	97,11	74,63	74,55	77,08	63,59
β -Xylp _l	4,52 (7,77)	3,44	3,74	3,83	4,11/3,41
	102,26	73,91	77,93	74,31	63,43
β -Xylp _{ll}	4,47 (7,52)	3,27	3,54	3,75	4,04/3,35
	101,94	73,58	74,31	76,97	63,52
β -Xylp _t	4,45 (7,65)	3,25	3,42	3,62	3,97/3,29
	102,42	73,42	76,24	69,80	65,85
α -Araf _{O3(l)}	5,39	4,16	3,91	4,27	3,81/3,78
	108,30	81,40	77,85	85,34	61,90

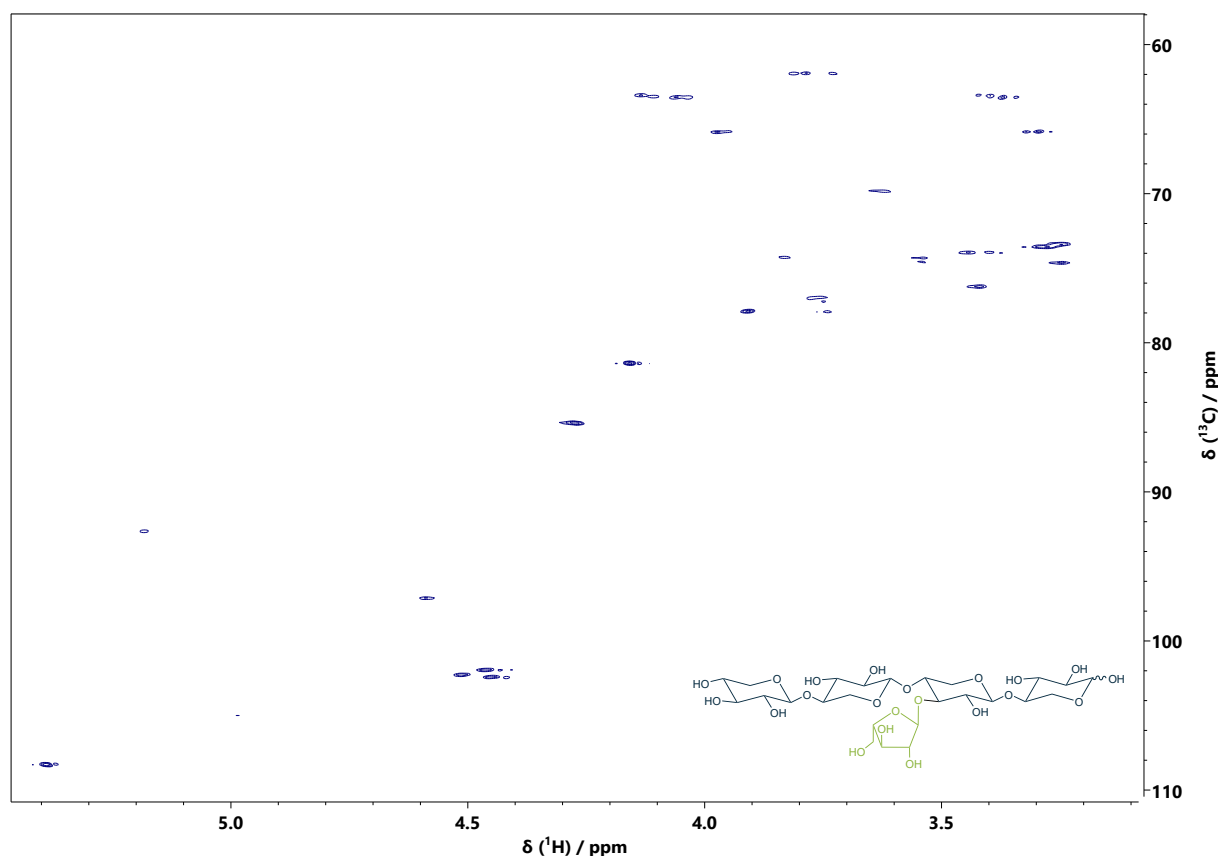


Abbildung A12: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids XXA³X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A12: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxyloligosaccharids $A^{2+3}XX$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,17 (3,66)	3,54	3,74	3,74	3,81/3,74
	92,64	72,01	71,57	77,21	59,45
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,78)	3,24	3,54	3,77	4,04/3,37
	97,15	74,63	74,55	77,01	63,59
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,46 (7,82)	3,28	3,55	3,78	4,14/3,41
	102,40	73,36	74,41	76,59	63,65
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,59 (7,49)	3,53	3,69	3,71	4,01/3,34
	100,65	78,74	82,81	68,67	65,41
$\alpha\text{-Araf}_{O2(t)}$	5,23	4,14	3,95	4,12	3,82/3,72
	109,35	81,84	77,34	85,02	61,86
$\alpha\text{-Araf}_{O3(t)}$	5,24	4,17	3,97	4,19	3,80/3,71
	109,11	81,76	77,13	84,66	61,82

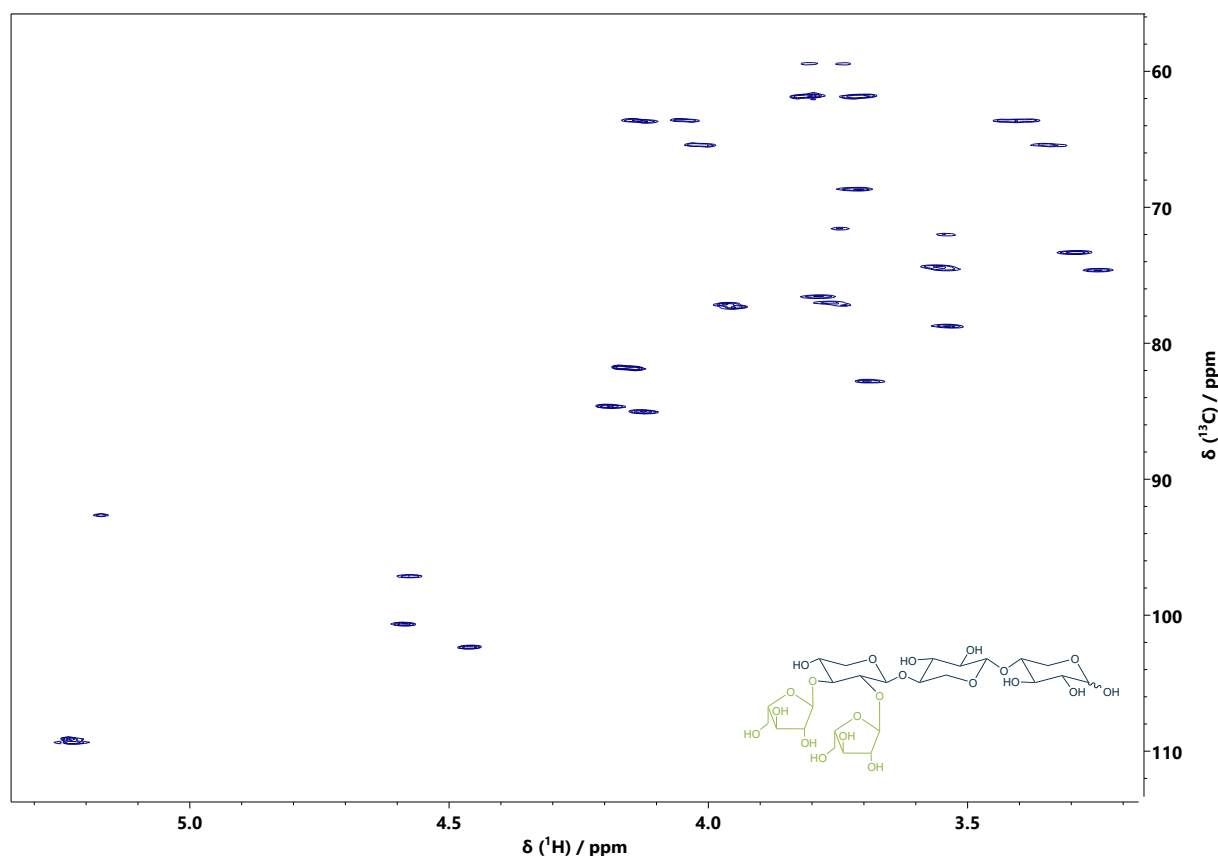


Abbildung A13: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxyloligosaccharids $A^{2+3}XX$. Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A13: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids XA^{2+3}XX , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,67)	3,54	3,74	3,74	3,81/3,74
	92,63	72,01	71,57	77,21	59,45
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,81)	3,25	3,54	3,77	4,04/3,37
	97,14	74,63	74,55	77,01	63,59
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,46 (7,99)	3,29	3,56	3,79	4,14/3,41
	102,36	73,34	74,35	76,36	63,59
$\beta\text{-Xylp}_{ll}$	4,63 (7,12)	3,57	3,82	3,86	4,14/3,43
	100,49	79,22	78,18	74,39	63,17
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,43 (7,76)	3,25	3,41	3,60	3,92/3,27
	102,02	73,66	76,24	69,88	65,73
$\alpha\text{-Araf}_{O2(II)}$	5,22	4,14	3,95	4,12	3,80/3,72
	109,35	81,84	77,31	85,06	61,86
$\alpha\text{-Araf}_{O3(II)}$	5,27	4,16	3,93	4,30	3,78/3,73
	108,72	81,60	77,81	84,94	61,72

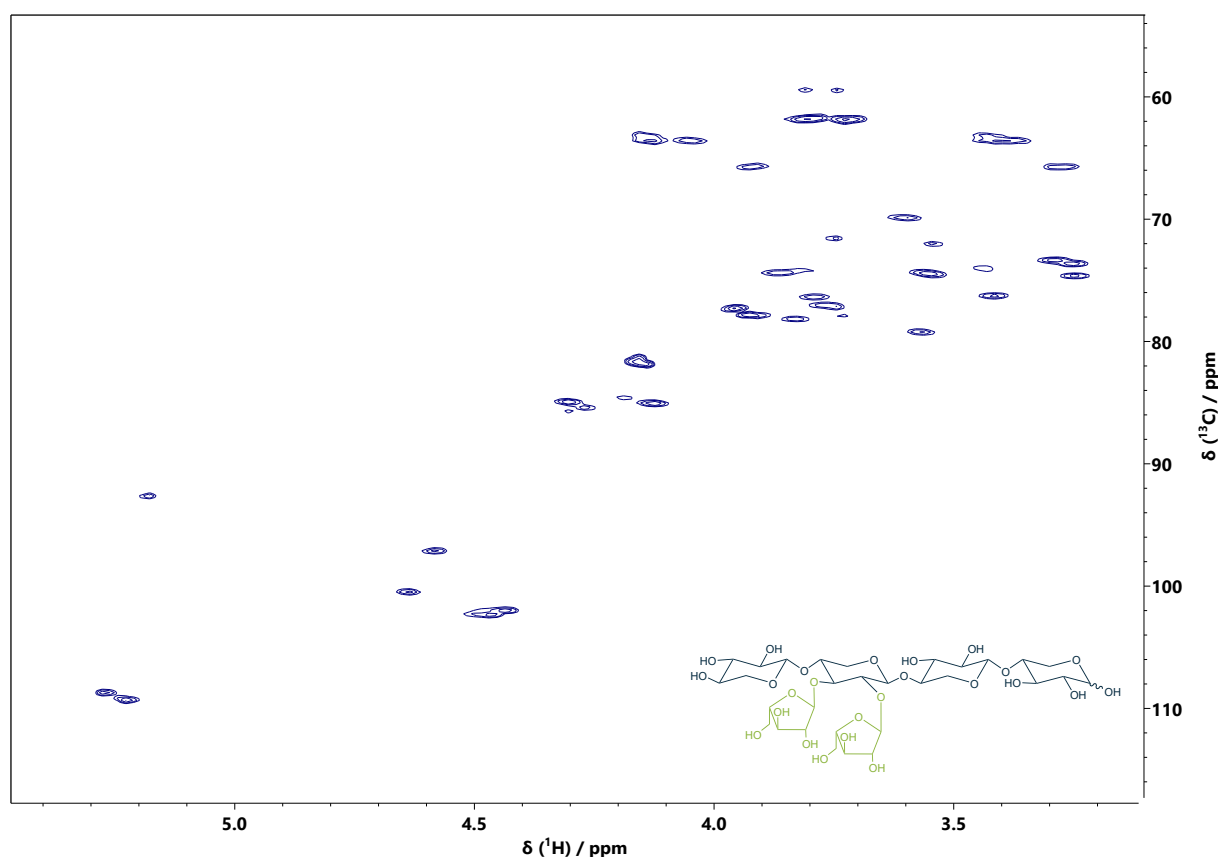


Abbildung A14: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids XA^{2+3}XX . Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A14: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids A³A³X, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
α -Xylp _r	5,18 (3,67)	3,54	3,75	3,75	3,81/3,74
	92,66	72,01	71,57	77,27	59,45
β -Xylp _r	4,59 (7,83)	3,25	3,54	3,78	4,05/3,37
	97,14	74,63	74,55	77,09	63,62
β -Xylp _l	4,51 (7,76)	3,44	3,74	3,83	4,12/3,83
	102,26	73,95	77,85	74,27	62,43
β -Xylp _t	4,48 (7,91)	3,40	3,57	3,66	3,94/3,31
	101,98	73,70	82,12	68,43	65,57
α -Araf _{03(l)}	5,39	4,15	3,89	4,27	3,80/3,72
	108,26	81,36	77,85	85,41	61,94
α -Araf _{03(t)}	5,32	4,17	3,95	4,18	3,81/3,71
	108,78	81,84	77,13	84,62	61,86

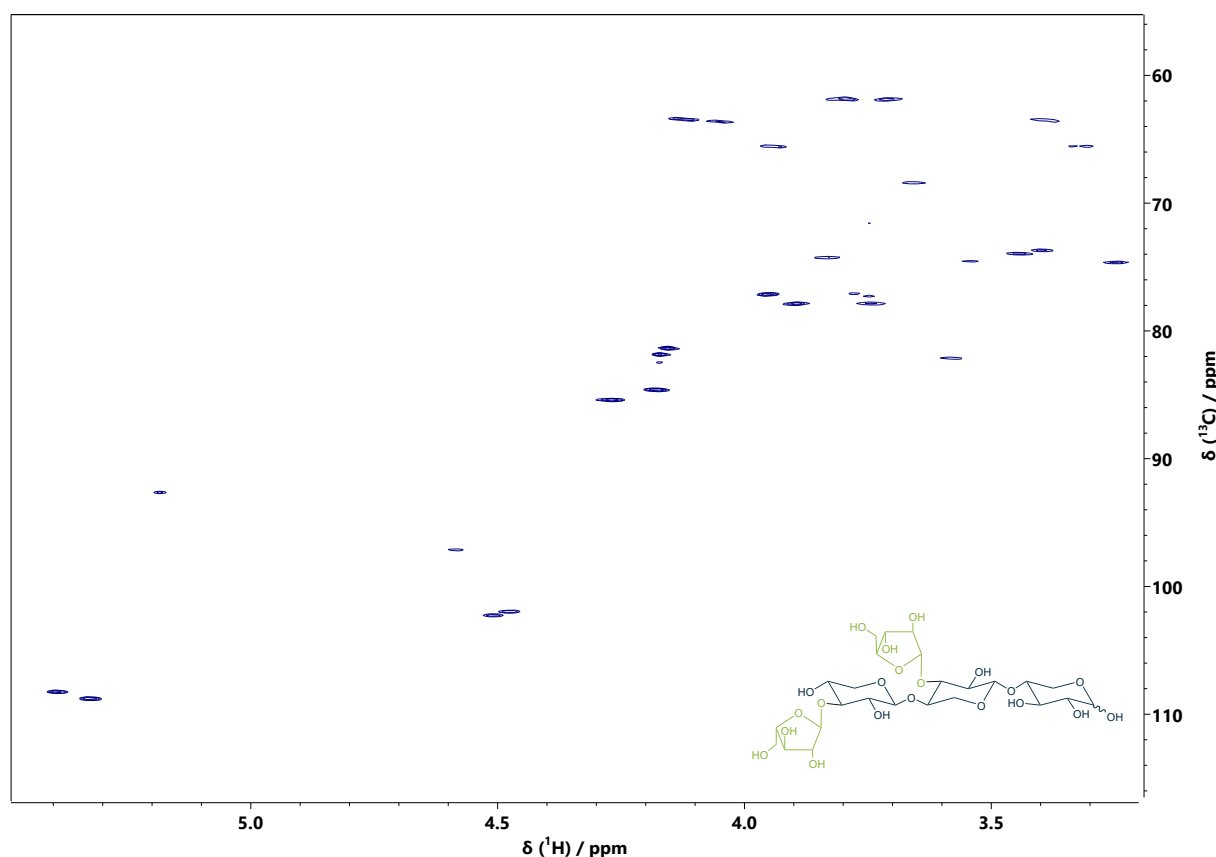


Abbildung A15: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids A³A³X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

9 Anhang

Tabelle A15: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxylooligosaccharids $\text{XA}^3\text{A}^3\text{X}$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,59) 92,67	3,54 72,05	3,75 71,57	3,74 77,29	3,82/3,74 59,44
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,89) 97,11	3,24 74,63	3,54 74,55	3,78 77,13	4,05/3,37 63,61
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,51 (7,80) 102,26	3,44 73,91	3,73 77,85	3,83 74,31	4,12/3,39 63,44
$\beta\text{-Xylp}_{ll}$	4,49 (7,97) 101,94	3,43 74,22	3,73 77,85	3,79 74,15	4,06/3,39 63,41
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,43 (7,91) 102,06	3,23 73,58	3,40 76,24	3,59 69,80	3,90/3,28 65,74
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O}3(\text{I})}$	5,39 108,22	4,15 81,35	3,90 77,86	4,27 85,43	3,79/3,72 61,94
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O}3(\text{II})}$	5,38 108,30	4,15 81,35	3,90 77,86	4,27 85,43	3,79/3,72 61,94

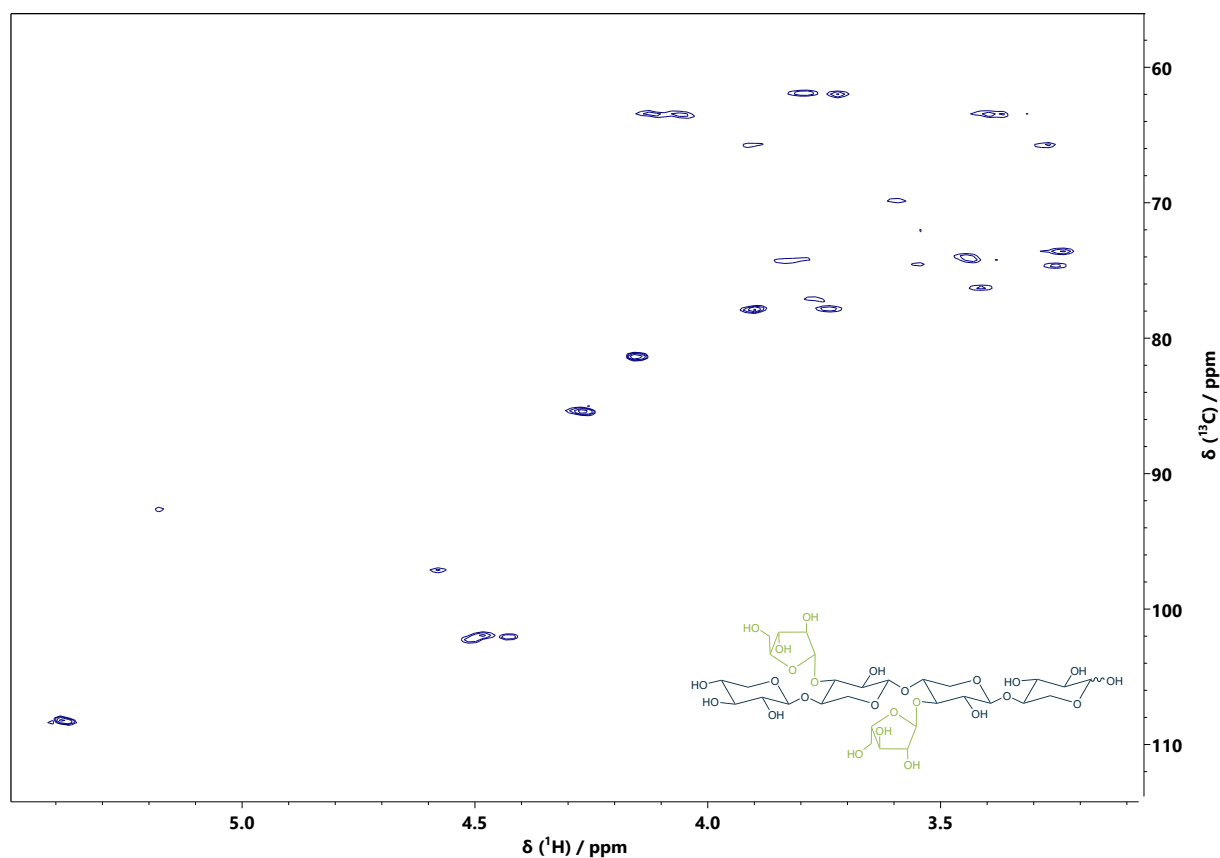


Abbildung A16: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids $\text{XA}^3\text{A}^3\text{X}$. Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A16: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxyloligosaccharids $A^3A^{2+3}XX$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,69)	3,54	3,75	3,74	3,81/3,74
	92,67	71,97	71,57	77,21	59,44
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,97)	3,24	3,54	3,77	4,04/3,37
	97,15	74,63	74,46	77,04	63,59
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,46	3,29	3,56	3,79	4,14/3,41
	102,34	73,34	74,39	76,40	63,59
$\beta\text{-Xylp}_{II}$	4,64 (7,16)	3,57	3,82	3,87	4,14/3,43
	100,49	79,22	78,21	74,47	63,19
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,46 (7,92)	3,40	3,58	3,67	3,95/3,30
	101,94	73,74	82,20	68,50	65,53
$\alpha\text{-Araf}_{O2(II)}$	5,22	4,14	3,95	4,12	3,81/3,72
	109,35	81,84	77,29	85,06	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O3(II)}$	5,26	4,16	3,93	4,30	3,79/3,71
	108,78	81,64	77,77	84,94	61,74
$\alpha\text{-Araf}_{O3(t)}$	5,32	4,17	3,95	4,18	3,81/3,72
	108,78	81,88	77,13	84,62	61,82

9 Anhang

Tabelle A17: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxyloligosaccharids $\text{XA}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,66)	3,55	3,75	3,74	3,82/3,74
	92,68	72,05	71,57	77,21	59,44
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,83)	3,25	3,55	3,77	4,05/3,37
	97,11	74,63	74,47	77,05	63,62
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,46 (7,75)	3,29	3,55	3,79	4,14/3,41
	102,34	73,34	74,39	76,40	63,59
$\beta\text{-Xylp}_{ll}$	4,64 (7,22)	3,56	3,84	3,87	4,14/3,43
	100,49	79,23	78,20	74,55	63,19
$\beta\text{-Xylp}_{lll}$	4,47 (7,64)	3,44	3,73	3,83	4,12/3,83
	101,86	74,31	77,85	74,27	62,43
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,43 (7,91)	3,23	3,40	3,59	3,26/3,89
	102,02	73,59	76,24	69,80	65,73
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O}2(\text{II})}$	5,22	4,14	3,95	4,12	3,81/3,72
	109,35	81,80	77,29	85,10	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O}3(\text{II})}$	5,26	4,16	3,93	4,30	3,79/3,71
	108,77	81,64	77,85	84,94	61,74
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O}3(\text{III})}$	5,40	4,15	3,90	4,27	3,80/3,72
	108,22	81,32	77,93	85,43	61,94

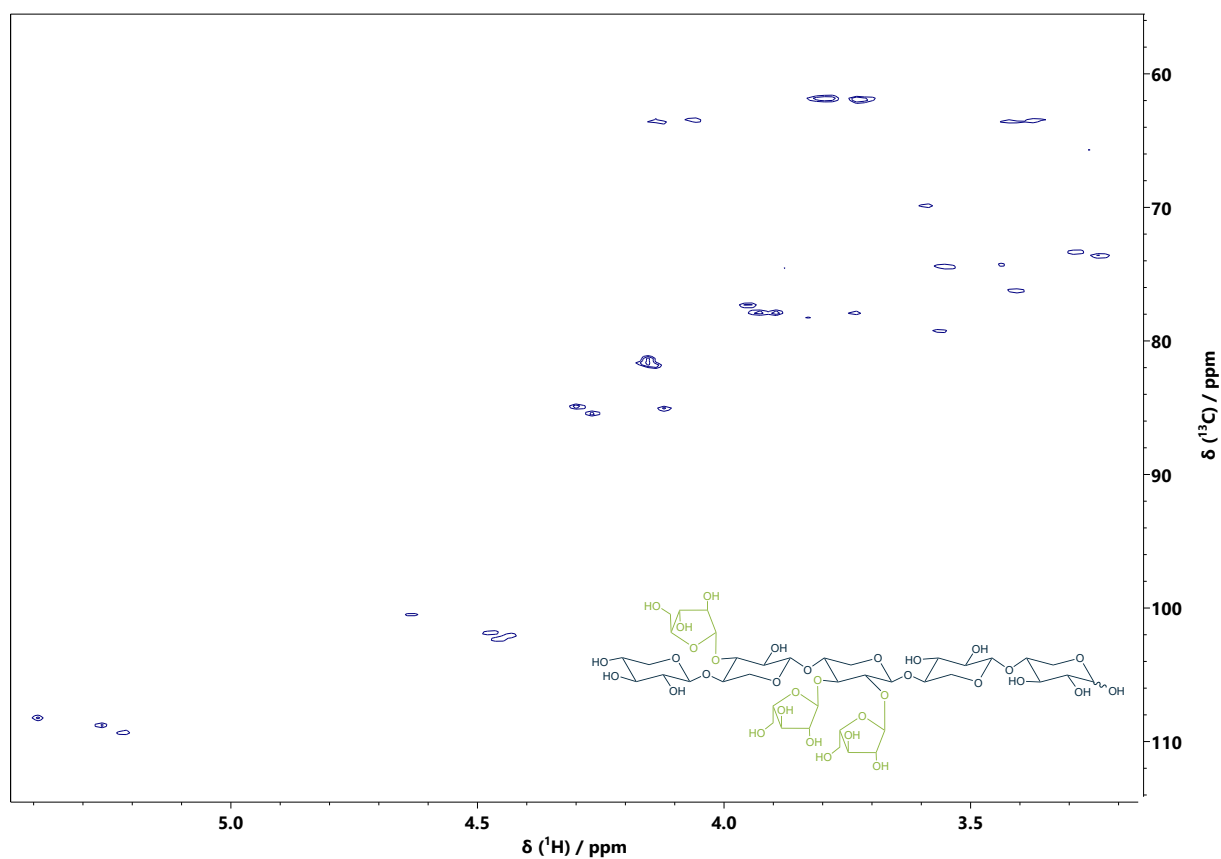


Abbildung A17: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids $\text{XA}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$. Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89 \text{ ppm}$). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

9 Anhang

Tabelle A18: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxyloligosaccharids $A^{2+3}A^{2+3}XX$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,17 (3,68)	3,74	3,54	3,74	3,81/3,73
	92,63	71,57	72,01	77,17	59,45
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,84)	3,24	3,54	3,76	4,04/3,37
	97,14	74,63	74,55	77,01	63,59
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,46 (7,75)	3,28	3,55	3,78	4,13/3,41
	102,38	73,34	74,39	76,32	63,59
$\beta\text{-Xylp}_{II}$	4,62 (7,19)	3,56	3,85	3,85	4,13/3,48
	100,61	79,46	78,05	74,50	63,35
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,54 (7,72)	3,54	3,66	3,68	3,95/3,29
	100,61	78,77	83,13	68,71	65,41
$\alpha\text{-Araf}_{O2(II)}$	5,22	4,14	3,95	4,12	3,82/3,72
	109,39	81,84	77,29	85,02	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O3(II)}$	5,29	4,16	3,93	4,33	3,82/3,72
	108,62	81,56	77,89	85,14	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O2(I)}$	5,25	4,14	3,97	4,16	3,82/3,72
	109,23	81,91	77,36	84,94	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O3(I)}$	5,24	4,17	3,97	4,19	3,82/3,72
	109,11	81,80	77,13	84,58	61,82

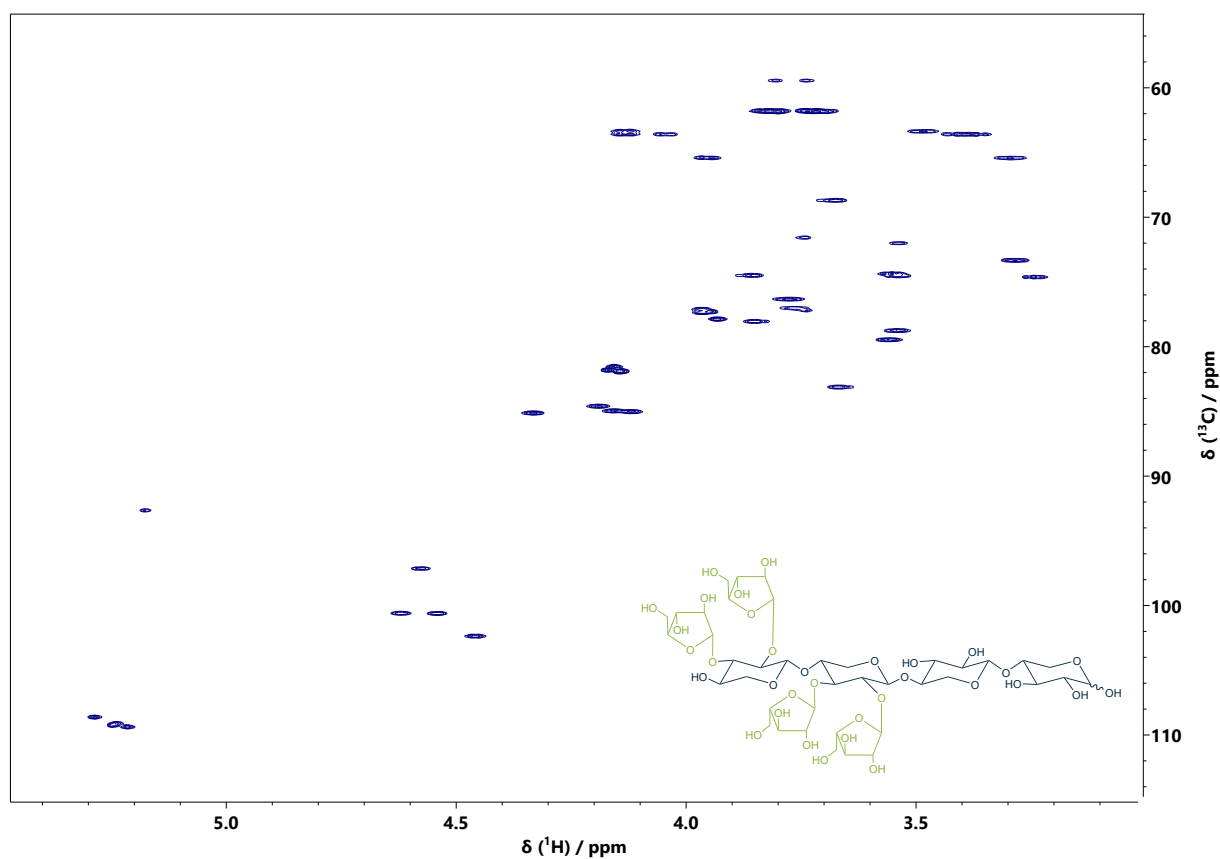


Abbildung A18: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids $A^{2+3}A^{2+3}XX$. Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

9 Anhang

Tabelle A19: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des Arabinoxyloligosaccharids $A^{2+3}XA^{2+3}XX$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22 und 23.

Einheit	H1	H2	H3	H4	H5
	C1	C2	C3	C4	C5
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,69)	3,74	3,54	3,74	3,81/3,74
	92,59	71,57	72,01	77,13	59,41
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,85)	3,24	3,54	3,76	4,11/3,38
	97,10	74,63	74,47	77,04	63,59
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,46 (7,82)	3,29	3,55	3,78	4,11/3,38
	102,34	73,34	74,39	76,40	63,59
$\beta\text{-Xylp}_{ll}$	4,63 (7,05)	3,56	3,82	3,86	4,13/3,42
	100,49	79,22	78,25	74,39	63,19
$\beta\text{-Xylp}_{lll}$	4,43 (7,81)	3,28	3,55	3,75	4,11/3,38
	101,94	73,58	74,39	76,56	63,59
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,58 (7,85)	3,53	3,68	3,71	4,01/3,32
	100,65	78,73	82,85	68,67	65,45
$\alpha\text{-Araf}_{O2(II)}$	5,23	4,14	3,95	4,12	3,81/3,72
	109,35	81,88	77,29	85,02	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O3(II)}$	5,27	4,16	3,93	4,30	3,81/3,72
	108,78	81,64	77,86	84,94	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O2(I)}$	5,23	4,14	3,95	4,12	3,81/3,72
	109,35	81,88	77,29	85,02	61,82
$\alpha\text{-Araf}_{O3(I)}$	5,24	4,17	3,97	4,19	3,81/3,72
	109,11	81,77	77,16	84,62	61,82

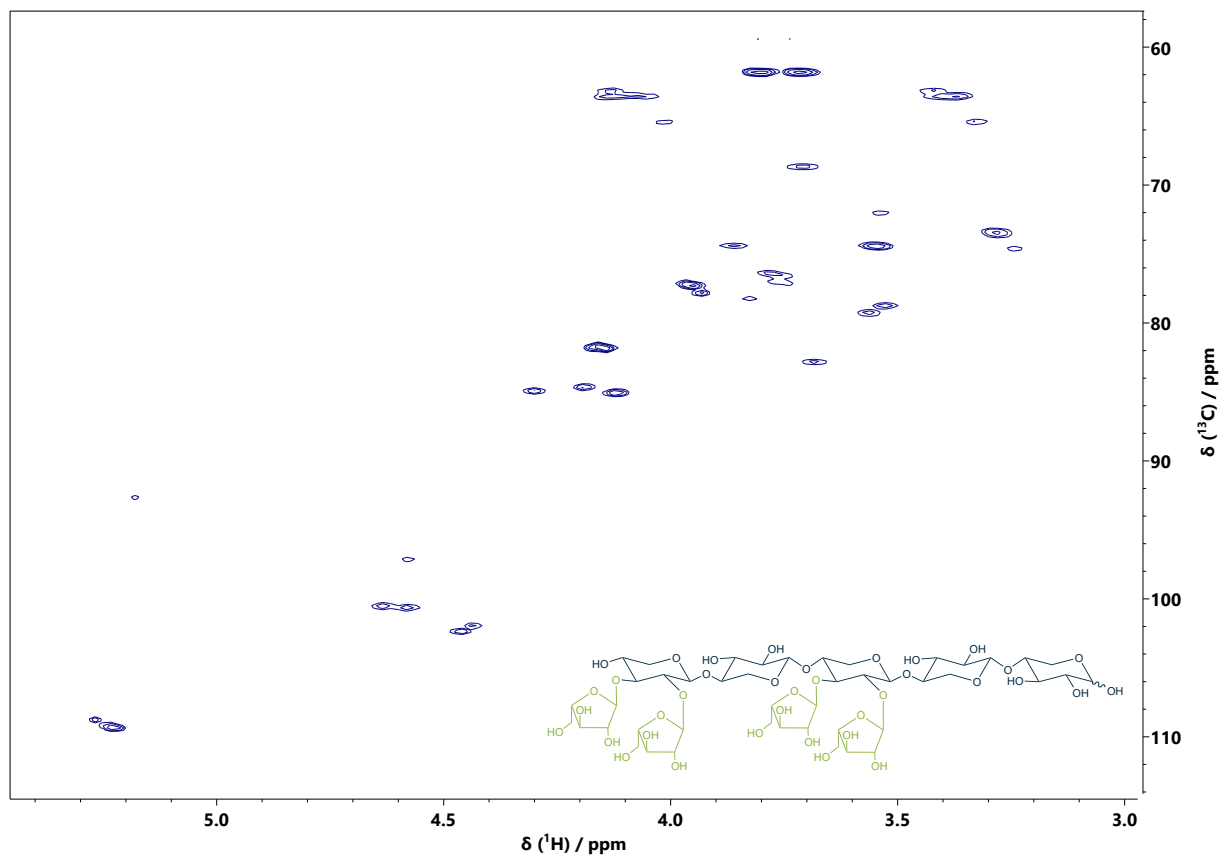


Abbildung A19: HSQC-Spektrum und Struktur des Arabinoxylooligosaccharids $A^{2+3}XA^{2+3}XX$. Das Spektrum wurde in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 23.

Tabelle A20: Aufreinigungsschritte der isolierten ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharide (FAXOS) aus den enzymatischen Hydrolysaten der unlöslichen Roggen- und Maisballaststoffe. HILIC, Hydrophilie Interaktionschromatographie; HPLC, Hochleistungsflüssigchromatographie; SEC, Größenausschlusschromatographie

FAXOS		Aufreinigungsschritte			HPLC-UV (325 nm) Reinheit
		SEC	Semipräparative HPLC		
		Sephadex	C18	HILIC	
Roggen	A ^{5f3} X	X	X	-	> 95 %
	A ^{5f*3} X	X	X	-	> 85 %
	XA ^{5f3} X	X	X	-	> 95 %
	XA ³ A ^{5f3} X	X	X	X	> 85 %
	XA ²⁺³ A ^{5f3} X	X	X	X	> 85 %
Mais	XA ^{5f3} X	X	X	-	> 90 %
	XA ^{2a5f3} X	X	X	-	> 90 %
	XA ^{5f3} XX	X	X	-	> 90 %
	XD ^{2,5f3} XX	X	X	-	> 95 %

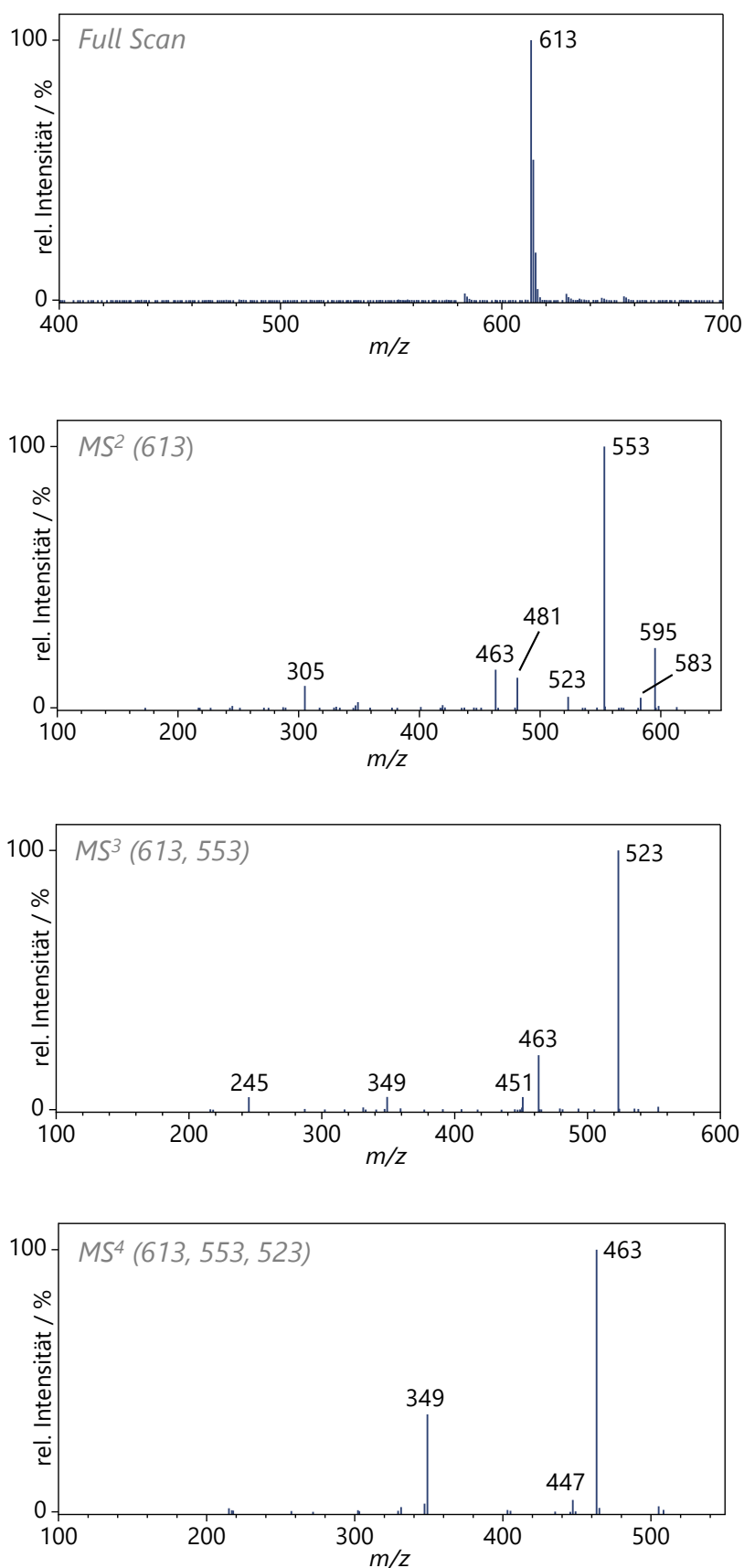


Abbildung A20: ESI-(+)- MS^n -Spektren des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids A^{5f3}X. Das erste Spektrum entspricht dem *Full Scan* und weist das Quasimolekülion des Analyten als einfaches Natriumaddukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Fragmentationen. m/z , Masse-zu-Ladungsverhältnis

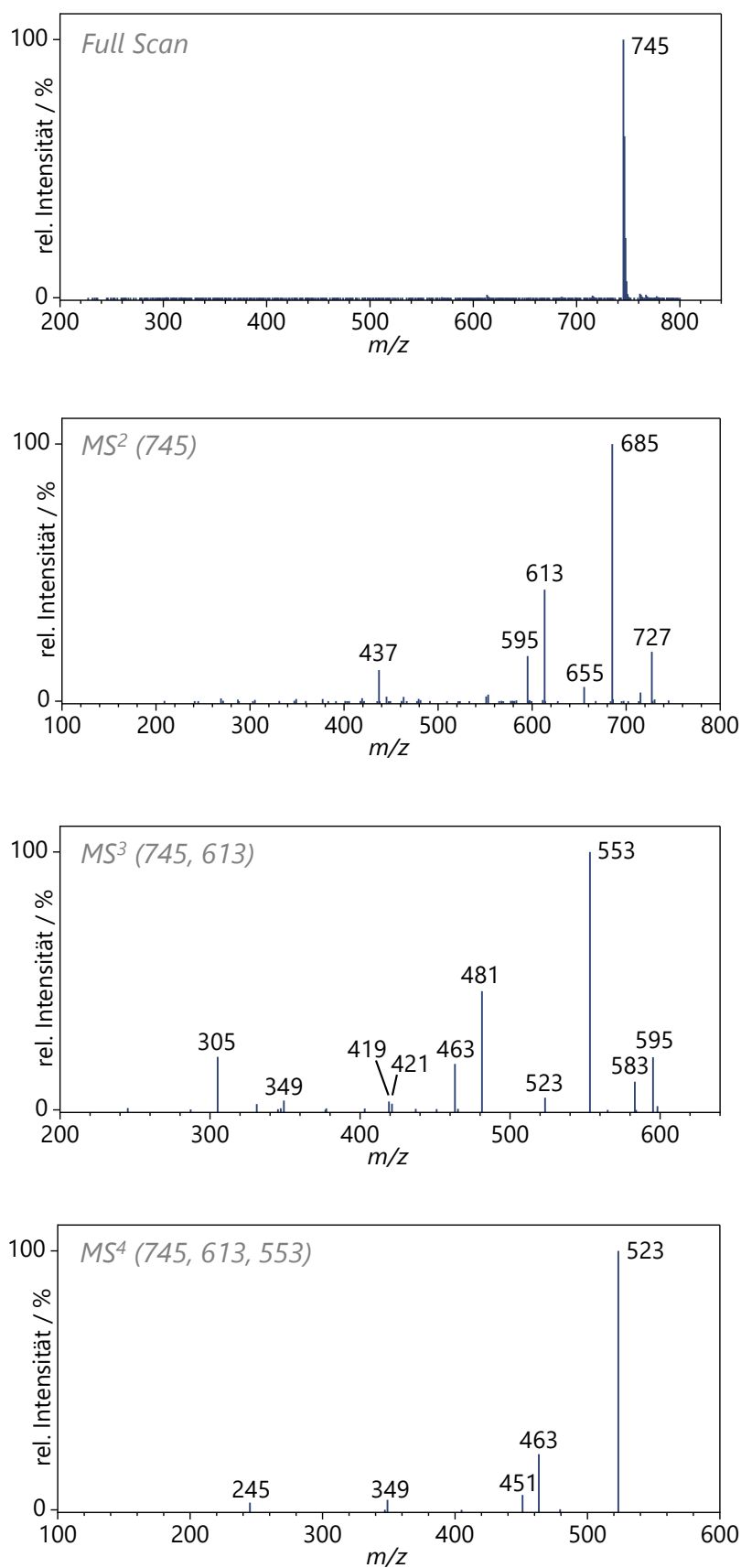


Abbildung A21: ESI-(+)-MSⁿ-Spektren des ferulasäurehaltigen Arabinooligosaccharids XA^{5f3}X. Das erste Spektrum entspricht dem *Full Scan* und weist das Quasimolekülion des Analyten als einfaches Natriumaddukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Fragmentationen. *m/z*, Masse-zu-Ladungsverhältnis

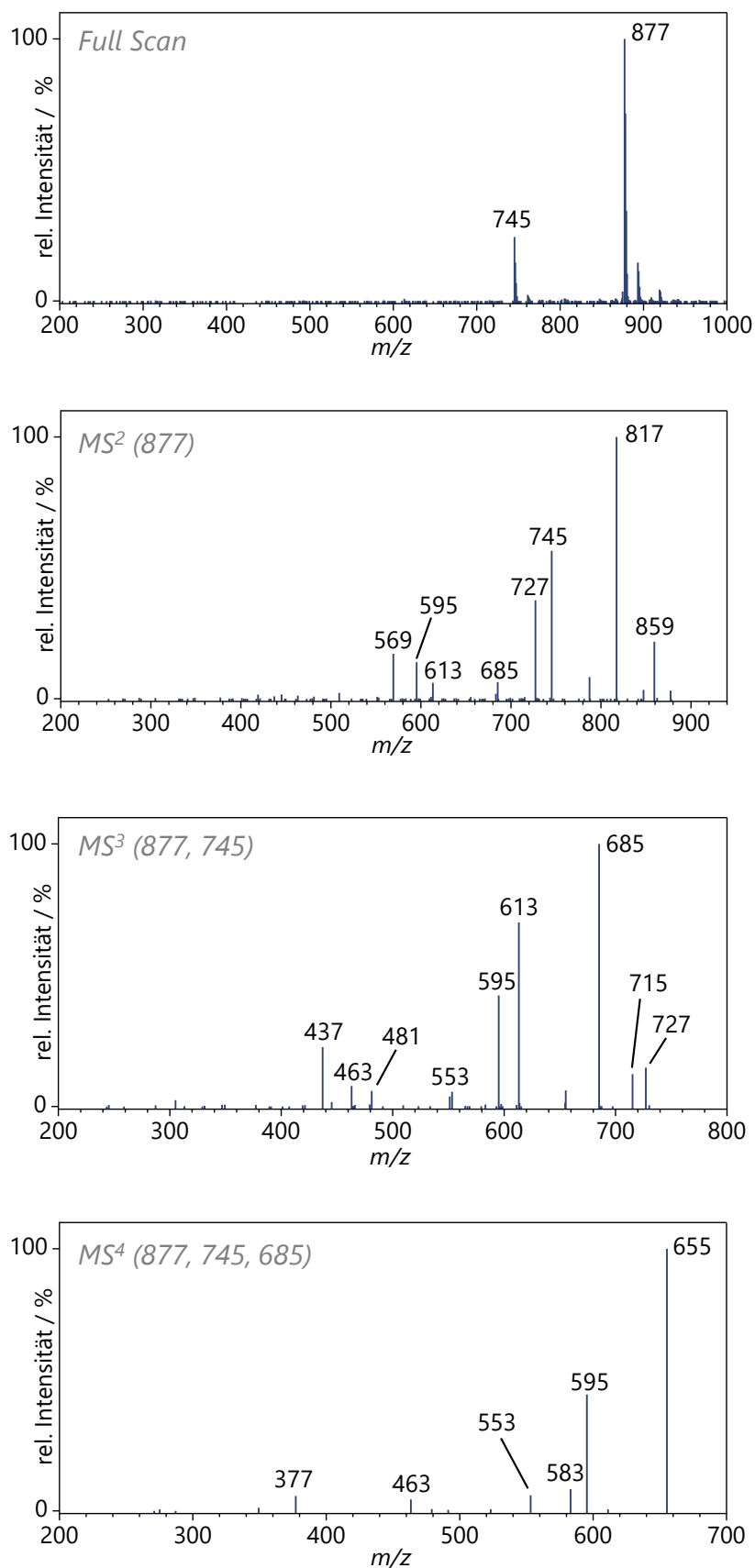


Abbildung A22: ESI-(+)- MS^n -Spektren des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids $XA^{5f3}XX$. Das erste Spektrum entspricht dem *Full Scan* und weist das Quasimolekül des Analyten als einfaches Natriumaddukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Fragmentationen. m/z , Masse-zu-Ladungsverhältnis

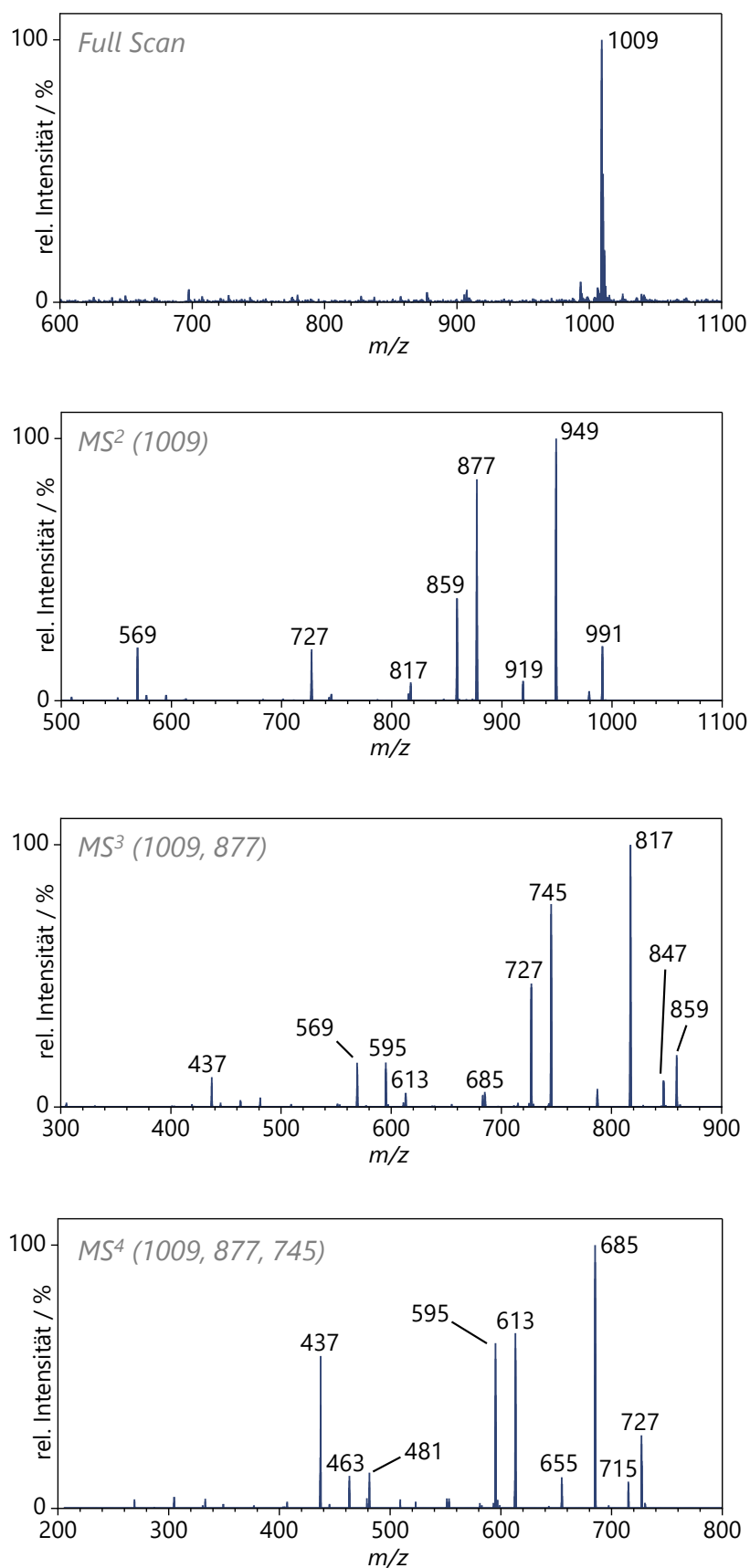


Abbildung A23: ESI-(+)-MSⁿ-Spektren des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids XD^{2,5f3}XX. Das erste Spektrum entspricht dem *Full Scan* und weist das Quasimolekül des Analyten als einfaches Natriumaddukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Fragmentationen. *m/z*, Masse-zu-Ladungsverhältnis

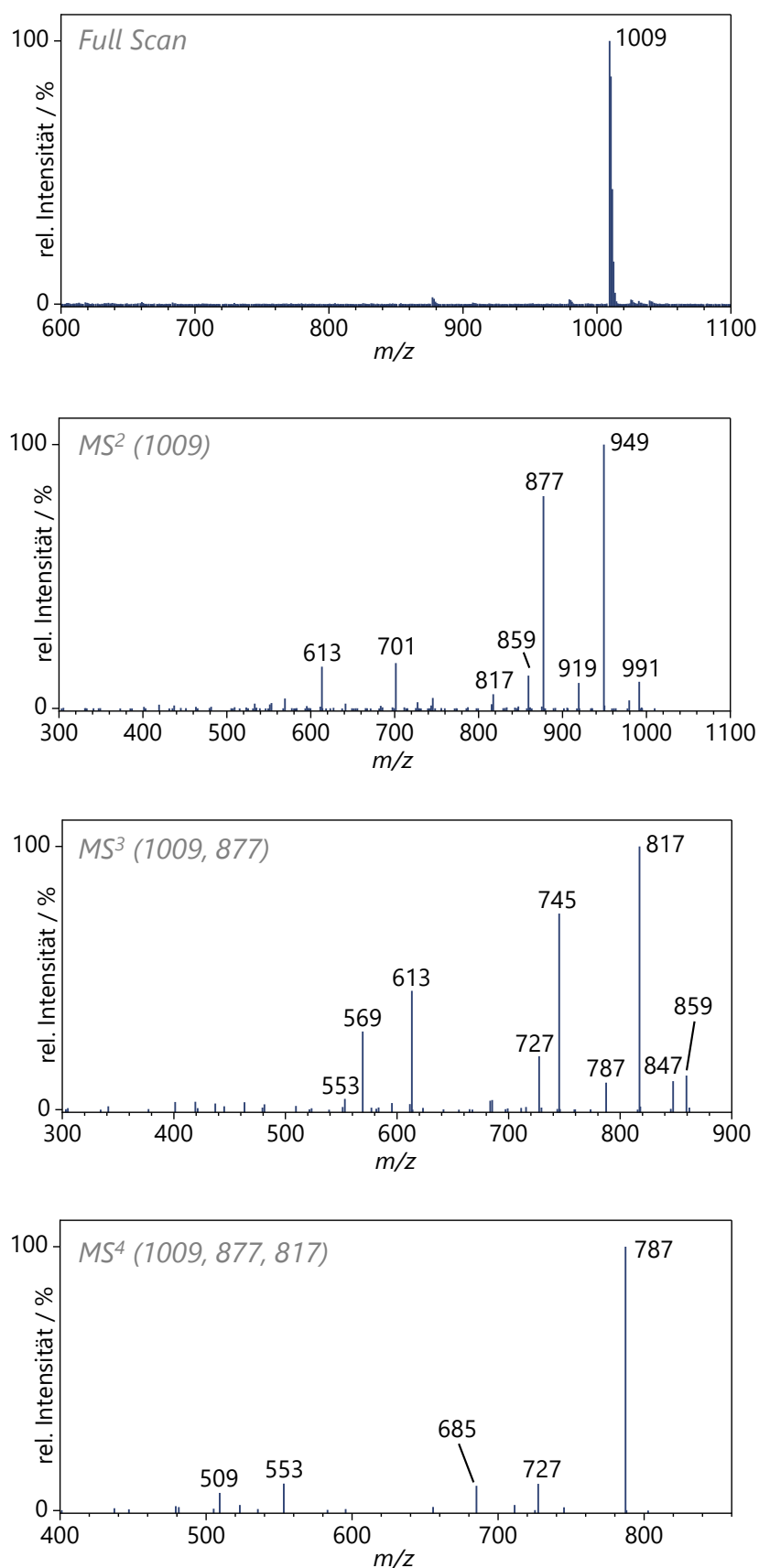


Abbildung A24: ESI-(+)-MSⁿ-Spektren des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids XA³A^{5f3}X. Das erste Spektrum entspricht dem *Full Scan* und weist das Quasimolekül des Analyten als einfaches Natriumaddukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Fragmentationen. *m/z*, Masse-zu-Ladungsverhältnis

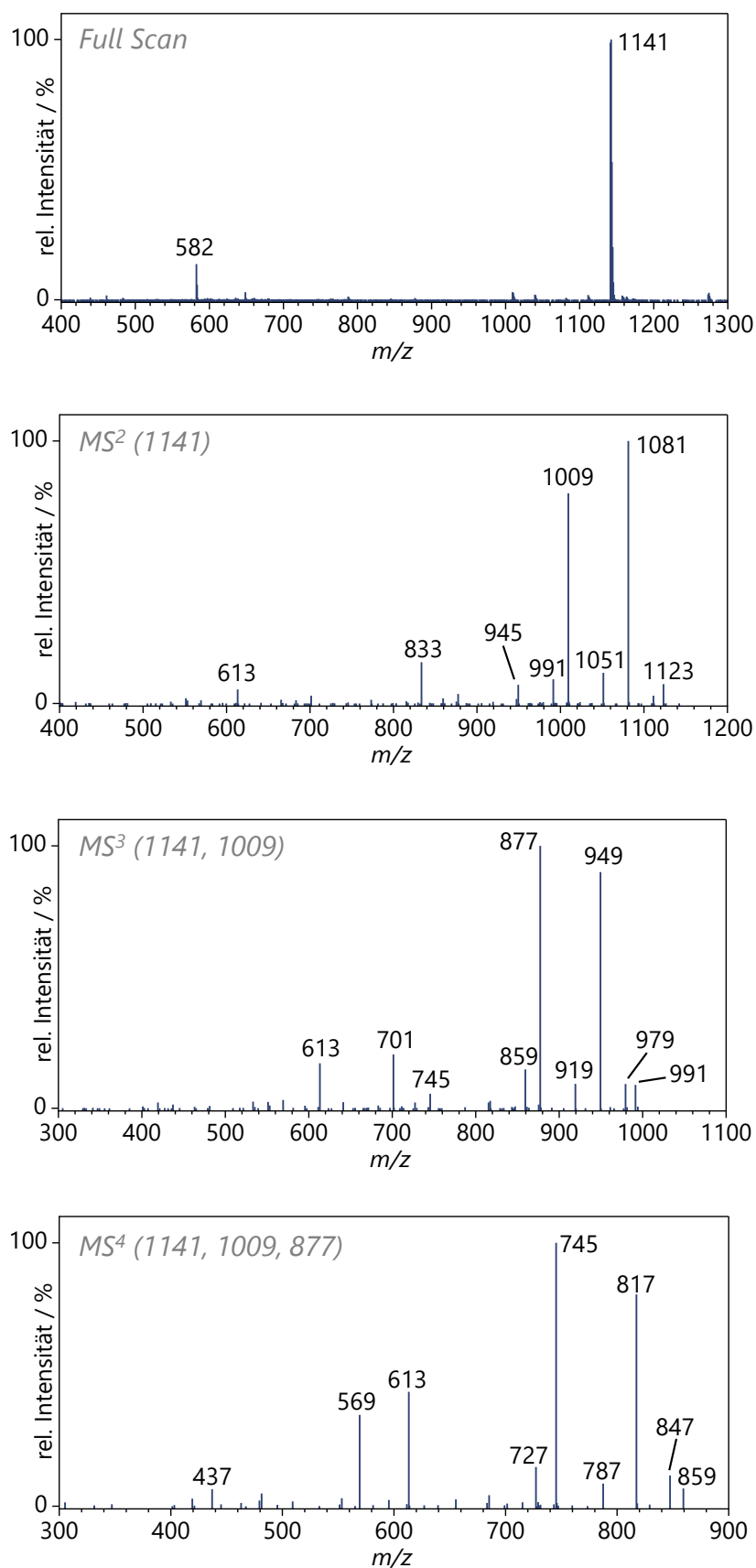


Abbildung A25: ESI-(+)-MSⁿ-Spektren des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids $\text{XA}^{2+3}\text{A}^{5f3}\text{X}$. Das erste Spektrum entspricht dem *Full Scan* und weist das Quasimolekülion des Analyten als einfaches Natriumaddukt auf. Die übrigen Spektren zeigen die sukzessive Fragmentierung des Analyten ausgehend von ausgewählten Fragmentionen. *m/z*, Masse-zu-Ladungsverhältnis

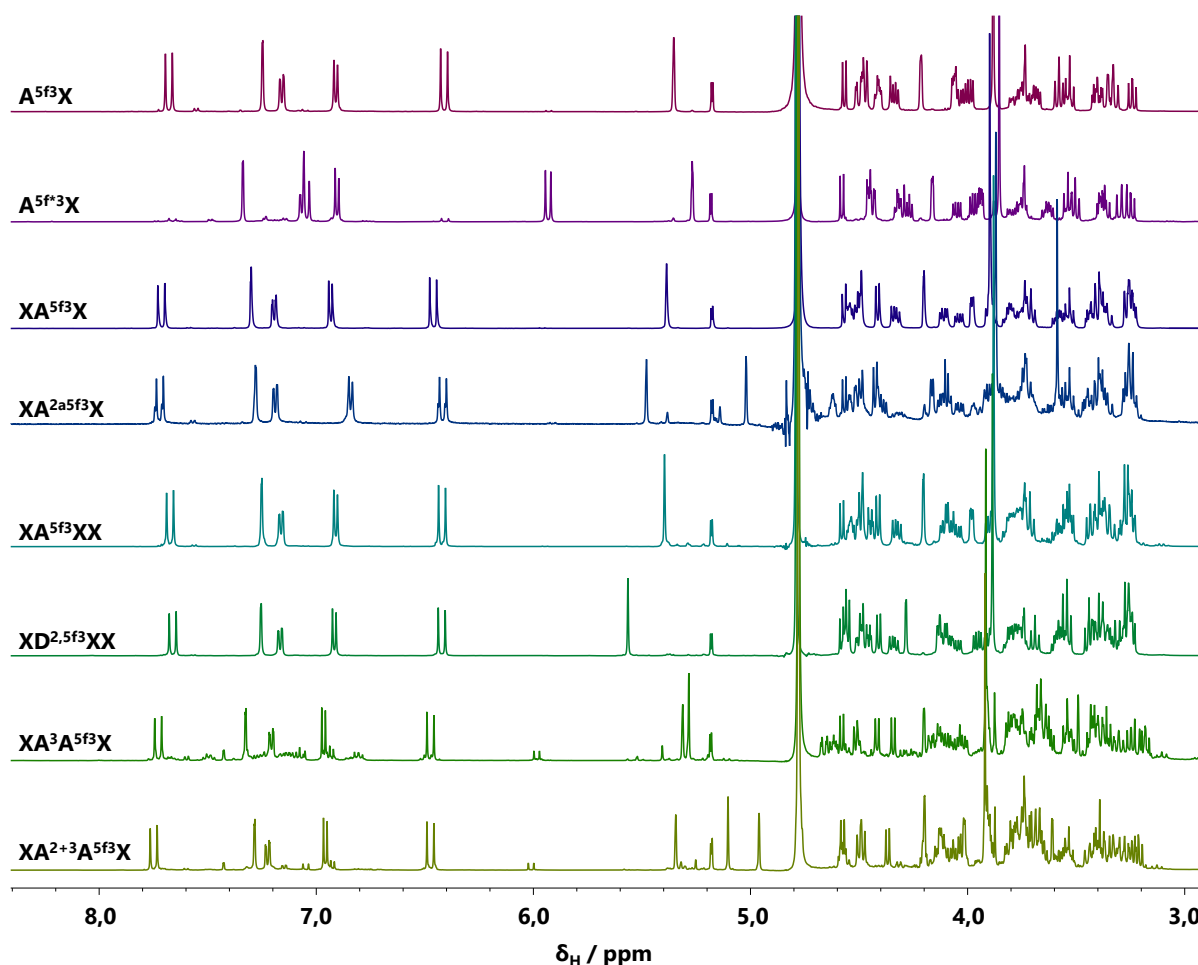


Abbildung A26: Erweiterte Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der aus Roggen- und Maisballaststoffen isolierten Standardsubstanzen der ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharide (FAXOS). Die Ausschnitte zeigen sowohl den Bereich der Ringprotonen als auch die Protonensignale der anomeren Positionen sowie der estergebundenen Ferulasäure. Das intensive Signal bei $\delta_{\text{H}} = 4,7 - 4,8$ ppm wird durch Restwasser im Lösungsmittel hervorgerufen. Die Spektren wurden in D_2O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Acetonsignals kalibriert ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm). Die Nomenklatur der FAXOS entspricht den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

9 Anhang

Tabelle A21: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids A^{5f3}X, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	-OCH ₃
α -Xylp _r	5,18 (3,69)	3,73	3,53	3,73	3,73/ 3,79	-	-	-	-
	92,59	71,57	71,97	77,29	59,48	-	-	-	-
β -Xylp _r	4,57 (7,94)	3,24	3,53	3,77	3,36/ 4,04	-	-	-	-
	97,11	74,56	74,55	77,13	63,67	-	-	-	-
β -Xylp _t	4,48 (7,87)	3,41	3,58	3,69	3,33/ 3,99	-	-	-	-
	102,42	73,42	82,28	68,27	65,69	-	-	-	-
α -Araf(+FS) _{O3(t)}	5,35	4,21	4,06	4,41	4,41/ 4,50	-	-	-	-
	108,87	81,80	77,45	82,12	64,40	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,25	-	-	6,92	7,16	7,68	6,41	3,88
	-	111,92	-	-	116,44	124,29	147,37	114,34	56,51

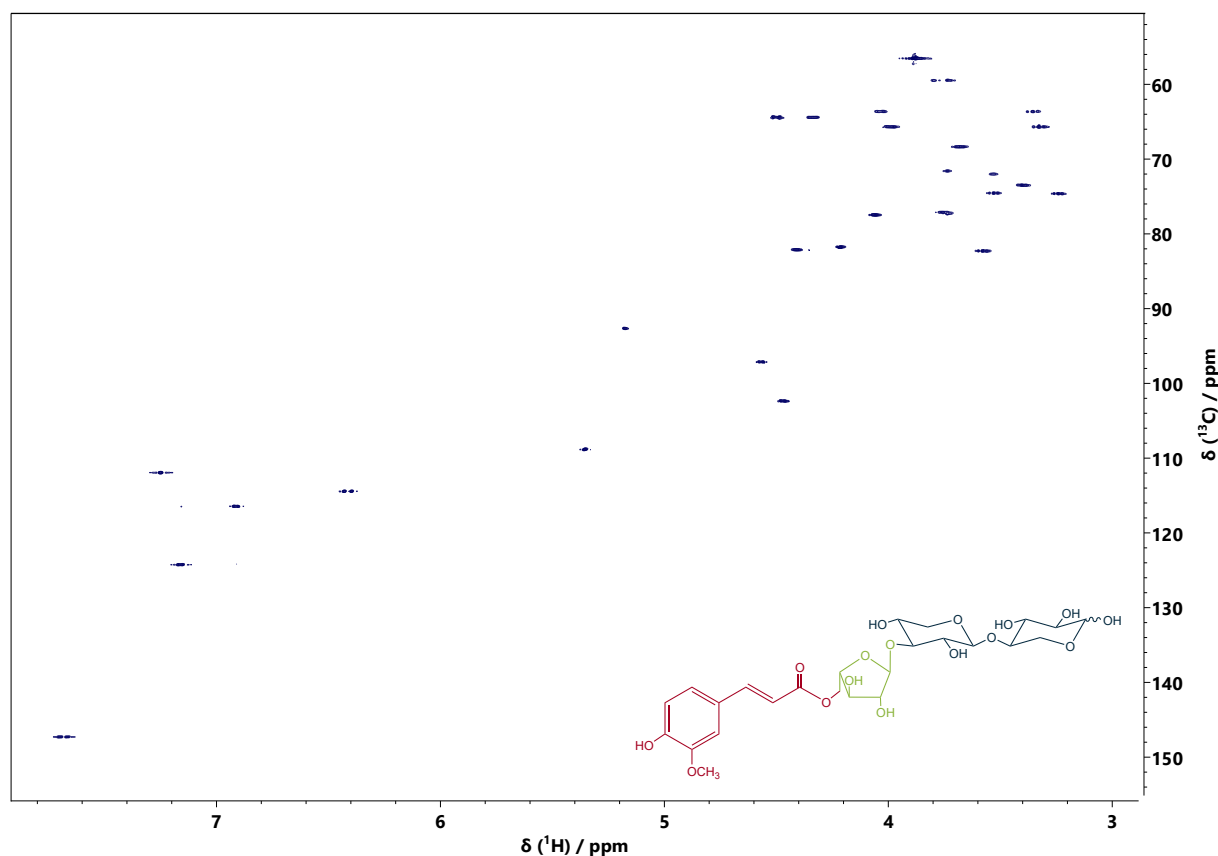


Abbildung A27: HSQC-Spektrum und Struktur des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids A^{5f3}X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 29.

Tabelle A22: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids A^{5f+3}X, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	-OCH ₃
α -Xylp _r	5,18 (3,66)	3,53	3,73	3,73	3,73/ 3,80	-	-	-	-
	92,68	71,97	71,57	77,29	59,49	-	-	-	-
β -Xylp _r	4,58 (7,92)	3,25	3,53	3,77	3,37/ 4,03	-	-	-	-
	97,11	74,63	74,55	77,09	63,60	-	-	-	-
β -Xylp _t	4,45	3,38	3,50	3,62	3,29/ 3,95	-	-	-	-
	102,34	73,34	82,37	68,35	65,61	-	-	-	-
α -Araf(+FS) _{O3(t)}	5,26	4,16	3,93	4,32	4,27/ 4,44	-	-	-	-
	108,87	81,64	77,37	81,92	64,48	-	-	-	-
<i>cis</i> -FS	-	7,33	-	-	6,90	7,06	7,04	5,93	3,85
	-	114,26	-	-	115,71	124,82	145,20	116,92	56,51

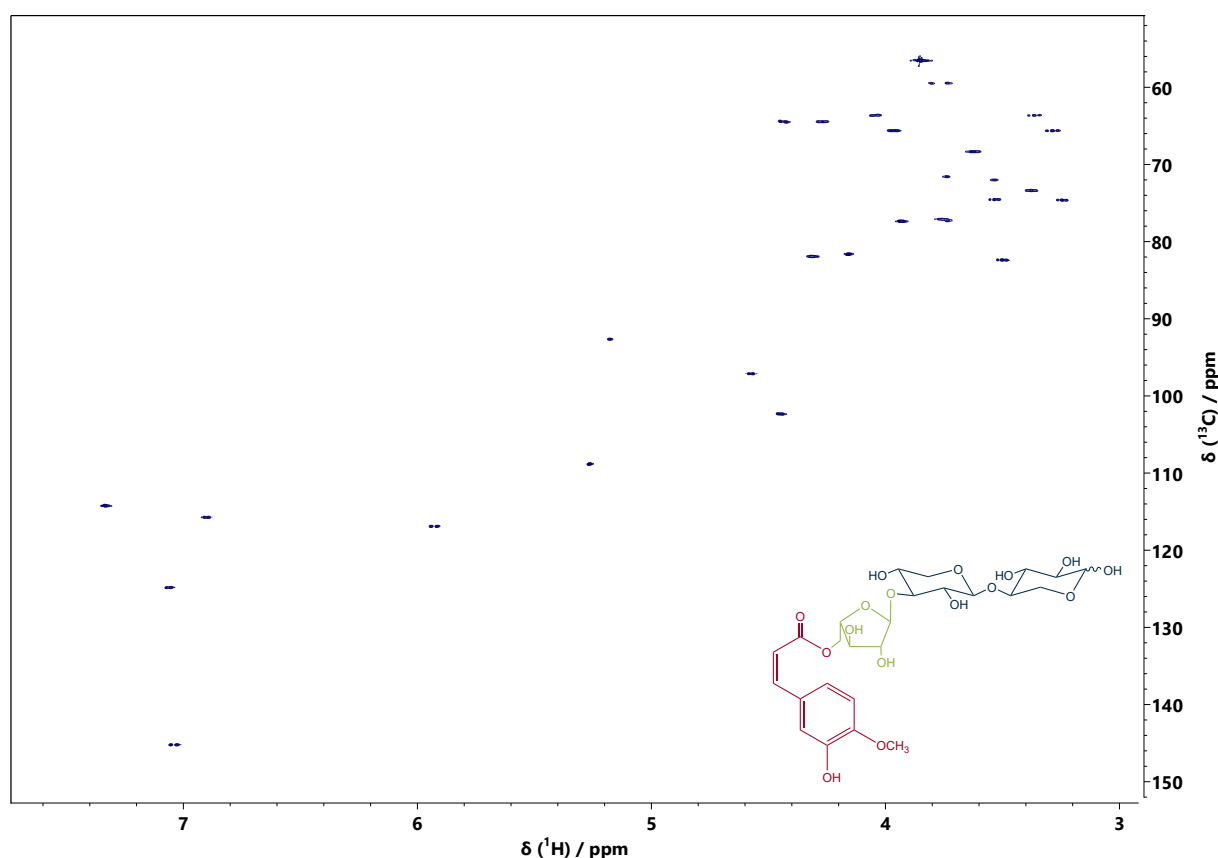


Abbildung A28: HSQC-Spektrum und Struktur des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids A^{5f+3}X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 29.

9 Anhang

Tabelle A23: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids XA^{5f3}X , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	-OCH ₃
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,56)	3,54	3,74	3,74	3,74/ 3,80	-	-	-	-
	92,68	72,01	71,57	77,25	59,46	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,57 (7,93)	3,24	3,53	3,77	3,35/ 4,04	-	-	-	-
	97,11	74,63	74,55	77,09	63,60	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_i$	4,50 (7,87)	3,44	3,71	3,81	3,40/ 4,11	-	-	-	-
	102,26	73,90	78,58	74,39	63,51	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,42 (7,81)	3,26	3,39	3,58	3,25/ 3,90	-	-	-	-
	102,34	73,66	76,24	69,88	65,74	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}(+\text{FS})_{\text{O3(l)}}$	5,39	4,20	3,98	4,55	4,34/ 4,50	-	-	-	-
	108,62	81,43	78,37	82,61	64,88	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,30	-	-	6,93	7,19	7,71	6,46	3,90
	-	112,09	-	-	116,36	124,25	147,37	114,66	56,59

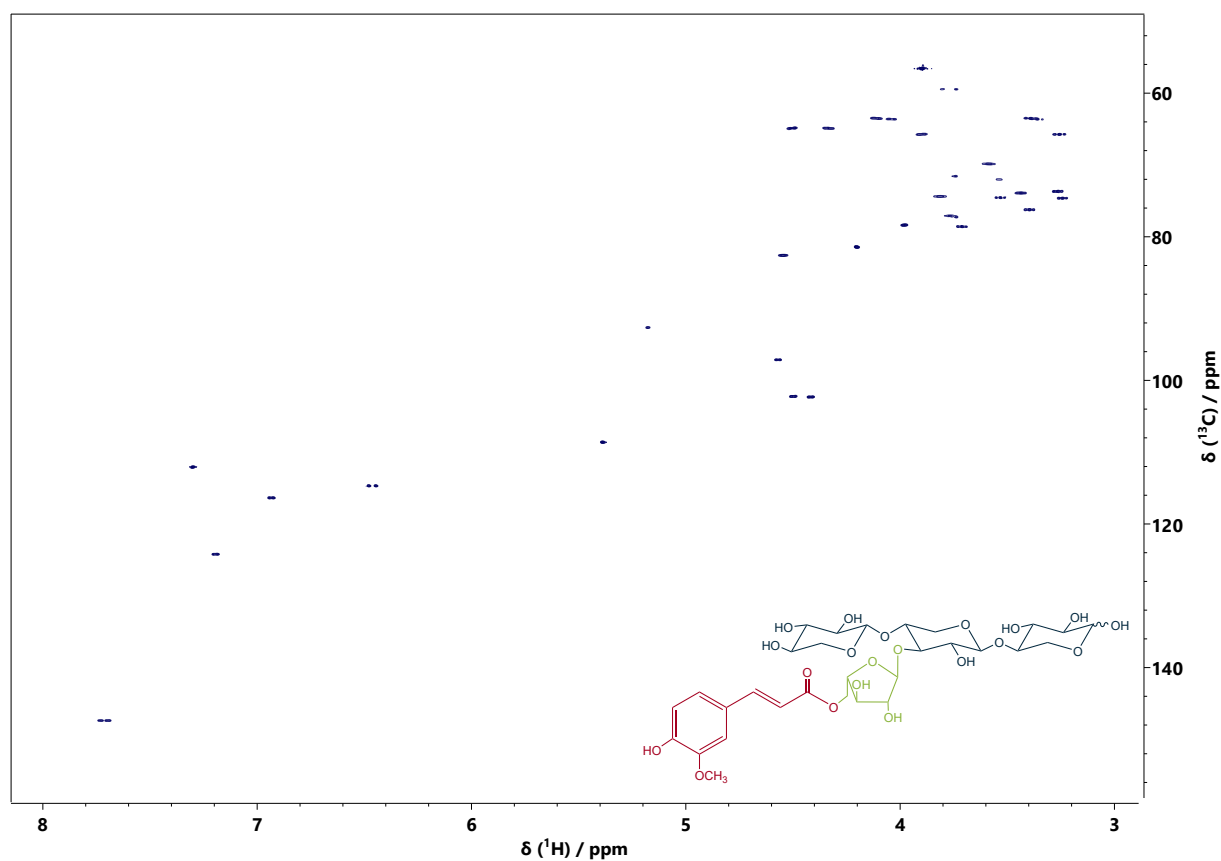


Abbildung A29: HSQC-Spektrum und Struktur des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids XA^{5f3}X.

Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 29.

9 Anhang

Tabelle A24: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids $\text{XA}^{2a5f3}\text{X}$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die über eine Esterbindung an die Arabinofuranose-Einheit gebundene Acetylgruppe weist eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{H/C}} = 2,10$ ppm/20,90 ppm auf. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 C8	-OCH ₃
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,69)	3,54	3,74	3,75	3,74/ 3,80	-	-	-	-
	92,59	71,97	71,57	77,29	59,41	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,57 (7,87)	3,24	3,54	3,78	3,36/ 4,04				
	97,10	74,55	74,55	77,12	63,59				
$\beta\text{-Xylp}_i$	4,50 (7,74)	3,45	3,73	3,85	3,41/ 4,12				
	102,26	73,74	78,66	74,31	63,51				
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,43 (7,91)	3,26	3,40	3,59	3,26/ 3,91				
	102,26	73,66	76,24	69,80	65,75				
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O3(l)}}\text{(+FS, +Ac)}$	5,48	5,02	4,17	4,63	4,40/ 4,54	-	-	-	-
	106,37	83,73	76,32	82,93	64,21	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,31	-	-	6,90	7,21	7,73	6,45	3,89
	-	112,01	-	-	116,76	124,57	147,70	113,94	56,50

Tabelle A25: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids XA^{5f3}XX , gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 H8	-OCH ₃
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,65)	3,54	3,74	3,74	3,74/ 3,81	-	-	-	-
	92,59	71,97	71,57	77,21	59,44	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,93)	3,25	3,54	3,78	3,36/ 4,04	-	-	-	-
	97,11	74,63	74,55	77,05	63,59	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_l$	4,45 (7,62)	3,28	3,53	3,77	3,40/ 4,11	-	-	-	-
	102,34	73,34	74,31	77,05	63,51	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_{II}$	4,49 (7,86)	3,44	3,71	3,81	3,38/ 4,08	-	-	-	-
	102,26	73,91	78,58	74,35	63,59	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,41 (7,80)	3,26	3,40	3,59	3,25/ 3,90	-	-	-	-
	102,34	73,66	76,24	69,87	65,74	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}(+\text{FS})_{\text{O3(II)}}$	5,40	4,20	3,98	4,54	4,33/ 4,50	-	-	-	-
	108,54	81,40	78,34	82,60	64,88	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,25	-	-	6,91	7,16	7,67	6,42	3,88
	-	112,01	-	-	116,36	124,25	147,37	114,50	56,51

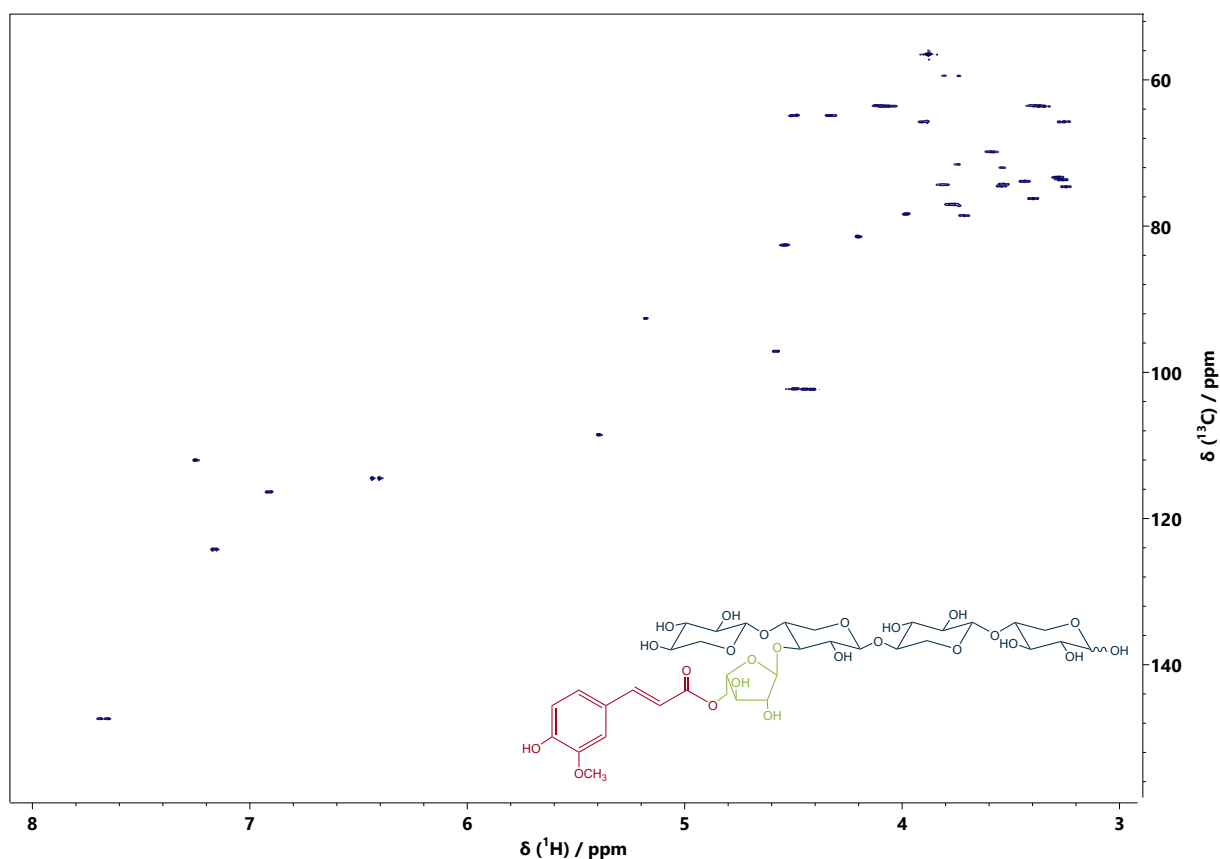


Abbildung A30: HSQC-Spektrum und Struktur des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids XA^{5f3}XX. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 29.

Tabelle A26: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids XD^{2,5f3}XX, gemessen in D₂O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{H,H}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29. Die Xylopyranose (Xylp)-Einheit in der Seitenkette wird mit einem S im Subskript angegeben.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 H8	-OCH ₃
α -Xylp _r	5,18 (3,56)	3,54	3,75	3,74	3,74/ 3,81	-	-	-	-
	92,67	72,05	71,61	77,24	59,49	-	-	-	-
β -Xylp _r	4,58 (7,87)	3,25	3,54	3,78	3,36/ 4,05	-	-	-	-
	97,19	74,63	74,55	77,09	63,63	-	-	-	-
β -Xylp _I	4,46 (7,88)	3,28	3,54	3,77	3,40/ 4,11	-	-	-	-
	102,34	73,34	74,31	77,09	63,54	-	-	-	-
β -Xylp _{II}	4,49 (7,64)	3,43	3,69	3,81	3,38/	-	-	-	-
	102,30	73,87	78,90	74,43	63,63	-	-	-	-
β -Xylp _t	4,41 (7,94)	3,26	3,40	3,58	3,25/ 3,91	-	-	-	-
	102,38	73,74	76,28	69,84	65,77	-	-	-	-
β -Xylp _s	4,55 (7,69)	3,26	3,44	3,58	3,32/ 3,95	-	-	-	-
	103,55	73,58	76,28	69,84	65,93	-	-	-	-
α -Araf _{03(II)} (+FS, +Xylp _s)	5,57	4,29	4,13	4,56	4,34/ 4,50	-	-	-	-
	107,38	89,49	77,05	82,08	64,64	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,26	-	-	6,92	7,17	7,66	6,42	3,89
	-	112,05	-	-	116,40	124,29	147,45	114,63	56,59

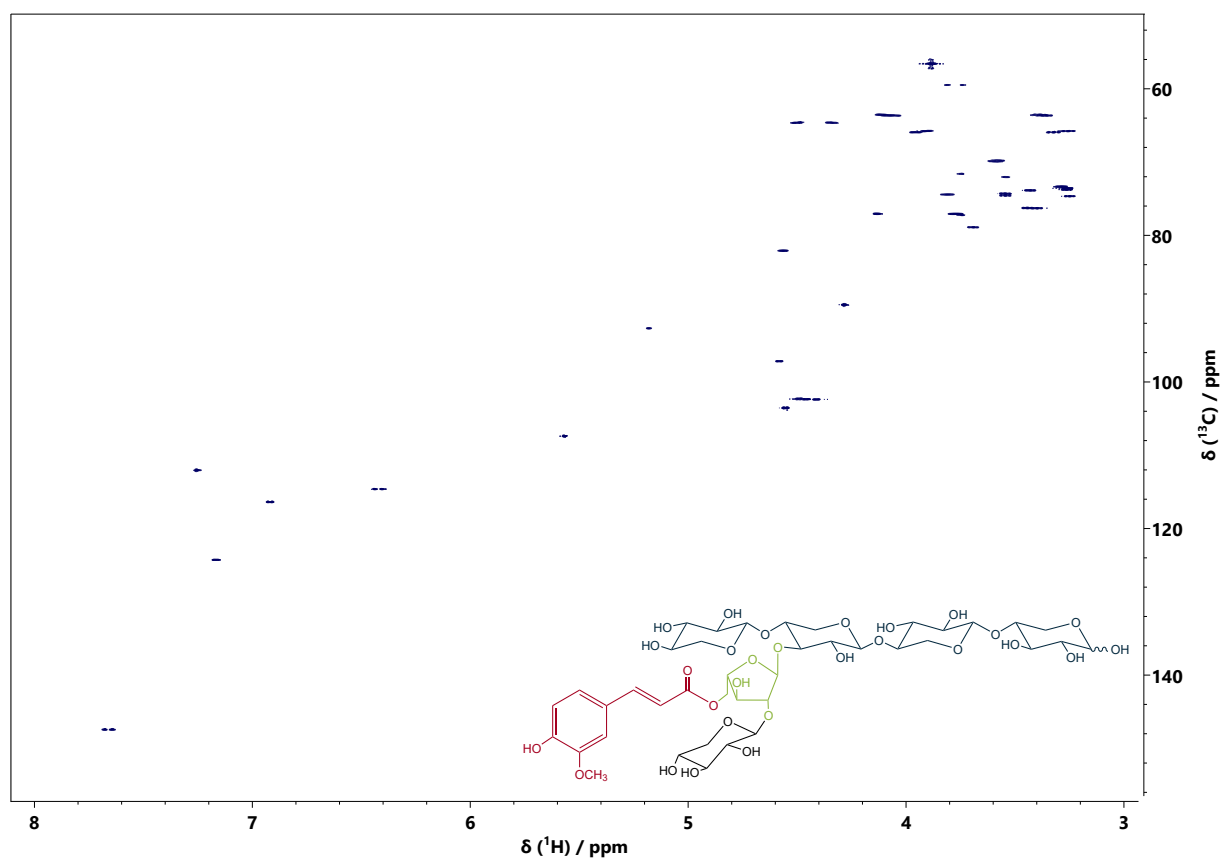


Abbildung A31: HSQC-Spektrum und Struktur des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids XD^{2.5f3}XX. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 29.

Tabelle A27: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxylooligosaccharids $\text{XA}^3\text{A}^{5f3}\text{X}$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 H8	-OCH ₃
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,19 (3,62)	3,55	3,75	3,75	3,75/ 3,82	-	-	-	-
	92,67	72,05	71,57	77,25	59,49	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,93)	3,26	3,55	3,78	3,36/ 4,05				
	97,14	74,63	74,55	77,13	63,61				
$\beta\text{-Xylp}_i$	4,52 (7,71)	3,42	3,66	3,79	3,42/ 4,10	-	-	-	-
	102,26	73,99	79,95	75,12	63,68	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_{ii}$	4,42 (7,93)	3,44	3,68	3,65	3,32/ 4,02				
	102,58	74,71	76,28	74,31	63,27				
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,34 (7,93)	3,18	3,36	3,54	3,21/ 3,81	-	-	-	-
	102,10	73,58	76,24	69,80	65,77	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}_{\text{O3(II)}}$	5,29	3,49	3,67	4,14	3,64/ 3,70	-	-	-	-
	107,66	80,27	78,18	86,15	62,26	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}(+\text{FS})_{\text{O3(I)}}$	5,31	4,20	3,91	4,62	4,16/ 4,66	-	-	-	-
	109,27	81,80	78,74	81,96	65,66	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,33	-	-	6,97	7,21	7,73	6,47	3,92
	-	112,01	-	-	116,32	124,41	147,61	114,75	56,56

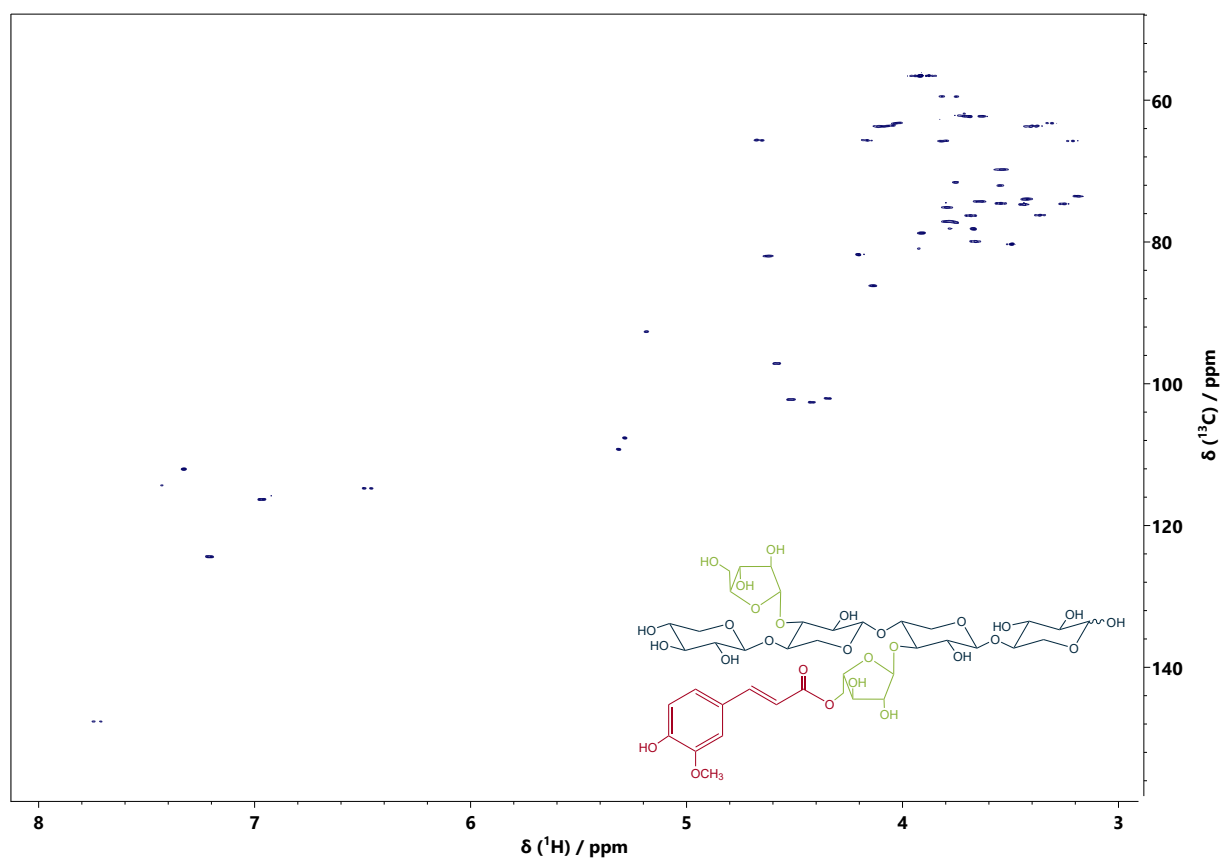


Abbildung A32: HSQC-Spektrum und Struktur des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids XA³A^{5f3}X. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und auf die chemische Verschiebung des Signals von Aceton kalibriert ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm). Das Farbschema der chemischen Struktur entspricht der in Abb. 29.

Tabelle A28: Chemische Verschiebungen der korrelierten Protonen und Kohlenstoffe aus dem HSQC-Spektrum des ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharids $\text{XA}^{2+3}\text{A}^{5f3}\text{X}$, gemessen in D_2O mit Aceton als Referenzsubstanz ($\delta_{\text{H/C}} = 2,22/30,89$ ppm). In Klammern ist die vicinale Kopplungskonstante in Hz ($^3J_{\text{H,H}}$) zum benachbarten Proton angegeben. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 28 und 29.

Einheit	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6	H7 C7	H8 H8	-OCH ₃
$\alpha\text{-Xylp}_r$	5,18 (3,53)	3,53	3,74	3,74	3,74/ 3,80	-	-	-	-
	92,68	71,98	71,57	77,21	59,49	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_r$	4,58 (7,96)	3,24	3,53	3,76	3,36/ 4,05	-	-	-	-
	97,10	74,63	74,55	77,05	63,60	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_i$	4,50 (7,97)	3,40	3,66	3,75	3,44/ 4,08	-	-	-	-
	102,26	73,99	80,11	75,28	63,90	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_{ii}$	4,48 (7,97)	3,33	3,70	3,67	3,30/ 4,02	-	-	-	-
	101,05	79,95	77,37	74,24	63,19	-	-	-	-
$\beta\text{-Xylp}_t$	4,37 (7,89)	3,21	3,39	3,56	3,27/ 3,89	-	-	-	-
	102,10	73,59	76,24	69,88	65,85	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}_{02(\text{II})}$	4,96	4,01	3,90	4,12	3,73/ 3,81	-	-	-	-
	109,59	81,72	77,37	85,02	61,98	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}_{03(\text{II})}$	5,10	3,61	3,78	4,20	3,64/ 3,71	-	-	-	-
	108,22	80,76	77,93	85,47	61,91	-	-	-	-
$\alpha\text{-Araf}(+\text{FS})_{03(\text{I})}$	5,35	4,20	3,92	4,58	4,13/ 4,77	-	-	-	-
	109,31	81,48	78,58	82,69	65,53	-	-	-	-
<i>trans</i> -FS	-	7,29	-	-	6,96	7,23	7,76	6,47	3,92
	-	112,49	-	-	116,36	124,25	147,78	114,75	56,59

Tabelle A29: Validierungsparameter der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode zur strukturellen Charakterisierung von Arabinoxylanen aus Getreide. Die (Arabino-)Xylooligosaccharide ((A)XOS) sind nach der von Fauré *et al.* (2009) eingeführten Nomenklatur benannt.

(A)XOS	Kalibrierbereich / μM	Korrelationskoeffizient	Verfahrensvariationskoeffizient / %
X_2	0,1 - 30	0,99997	0,94
X_3	0,1 - 30	0,99980	2,66
X_4	0,1 - 30	0,99959	3,77
X_5	0,1 - 15	0,99903	5,73
X_6	0,1 - 15	0,99821	7,73
A^2XX	0,1 - 30	0,99985	2,25
A^3X	0,1 - 30	0,99988	2,08
XA^3X	0,1 - 30	0,99989	2,07
XA^3XX	0,1 - 30	0,99949	4,22
XA^{2+3}XX	0,1 - 30	0,99902	5,76
A^{2+3}XX	0,1 - 30	0,99939	4,59
$\text{XA}^3\text{A}^3\text{X}$	0,1 - 30	0,99983	2,39
$\text{A}^3\text{A}^3\text{X}$	0,1 - 30	0,99988	2,08
$\text{XA}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$	0,1 - 30	0,99969	3,28
$\text{A}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$	0,1 - 30	0,99976	2,88
$\text{A}^{2+3}\text{XA}^{2+3}\text{XX}$	0,1 - 30	0,99946	4,31
$\text{A}^{2+3}\text{A}^{2+3}\text{XX}$	0,1 - 30	0,99960	3,69

Tabelle A30: Relativen Retentionszeiten (RRT) sowie Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der durch die entwickelte HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode erfassten (Arabino-)Xylooligosaccharide ((A)XOS) bei Analyse auf einer SweetSepAEX200-Säule (Antec Scientific). Die RRT sind in Bezug auf die internen Standardsubstanzen Isomaltotriose (IMT) und Laminaritriose (LT) angegeben. Die (A)XOS sind nach der von Fauré *et al.* (2009) eingeführten Nomenklatur benannt.

(A)XOS	RRT	LOD / μM	LOQ / μM
X_2	0,823 ^{IMT}	0,05	0,075
X_3	1,091 ^{IMT}	0,05	0,075
X_4	1,407 ^{IMT}	0,025	0,075
X_5	1,733 ^{IMT}	0,025	0,05
X_6	2,067 ^{IMT}	0,05	0,075
A^2XX	2,178 ^{IMT}	0,025	0,075
A^3X	2,261 ^{IMT}	0,05	0,1
XA^3X	2,294 ^{IMT}	0,025	0,05
XA^3XX	1,044 ^{LT}	0,025	0,075
XA^{2+3}XX	1,146 ^{LT}	0,01	0,05
A^{2+3}XX	1,159 ^{LT}	0,025	0,05
$\text{XA}^3\text{A}^3\text{X}$	1,289 ^{LT}	0,025	0,05
$\text{A}^3\text{A}^3\text{X}$	1,316 ^{LT}	0,025	0,05
$\text{XA}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$	1,400 ^{LT}	0,01	0,05
$\text{A}^3\text{A}^{2+3}\text{XX}$	1,428 ^{LT}	0,01	0,05
$\text{A}^{2+3}\text{XA}^{2+3}\text{XX}$	1,533 ^{LT}	0,01	0,025
$\text{A}^{2+3}\text{A}^{2+3}\text{XX}$	1,573 ^{LT}	0,01	0,025

Tabelle A31: Molare Anteile (mol%, n = 2) von Xylooligosacchariden (XOS) und Arabinoxylooligosacchariden (AXOS) nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Getreide mit einer *endo*- β -1,4-Xylanase der GH-Familie 10 (XYL₁₀), bestimmt mittels der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Die Nomenklatur der (A)XOS erfolgt nach den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). UBS, Unlösliche Ballaststoffe; LBS, Lösliche Ballaststoffe

		XOS		AXOS			
Weizen	UBS	X ₂	52,3 ± 1,5	A ² XX	0,8 ± 0,0	XA ³ A ³ X	1,2 ± 0,1
		X ₃	18,0 ± 2,4	A ³ X	6,3 ± 0,5	A ³ A ³ X	1,8 ± 0,1
		X ₄	0,7 ± 0,2	XA ³ X	7,6 ± 0,4	XA ³ A ²⁺³ XX	0,5 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	0,6 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	0,7 ± 0,1
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	4,3 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	0,8 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	3,3 ± 0,1	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	1,1 ± 0,0
	LBS	X ₂	29,2 ± 0,4	A ² XX	0,9 ± 0,1	XA ³ A ³ X	2,3 ± 0,0
		X ₃	5,2 ± 0,5	A ³ X	9,6 ± 0,0	A ³ A ³ X	2,3 ± 0,0
		X ₄	-	XA ³ X	11,6 ± 0,4	XA ³ A ²⁺³ XX	3,8 ± 0,1
		X ₅	-	XA ³ XX	0,4 ± 0,1	A ³ A ²⁺³ XX	4,0 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	13,9 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	2,9 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	10,1 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	3,8 ± 0,0
Roggen	UBS	X ₂	51,7 ± 1,2	A ² XX	0,7 ± 0,1	XA ³ A ³ X	2,5 ± 0,1
		X ₃	16,9 ± 0,5	A ³ X	8,9 ± 0,1	A ³ A ³ X	4,1 ± 0,1
		X ₄	0,5 ± 0,1	XA ³ X	9,3 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	0,2 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	0,8 ± 0,1	A ³ A ²⁺³ XX	0,3 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	1,5 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	0,5 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	1,2 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	0,9 ± 0,0
	LBS	X ₂	19,2 ± 0,0	A ² XX	0,5 ± 0,0	XA ³ A ³ X	10,1 ± 0,0
		X ₃	5,6 ± 0,1	A ³ X	15,5 ± 0,2	A ³ A ³ X	13,9 ± 0,1
		X ₄	-	XA ³ X	13,5 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	1,6 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	3,3 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	2,8 ± 0,1
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	3,1 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	3,1 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	2,8 ± 0,1	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	5,1 ± 0,0
Einkorn	UBS	X ₂	47,8 ± 0,7	A ² XX	0,7 ± 0,1	XA ³ A ³ X	1,7 ± 0,1
		X ₃	17,5 ± 0,1	A ³ X	7,9 ± 0,2	A ³ A ³ X	2,7 ± 0,1
		X ₄	-	XA ³ X	9,2 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	0,7 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	0,9 ± 0,0	A ³ A ²⁺³ XX	1,1 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	3,7 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	1,0 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	3,1 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	1,9 ± 0,1
	LBS	X ₂	26,9 ± 0,5	A ² XX	0,8 ± 0,0	XA ³ A ³ X	3,6 ± 0,0
		X ₃	4,2 ± 0,2	A ³ X	10,5 ± 0,1	A ³ A ³ X	4,4 ± 0,0
		X ₄	-	XA ³ X	10,7 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	4,2 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	0,3 ± 0,0	A ³ A ²⁺³ XX	4,7 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	11,6 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	3,4 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	9,4 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	5,3 ± 0,0
Emmer	UBS	X ₂	42,0 ± 1,5	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	1,4 ± 0,0
		X ₃	25,9 ± 0,0	A ³ X	4,6 ± 0,0	A ³ A ³ X	2,1 ± 0,0
		X ₄	4,6 ± 0,7	XA ³ X	7,5 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₅	-	XA ³ XX	-	A ³ A ²⁺³ XX	0,3 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	5,3 ± 0,3	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	1,2 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	3,5 ± 0,1	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	1,6 ± 0,1

9 Anhang

Fortsetzung von Tabelle A31

Emmer	LBS	X ₂	22,6 ± 0,1	A ² XX	1,2 ± 0,0	XA ³ A ³ X	1,5 ± 0,0
		X ₃	4,4 ± 0,1	A ³ X	4,8 ± 0,0	A ³ A ³ X	1,4 ± 0,0
		X ₄	-	XA ³ X	6,3 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	3,6 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	0,4 ± 0,0	A ³ A ²⁺³ XX	3,4 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	18,8 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	6,9 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	15,5 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	9,2 ± 0,0
Kamut	UBS	X ₂	43,0 ± 0,2	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	1,6 ± 0,0
		X ₃	18,0 ± 0,5	A ³ X	7,4 ± 0,2	A ³ A ³ X	2,7 ± 0,0
		X ₄	1,0 ± 0,2	XA ³ X	9,1 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	0,8 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	1,3 ± 0,1	A ³ A ²⁺³ XX	0,9 ± 0,1
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	6,0 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	1,4 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	4,7 ± 0,1	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	2,0 ± 0,1
	LBS	X ₂	28,8 ± 0,3	A ² XX	0,9 ± 0,0	XA ³ A ³ X	2,6 ± 0,0
		X ₃	4,7 ± 0,3	A ³ X	8,7 ± 0,1	A ³ A ³ X	3,5 ± 0,0
		X ₄	-	XA ³ X	9,8 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	3,3 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	-	A ³ A ²⁺³ XX	3,4 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	14,1 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	3,7 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	10,9 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	5,6 ± 0,0
Dinkel	UBS	X ₂	52,8 ± 2,5	A ² XX	0,9 ± 0,0	XA ³ A ³ X	1,5 ± 0,0
		X ₃	14,2 ± 1,9	A ³ X	4,8 ± 0,0	A ³ A ³ X	2,4 ± 0,0
		X ₄	-	XA ³ X	7,4 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	0,9 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	-	A ³ A ²⁺³ XX	1,0 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	5,7 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	1,2 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	5,2 ± 0,2	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	1,9 ± 0,0
	LBS	X ₂	26,7 ± 0,6	A ² XX	1,1 ± 0,0	XA ³ A ³ X	1,9 ± 0,1
		X ₃	8,9 ± 1,1	A ³ X	8,0 ± 0,4	A ³ A ³ X	2,6 ± 0,1
		X ₄	-	XA ³ X	10,4 ± 0,2	XA ³ A ²⁺³ XX	3,6 ± 0,1
		X ₅	-	XA ³ XX	1,6 ± 0,4	A ³ A ²⁺³ XX	3,1 ± 0,1
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	14,6 ± 0,4	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	3,7 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	10,1 ± 0,5	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	3,6 ± 0,1
Gerste	UBS	X ₂	24,5 ± 0,1	A ² XX	2,6 ± 0,2	XA ³ A ³ X	2,1 ± 0,0
		X ₃	7,7 ± 0,3	A ³ X	11,9 ± 0,2	A ³ A ³ X	3,6 ± 0,1
		X ₄	-	XA ³ X	10,0 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	1,4 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	0,4 ± 0,0	A ³ A ²⁺³ XX	1,3 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	12,1 ± 0,2	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	3,7 ± 0,0
				A ²⁺³ XX	15,2 ± 0,1	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	3,6 ± 0,0
	LBS	X ₂	23,4 ± 0,5	A ² XX	4,7 ± 0,5	XA ³ A ³ X	1,2 ± 0,1
		X ₃	2,6 ± 0,1	A ³ X	6,3 ± 0,0	A ³ A ³ X	1,9 ± 0,2
		X ₄	-	XA ³ X	6,3 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	4,8 ± 0,1
		X ₅	-	XA ³ XX	-	A ³ A ²⁺³ XX	4,6 ± 0,5
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	16,9 ± 0,2	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	5,1 ± 0,2
				A ²⁺³ XX	17,1 ± 0,1	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	5,1 ± 0,1

Tabelle A32: Molare Anteile (mol%, n = 2) von Xylooligosacchariden (XOS) und Arabinoxylooligosacchariden (AXOS) nach enzymatischer Hydrolyse verschiedener Getreide mit einer *endo*- β -1,4-Xylanase der GH-Familie 11 (XYL₁₁), bestimmt mittels der entwickelten HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode. Die Nomenklatur der (A)XOS erfolgt nach den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009). UBS, Unlösliche Ballaststoffe; LBS, Lösliche Ballaststoffe

		XOS			AXOS		
Weizen	UBS	X ₂	44,5 ± 0,5	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,6 ± 0,0
		X ₃	25,5 ± 0,1	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	5,2 ± 0,1	XA ³ X	0,6 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	1,2 ± 0,1
		X ₅	1,1 ± 0,0	XA ³ XX	14,9 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	0,6 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	5,8 ± 0,5	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
	LBS			A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	27,7 ± 1,0	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	-
		X ₃	12,5 ± 0,5	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	4,2 ± 0,2	XA ³ A ²⁺³ XX	7,1 ± 0,1
		X ₅	-	XA ³ XX	28,4 ± 0,5	A ³ A ²⁺³ XX	-
Roggen	UBS	X ₆	-	XA ²⁺³ XX	20,1 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	67,4 ± 0,8	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,9 ± 0,0
		X ₃	3,8 ± 0,6	A ³ X	0,3 ± 0,0	A ³ A ³ X	-
		X ₄	7,2 ± 0,2	XA ³ X	0,4 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	0,3 ± 0,0
	LBS	X ₅	1,3 ± 0,0	XA ³ XX	15,3 ± 0,3	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	0,9 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	1,9 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	0,3 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	20,0 ± 0,2	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	6,5 ± 0,0
		X ₃	9,8 ± 0,3	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
Einkorn	UBS	X ₄	1,0 ± 0,0	XA ³ X	4,2 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	4,7 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	45,2 ± 0,1	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	8,5 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	54,7 ± 4,3	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,5 ± 0,0
	LBS	X ₃	16,8 ± 4,9	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	6,3 ± 0,2	XA ³ X	0,6 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	1,1 ± 0,1
		X ₅	1,3 ± 0,0	XA ³ XX	13,5 ± 0,4	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	0,8 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	4,4 ± 0,2	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
Emmer	UBS	X ₂	29,2 ± 1,0	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	1,5 ± 0,3
		X ₃	9,2 ± 0,5	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	3,2 ± 0,9	XA ³ A ²⁺³ XX	8,5 ± 0,3
		X ₅	-	XA ³ XX	27,1 ± 0,4	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	21,3 ± 0,7	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
	LBS			A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	47,3 ± 1,2	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,3 ± 0,0
		X ₃	27,4 ± 0,9	A ³ X	0,4 ± 0,0	A ³ A ³ X	-
		X ₄	7,2 ± 0,4	XA ³ X	0,3 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	0,4 ± 0,0
		X ₅	1,4 ± 0,1	XA ³ XX	10,1 ± 0,0	A ³ A ²⁺³ XX	-
Emmer	UBS	X ₆	0,8 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	4,3 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	47,3 ± 1,2	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,3 ± 0,0
		X ₃	27,4 ± 0,9	A ³ X	0,4 ± 0,0	A ³ A ³ X	-
		X ₄	7,2 ± 0,4	XA ³ X	0,3 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	0,4 ± 0,0
	LBS	X ₅	1,4 ± 0,1	XA ³ XX	10,1 ± 0,0	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	0,8 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	4,3 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
		X ₂	47,3 ± 1,2	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,3 ± 0,0
		X ₃	27,4 ± 0,9	A ³ X	0,4 ± 0,0	A ³ A ³ X	-

9 Anhang

Fortsetzung von Tabelle A32

Emmer	LBS	X ₂	27,8 ± 0,2	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	1,4 ± 0,0
		X ₃	9,8 ± 0,6	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	2,9 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	9,5 ± 1,3
		X ₅	-	XA ³ XX	15,3 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	33,3 ± 0,4	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
Kamut	UBS	X ₂	46,5 ± 0,6	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,5 ± 0,0
		X ₃	24,0 ± 0,3	A ³ X	0,2 ± 0,0	A ³ A ³ X	-
		X ₄	5,2 ± 0,0	XA ³ X	0,6 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	1,2 ± 0,0
		X ₅	1,0 ± 0,0	XA ³ XX	13,9 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	0,3 ± 0,0
		X ₆	0,5 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	5,9 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	0,2 ± 0,0	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
	LBS	X ₂	27,0 ± 0,5	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	1,4 ± 0,0
		X ₃	11,4 ± 0,0	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	1,6 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	6,9 ± 0,1
		X ₅	-	XA ³ XX	24,3 ± 0,1	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	21,6 ± 0,0	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	5,9 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
Dinkel	UBS	X ₂	62,8 ± 1,8	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	0,4 ± 0,0
		X ₃	9,9 ± 1,7	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	6,4 ± 0,3	XA ³ X	0,5 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	1,0 ± 0,1
		X ₅	1,1 ± 0,1	XA ³ XX	11,5 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	0,7 ± 0,0	XA ²⁺³ XX	5,7 ± 0,3	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	-
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
	LBS	X ₂	43,0 ± 2,0	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	3,6 ± 0,1
		X ₃	-	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	1,8 ± 0,0	XA ³ A ²⁺³ XX	5,6 ± 0,3
		X ₅	-	XA ³ XX	20,2 ± 0,5	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	21,2 ± 1,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	4,6 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
Gerste	UBS	X ₂	43,5 ± 0,5	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	1,1 ± 0,0
		X ₃	5,7 ± 0,6	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	1,8 ± 0,1	XA ³ A ²⁺³ XX	2,4 ± 0,0
		X ₅	-	XA ³ XX	27,2 ± 0,2	A ³ A ²⁺³ XX	0,4 ± 0,0
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	14,9 ± 0,1	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	3,0 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-
	LBS	X ₂	28,1 ± 0,1	A ² XX	-	XA ³ A ³ X	-
		X ₃	8,4 ± 0,5	A ³ X	-	A ³ A ³ X	-
		X ₄	-	XA ³ X	-	XA ³ A ²⁺³ XX	7,7 ± 0,2
		X ₅	-	XA ³ XX	17,4 ± 0,6	A ³ A ²⁺³ XX	-
		X ₆	-	XA ²⁺³ XX	32,4 ± 0,9	A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	6,1 ± 0,1
				A ²⁺³ XX	-	A ²⁺³ A ²⁺³ XX	-

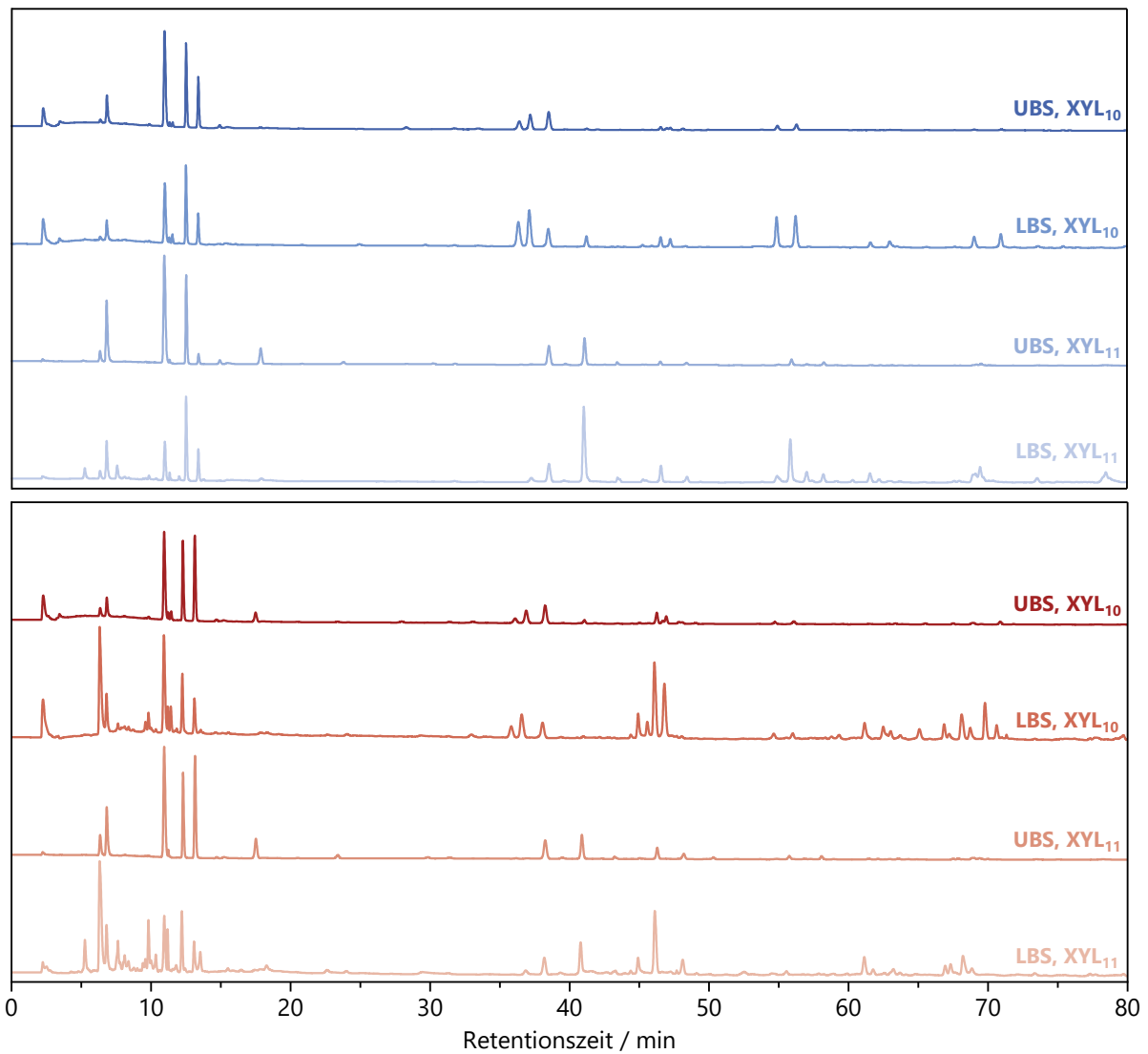


Abbildung A33: Chromatogramme des HPAEC-PAD-Profilings von (Arabino-)Xylooligosacchariden aus unlöslichen und löslichen Ballaststoffen (UBS, LBS) von Roggen (blau markiert) und Emmer (rot markiert) nach enzymatischer Hydrolyse mit *endo*- β -1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁)

9 Anhang

Tabelle A33: Molare Anteile der Monosaccharide (mol% $\pm$ Standardabweichung, n = 3) in verschiedenen Getreiden nach saurer Hydrolyse, bestimmt mittels HPAEC-PAD. UBS, Unlösliche Ballaststoffe; LBS, Lösliche Ballaststoffe; Ara, Arabinose; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Man, Mannose; GalA, Galacturonsäure; GlcA, Glucuronsäure

		Weizen	Roggen	Einkorn	Emmer	Kamut	Dinkel	Gerste
UBS	Ara	25,4 $\pm$ 0,4	22,3 $\pm$ 0,2	26,0 $\pm$ 0,2	24,9 $\pm$ 0,1	26,5 $\pm$ 0,4	23,1 $\pm$ 0,2	23,3 $\pm$ 0,6
	Gal	1,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0
	Glc	28,1 $\pm$ 0,5	31,0 $\pm$ 0,2	22,4 $\pm$ 0,3	23,7 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,5	28,0 $\pm$ 0,4	38,9 $\pm$ 0,2
	Xyl	42,6 $\pm$ 0,9	41,8 $\pm$ 0,2	46,9 $\pm$ 0,3	46,3 $\pm$ 0,2	42,5 $\pm$ 0,8	45,5 $\pm$ 0,5	32,3 $\pm$ 0,9
	Man	1,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,2
	GalA	-	0,5 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	-	-
	GlcA	1,2 $\pm$ 0,0	-	1,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	-
LBS	Ara	24,0 $\pm$ 0,3	25,2 $\pm$ 0,1	29,8 $\pm$ 0,4	35,0 $\pm$ 0,1	28,8 $\pm$ 0,2	25,2 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,3
	Rha	0,6 $\pm$ 0,1	-	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1	-	-
	Gal	9,5 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,0	9,6 $\pm$ 0,2	15,2 $\pm$ 0,2	10,9 $\pm$ 0,0	11,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1
	Glc	16,0 $\pm$ 1,4	18,4 $\pm$ 0,1	10,9 $\pm$ 0,3	10,0 $\pm$ 0,2	11,5 $\pm$ 1,0	25,4 $\pm$ 0,3	78,0 $\pm$ 0,7
	Xyl	36,7 $\pm$ 1,8	48,1 $\pm$ 0,2	37,8 $\pm$ 1,1	30,3 $\pm$ 0,4	36,5 $\pm$ 0,4	27,7 $\pm$ 0,1	9,7 $\pm$ 0,3
	Man	13,0 $\pm$ 0,4	5,4 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,2	11,2 $\pm$ 0,6	10,4 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,1
	GalA	0,5 $\pm$ 0,0	-	-	-	0,4 $\pm$ 0,0	-	-
	GlcA	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A34: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von unlöslichen Ballaststoffen (UBS) aus verschiedenen Getreiden (mol% $\pm$ Range/2, n = 2). Araf, Arabinofuranose; Arap, Arabinopyranose; Galp, Galactopyranose; Glcp, Glucopyranose; Manp, Mannopyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Xylp, Xylopyranose

	PMAA	Weizen	Einkorn	Emmer	Kamut	Dinkel	Gerste
Ara	t-Araf	13,3 $\pm$ 0,3	16,0 $\pm$ 0,0	15,0 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 0,3	13,5 $\pm$ 0,9	15,5 $\pm$ 0,2
	1,2-Araf	0,5 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,0
	1,3-Araf	1,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0
	1,5-Araf/1,4-Arap	2,0 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,0
	1,2,3,5-Araf	0,6 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	Summe	17,4 $\pm$ 0,9	20,2 $\pm$ 0,2	19,3 $\pm$ 0,5	18,8 $\pm$ 0,5	17,0 $\pm$ 1,2	18,6 $\pm$ 0,2
Xyl	t-Xylp	2,1 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1
	1,4-Xylp	37,3 $\pm$ 1,8	33,8 $\pm$ 0,2	34,1 $\pm$ 0,8	30,9 $\pm$ 2,1	28,6 $\pm$ 3,0	16,8 $\pm$ 0,4
	1,2,4-Xylp	1,3 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2
	1,3,4-Xylp	7,0 $\pm$ 0,8	7,3 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,0	7,1 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,2
	1,2,3,4-Xylp	6,7 $\pm$ 0,9	8,3 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,6	7,3 $\pm$ 0,9	9,1 $\pm$ 0,8
	Summe	54,4 $\pm$ 4,0	53,5 $\pm$ 0,7	51,1 $\pm$ 1,0	49,5 $\pm$ 3,0	45,8 $\pm$ 4,4	33,5 $\pm$ 1,7
Glc	t-Glcp	1,2 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,4
	1,3-Glcp	3,1 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,0	6,8 $\pm$ 0,1
	1,4-Glcp	19,4 $\pm$ 2,7	16,9 $\pm$ 0,1	20,2 $\pm$ 0,6	22,2 $\pm$ 0,4	24,9 $\pm$ 1,2	30,0 $\pm$ 1,6
	1,4,6-Glcp	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1
	Summe	24,5 $\pm$ 3,2	21,2 $\pm$ 0,3	24,3 $\pm$ 0,9	27,1 $\pm$ 0,8	30,6 $\pm$ 1,4	39,5 $\pm$ 2,2
Gal	t-Galp	0,9 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,1
	1,3-Galp	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,0
	1,4-Galp	1,0 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,0
	1,6-Galp	-	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	1,3,6-Galp	-	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
	Summe	2,0 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,2
Man	t-Manp	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
	1,4-Manp	1,6 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,1
	Summe	1,8 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,1

9 Anhang

Tabelle A35: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von löslichen Ballaststoffen (LBS) aus verschiedenen Getreiden (mol% $\pm$ Range/2, n = 2). Araf, Arabinofuranose; Arap, Arabinopyranose; Galp, Galactopyranose; Glcp, Glucopyranose; Manp, Mannopyranose; PMAA, partiell methylierte Alditolacetate; Xylp, Xylopyranose

	PMAA	Weizen	Roggen	Einkorn	Emmer
Ara	t-Araf	22,2 $\pm$ 0,2	23,9 $\pm$ 0,0	25,3 $\pm$ 0,1	28,6 $\pm$ 0,0
	1,2-Araf	0,4 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
	1,3-Araf	0,3 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
	1,5-Araf/1,4-Arap	1,1 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0
	1,2,3,5-Araf	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	Summe	24,1 $\pm$ 0,2	25,2 $\pm$ 0,0	27,8 $\pm$ 0,1	30,7 $\pm$ 0,0
Xyl	t-Xylp	1,2 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0
	1,4-Xylp	30,8 $\pm$ 0,1	25,9 $\pm$ 0,4	29,5 $\pm$ 0,1	25,1 $\pm$ 0,0
	1,2,4-Xylp	0,8 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1
	1,3,4-Xylp	4,8 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1
	1,2,3,4-Xylp	9,3 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,1	11,6 $\pm$ 0,0	13,3 $\pm$ 0,2
	Summe	46,9 $\pm$ 0,3	51,7 $\pm$ 0,9	49,8 $\pm$ 0,3	44,7 $\pm$ 0,4
Glc	t-Glcp	1,9 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0
	1,3-Glcp	3,2 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1
	1,4-Glcp	7,0 $\pm$ 0,1	10,0 $\pm$ 0,0	3,4 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1
	1,4,6-Glcp	-	-	-	-
	Summe	12,1 $\pm$ 0,3	16,0 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,2
Gal	t-Galp	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
	1,3-Galp	1,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1
	1,4-Galp	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,0	2,2 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0
	1,6-Galp	1,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,1
	1,3,6-Galp	7,1 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,0	6,2 $\pm$ 0,0	11,6 $\pm$ 0,0
	Summe	12,2 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1	11,3 $\pm$ 0,0	16,6 $\pm$ 0,2
Man	t-Manp	1,7 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0
	1,4-Manp	3,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0
	Summe	4,7 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 0,0

Fortsetzung von Tabelle A35

	PMAA	Kamut	Dinkel	Gerste
Ara	t-Araf	24,7 ± 0,0	22,3 ± 0,0	13,5 ± 0,4
	1,2-Araf	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0
	1,3-Araf	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0
	1,5-Araf/1,4-Arap	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,1
	1,2,3,5-Araf	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1
	Summe	27,1 ± 0,1	24,7 ± 0,6	15,8 ± 0,6
Xyl	t-Xylp	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
	1,4-Xylp	29,4 ± 0,4	31,2 ± 0,5	15,3 ± 0,7
	1,2,4-Xylp	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	1,3,4-Xylp	5,5 ± 0,1	4,5 ± 0,3	2,0 ± 0,0
	1,2,3,4-Xylp	11,3 ± 0,1	8,3 ± 1,0	7,3 ± 0,4
	Summe	48,8 ± 0,7	46,2 ± 1,8	26,1 ± 1,1
Glc	t-Glcp	1,6 ± 0,0	2,2 ± 0,2	3,1 ± 0,0
	1,3-Glcp	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1	12,5 ± 0,8
	1,4-Glcp	4,5 ± 0,1	7,6 ± 0,7	34,6 ± 1,6
	1,4,6-Glcp	-	-	-
	Summe	8,8 ± 0,2	13,2 ± 1,0	50,2 ± 2,4
Gal	t-Galp	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,0
	1,3-Galp	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0
	1,4-Galp	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1
	1,6-Galp	1,6 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,0
	1,3,6-Galp	8,2 ± 0,1	7,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2
	Summe	12,6 ± 0,1	11,5 ± 0,6	5,2 ± 0,3
Man	t-Manp	1,6 ± 0,0	1,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1
	1,4-Manp	1,2 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,2 ± 0,3
	Summe	2,8 ± 0,0	4,4 ± 0,3	2,8 ± 0,4

Tabelle A36: Longitudinale Relaxationszeiten (T_1 -Zeit) der anomeren Positionen in den Monomereinheiten der (Arabino-)Xylooligosaccharide ((A)XOS). Die T_1 -Zeiten wurden mittels dem *Inversion-Recovery*-Experiment bestimmt. Die Bezeichnungen der Monomereinheiten entsprechen denen in Abb. 22. Die Nomenklatur der (A)XOS erfolgt nach den gängigen Richtlinien (Fauré *et al.*, 2009).

(A)XOS	α -Xylp _r	β -Xylp _r	β -Xylp _t	β -Xylp _i	β -Xylp _{ii}	β -Xylp _{iii}
X ₂	2,101	1,228	0,691	-	-	-
X ₃	2,167	1,366	0,722	n. b.	-	-
X ₄	2,419	1,43	n. b.	n. b.	n. b.	-
X ₅	2,152	1,446	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
X ₆	2,726	1,49	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
A ³ X	2,965	1,367	0,946	-	-	-
A ² XX	2,484	1,373	0,726	0,754	-	-
A ²⁺³ XX	2,327	-	-	0,834	-	-
XA ³ XX	2,866	1,228	0,976	0,924	0,899	-
XXA ³ X	2,552	1,358	-	0,804	-	-
XA ³ X	2,032	1,336	0,691	0,706	-	-
XA ²⁺³ XX	1,986	1,398	0,746	0,778	0,723	-
A ³ A ³ X	2,497	1,415	0,762	0,795	-	-
XA ³ A ³ X	2,498	1,358	0,738	-	-	-
A ³ A ²⁺³ XX	2,723	1,429	n. b.	n. b.	0,913	-
XA ³ A ²⁺³ XX	2,933	1,475	0,976	-	0,978	-
A ²⁺³ A ²⁺³ XX	2,935	1,38	0,914	0,923	0,903	-
A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	2,574	n. b.	-	0,973	0,957	0,975

(A)XOS	α -Araf _{O3(t)}	α -Araf _{O3(I/II/III)}	α -Araf _{O2(t)}	α -Araf _{O2(I/II)}
X ₂	-	-	-	-
X ₃	-	-	-	-
X ₄	-	-	-	-
X ₅	-	-	-	-
X ₆	-	-	-	-
A ³ X	1,463	-	-	-
A ² XX	-	-	-	-
A ²⁺³ XX	1,286	-	-	-
XA ³ XX	-	1,418	-	-
XXA ³ X	-	1,477	-	-
XA ³ X	-	1,358	-	-
XA ²⁺³ XX	-	1,130	-	1,085
A ³ A ³ X	1,317	1,380	-	-
XA ³ A ³ X	-	1,44	-	-
A ³ A ²⁺³ XX	1,484	1,396	-	1,277
XA ³ A ²⁺³ XX	-	1,49	-	1,355
A ²⁺³ A ²⁺³ XX	1,325	1,418	-	1,323
A ²⁺³ XA ²⁺³ XX	1,46	1,463	-	1,333

Tabelle A37: Relative Responsefaktoren der HSQC-Markersignale verschiedener Strukturelemente von Xylo- und Arabinoxylooligosacchariden. Xylp, Xylopyranose; r, reduzierend; t, terminal

Markersignal	Strukturelement	Relativer Responsefaktor
1	r-Xylp ($\alpha+\beta$)	1,166
2	t-Xylp	0,997
3	1,4-Xylp	0,990
4	1,2-/1,2,4-Xylp	2,079
5	1,3-Xylp	1,828
6	1,3,4-Xylp	1,069
7	1,2,3-Xylp	0,898
8	1,2,3,4-Xylp	1,043

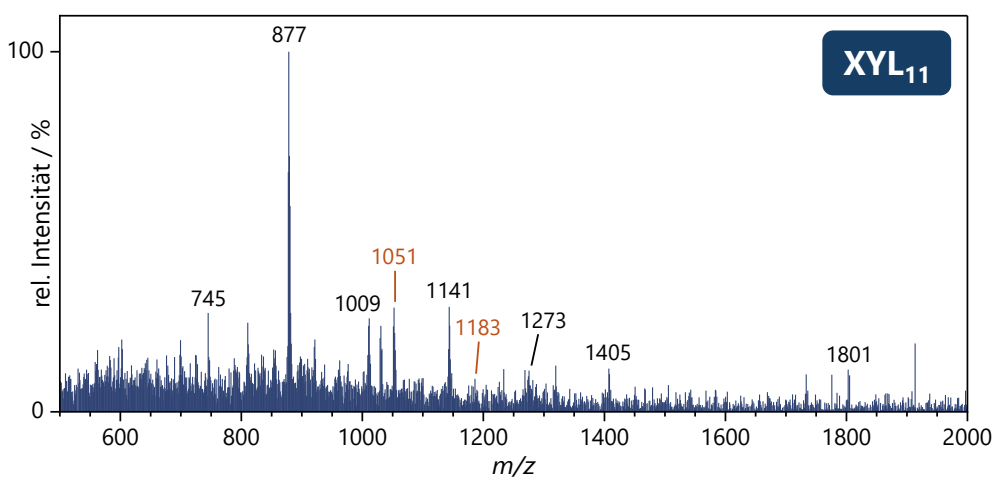
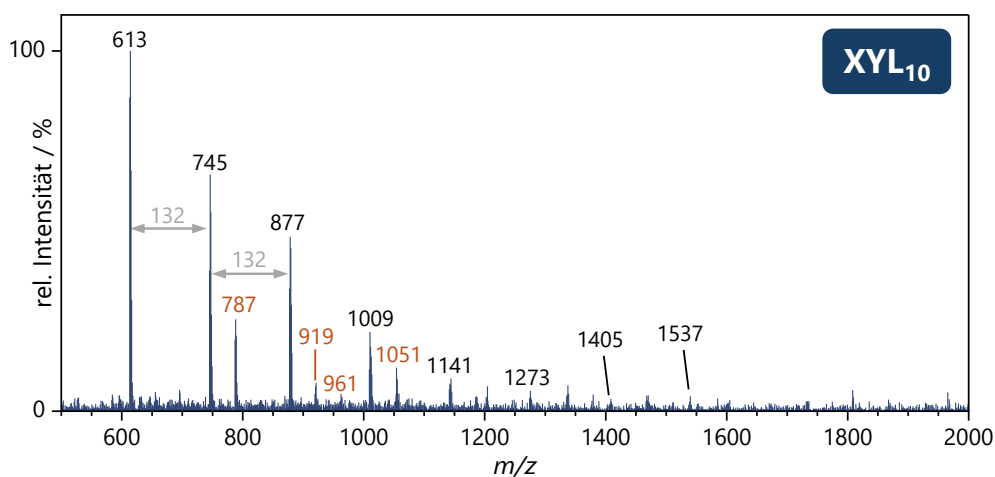


Abbildung A34: ESI(+)-Massenspektren der durch eine semipräparative Trennung auf einer Phenyl-Hexyl-Säule gewonnenen ferulasäurehaltigen (Arabino-)Xylooligosaccharide (FAXOS) aus dem enzymatischen Hydrolysat der unlöslichen Weizenballaststoffe mit den eingesetzten *endo*- β -1,4-Xylanasen der GH-Familien 10 (XYL₁₀) und 11 (XYL₁₁). Die Spektren wurden durch Direktinjektion in ein Ionenfallen-Massenspektrometer erhalten. Die Spektren zeigen die typischen Natriumaddukte pentosebasierter, ferulasäurehaltiger Oligosaccharide mit einem Massenunterschied von 132 Da (vgl. Tabelle 4 in Kapitel 4.1.5). Die Natriumaddukte der FAXOS, die eine oder zwei zusätzliche Acetylgruppen enthalten, sind rot markiert.

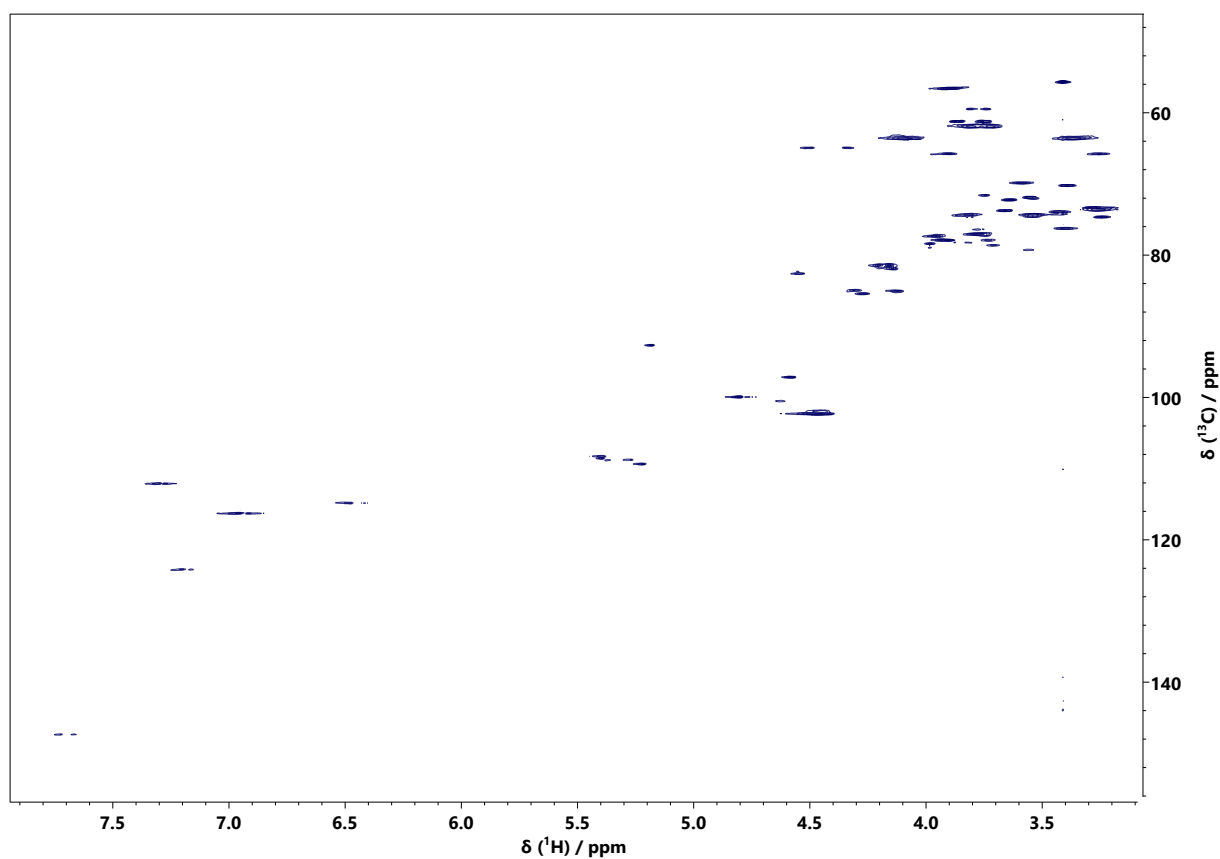


Abbildung A35: HSQC-Spektrum der aus unlöslichen Weizenballaststoffen durch enzymatische Hydrolyse mit der GH11-Xylanase (XYL₁₁) freigesetzten ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosaccharide. Das Spektrum wurde in D₂O mit einem 500 MHz-Spektrometer aufgenommen und gegen die chemische Verschiebung des Acetonsignals ($\delta_{H/C} = 2,22/30,89$ ppm) kalibriert.

10 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Sitter, L. & Bunzel, M. (2026). 2D-NMR characterization of higher substituted oligosaccharides isolated from enzymatic wheat flour arabinoxylan hydrolysates. *Frontiers in Plant Science*, 17, 1784230. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1784230>

Sitter, L. & Bunzel, M. (2026). Advanced structural profiling of arabinoxylans from cereal grains by high performance anion exchange chromatography with parallel pulsed amperometric and mass spectrometric detection. *Carbohydrate Research*, 569, 110074. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2026.110074>

Vorträge auf Fachtagungen

Sitter, L. & Bunzel, M. (2025). Erweiterte HPAEC-PAD/MS-Profilierungsmethode zur Strukturcharakterisierung von Arabinoxylanen in Getreide. *Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Freiburg, Deutschland.

Sitter, L. & Bunzel, M. (2025). Advanced HPAEC-PAD/MS profiling method for structural characterization of cereal arabinoxylans. *21st International Conference on Polysaccharides and Glycoscience*, Prag, Tschechien.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

Sitter, L., Braun, J. & Bunzel, M. (2023). 2D-NMR spectroscopic screening of oligosaccharides of cereal grain arabinoxylans. *Cereals & Grains 23*, Hyatt Regency Schaumburg, Illinois, USA.

Sitter, L. & Bunzel, M. (2024). Ferulasäurehaltige Arabinoxylane aus Roggen und Mais: Isolierung und Charakterisierung ein-, zwei- und dreifach substituierter Struktureinheiten. *52. Deutsche Lebensmittelchemietage*, Freising, Deutschland.

Sitter, L. & Bunzel, M. (2024). Isolierung und Charakterisierung von ferulasäurehaltigen Arabinoxyloligosacchariden aus Roggen und Mais. *135. VDLUFA-Kongress*, Karlsruhe, Deutschland.

Sitter, L. & Bunzel, M. (2025). 2D-NMR-Profilierungsmethode zur Strukturcharakterisierung ferulasäurehaltiger Arabinoxyloligosaccharide in ausgewählten Getreidearten. *53. Deutsche Lebensmittelchemietage*, Halle (Saale), Deutschland.