
Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
- Abteilung Lebensmittelchemie –
der Universität Hamburg

vorgelegt von

MIRKO BUNZEL
aus Göttingen

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis März 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2001

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart möchte ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. John Ralph für die hervorragende Zusammenarbeit, seine freundschaftliche Unterstützung und zahlreiche wertvolle Diskussionen aussprechen. John und seiner Frau Sally möchte ich des weiteren für ihre einmalige Gastfreundschaft danken. Thanks John, thanks Sally!

Außerdem gilt mein Dank Dr. Jane Marita, Dr. Ronald Hatfield und den Mitarbeitern des US Dairy Forage Research Center, Madison (USA) für ihre freundliche Unterstützung.

Herzlicher Dank gebührt Frau Dr. Anja Renger, Frau Ella Allerdings, Herrn Michael Nüß und Herrn Lars Großterlinden für die gute Zusammenarbeit sowie Frau Nida Serttas (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) für ihre große Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. V. Sinwell (Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg) danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und seine Bereitschaft, mir die Details der NMR-Spektroskopie näherzubringen.

Bei den Mitgliedern des Arbeitskreises Steinhart bedanke ich mich für das gute und angenehme Arbeitsklima. In besonderer Weise möchte ich Frau Gabi Schmidt, Frau Angelika Lahrssen und Frau Ella Allerdings für die Durchsicht des Skripts danken.

Bei der H. Wilhelm Schaumann-Stiftung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Auslandsaufenthalte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein durfte.

Die vorliegende Arbeit wurde mit der finanziellen Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Meinen Eltern

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen:

A	Arabinose (in Abbildungen)
AACC	Association of American Cereal Chemists
Ac	Acetyl-
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ara	Arabinose
BS	Ballaststoffe
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
¹³ C-BB	¹³ C-NMR-Spektroskopie mit ¹ H-Breitband-Entkopplung
4- <i>O</i> -β-CFE	4- <i>O</i> -β-Coniferylalkohol-Ferulasäureether
(C,H)-COSY	zweidimensional heteronuklear (C,H)-korrelierte NMR-Spektroskopie (Correlated Spectroscopy)
CoA	Coenzym A
d	Dublett
DAD	(Photo)Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFS	Dehydrodiferulasäure
4- <i>O</i> -5'-DFS	4- <i>O</i> -5'-Dehydrodiferulasäure
5-5'-DFS	5-5'-Dehydrodiferulasäure
5-5'-Me-DFS	monomethoxylierte 5-5'-Dehydrodiferulasäure
8-5'-DFS	Summe 8-5'-gekoppelter Dehydrodiferulasäuren
8-5'-DFS _c	8-5'-Dehydrodiferulasäure, benzofurane Form (=cyclic)
8-5'-DFS _{dc}	8-5'-Dehydrodiferulasäure, decarboxylierte Form
8-5'-DFS _{nc}	8-5'-Dehydrodiferulasäure, offene Form (=non cyclic)
8-8'-DFS	Summe 8-8'-gekoppelter Dehydrodiferulasäuren
8-8'-DFS _c	8-8'-Dehydrodiferulasäure, aryltetraline Form (=cyclic)
8-8'-DFS _{nc}	8-8'-Dehydrodiferulasäure, offene Form (=non cyclic)
8- <i>O</i> -4'-DFS	8- <i>O</i> -4'-Dehydrodiferulasäure
8-8'-7- <i>O</i> -7'-DFS	8-8'-7- <i>O</i> -7'-Dehydrodiferulasäure
8-8'-DSS _c	8-8'-Dehydrodisinapinsäure, cyclische Form (=cyclic)
8-8'-DSS _{nc}	8-8'-Dehydrodisinapinsäure, aryltetraline Form (=non cyclic)
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>f</i>	Furanose
F	Ferulasäure (in Abbildungen)
FA	5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)-L-arabinofuranose
FAX	<i>O</i> -β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-L-arabinofuranose]
FAXX	<i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl]-(1→3)- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose
FAXXX	<i>O</i> -β-D-Xylopyranosyl-(1→4)- <i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl]-(1→3)- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose
FIA	Fließinjektionsanalyse

FID	F lamm e nionisations d etektor
FID ^[NMR]	F ree I nduction D ecay
FS	F erulasäure
FS-SA	F erulasäure-Sinapinsäure (sinapic acid)-Dimer
Fuc	F ucose
G	G uaiacyl-Einheit
Gal	G alaktose
GBS	G esamtballaststoffe
GC	G aschromatographie
Glc	G lucose
GPC	G elpermeationschromatographie
h	Stunde (h our)
H	<i>p</i> - H ydroxyphenyl-Einheit
4-HBS	4- H ydroxybenzoesäure
(H,H)-COSY	zweidimensional homonuklear (H,H)-korrelierte NMR-Spektroskopie (C orrelated Spectroscopy)
HMBC	H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation
HMQC	H eteronuclear M ultiple Q uantum C oherence
4-HPES	4- H ydroxyphenylessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, H igh P erformance L iquid C hromatography
4-HPPS	4- H ydroxyphenylpropionsäure
Hz	H ertz
ID	i nnere r D urchmesser
IS	i nterne r S tandard
<i>iso</i> -MEL	i so- M onoepoxylignanole (8- β -gekoppeltes Coniferylalkohol-Ferulasäure-Kreuzprodukte mit Pinoresinolstruktur)
K _{av}	LAURENT und KILLANDER K onstante (av =available)
KF	K orrekturfaktor (Responsefaktor)
L	L ignineinheit
LBS	lösliche B allaststoffe
LC-MS	Flüssigchromatographie (L iquid C hromatography)- M assenspektrometer-Kopplung
LMBG	L ebensmittel- und B edarfsgegenständeg e setz
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Man	M annose
MeCN	Acetonitril
MEL	M onoepoxylignanole (8- β -gekoppeltes Coniferylalkohol-Ferulasäure-Kreuzprodukte mit Pinoresinolstruktur)
MeOH	Methanol
min	Minute (min ute)
MS	M assenspektrometrie
na	n icht a uswertbar
nk	n icht k orrigiert
nb	n icht b estimmbar
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie, N uclear M agnetic R esonance
nn	n icht n achweisbar

oCS	<i>ortho</i> -Cumarsäure
<i>p</i>	P yranose
PCS	P henolcarbonsäure
pCS	<i>para</i> -Cumarsäure
Rha	R hamnose
RI	Brechungsindex (R efraction I ndex)
RP	R eversed- P hase
RRT	relative Retentionszeit (R elative R etention T ime)
RT	R aumtemperatur
RT ⁺	Retentionszeit (R etention T ime)
s	S ingulett
S	S yringyl-Einheit
SA	Sinapinsäure, S inapic A cid
SCFA	kurzkettige Fettsäuren, S hort- C hain F atty A cids
SD	Standardabweichung (S tandard D eviation)
sec	Sekunde (s econd)
SIM	S electe I on M onitoring
SyS	S yringasäure
TFA	Trifluoressigsäure, T rifluoroacetic A cid
8-β-THF-CF	8-β -gekoppeltes Coniferylalkohol-Ferulasäure-Kreuzprodukt mit T etrahydrofuranstruktur
TIC	T otal- I onenstrom C hromatogramm
TMS	t rimethylsilyliert
TOCSY	T otal C orrelation S pectroscopy
tr	Spuren (t races)
U.S. DFRC	U.S. D airy F orage R esearch C enter, Madison, USA
UBS	u nlösliche B allaststoffe
V ₀	äußeres Volumen
V _e	Elutionsvolumen
VS	V anillinsäure
V _t	Gesamtvolumen
X	X ylose (in Abbildungen)
XFAXX	{[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)][<i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→2)]- <i>O</i> -α-L-arabinofuranosyl-(1→3)}- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose
Xyl	X ylose

Symbole:

<i>t</i> ₁	variable Zeit bei 2D-NMR-Experimenten
<i>t</i> ₂	Detektionszeit (NMR)
τ	Impulsintervall (NMR)
Θ	Impulswinkel (NMR)
ⁿ <i>J</i>	Kopplungskonstante über <i>n</i> Bindungen
<i>ν</i>	Frequenz
δ	chemische Verschiebung

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ALLGEMEINER TEIL	1
1.1	DEFINITION UND BEDEUTUNG VON BALLASTSTOFFEN	1
1.2	PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON BALLASTSTOFFEN	2
1.3	BALLASTSTOFFKOMPONENTEN UND DEREN STRUKTUREN	3
1.3.1	ZUSAMMENSETZUNG UND STRUKTUREN VON PFLANZENZELLWÄNDEN	3
1.3.1.1	Zellwandpolysaccharide	4
1.3.1.2	Lignin	6
1.3.1.3	Monomere Phenolcarbonsäuren	7
1.3.1.4	Dimere Phenolcarbonsäuren als Polysaccharid-Crosslinks	9
1.3.1.5	Ferulasäure und Ferulasäuredimere als Polysaccharid-Lignin-Crosslinks	13
1.4	PROBLEMSTELLUNG	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	UNTERSUCHUNGSMATERIAL	16
2.2	METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG MONOMERER UND DIMERER PHENOLCARBONSÄUREN SOWIE VON FERULASÄURE-MONOLIGNOL-KREUZPRODUKTEN IN LÖSLICHEN UND UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	16
2.2.1	BESTIMMUNG UND ISOLIERUNG VON LÖSLICHEN UND UNLÖSLICHEN GETREIDEBALLASTSTOFFEN	16
2.2.2	ERMITTLUNG VON KORREKTURFAKTOREN ZUR BESTIMMUNG KORRIGIERTER BALLASTSTOFFGEHALTE	17
2.2.3	BESTIMMUNG DER KOHLENHYDRATZUSAMMENSETZUNG DER BALLASTSTOFFE	18
2.2.3.1	Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung	19
2.2.3.2	Gaschromatographische Trennung und Bestimmung der Alditolacetate	19
2.2.4	SYNTHESE PHENOLISCHER STANDARDSUBSTANZEN	20
2.2.4.1	Isomerisierung von <i>trans</i> -Ferulasäure und <i>trans-p</i> -Cumarsäure zu den entsprechenden <i>cis</i> -Isomeren	20
2.2.4.2	Synthese radikalisch gekoppelter Dehydrodiferulasäuren	20
2.2.4.3	Isomerisierung radikalisch gekoppelter Dehydrodiferulasäuren	22
2.2.4.4	Synthese radikalisch gekoppelter Dehydrodisinapinsäuren	22
2.2.4.5	Synthese 4- <i>O</i> - β - und 8- β -gekoppelter Kreuzprodukte	22
2.2.4.6	Synthese des internen Standards (monomethoxylierte 5-5'-Dehydrodiferulasäure)	23
2.2.5	IDENTIFIZIERUNG ESTERBUNDENER MONOMERER UND DIMERER PHENOLCARBONSÄUREN SOWIE ESTERBUNDENER KREUZPRODUKTE	23
2.2.5.1	Hydrolyse und Extraktion	23
2.2.5.2	Gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Identifizierung der Phenolcarbonsäuren und der Kreuzprodukte	24
2.2.6	QUANTIFIZIERUNG ESTERBUNDENER MONOMERER UND DIMERER PHENOLCARBONSÄUREN	25
2.3	METHODEN ZUR ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARID-VERBINDUNGEN AUS UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	26
2.3.1	ISOLIERUNG VON UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	26
2.3.2	HYDROLYSE DER BALLASTSTOFFE	26
2.3.2.1	Enzymatische Hydrolyse von Ballaststoffen	27

2.3.2.2	Saure Hydrolyse von Ballaststoffen	27
2.3.2.3	Bestimmung der Anteile freigesetzter monomerer Phenolcarbonsäuren	27
2.3.3	REINIGUNG DER HYDROLYSATE	28
2.3.4	GELCHROMATOGRAPHISCHE FRAKTIONIERUNG DER HYDROLYSATE	28
2.3.5	SCREENING-METHODEN ZUR PRÜFUNG DER GELCHROMATOGRAPHISCHEN FRAKTIONEN AUF PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARID-VERBINDUNGEN	29
2.3.5.1	Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Dünnschichtchromatographie	29
2.3.5.2	Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und UV-Detektion unter Verwendung eines Dioden-Array-Detektors	29
2.3.5.3	Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und massenspektrometrischer Detektion	30
2.3.6	FRAKTIONIERUNG BZW. REINIGUNG DER GPC-FRAKTIONEN MITTELS (SEMI)PRÄPARATIVER HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	30
2.3.7	IDENTIFIZIERUNG (UND QUANTIFIZIERUNG) MONOMERER PHENOLISCHER SÄUREN AUS LÖSLICHEN PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARIDEN MITTELS HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	31
2.3.8	IDENTIFIZIERUNG (UND QUANTIFIZIERUNG) VON MONOSACCHARIDEN AUS PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARIDEN MITTELS GASCHROMATOGRAPHIE	33
2.3.9	BESTIMMUNG DER RELATIVEN MOLEKÜLMASSE MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE	33
2.3.10	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN MITTELS KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE	34
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	37
3.1	IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG MONOMERER UND DIMERER PHENOLCARBONSÄUREN SOWIE VON FERULASÄURE-MONOLIGNOL-KREUZPRODUKTEN IN LÖSLICHEN UND UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	37
3.1.1	BALLASTSTOFFGEHALTE	37
3.1.2	KOHLENHYDRATZUSAMMENSETZUNG DER BALLASTSTOFFE	37
3.1.3	IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG MONOMERER PHENOLCARBONSÄUREN	38
3.1.4	IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON 8-5', 8-8', 5-5', 8-O-4'- UND 4-O-5'-GEKOPPELTEN <i>TRANS</i> -DEHYDRODIFERULASÄUREN	40
3.1.5	VERHÄLTNISSE MONOMERER FERULASÄURE ZU DEHYDRODIFERULASÄUREN	45
3.1.6	GEHALTE AN MONOMERER UND DIMERER FERULASÄURE IN BEZUG AUF DEN ARABINOXYLANGEHALT DER BALLASTSTOFFE	46
3.1.7	VERGLEICH DER DIFERULASÄUREMUSTER VON LÖSLICHEN UND UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	48
3.1.8	IDENTIFIZIERUNG VON „ <i>cis</i> “-DEHYDRODIFERULASÄUREN	50
3.1.9	VORLÄUFIGE IDENTIFIZIERUNG UND SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG VON 8-8'-7-O-7'-GEKOPPELTER DEHYDRODIFERULASÄURE	51
3.1.10	IDENTIFIZIERUNG UND SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG 8-8'-GEKOPPELTER DEHYDRODISINAPINSÄUREN	53
3.1.11	GEMISCHTE FERULASÄURE-SINAPINSÄURE- UND FERULASÄURE- <i>PARA</i> -CUMARSÄURE-DIMERE	56
3.1.12	IDENTIFIZIERUNG VON FERULASÄURE-MONOLIGNOL-KREUZPRODUKTEN AUS UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	57
3.2	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARID-VERBINDUNGEN AUS UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	61
3.2.1	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARID-VERBINDUNGEN AUS UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN AUS ROGGENKARYOPSEN	61

3.2.1.1	Hydrolyse der unlöslichen Roggenballaststoffe und Reinigung des Hydrolysats	61
3.2.1.2	Gelpermeationschromatographische Fraktionierung der gereinigten Hydrolysate	62
3.2.1.3	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Tetrasaccharids aus der Fraktion E9	63
3.2.1.4	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Trisaccharids aus der Fraktion E11	72
3.2.1.5	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Disaccharids aus der Fraktion S2	74
3.2.1.6	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Monosaccharids aus der Fraktion S4	76
3.2.1.7	Rückschlüsse aus den identifizierten Verbindungen auf die Arabinoxylanstruktur von Roggen	78
3.2.2	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARID- VERBINDUNGEN AUS UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN AUS WILDREISKARYOPSEN	79
3.2.2.1	Hydrolyse der unlöslichen Wildreisballaststoffe und Reinigung des Hydrolysats	79
3.2.2.2	Gelpermeationschromatographische Fraktionierung der gereinigten Hydrolysate	80
3.2.2.3	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Tetrasaccharids aus der Fraktion E5	81
3.2.2.4	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Tetrasaccharids aus der Fraktion E6	82
3.2.2.5	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Trisaccharids aus der Fraktion E7	84
3.2.2.6	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Disaccharids aus der Fraktion S8	85
3.2.2.7	Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Monosaccharids aus der Fraktion S9	86
3.2.2.8	Rückschlüsse aus den identifizierten Verbindungen auf die Arabinoxylanstruktur von Wildreis	86

4 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY 92

5 ANHANG 96

5.1	GERÄTE UND MESSPARAMETER	96
5.1.1	GASCHROMATOGRAPHIE	96
5.1.1.1	Bestimmung der Alditolacetate	96
5.1.1.2	Identifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren sowie von Ferulasäure- Monolignol-Kreuzprodukten	96
5.1.1.3	Quantifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren	97
5.1.2	GELPERMEATIONSCHROMATOGRAPHIE	98
5.1.3	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	98
5.1.3.1	Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening (HPLC-UVD)	98
5.1.3.2	Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening (HPLC-MSD)	99
5.1.3.3	Fraktionierung bzw. Reinigung der GPC-Fractionen ((semi)präparative HPLC)	99
5.1.3.4	Identifizierung und Quantifizierung monomerer phenolischer Säuren	100
5.1.4	MASSENSPEKTROMETRIE (FLIEBINJEKTIONSANALYSE)	101
5.1.5	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE	101
5.1.6	SONSTIGE GERÄTE	101
5.2	VERWENDETE CHEMIKALIEN	102
5.3	ARBEITSVORSCHRIFTEN	104
5.3.1	ARBEITSVORSCHRIFTEN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG MONOMERER UND DIMERER PHENOLCARBONSÄUREN SOWIE FERULASÄURE-MONOLIGNOL-KREUZPRODUKTEN IN LÖSLICHEN UND UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	104
5.3.1.1	Isolierung unlöslicher und löslicher Getreideballaststoffe	104
5.3.1.2	Bestimmung der Restprotein- und Aschegehalte von unlöslichen und löslichen Ballaststoffen	105
5.3.1.3	Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung der Ballaststoffe – Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung	106
5.3.1.4	Isomerisierung von <i>trans</i> -Ferulasäure und <i>trans-p</i> -Cumarsäure zu den entsprechenden <i>cis</i> -Isomeren	106

5.3.1.5	Synthese von 5-5'-Dehydrodiferulasäure	107
5.3.1.6	Synthese von 8-5'-Dehydrodiferulasäuren	107
5.3.1.7	Alkalische Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung estergebundener Substanzen in löslichen und unlöslichen Ballaststoffen	108
5.3.2	ARBEITSVORSCHRIFTEN ZUR ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON PHENOLCARBONSÄURE-OLIGOSACCHARID-VERBINDUNGEN AUS UNLÖSLICHEN BALLASTSTOFFEN	108
5.3.2.1	Enzymatische Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe	108
5.3.2.2	Saure Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe	109
5.3.2.3	Reinigung der Hydrolysate an Amberlite XAD-2	109
5.3.2.4	Fraktionierung der Hydrolysate mittels Gelpermeationschromatographie	109
5.3.2.5	Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Dünnschichtchromatographie	110
5.3.2.6	Fraktionierung bzw. Reinigung der GPC-Fractionen mittels semi(präparativer) Hochleistungsflüssigchromatographie	110
5.3.2.7	Identifizierung (und Quantifizierung) monomerer phenolischer Säuren aus löslichen Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie	110
5.3.2.8	Identifizierung (und Quantifizierung) von Monosacchariden aus Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Gaschromatographie	111
5.4	TABELLEN	112
5.4.1	FAKTOREN UND VERFAHRENSKENNDATEN FÜR DIE GASCHROMATOGRAPHISCHE KOHLENHYDRATBESTIMMUNG	112
5.4.2	FAKTOREN FÜR DIE GASCHROMATOGRAPHISCHE IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON MONOMEREN UND DIMEREN PHENOLCARBONSÄUREN SOWIE VON KREUZPRODUKTEN	112
5.4.3	KALIBRATIONSDATEN DER SEPHADEX LH-20 GELPERMEATIONSCHROMATOGRAPHIE-SÄULE	114
5.4.4	FAKTOREN UND VERFAHRENSKENNDATEN FÜR DIE FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG MONOMERER PHENOLCARBONSÄUREN	114
5.4.5	BALLASTSTOFFGEHALTE DER UNTERSUCHTEN GETREIDE	115
5.4.6	KOHLENHYDRATZUSAMMENSETZUNG DER BALLASTSTOFFE	116
5.4.7	GEHALTE AN MONOMEREN PHENOLCARBONSÄUREN	117
5.4.8	DEHYDRODIFERULASÄUREGEHALTE IN UNLÖSLICHEN UND LÖSLICHEN GETREIDEBALLASTSTOFFEN	118
5.4.9	FAKTOREN ZUR ABSCHÄTZUNG DES DIMERISIERUNGSGRADES VON FERULASÄURE	119
5.4.10	DIFERULASÄUREMUSTER IN LÖSLICHEN UND UNLÖSLICHEN GETREIDEBALLASTSTOFFEN	119
5.4.11	RELATIVE RETENTIONSZEITEN UND GEHALTE VON 8-8'-7-O-7'-DEHYDRODIFERULASÄURE IN UNLÖSLICHEN UND LÖSLICHEN GETREIDEBALLASTSTOFFEN	120
5.4.12	DEHYDRODISINAPINSÄUREGEHALTE SOWIE ABSCHÄTZUNG DER DIMERISIERUNG VON SINAPINSÄURE IN UNLÖSLICHEN UND LÖSLICHEN GETREIDEBALLASTSTOFFEN	121
5.4.13	¹ H- UND ¹³ C-NMR DATEN FÜR AUS WILDREIS ISOLIERTE FS-OLIGOSACCHARIDE	122
5.5	CHROMATOGRAMME UND SPEKTREN	124
5.5.1	CHROMATOGRAMME	124
5.5.2	SPEKTREN	127
6	LITERATUR	138

1 Einleitung und allgemeiner Teil

1.1 Definition und Bedeutung von Ballaststoffen

Viele Forschungseinrichtungen haben sich zum Ziel gesetzt, durch Verbesserung der Lebensmittel oder gezielte Anreicherung der Nahrung mit bestimmten Lebensmittelinhaltsstoffen Krankheiten bereits in ihrer Entstehung zu verhindern. Nicht selten werden bereits große Forschungsvorhaben bezüglich bestimmter Lebensmittelinhaltsstoffe durchgeführt, deren physiologische Wirkungen noch weitgehend unbekannt sind. Ballaststoffe (BS), über deren physiologische Wirkungen bereits viele Kenntnisse gesammelt wurden und deren positiver Einfluß auf die Gesundheit grundsätzlich als gesichert gelten darf, scheinen hingegen in der Forschung hinsichtlich der Strukturaufklärung wieder in Vergessenheit zu geraten.

Der Begriff BS (englisch dietary fiber) fand vor ca. 50 Jahren zum ersten Mal Erwähnung. HIPSLEY (1953) benutzte den Begriff „dietary fiber“ als Kurzbezeichnung, um Pflanzenzellwände in der menschlichen Nahrung zu beschreiben, von denen er annahm, sie würden vor Schwangerschaftstoxikosen schützen. Seitdem herrschte über den Begriff der BS lange Zeit Uneinigkeit. Zwischen 1972 und 1976 trieben Trowell, Burkitt, Walker und Painter die Definition der BS voran, indem sie den Begriff in bezug zu gesundheitsbezogenen Hypothesen stellten (TROWELL, 1972a, TROWELL, 1972b, BURKITT et al., 1972) und eine physiologisch-botanische Beschreibung des Begriffs BS prägten. So beschrieben sie BS als „Überreste pflanzlicher Zellwände, die gegenüber der menschlichen Verdauung resistent sind“ (TROWELL, 1974). 1976 wurde die Ballaststoffdefinition erweitert (TROWELL et al., 1976), um alle verdauungsresistenten Polysaccharide mit in die Definition einzubeziehen. Durch die erweiterte Definition der BS als „Polysaccharide und Lignin, die durch endogene Enzyme im menschlichen Magen-Darm-Trakt nicht abgebaut werden“ wurden erstmals pflanzliche Speicherpolysaccharide und modifizierte Cellulosen mit in den Ballaststoffbegriff einbezogen. 1992 setzte sich in Fachkreisen die Meinung durch, unverdaubare Oligosaccharide mit in die Definition aufzunehmen. So hat sich bis heute folgende Definition für BS entwickelt (deVRIES et al., 1999):

Ballaststoffe bestehen aus den Überresten essbarer Pflanzenzellen, Polysacchariden, Lignin und assoziierten Substanzen, die gegenüber der Verdauung durch körpereigene Enzyme des Menschen resistent sind (und in den Dickdarm gelangen).

Auch wenn sich scheinbar diese physiologisch-chemisch geprägte Definition der BS durchgesetzt hat, so wird die Diskussion um die Definition der BS noch nicht beendet sein. Dies zeigt sich u.a. auf der Internetseite der Association of American Cereal Chemists (AACC), wo Fachleute aus der Wissenschaft, der Überwachung und der Industrie aufgefordert werden, ihren Standpunkt bezüglich der oben dargestellten Definition darzulegen.

BS können in lösliche Ballaststoffe (LBS), unlösliche Ballaststoffe (UBS) und Gesamtballaststoffe (GBS) unterteilt werden. Zur Bestimmung der GBS existierte eine Methode von der Association of Official Analytical Chemists (AOAC), die ebenfalls von der AACC übernommen wurde (AOAC Official Method 985.29 bzw. AACC Approved Method 32-05). Zur Bestimmung der UBS und LBS mußten derartige Methoden jedoch erst entwickelt bzw. validiert werden, nachdem bekannt wurde,

daß LBS und UBS sich in ihren physiologischen Eigenschaften grundlegend voneinander unterscheiden. Die methodische Unterscheidung zwischen UBS und LBS beruht auf der Löslichkeit der LBS in einer pH kontrollierten Enzymlösung, wie dies auch im menschlichen Verdauungstrakt der Fall ist. Diese Definition ist jedoch trotzdem eher als eine methodische als eine physiologische Definition zu beschreiben, da die Lösung im Labormaßstab viel verdünnter ist und den physiologischen Bedingungen somit nicht exakt entspricht. Dennoch ist diese Unterscheidung bei der Untersuchung der physiologischen Effekte von BS von großem Nutzen.

1.2 Physiologische Eigenschaften von Ballaststoffen

BS sind für die Ernährung des Menschen keine essentiellen, d.h. lebenswichtigen Nährstoffe. Gleichwohl ist es unbestritten, daß sie wichtige Funktionen im Verdauungstrakt ausüben und den Stoffwechsel vielfältig beeinflussen.

Dabei muß man zwischen den direkten und indirekten Einflüssen einer ballaststoffreichen Ernährung unterscheiden. Die Aufnahme ballaststoffreicher Lebensmittel in den Speiseplan führt üblicherweise zu einem reduzierten Energiegehalt der Nahrung bei größerem Nahrungsvolumen. Durch die verringerte Energieaufnahme bei gleichzeitig größerem und lang anhaltendem Sättigungsgefühl wird Fettleibigkeit vorgebeugt (McDOUGALL et al., 1996). Des Weiteren ist eine ballaststoffreiche Kost im allgemeinen arm an Fett, gesättigten Fettsäuren, Cholesterin und tierischem Protein, dafür aber reich an Mineralien, Spurenelementen, Vitaminen und anderen Phytochemikalien mit positiven physiologischen Eigenschaften.

Neben diesen indirekten physiologischen Einflüssen sind in den letzten 20-30 Jahren viele direkte Einflüsse von BS auf verschiedene Krankheitsmuster festgestellt worden.

Die von der chemischen Struktur der Ballaststoffkomponenten abhängigen physikalischen Eigenschaften bestimmen die verschiedenen Charakteristika der BS wie Wasserbindungsvermögen, Viskosität, Bindung organischer Substanzen, Bulkvermögen, mikrobielle Fermentierbarkeit im Dickdarm etc., die zum Verständnis der physiologischen Wirkungen wichtig sind (SCHNEEMAN, 1998).

Regulierung des Blutzuckers und vermindertes Diabetesrisiko: Insbesondere lösliche, viskose BS, z.B. Pektine und β -Glucane, haben positive Wirkungen. Durch die Erhöhung der Viskosität der aufgenommenen Nahrung wird die Magenentleerung verlangsamt und die intestinale Absorption durch die Beeinflussung der Diffusion über die „unstirred water layer“ verzögert. Dadurch werden der postprandiale Blutzucker-Response und langfristig auch die Nüchternwerte gesenkt, was den Insulinbedarf reduziert (SCHREZENMEIR, 1996).

Blutcholesterin senkender Effekt: Viskose, lösliche Ballaststoffkomponenten zeigen einen Blutcholesterin senkenden Effekt. Ballaststoffquellen mit einem hohen Anteil an unlöslichen BS zeigen nur einen geringen Effekt auf den Serumcholesterinspiegel. Folgende Mechanismen werden u.a. diskutiert (PLAAMI, 1997): a) Durch Bindung von Gallensäuren an Ballaststoffkomponenten und Ausscheidung mit dem Stuhl wird der Gallensäurenpool verringert, und es wird Cholesterin verwendet, um den Gallensäurenpool wieder aufzufrischen. b) Durch die Fermentation löslicher BS zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, short-chain fatty acids) (s.u.) wird die hepatische Cholesterinsynthese inhibiert.

Fermentation von BS im Kolon: Das Ausmaß der Fermentation von BS durch die Kolonmikroflora ist vor allem von der chemischen Struktur, der Löslichkeit sowie dem Lignifizierungsgrad der BS abhängig (ASP et al., 1993). Primäre Fermentationsprodukte sind Kohlendioxid, Wasserstoff,

Methan und SCFA (Acetat, Propionat und *n*-Butyrat). Während Acetat und Propionat über das Portalblut zur Leber gelangen, wird *n*-Butyrat von der Mucosa oxidiert (SCHNEEMAN, 1998). Durch die Produktion der SCFA kommt es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes, was eine verminderte Umsetzung von primären zu sekundären Gallensäuren zur Folge hat. Außerdem setzt die pH-Wert-Erniedrigung die Löslichkeit der sekundären Gallensäuren herab (RAFTER et al, 1986). Sekundäre Gallensäuren wirken im gelösten Zustand wahrscheinlich kolonkarzinogen. *n*-Butyrat hat des weiteren antineoplastische Eigenschaften. Bei Tumorzellen vermindert *n*-Butyrat das Zellwachstum und induziert Differenzierung und Apoptose („programmierter Zelltod“) (SCHEPPACH, 1996). Schließlich wird durch das Bakterienwachstum im Kolon das Stuhlgewicht erhöht (s.u.).

Stuhlgewicht und Transitzeit: Ballaststoffquellen mit hohen Anteilen an unlöslichen BS, z.B. Weizenkleie, erhöhen das Stuhlgewicht und -volumen hauptsächlich aufgrund ihrer Bulking-Eigenschaften und des Wasserhaltevermögens. Durch die Erhöhung des Stuhlvolumens wird die Darmperistaltik positiv beeinflusst und die gastrointestinale Transitzeit verkürzt. Verstopfungen, Hämorrhoiden und divertikulären Krankheiten wird auf diese Weise vorgebeugt. Des weiteren können Karzinogene und andere schädliche Substanzen an die BS gebunden werden, und aus dem beschleunigten Kolontransit resultiert eine kürzere Kontaktzeit von Karzinogenen mit der Darmwand. Vor allem Lignin und andere hydrophobe Ballaststoffkomponenten sollen hydrophobe Wechselwirkungen mit möglichen Karzinogenen eingehen (RYDEN & ROBERTSON, 1995a, McDOUGALL et al., 1996).

1.3 Ballaststoffkomponenten und deren Strukturen

Gemäß ihrer Definition zählen Zellwandbestandteile, nichtverdaubare Speicherpolysaccharide, nichtstrukturelle, lösliche Polysaccharide, die die Pflanze vor dem Austrocknen schützen, sowie bestimmte Lebensmittelzusätze und Verarbeitungsprodukte zu den BS. Zu den unverdaubaren Speicherpolysacchariden gehören z.B. resistente Stärke und Fruktane, zu den Zellwandbestandteilen Cellulose, Hemicellulosen, Pektine und Lignin. Pflanzenschleime und Pflanzengummis schützen die Pflanze vor dem Austrocknen und sind Bestandteile der BS. Nicht verdaubare Lebensmittelzusätze sind z.B. modifizierte Cellulosen und Algenpolysaccharide. Modifizierte (resistente) Stärke und Maillardprodukte sind Beispiele für Verarbeitungsprodukte als Bestandteile der BS. Unter diesen Ballaststoffkomponenten stellen die Zellwandbestandteile mit Abstand den größten Anteil dar und werden daher im folgenden näher vorgestellt.

1.3.1 Zusammensetzung und Strukturen von Pflanzenzellwänden

Die Entwicklung einer relativ starren, den Protoplasten umgebenden Primärwand war ein wesentlicher Schritt für das Leben von Pflanzen an Land. Einen weiteren wichtigen Entwicklungsschritt für Landpflanzen stellte die Lignifizierung und die daraus resultierende Festigkeit der Sekundärwand dar (WILSON, 1993).

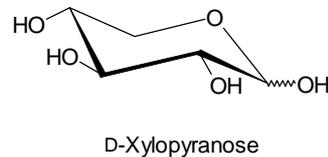
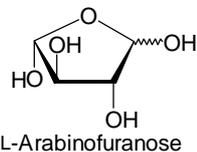
Die Mittellamelle bildet die Grenze zwischen benachbarten Zellen und geht bei der Zellteilung aus der Zellplatte hervor. Die Mittellamelle besteht fast vollständig aus Pektinen. An die Mittellamelle schließt sich die Primärwand an. Die Matrix der Primärwand setzt sich aus Pektinen und Hemicellulosen zusammen, in die nicht ausgerichtete Cellulosemikrofibrillen eingelagert sind. Des weiteren enthalten die Primärwände Strukturproteine, z.B. Extensin, ein hydroxyprolinreiches Glycoprotein. Je nach Funktion der Zellen (z.B. Wassertransport, Festigung) können diese nach Beendigung des Zellenwachstums eine Sekundärwand bilden. Normalerweise besteht die Sekundärwand aus drei

mikroskopisch erkennbaren Schichten, die von außen nach innen mit S_1 , S_2 und S_3 bezeichnet werden. Die Sekundärwand besitzt im Gegensatz zur Primärwand einen stark erhöhten Anteil an Cellulosemikrofibrillen, die parallel angeordnet sind. Die Matrix besteht aus Hemicellulosen. Sekundärwände können verholzen, wobei die Einlagerung des Lignins von der Mittellamelle aus beginnt. Die chemischen Strukturen der Zellwände unterschiedlicher Pflanzen differieren. Vor allem die Zellwände von Vertretern der monokotylen Gräserfamilie *Gramineae* (neuere Bezeichnung *Poaceae*) unterscheiden sich stark gegenüber den Zellwänden dikotyler Pflanzen, aber auch gegenüber denen anderer monokotyler Pflanzen. Des weiteren muß bei einer generellen Betrachtung der Zellwandstrukturen berücksichtigt werden, daß diese sich im Laufe der Entwicklung verändern.

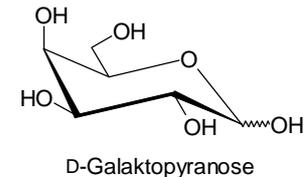
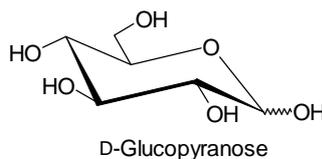
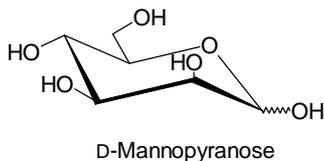
1.3.1.1 Zellwandpolysaccharide

Mehr als 100 unterschiedliche Monosaccharide werden in der Natur beschrieben. Von diesen kommen jedoch im allgemeinen nur zehn als Monomere der Zellwandpolysaccharide vor: L-Arabinose, D-Xylose, D-Mannose, D-Glucose, D-Galaktose, L-Rhamnose, L-Fucose sowie die Uronsäuren D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure (ÅMAN, 1993) (Abb. 1). Die Polysaccharide bzw. deren Vorstufen mit Ausnahme der Cellulose werden während der Entwicklung der Pflanzenzellwand im Golgi-Apparat synthetisiert. Glucose wird in den Dictyosomen in Protopektin- bzw. Hemicellulosevorstufen umgewandelt und in abgeschnürten Golgi-Vesikeln durch das Cytoplasma zur Peripherie transportiert, wo sie durch das Plasmalemma hindurchgeschleust und in die Zellwand inkorporiert werden. Die Biosynthese der Cellulose hingegen erfolgt am Plasmalemma (CARPITA, 1990).

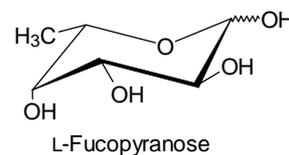
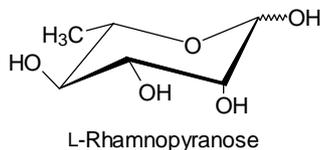
Pentosen:



Hexosen:



6-Desoxyhexosen:



Uronsäuren:

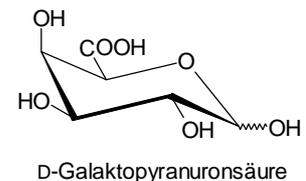
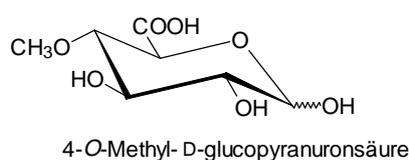
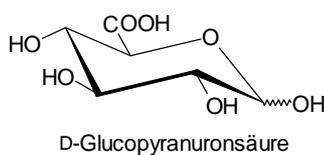


Abbildung 1: Monomereinheiten von Polysacchariden der pflanzlichen Zellwand

Zellwandpolysaccharide dikotyle Pflanzen

Parenchymatische Zellwände bestehen mit bis zu 55 % überwiegend aus Pektinen (Galakturonan, Rhamnogalakturonan I und II) (SELVENDRAN & MacDOUGALL, 1995). Cellulose kommt zu ungefähr 30 % in der Zellwand vor. Unter den Hemicellulosen dominieren die Xyloglucane (ca. 10 %, teilweise bis zu 25 % der Zellwand), lineare β -D-Glucan-Ketten, die in *O*-6-Stellung mit Xylose substituiert sind. Des weiteren enthalten einige Glucose-Einheiten Galaktosyl-(1 \rightarrow 4) β -D-xylose- oder Fucosyl-(1 \rightarrow 2) α -D-galaktosyl-(1 \rightarrow 2) β -D-xylose-Seitenketten in *O*-6-Stellung (CARPITA, 1990). Arabinoxylane sind nur Minorkomponenten unter den Hemicellulosen (bis zu 5 % der Zellwand). Ungefähr 2-5 % der Zellwand bestehen aus Proteinen. In die Sekundärwand werden vor allem Cellulose, saure Xylane, Lignin und Glucomannane eingelagert.

Zellwandpolysaccharide von Gramineen (v.a. Karyopsen)

Das Hauptgewebe der Getreidekörner ist das Endosperm. Dieses liegt dem Embryo seitlich an. Das Endosperm ist von der Aleuronschicht umgeben. Die Fruchtschale (Episperm, Testa) ist fest mit der Samenschale (Endokarp, Epikarp, Epidermis) verwachsen. Die Endospermzellwände unterscheiden sich stark von den parenchymatischen Zellwänden dikotyle Pflanzen. Pektine kommen nur in sehr geringen Mengen vor, Hemicellulosen stellen mit bis zu 90 % die Hauptpolysaccharide dar. Die bei den Dikotylen dominierenden Xyloglucane kommen in Endospermzellwänden zu nur sehr geringen Anteilen vor. Der Celluloseanteil beträgt 10-15 %, kann aber auch bis zu 30 % der Zellwand darstellen.

Die Hemicellulosefraktion aus Endospermzellwänden setzt sich vor allem aus neutralen Arabinoxylanen und mixed-linked β -Glucanen zusammen. Neutrale Arabinoxylane bestehen aus linearen (1 \rightarrow 4)-D-Xylan-Ketten, die in *O*-2-Stellung, *O*-3-Stellung oder in *O*-2 und *O*-3 Stellung mit L-Arabinose-Einheiten substituiert sind (Abb. 2) (THEANDER et al., 1993). Des weiteren können in geringem Maße Arabinoseoligomere, die 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3 oder 1 \rightarrow 5 verknüpft sind, Seitenketten bilden (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). Die Arabinoxylane der verschiedenen Getreide unterscheiden sich erheblich. Unterschiede bestehen vor allem im Arabinose/Xylose-Verhältnis, im Arabinose-Substitutionsmuster sowie in der Molekülgröße (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995).

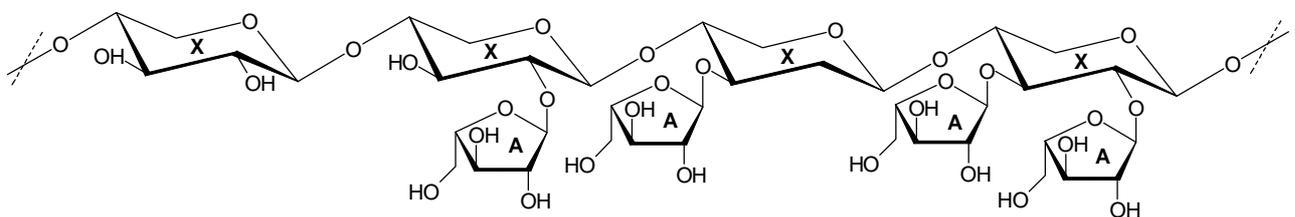


Abbildung 2: Strukturelle Merkmale von Getreidearabinoxylanen

Mixed-linked β -Glucane kommen nach bisherigen Kenntnissen im Pflanzenreich nur in Gräsern vor (CARPITA, 1990). Diese bestehen aus (1 \rightarrow 3) β -D- und (1 \rightarrow 4) β -D-Glucoseeinheiten in einem Verhältnis von ungefähr 1:3. Hauptsächlich bilden die (1 \rightarrow 4) β -D-Glucoseeinheiten Cellotriosyl- und Cellotetraosyleinheiten, die durch (1 \rightarrow 3)-gebundene β -D-Glucoseeinheiten unterbrochen werden. Typische Getreide mit einem sehr hohen mixed-linked β -Glucan-Gehalt sind Gerste und Hafer.

Weizen enthält hingegen nur geringe Mengen an mixed-linked β -Glucanen; hier dominieren die neutralen Arabinoxylane die Hemicellulosefraktion. Roggen enthält sowohl neutrale Arabinoxylane als auch mixed-linked β -Glucane und nimmt somit eine mittlere Stellung zwischen den zuvor erwähnten Getreiden ein.

Reis stellt unter den gewöhnlich verzehrten Getreiden die einzige Ausnahme hinsichtlich der Zellwandbeschaffenheit der Endospermzellwände dar. In ihrer chemischen Struktur zeigen die Reisedospermzellwände viele Parallelen zu den Zellwänden parenchymatischer Gewebe von Dikotylen. So sind z.B. in Reisedospermzellwänden signifikante Mengen an Pektinen und Xyloglucanen vorhanden (THEANDER et al., 1993).

Die Zellwände der äußeren Schichten des Getreidekorns (Aleuronschicht, Epispem, Testa, Endokarp, Epikarp, Epidermis) unterscheiden sich erheblich von den Endospermzellwänden. Anstelle der neutralen Arabinoxylane und mixed-linked β -Glucane stellen die sauren Glucuroarabinoxylane den Hauptanteil unter den Hemicellulosen (SELVENDRAN & MacDOUGALL, 1995). Durch den höheren Anteil von Zellen mit Sekundärwand ist der Celluloseanteil höher, die Zellen sind teilweise lignifiziert.

1.3.1.2 Lignin

Lignin ist definiert als „polymeres Naturprodukt, das durch enzymatisch initiierte Dehydrogenierungs-Polymerisation dreier primärer Vorstufen, Coniferyl-, Sinapyl- und *p*-Cumarylalkohol (Abb. 3), entsteht“ (SARKANEN & LUDWIG, 1971). Diese Vorstufen werden häufig nach ihrem aromatischen Kern auch als Guaiacyl (G)-, Syringyl (S)- und *p*-Hydroxyphenyl (H)-Einheiten bezeichnet und sind Produkte des Phenylpropan-Stoffwechsels (s. Kapitel 1.3.1.3).

Peroxidasen und/oder Oxidasen reagieren mit diesen Vorstufen und dem sich entwickelnden Ligninmolekül zu Einelektronenoxidierten, resonanzstabilisierten Produkten, die durch komplexe radikalische Kopplungsreaktionen das Polymer bilden. Während dieser Kopplungsreaktionen werden sowohl Ether- (Alkyl-*O*-Aryl, Aryl-*O*-Aryl) als auch C-C-Bindungen gebildet. Abbildung 4 zeigt die vorherrschenden Bindungen zwischen Phenylpropaneinheiten.

Das Verhältnis der H-, G- und S-Einheiten sowie viele Strukturkennzeichen hängen von der botanischen Herkunft, dem betrachteten Pflanzenteil und -gewebe sowie der Lokalisierung in der Pflanzenzellwand ab (BESLE et al., 1994). Lignin in Gräsern wird im allgemeinen zu dem H-G-S-Typ gerechnet, wobei die H-Einheiten normalerweise eine untergeordnete Rolle spielen.

Da auch andere Komponenten wie z.B. Hydroxyzimtsäuren (s. Kapitel 1.3.1.3) in Lignin einbezogen werden können, wird vorgeschlagen, die oben genannte Definition zu erweitern bzw. durch eine funktionelle Definition zu ersetzen. HATFIELD et al. (1999) legen folgende funktionelle Definition nahe: „Lignin ist ein phenolisches Makromolekül (Polymer), das mit anderen Zellwandbestandteilen in Wechselwirkung tritt, um strukturelle Integrität, Widerstand gegenüber dem Abbau und Wasserundurchlässigkeit zu gewährleisten“.

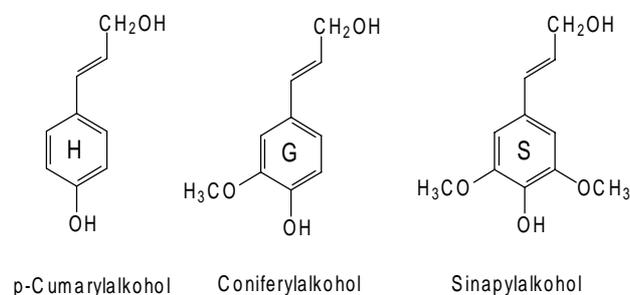


Abbildung 3: Monolignole

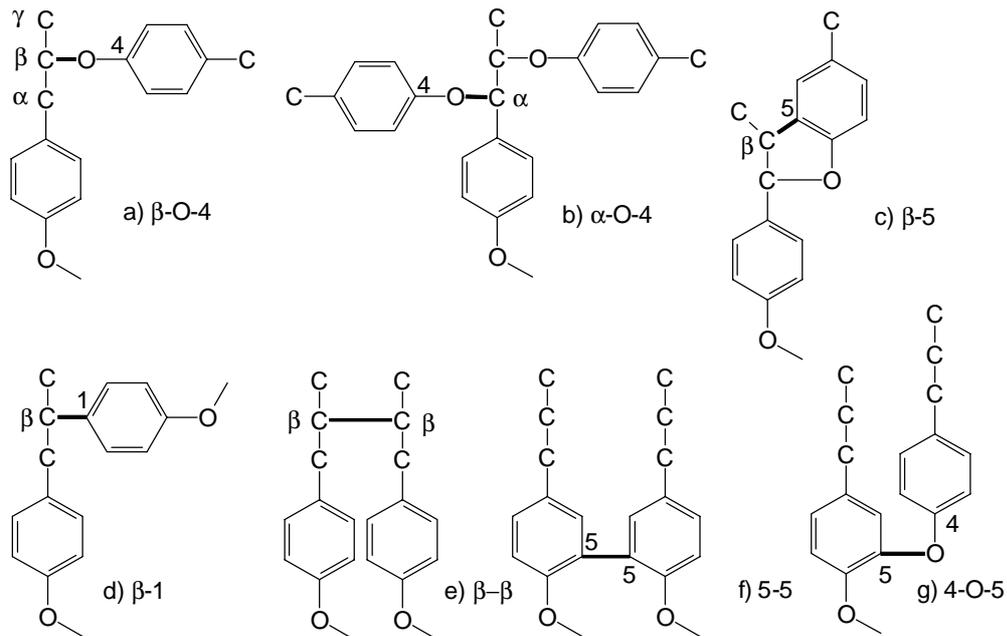


Abbildung 4: Vorherrschende Bindungen zwischen Phenylpropan-Einheiten

1.3.1.3 Monomere Phenolcarbonsäuren

Aromatische Carbonsäuren nehmen im pflanzlichen Stoffwechsel eine zentrale Rolle ein (HERRMANN, 1989, HERRMANN, 1991). Die „Zimtsäuren“, korrekter Phenylpropanderivate oder Phenolcarbonsäuren (PCS), sind Produkte des allgemeinen Phenylpropan-Stoffwechsels (Abb. 5). Ausgangsverbindungen für den Phenylpropan-Stoffwechsel sind Phenylalanin (und Tyrosin), die Produkte des Shikimisäure-Wegs (Abb. 5) darstellen. Zentrales Enzym für den Übergang vom Shikimisäure-Weg zum Phenylpropan-Stoffwechsel ist die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (E.C. 4.3.1.5), die die Deaminierung von Phenylalanin unter Freisetzung von Ammoniak zur *trans*-Zimtsäure katalysiert (BOLWELL, 1988). Zweites im Phenylpropan-Stoffwechsel beteiligtes Enzym ist die Zimtsäure-4-Hydroxylase (E.C. 1.14.13.11). Die Hydroxylierung führt zu *p*-Cumarsäure (pCS), einer PCS, die auch direkt aus Tyrosin unter Mitwirkung von Tyrosin-Ammoniak-Lyase synthetisiert werden kann. Die Anwesenheit von Tyrosin-Ammoniak-Lyase ist jedoch auf einige Pflanzen, darunter die Gramineen, beschränkt (WALDRON et al., 1997b). Von pCS geht die Bildung der beiden anderen in der Zellwandarchitektur bedeutenden PCS, Ferulasäure (FS) und Sinapinsäure (SA), aus. Durch Hydroxylierung entsteht zunächst Kaffeesäure, welche durch Catechol-*O*-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.68) zur FS umgewandelt wird. Hydroxylierung durch Ferulat-5-Hydroxylase (E.C. 1.14.13.11) ergibt 5-Hydroxyferulasäure, welche durch *O*-Methylierung in SA überführt wird.

Von den PCS ausgehend werden die Monolignole (s. Kapitel 1.3.1.2) durch enzymatische Reduktion gebildet.

Bindung monomerer Phenolcarbonsäuren an Zellwandpolysaccharide

Schon lange ist bekannt, daß gebundene FS in signifikanten Mengen in der pflanzlichen Zellwand vorhanden ist. Erste Untersuchungen diesbezüglich wurden an Zellwänden von Gramineen und Chenopodiaceen mittels UV-Fluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt (HARRIS & HARTLEY, 1976). Nach milder alkalischer Hydrolyse von Zellwandmaterial konnten FS und pCS mit Hilfe

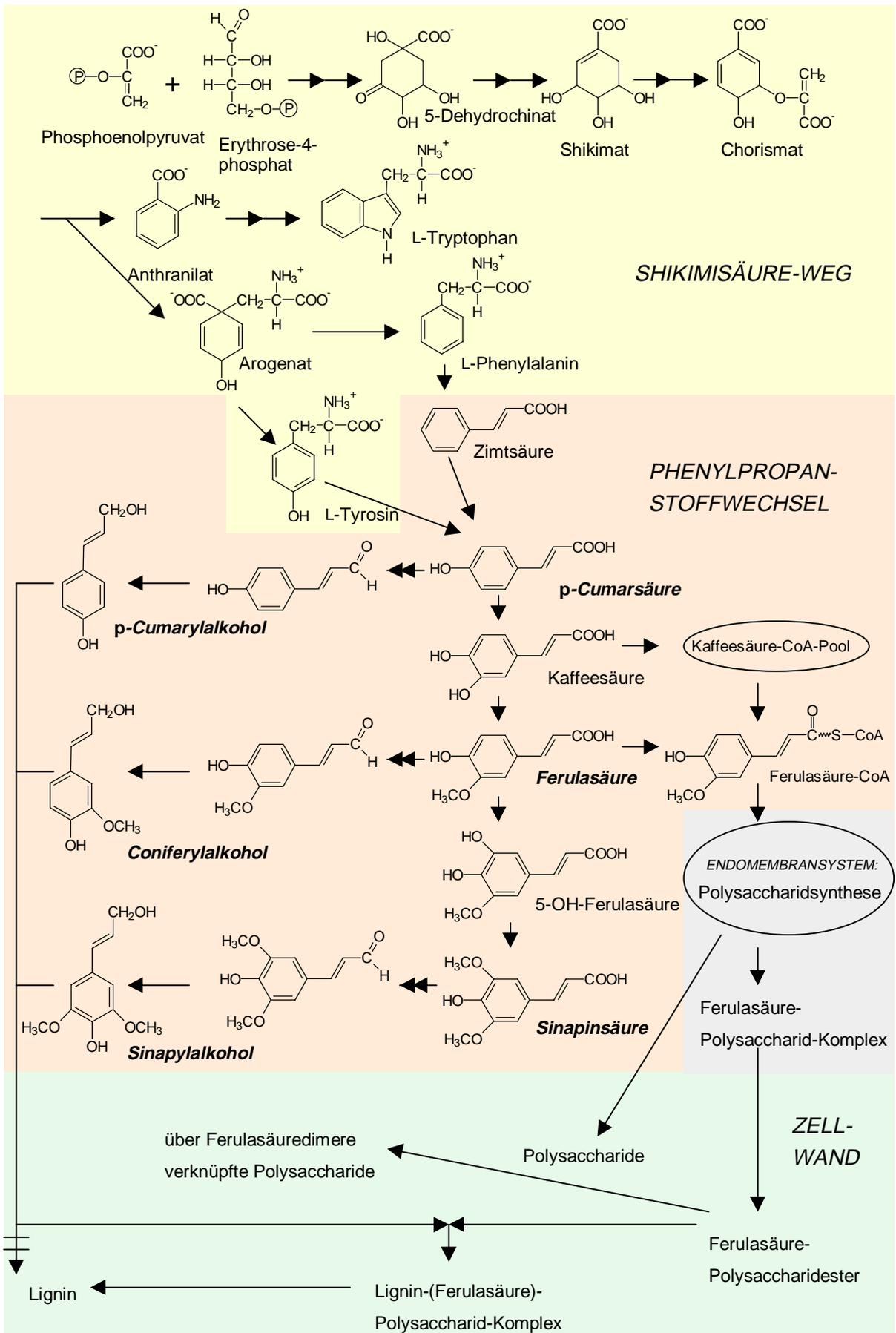


Abbildung 5: Biosynthese von Phenolcarbonsäuren und Monolignolen und deren Einbau in die Pflanzenzellwand

flüssig- und gaschromatographischer Methoden in den Extrakten nachgewiesen werden (HARTLEY & FORD, 1989). Dies wurde als Indiz angesehen, daß PCS und Zellwandpolymere über eine Esterbindung miteinander verbunden sind. SA wurde in signifikanten Mengen bisher nur in Zellwänden von Reis gefunden. Jedoch vermuten die Autoren, daß sie als Abbauprodukt des Lignins während der Extraktion gebildet wurde (HE & TERASHIMA, 1989). In Gräsern sind größere Ferulasäuremengen vor allem in den Getreidekleien zu finden, wohingegen pCS die dominierende PCS in den Getreidehalmen und –stengeln darstellt (FAULDS & WILLIAMSON, 1999).

PACKERT (1993) untersuchte lösliche und unlösliche Getreideballaststoffe auf estergebundene monomere phenolische Säuren und konnte in allen untersuchten Materialien *trans*-FS als dominierende Säure bestimmen. Während pCS ebenfalls in signifikanten Mengen nachgewiesen wurde, konnte in den alkalischen Extrakten keine SA identifiziert werden.

Die Bindung von FS und pCS an Zellwandpolysaccharide wurde anhand von wasserlöslichen PCS-Oligosacchariden bestimmt. Hierzu sind Hydrolysemethoden notwendig, die die säure- und alkalilabilen phenolischen Substituenten nicht spalten. Hauptsächlich wurde Zellwandmaterial von Futtergräsern untersucht. Für die menschliche Ernährung bestimmtes Material wurde bisher in weit geringerem Umfang in die Untersuchungen einbezogen. Unter den Getreiden wurden bisher nur Mais- und Weizenkleie bzw. –karyopsen sorgfältig untersucht. In geringem Umfang wurden auch Gerstenaleuronzellen analysiert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher isolierten und identifizierten PCS-Oligosaccharide, die Hinweise über die Bindung von PCS an Zellwandpolysaccharide geben.

Aus den bisher gesammelten Strukturinformationen kann man den Trend erkennen, daß in monokotylen Pflanzen die PCS eher an Hemicellulosen gebunden sind (Arabinoxylane, Xyloglucane), wohingegen sie in dikotylen Pflanzen mit Pektinen assoziiert sind.

Über den Mechanismus der Kopplung von FS bzw. pCS an die Zellwandpolysaccharide ist bisher nur wenig bekannt. FRY & MILLER (1989) und MYTON & FRY (1994) konnten zeigen, daß die Kopplung von FS an Zellwandpolysaccharide intrazellulär abläuft. Alternativ schlagen YAMAMOTO et al. (1989) vor, daß die Ferulasäurekopplung in der Zellwand über Ferulasäure-CoA verläuft. Diese Möglichkeit der extrazellulären Kopplung erscheint aus metabolischer Sicht jedoch eher unwahrscheinlich, da es für die Pflanze schwierig wäre, das CoA-Produkt aus der Reaktion zurückzugewinnen. Die Arbeiten von MEYER et al. (1991), die die intrazelluläre Übertragung von FS von Ferulasäure-CoA auf Polysaccharidakzeptoren demonstrieren (Abb. 5), stellen dementsprechend auch den bisher wahrscheinlichsten Mechanismus dar.

1.3.1.4 Dimere Phenolcarbonsäuren als Polysaccharid-Crosslinks

Durch die Bindung von FS an Polysaccharide bieten sich mehrere Mechanismen, Polysaccharidketten miteinander zu koppeln. Aufgrund der Bifunktionalität der FS (Carboxyl- und phenolische Hydroxylgruppe) besteht die Möglichkeit, zwei Polysaccharidketten mit Hilfe monomerer FS über eine Ester- und eine Etherbindung zu verknüpfen. Bei den bisherigen Strukturuntersuchungen konnten jedoch keinerlei Hinweise auf eine Etherbindung zwischen FS und Polysacchariden gefunden werden, so daß zwei andere Mechanismen wahrscheinlicher sind: a) Kopplung über radikalisch gebildete Ferulasäuredehydrodimere unter Nutzung zellwandgebundener Peroxidase und H₂O₂, b) Kopplung über photochemisch gebildete Dimere der FS (Abb. 6).

Tabelle 1: Strukturen identifizierter Ferulasäure/p-Cumarsäure-Mono-/Oligosaccharid-Verbindungen

Struktur	Nomenklatur	Material	Literatur
5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)-L-arabinose	FS-Ara	Weizenkleie	McCALLUM et al., 1991
		Maiskleie	OHTA et al., 1994 SAULNIER et al., 1995
		Zuckerrübe	COLQUHOUN et al., 1994
		Schwingel, Dt./Welsches Weidelgras etc.	WENDE & FRY, 1997b
<i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-D-xylose	FS-Ara-(1 \rightarrow 3)-Xyl	Welsches Weidelgras, Gerstestroh, Weizenblätter/-kleie	SMITH & HARTLEY, 1983
<i>O</i> -(2- <i>O</i> - <i>trans</i> -Feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 5)-L-arabinose	FS-Ara-(1 \rightarrow 5)-Ara	Spinat	FRY, 1982 ISHII, 1994 ISHII & TOBITA, 1993
		Zuckerrübe	ISHII, 1994 COLQUHOUN et al., 1994
<i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>trans</i> -Feruloyl)- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-galaktose	FS-Gal-(1 \rightarrow 4)-Gal	Spinat	FRY, 1982 ISHII, 1994 ISHII & TOBITA, 1993
		Zuckerrübe	ISHII, 1994 COLQUHOUN et al., 1994
<i>O</i> - β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-L-arabinose]	Xyl-(1 \rightarrow 2)-(FS-Ara)	Maiskleie	SAULNIER et al., 1995
		Schwingel	WENDE & FRY, 1997b
<i>O</i> -4- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)- α -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucose	FS-Xyl-(1 \rightarrow 6)-Glc	Bambussprößling	ISHII et al., 1990 ISHII & HIROI, 1990b
<i>O</i> - α -L-Arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> -(2- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 5)-L-arabinose	Ara-(1 \rightarrow 3)-(FS-Ara)-(1 \rightarrow 5)-Ara	Spinat	ISHII & TOBITA, 1993
		Zuckerrübe	ISHII, 1994 COLQUHOUN et al., 1994
<i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylose	FS-Ara-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 4)-Xyl	Zuckerrohr (Bagasse)	KATO et al., 1983
		Mais (Sprößling)	KATO & NEVINS, 1985
		Gerste (Aleuron) Gerste (Stroh)	GUBLER et al., 1985 MÜLLER-HARVEY et al., 1986
		Bambussprößling Maiskleie	ISHII & HIROI, 1990a McCALLUM et al., 1991
		Bermudagrass	HARTLEY et al., 1990
<i>O</i> -[2- <i>O</i> -Acetyl-5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 3)]- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylose	FS,Ac-Ara-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 4)-Xyl	Bambussprößling	ISHII, 1991a

Fortsetzung Tabelle 1

Struktur	Nomenklatur	Material	Literatur
<i>O</i> -L-Galaktopyranosyl-(1→4)- <i>O</i> -D-xylopyranosyl-(1→2)-[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-L-arabinose]	Gal-(1→4)-Xyl-(1→2)-(FS-Ara)	Maiskleie	SAULNIER et al., 1995
<i>O</i> -β-D-Xylopyranosyl-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)- <i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-L-arabinose]	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→2)-(FS-Ara)	Schwengel	WENDE & FRY, 1997a
<i>O</i> -β-D-Xylopyranosyl-(1→4)- <i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl-(1→3)]- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-β-D-xylose	Xyl-(1→4)-[(FS-Ara)-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Xyl	Zuckerrohr (Bagasse) Bambussprößling	KATO et al., 1987 ISHII & HIROI, 1990a
<i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>p</i> -Cumaroyl)-α-L-arabinofuranosyl-(1→3)]- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylose	pCS-Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)-Xyl	Gerstenstroh Bambussprößling Bermudagrass	MÜLLER-HARVEY et al., 1986 ISHII et al., 1990 ISHII & HIROI, 1990b HARTLEY et al., 1990 BORNEMAN et al., 1990
<i>O</i> -β-D-Xylopyranosyl-(1→4)- <i>O</i> -[5- <i>O</i> -(<i>p</i> -cumaroyl)-α-L-arabinofuranosyl-(1→3)]- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylose	Xyl-(1→4)-[(pCS-Ara)-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Xyl	Bambussprößling	ISHII, 1996
<i>O</i> -β-D-Xylopyranosyl-(1→4)- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -acetyl-5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl-(1→3)]- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylose	Xyl-(1→4)-[(FS,Ac-Ara)-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Xyl	Zuckerrohr (Bagasse)	AZUMA et al., 1990
{[5- <i>O</i> -(<i>trans</i> -Feruloyl)][<i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→2)]- <i>O</i> -α-L-arabinofuranosyl-(1→3)}- <i>O</i> -β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylose	{[FS-(1→5)][Xyl-(1→2)]-Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Xyl	Bermudagrass	HIMMELSBACH et al., 1994

Radikalische Kopplung: Bildung von Ferulasäuredehydrodimeren

Bereits vor dreißig Jahren konnten GEISSMANN und NEUKOM (1971) zeigen, daß FS-Polysaccharidester unter oxidativen Bedingungen (H_2O_2 /Peroxidase) gekoppelt werden können. Sie führten die Kopplung auf eine 5-5'-gebundene Dehydrodiferulasäure (5-5'-DFS) zurück, die sie isolieren und identifizieren konnten (MARKWALDER & NEUKOM, 1976). Dieses über zwanzig Jahre alleine bekannte Ferulasäuredehydrodimer wurde in verschiedenen Materialien identifiziert und quantifiziert, u.a. in Welschem Weidelgras (HARTLEY & JONES, 1976), in Gerste (NORDKVIST et al., 1984) und in Hafer (KAMISAKA et al., 1990). Auch PACKERT (1993) konnte 5-5'-DFS in verschiedenen unlöslichen Getreideballaststoffen nachweisen.

1989 vermuteten YAMAMOTO et al., daß 5-5'-DFS nicht als einziges Produkt aus einer radikalischen Kopplung hervorgehen kann. RALPH et al. (1992b) co-polymerisierten in einer radikalischen Reaktion ein Ferulasäurearabinosid und Coniferylalkohol. Hierbei zeigte sich, daß Ferulasäureester leicht durch Peroxidase oxidiert werden und radikalische Kopplungsprodukte bilden, die gemäß des Mechanismus der freien radikalischen Kopplung entstehen sollten. Dementsprechend wurde das Ferulasäurearabinosid in 2,3-Dihydrobenzofuran (8-5'-), Alkyl-Aryl-Ether (8-*O*-4')- und Furofuran (8-8')-Strukturen eingebunden. Ausgehend von diesen Ergebnissen synthetisierten RALPH et al. (1994) nach mechanistischen Überlegungen sieben Dehydrodiferulasäuren (DFS) und konnten diese mit Ausnahme der 4-*O*-5'-Dehydrodiferulasäure (4-*O*-5'-DFS) u.a. in alkalischen Hydrolysaten aus Zellwänden von Knäuelgras nachweisen.

Infolge dieser Erkenntnisse wurden verschiedene Materialien von Forschern mit unterschiedlichsten Interessen (z.B. Pflanzenphysiologen, Mikrobiologen, Lebensmittelchemikern) auf die Existenz der neu entdeckten DFS untersucht. So konnten in Pinienhypokotylen (SÁNCHEZ et al., 1996), Maiszellsuspensionen (GRABBER et al., 1995), Zuckerrüben (WALDRON et al., 1997a, MICARD et al., 1997), chinesischen Wasser-

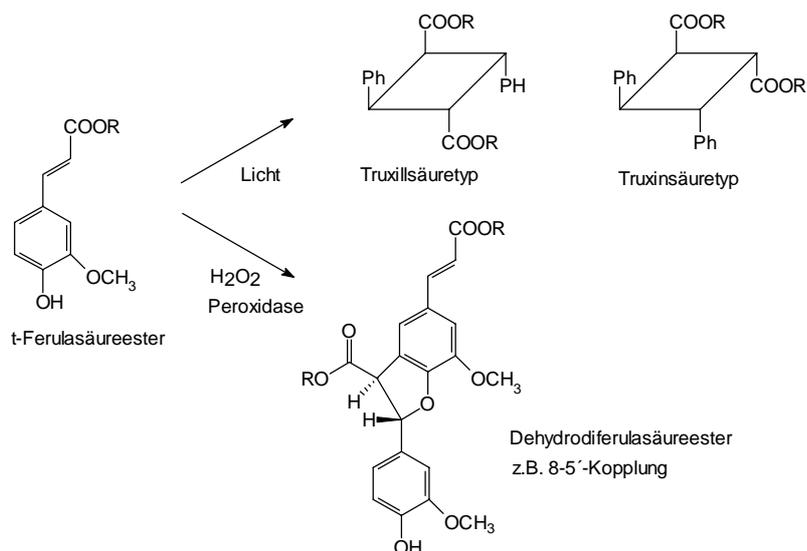


Abbildung 6: Photochemische und radikalische Dimerisierung von Ferulasäureestern

kastanien (PARR et al., 1996), Karotten (PARR et al., 1997), Weizenkleie (GARCIA-CONESA et al., 1998), Maiskleie (NG et al., 1997, SAULNIER et al., 1999), Roggenmehl (ANDREASEN et al., 2000) und Treber (BARTOLOMÉ et al., 1997) sowie in einigen unlöslichen Getreideballaststoffen (RENGER & STEINHART, 2000) einige der neu beschriebenen DFS in unterschiedlichen Mustern und Mengen nachgewiesen werden. Bei den meisten dieser Bestimmungen ergaben sich jedoch aufgrund mangelnder Standardsubstanzen (und Korrekturfaktoren) oder wenig geeigneter Bestimmungsmethoden nur unvollständige Ergebnisse, die untereinander nicht vergleichbar sind.

Obwohl in den alkalischen Hydrolysaten der oben aufgeführten Pflanzen bzw. Pflanzenteile DFS nachgewiesen werden konnten, wurde der direkte Beweis, daß DFS an Polysaccharide gebunden sind und damit Polysaccharidstränge verknüpfen können, weitaus seltener erbracht. ISHII (1991b) konnte nach enzymatischem Abbau von Zellwänden von Bambussproßlingen ein 5-5'-DFS-Oligosaccharid isolieren und identifizieren. Trotz jahrelanger Forschung konnten auch SAULNIER et al. (1999) nur zwei 5-5'-DFS-Oligosaccharide aus sauer hydrolysierten Maiskleie isolieren und identifizieren. Der Nachweis der Bindung der anderen DFS an Polysaccharide steht noch aus. Des Weiteren besteht das Problem, daß es nicht möglich ist, aufgrund der isolierten DFS-Oligosaccharide zwischen intermolekularer und intramolekularer Kopplung zu differenzieren. Obwohl vieles für die Crosslink-Eigenschaften von DFS spricht, konnte dies noch nicht mit letzter Sicherheit bewiesen werden.

Photochemische Kopplung: Bildung von Cyclobutanderivaten

Zimtsäure und einige Derivate können unter Einwirkung von UV-Licht im Zuge einer (2+2)-Cycloaddition zu Cyclobutanderivaten dimerisieren. Bei der Dimerisierung können Truxillsäure (2,4-Diphenyl-cyclobutan-1,3-dicarbonsäure)- oder Truxinsäure (3,4-Diphenyl-cyclobutan-1,2-dicarbonsäure)-Derivate entstehen (Abb. 6). FS und pCS können Homodimere, bei Belichtung einer FS/pCS-Mischung aber auch Heterodimere bilden. Es können je 11 Stereoisomere der Homodimere und 14 Stereoisomere der Heterodimere entstehen.

FS- und pCS-Homodimere als auch FS/pCS-Heterodimere wurden u.a. in tropischen Gräsern (FORD & HARTLEY, 1990) sowie in Gerstenstroh, Gerstenblättern und Weizenblättern (TURNER et al., 1993) nachgewiesen. PACKERT (1993) identifizierte pCS und FS Homo- und Heterodimere in UBS einiger Getreide.

HARTLEY et al. (1990) konnten FS-Oligosaccharide durch UV-Einstrahlung unter Bildung von Cyclobutanderivaten dimerisieren. Dieser Mechanismus scheint demnach auch für die Kopplung von Zellwandpolysacchariden möglich.

1.3.1.5 Ferulasäure und Ferulasäuredimere als Polysaccharid-Lignin-Crosslinks

Vier Möglichkeiten zur Kopplung von Zellwandpolysacchariden an Lignin sind denkbar (IIYAMA et al., 1994):

- direkte Esterbindung von uronsäurehaltigen Polysacchariden an Lignin
- direkte Etherbindung zwischen Polysacchariden und Lignin
- Kopplung über ester- (Polysaccharide) und ethergebundene (Lignin) monomere FS
- Kopplung über ester- (Polysaccharide) und ethergebundene (Lignin) Ferulasäuredimere.

Die wahrscheinlich wichtigsten Mechanismen zur Kopplung von Zellwandpolysacchariden an Lignin sind die die PCS einbeziehenden Mechanismen c) und d). Der Nachweis ethergebundener FS in Ligninfraktionen führte bereits früh zu Spekulationen, daß monomere FS in Ester-Ether-Bindungen zwischen Polysacchariden und Lignin involviert sei (SCALBERT et al., 1985, SCALBERT et al., 1986). Mittels einer alkalischen Hochtemperaturhydrolyse kann monomere FS aus solchen Bindungen freigesetzt werden. LAM et al. (1992a) entwickelten daraufhin eine Analyse-methode, mit der sie eindeutig nachweisen konnten, daß die gesamte FS, die über eine Etherbin-dung an Lignin gebunden ist, auch estergebunden ist.

Umstritten ist der Mechanismus, über den die FS-Polysaccharidester in Lignin eingebunden wer-den, und welche Strukturen daraus folgen. Lange Zeit wurde der „passive“ oder „opportunistische“ Mechanismus vorgeschlagen (SCALBERT et al., 1986, LAM et al., 1992b, IIYAMA et al., 1993): Bei der radikalischen Kopplung von Monolignolen und dem sich entwickelnden Ligninpolymer entstehen Chinonmethide als reaktive Zwischenstufen (Abb. 7). Diese werden typischerweise nucleophil an der α -Position angegriffen. Im Falle der FS-Polysaccharidester kann die Phenolgrup-pe die Chinonmethide nucleophil angreifen, was zu α -Ethern führen würde (Abb. 7).

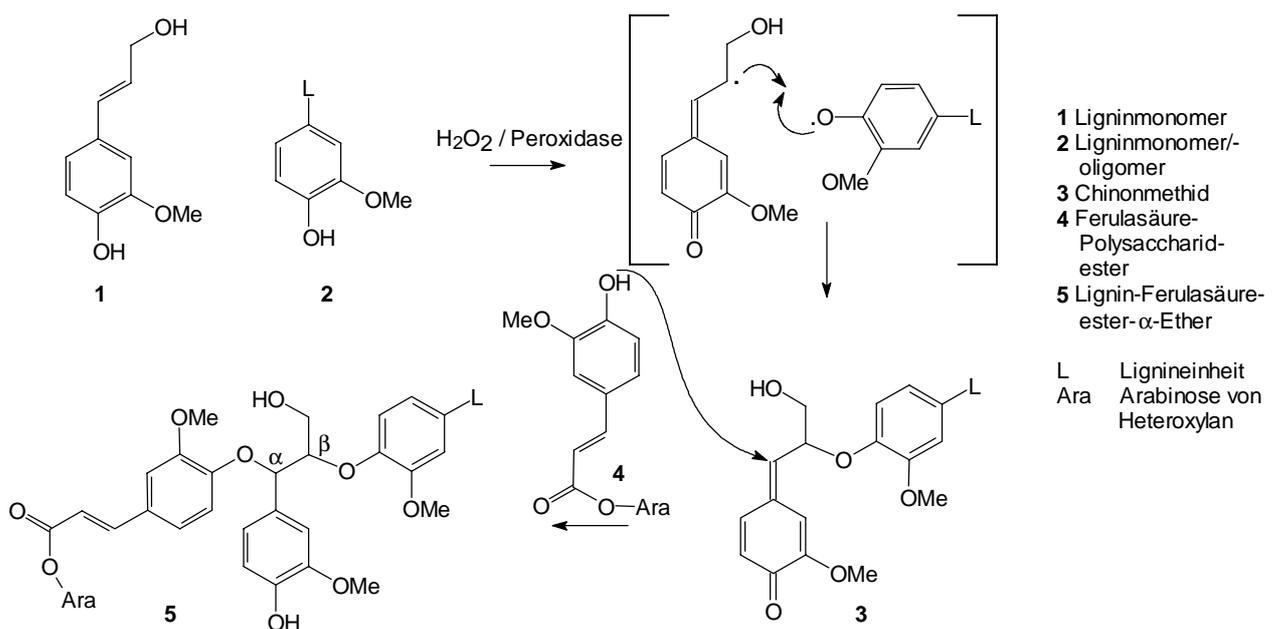


Abbildung 7: „Passiver“ Mechanismus zur Kopplung von Ferulasäure-Polysaccharidestern an Lignin

Alternativ postulierte die Arbeitsgruppe von RALPH den „aktiven“ Mechanismus und konnte diesen anhand einer Reihe von Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels NMR-Studien nachweisen (RALPH et al., 1992a, RALPH et al., 1992b, RALPH et al., 1995, QUIDEAU & RALPH, 1997). Unter dem „aktiven“ Mechanismus versteht man die Einbeziehung der Ferulasäureester in den radikalischen Prozeß. Sowohl Monolignole (theoretisch auch Ligninoligomere) als auch die Ferulasäureester bilden resonanzstabilisierte Phenoxyradikale und reagieren durch Kreuzkopplungsreaktionen zu Produkten, die gemäß der Chemie der radikalischen Kopplung möglich sind, z.B. 8- β -, 5- β - oder 4- O - β -gebundene Strukturen (Abb. 8).

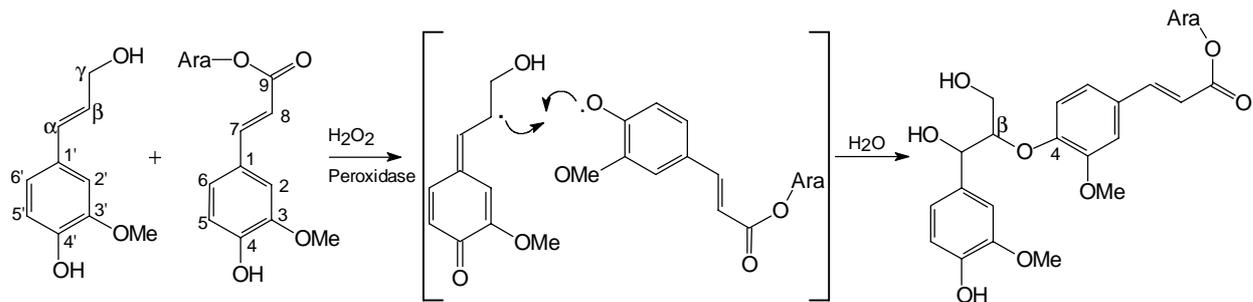


Abbildung 8: „Aktiver“ Mechanismus zur Kopplung von Ferulasäure-Polysaccharidestern an Lignin

GRABBER et al. (1995) konnten zeigen, daß mindestens 60 % der Ferulasäureester über den „aktiven“ Mechanismus mit Lignin gekoppelt werden. Da bei diesen Untersuchungen jedoch die 4- O - β -Ether nicht von den α -Ethern unterschieden werden konnten, dürften weit mehr als 60 % der Ferulasäureester dem „aktiven“ Mechanismus folgen.

Die Untersuchungen der Gruppe von RALPH ergaben weiterhin, daß die Ferulasäureester wahrscheinlich nur mit Monolignolen reagieren und so als Initiationsstelle für die Lignifizierung angesehen werden können (RALPH et al., 1995).

An Polysaccharide gebundene DFS haben mindestens eine nichtsubstituierte phenolische Gruppe, die entsprechend der monomeren FS durch den „passiven“ oder „aktiven“ Mechanismus an Lignin gebunden werden kann. Für 5-5'-DFS-Ester konnten QUIDEAU & RALPH (1997) die „aktive“ Kopplung an Lignin nachweisen. Im Gegensatz zum „passiven“ Mechanismus können beim „aktiven“ Mechanismus wie bei der monomeren FS die 8-Positionen neben den phenolischen Gruppen gekoppelt werden, so daß ein 5-5'-DFS-Ester über vier koppelbare Positionen verfügt und damit als vielfacher Verknüpfungspunkt dienen kann.

1.4 Problemstellung

Die physiologischen Eigenschaften der BS stehen im engen Zusammenhang mit ihrer chemischen Struktur. PCS stellen zwar innerhalb der BS nur eine Minorkomponente dar, sie haben jedoch aufgrund ihrer Eigenschaft, Crosslinks auszubilden, großen Einfluß auf die physikochemischen Eigenschaften der unterschiedlichen Ballaststoffkomponenten. Bereits durch Bildung weniger Polysaccharid-Crosslinks über DFS kann z.B. das Molekulargewicht um ein Vielfaches erhöht werden, was das Löslichkeitsverhalten der Polysaccharide beeinflusst. Auch die Bindung von Polysacchariden an Lignin verändert das Löslichkeitsverhalten drastisch. Aus Untersuchungen an Futtermitteln ergeben sich Hinweise, daß die Bindung von PCS an Polysaccharide, vor allem aber die Bildung von DFS-

Polysaccharid-Crosslinks, die Fermentation der Polysaccharide negativ beeinflusst. Ähnliche Effekte sind auch durch die Bindung von Polysacchariden an Lignin zu erwarten.

Bei bisherigen Untersuchungen über Abhängigkeiten zwischen physikochemischen Eigenschaften der BS und ihren physiologischen Wirkungen haben spezielle Strukturmerkmale nur wenig Aufmerksamkeit gefunden. Meistens beschränkte man sich darauf, diese Untersuchungen mit Ballaststoffquellen, die z.B. stark lignifiziert sind oder hohe Anteile an UBS/LBS haben etc., durchzuführen. Detailarbeit auf molekularer Ebene wurde bisher jedoch nur selten durchgeführt, ist aber unbedingt notwendig, um z.B. den mikrobiellen Abbau der BS im Dickdarm zu verstehen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bindung von PCS an Ballaststoffkomponenten zu untersuchen, die Produkte ihrer Dimerisierung zu identifizieren und zu quantifizieren sowie Unterschiede zwischen LBS und UBS abzuleiten.

Die Identifizierung und Quantifizierung von dimeren PCS in LBS und UBS aus verschiedenen Getreiden sollte in Kooperation mit dem U.S. Dairy Forage Research Center, USDA, Madison, USA (U.S. DFRC) erfolgen, da dort Synthesen einiger dimerer PCS entwickelt wurden. Die Verfügbarkeit von Standardsubstanzen sollte eine sichere Identifizierung und Quantifizierung gewährleisten, um vergleichbare und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Geeignet schien die Trennung der DFS anhand von gaschromatographischen Verfahren, gekoppelt mit der Flammenionisationsdetektion. Durch den parallelen Einsatz der massenspektrometrischen Detektion wurde die Absicherung der Identifizierung und der Nachweis neuer, noch nicht beschriebener dimerer PCS angestrebt. Durch parallele Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung sollten die Verknüpfungsgrade der Polysaccharide über dimere PCS abgeschätzt werden.

Die Identifizierung von PCS-Monolignol-Kreuzprodukten sollte neue Aufschlüsse über die Bindung von Polysacchariden an Lignin in Getreidekaryopsen geben. Der Nachweis dieser Produkte sollte ähnlich wie für die dimeren PCS beschrieben erfolgen.

Durch die *Isolierung und Identifizierung von monomeren PCS-Oligosacchariden aus Ballaststoffhydrolysaten* sollte bestimmt werden, an welche Biopolymere und in welcher Bindung die monomeren PCS assoziiert sind. Innerhalb der Gruppe der zum menschlichen Verzehr geeigneten Getreide wurden solche Untersuchungen bisher nur für Maiskleie und Weizenkaryopsen umfangreich durchgeführt und in der Literatur beschrieben. Für andere Getreide existieren bislang nur Vermutungen. Daher sollten die BS von Roggen, einer für Nordeuropa bedeutenden Getreideart, auf derartige Strukturen untersucht werden. Nach den oben aufgeführten Analysen bezüglich dimerer PCS stellte sich auch Wildreis trotz seiner vergleichsweise kommerziell geringen Bedeutung als interessantes Untersuchungsmaterial heraus. Für die Isolierung boten sich präparative chromatographische Methoden (Gelpermeationschromatographie (GPC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)) an, das Hauptaugenmerk bei der Identifizierung sollte auf massenspektrometrischen (MS) und kernresonanzspektroskopischen (NMR) Methoden liegen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

LBS und UBS wurden aus neun verschiedenen Getreidearten isoliert und analysiert. Ganze Karyopsen von Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Dinkel, Hirse, Reis und Wildreis wurden in einem Hamburger Reformhaus gekauft. Auf Anfrage beim Großhändler konnten die in Tabelle 2 zusammengestellten Informationen über die Getreidearten in Erfahrung gebracht werden. Weizenkaryopsen wurden von der Diamant-Mühle, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Informationen über den verwendeten Weizen befinden sich ebenfalls in Tabelle 2.

Tabelle 2: Untersuchungsmaterialien

GETREIDE	BOTANISCHE BEZEICHNUNG	ANBAUORT/-REGION	SONSTIGES
Weizen	<i>Triticum aestivum</i> L.	Norddeutschland	
Dinkel	<i>Triticum spelta</i> L.	Baden-Württemberg	
Roggen	<i>Secale cereale</i> L.	Bad Bevensen	
Gerste	<i>Hordeum vulgare</i> L.	keine Informationen	entspelzt
Hafer	<i>Avena sativa</i> L.	keine Informationen	entspelzt
Mais	<i>Zea mays</i> cv. <i>microsperma</i> KOERN.	Argentinien	
Hirse	<i>Panicum miliaceum</i> L.	USA	
Reis	<i>Oryza sativa</i> L.	keine Informationen	entspelzt, nicht poliert
Wildreis	<i>Zizania aquatica</i> L.	Nord-Ontario, Saskatchewan, Kanada	entspelzt

Die Isolierung der LBS und UBS erfolgte gemäß den in Kapitel 2.2 beschriebenen Methoden.

2.2 Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren sowie von Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten in löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

2.2.1 Bestimmung und Isolierung von löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen

Zur Bestimmung des Ballaststoffgehaltes in Lebensmitteln haben sich bis heute zwei unterschiedliche Verfahrenstypen durchgesetzt, die enzymatisch-chemischen und die enzymatisch-gravimetrischen Verfahren.

Bei den enzymatisch-chemischen Methoden werden nach enzymatischem Stärkeabbau (teilweise zusätzlicher Dimethylsulfoxid-Extraktionsschritt zur Abtrennung resistenter Stärke) die Nichtstärkepolysaccharide zu den Monosacchariden hydrolysiert und diese nach Derivatisierung gaschro-

matographisch bestimmt. Uronsäuren werden kolorimetrisch oder durch Decarboxylierung bestimmt, Lignin gravimetrisch als Klason-Lignin. Die beiden hauptsächlich angewendeten Methoden des enzymatisch-chemischen Typs unterscheiden sich in den erfaßten Ballaststoffkomponenten und definieren damit den Begriff BS unterschiedlich: Während die „ENGLYST-Methode“ (ENGLYST et al., 1994, QUIGLEY & ENGLYST, 1994) sowohl resistente Stärke als auch Lignin ausschließt, werden diese beiden Komponenten bei dem als „UPPSALA-Methode“ bekannten Verfahren (THEANDER et al., 1995) mit einbezogen.

Bei den enzymatisch-gravimetrischen Verfahren werden sowohl Stärke als auch Proteine enzymatisch hydrolysiert. Nach Filtration wird der Hydrolyserückstand gravimetrisch als UBS bestimmt. Die in dem Filtrat vorhandenen LBS werden in Ethanol (80 %ig) gefällt, filtriert und gravimetrisch bestimmt. Im Anschluß werden der Restproteingehalt und der Aschegehalt ermittelt und die Ballaststoffgehalte entsprechend korrigiert (s. Kapitel 2.2.2). Dies entspricht der Definition der BS. Probleme ergeben sich bei dieser Methode jedoch bei der vollständigen Erfassung der resistenten Stärke. Diese Methodik erfaßt die *in-vitro*-resistente Stärke nach Amylase-Behandlung bei hohen Temperaturen. Die so bestimmten Gehalte an resistenter Stärke sind allerdings niedriger als die Gehalte an *in-vivo*-resistenter Stärke (ASP, 2001). Ferner sind die unverdaulichen Oligosaccharide löslich in 80 %igem Ethanol und entziehen sich daher den hier vorgestellten enzymatisch-gravimetrischen als auch den enzymatisch-chemischen Methoden, die alle die Fällung mit 80 %igem Ethanol vorsehen (ASP, 2001).

Die offizielle enzymatisch-gravimetrische Methode der AOAC 985.29 zur Bestimmung der GBS (PROSKY et al., 1984, PROSKY et al., 1985) wurde von 1985-1988 auf die getrennte Bestimmung von LBS und UBS angepaßt und erprobt (PROSKY et al., 1988). Daraus resultierten die AOAC-Methoden 991.42 und 993.19 zur Bestimmung der UBS bzw. der LBS (PROSKY et al., 1992, PROSKY et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde die von der AOAC-Methode 985.29 ausgehende Methodik zur getrennten Bestimmung von UBS und LBS auf präparative Verhältnisse angepaßt. Die Isolierung der BS zur Untersuchung auf PCS-Dimere und FS-Monolignol-Kreuzprodukte erfolgte ausgehend von 10 g Mehl. Zur Isolierung der BS für die Untersuchung auf PCS-Oligosaccharide mußten aufgrund der großen benötigten Ballaststoffmengen 15 g Mehl pro Ansatz eingesetzt werden. Das Verfahren zur Isolierung ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die genaue Arbeitsvorschrift zur Isolierung der UBS und LBS ist dem Anhang 5.3.1.1 zu entnehmen.

2.2.2 Ermittlung von Korrekturfaktoren zur Bestimmung korrigierter Ballaststoffgehalte

Bestimmung des Proteingehalts:

Der Stickstoffgehalt der UBS wurde entsprechend der Kjeldahl-Methode bestimmt (§ 35 LMBG L 46.03-05; BgVV, 1997). Die Umrechnung auf den Proteingehalt erfolgte unter Verwendung des Faktors 6,25.

Der Proteingehalt der LBS mußte aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an LBS und aufgrund des geringen Restproteingehaltes mit einer anderen Methode bestimmt werden. Die Wahl fiel auf die Proteinbestimmung nach BRADFORD (BRADFORD, 1976), einer empfindlichen, einfach und schnell durchzuführenden, photometrischen Bestimmung.

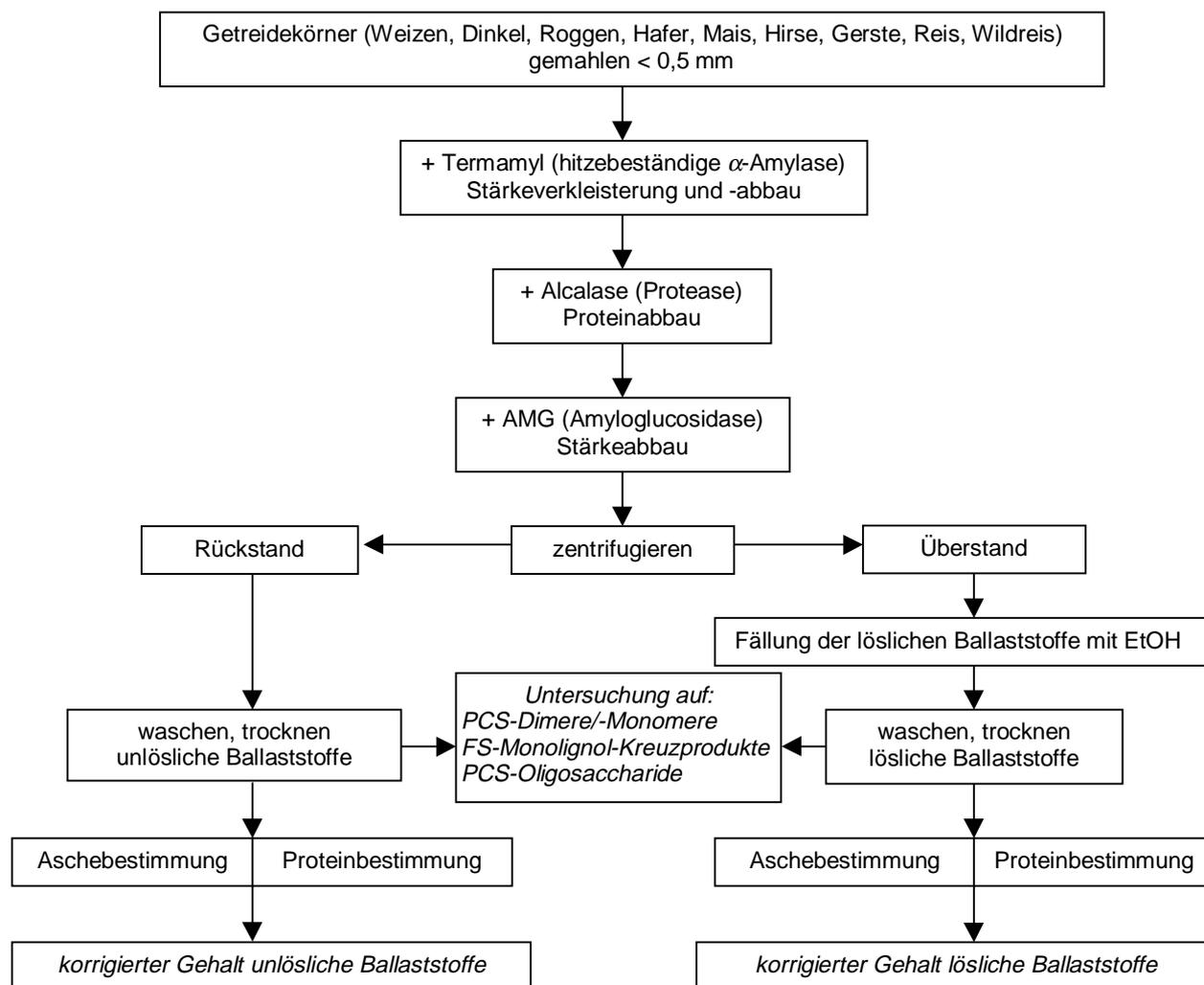


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Ballaststoffisolierung und der Bestimmung der Korrekturfaktoren

Bestimmung des Aschegehaltes:

Der Glührückstand wurde gemäß der § 35-Methode (§ 35 LMBG L06.00-07; BgVV, 1997) gravimetrisch nach Veraschung bei 525 °C bestimmt.

Die genauen Arbeitsvorschriften befinden sich im Anhang 5.3.1.2.

Aus den ermittelten Restprotein- und Aschegehalten wurden die entsprechenden Korrekturfaktoren (s. Anhang 5.4.5) bestimmt.

2.2.3 Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung der Ballaststoffe

Die Monomerenzusammensetzung der Ballaststoffpolysaccharide ist stark von der untersuchten Getreideart abhängig (s. Kapitel 1.3.1.1). Zur Charakterisierung der Ballaststoffpolysaccharide und zur Abschätzung der Verknüpfungsgrade über dimere PCS erfolgte die Identifizierung und Quantifizierung der als Bausteine verwendeten Monosaccharide nach saurer Hydrolyse. Da bisher in der Literatur nur die Bindung von FS an neutrale Kohlenhydratkomponenten beschrieben wurde, wurden die Untersuchungen auf die Bestimmung der neutralen Monosaccharide beschränkt. Zur parallelen Untersuchung der Uronsäuren wäre ein anderes Bestimmungsverfahren (meist photometrisch) nötig gewesen.

2.2.3.1 Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung

Hydrolyse

Zur Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden wurden zwei unterschiedliche Verfahren beschrieben, die im Laufe der Zeit vielen Modifikationen unterlagen. Das Verfahren nach ALBERSHEIM beinhaltet die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure bei 121 °C (ALBERSHEIM et al., 1967). Als effektiver hat sich jedoch die SAEMAN-Hydrolyse mit Schwefelsäure herausgestellt (SAEMAN et al., 1954). Aufgrund ihrer mikrokristallinen Struktur ist Cellulose nicht in verdünnter Schwefelsäure hydrolysierbar. Aber auch andere Polysaccharide, die z.B. beim Waschen mit Aceton im Verlauf der Ballaststoffisolierung aggregieren, sind der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure nicht zugänglich. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, beinhaltet die SAEMAN-Hydrolyse einen der eigentlichen Hydrolyse vorgeschalteten Schritt, bei dem das Zellwandmaterial in 12 M Schwefelsäure bei gemäßigten Temperaturen vorgequollen wird. Nach Verdünnung der Schwefelsäure findet bei 100 °C die eigentliche Hydrolyse statt.

Problematisch bei allen Hydrolysen ist die Zersetzung der bereits freigesetzten Monosaccharide. So sind Monomere in der Furanoseform leichter aus Polysacchariden freizusetzen als Pyranosen, und α -glykosidische Bindungen sind säurelabiler als β -glykosidische. Daher muß bei allen Hydrolysen das Ziel sein, das Optimum zwischen Freisetzung und Zersetzung der Monosaccharide zu erreichen. In dieser Arbeit wurde die von ENGLYST et al. (1994) modifizierte SAEMAN-Hydrolyse angewendet. Diese beinhaltet die Vorquellung mit 12 M Schwefelsäure bei 35 °C für 30 min. ENGLYST et al. (1994) konnten zeigen, daß bei dieser Temperatur eine Vorquellung für 30 min nur bei cellulosehaltigen Materialien notwendig ist, für alle anderen Polysaccharide genügen 5 min. Um unnötige Kohlenhydratverluste bei der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung zu vermeiden, wurden die LBS nur 5 min vorgequollen, die Cellulose enthaltenden UBS jedoch 30 min.

Nach Verdünnen zu 2 M Schwefelsäure wurde die Hydrolyse 60 min bei 100 °C durchgeführt.

Reduktion und Acetylierung

Der Hydrolyseansatz wurde bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Ammoniaklösung versetzt. Die Monosaccharide wurden mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Alditolen reduziert. Überschüssiges Natriumborhydrid wurde durch 80 %ige Essigsäure, die die internen Standardsubstanzen *myo*-Inosit und Erythrit enthält, zu Borat umgesetzt. Bei Verwendung des Katalysators 1-Methylimidazol können die nichtflüchtigen Alditole mit Essigsäureanhydrid zu den flüchtigen Alditolacetaten umgesetzt werden, ohne daß Borat vorher entfernt werden muß (BLAKENEY et al., 1983). Nach Zerstörung überschüssigen Essigsäureanhydrids mit Wasser wurden die Alditolacetate mit Chloroform extrahiert.

Die genaue Arbeitsvorschrift kann Kapitel 5.3.1.3 entnommen werden.

2.2.3.2 Gaschromatographische Trennung und Bestimmung der Alditolacetate

Ein Temperaturprogramm zur gaschromatographischen Trennung der aus Fucose, Rhamnose, Arabinose, Xylose, Galaktose, Mannose, Glucose, Erythrit und *myo*-Inosit entstehenden Alditolacetate auf einer HP-5 Kapillarsäule mit on-column-Injektion wurde entwickelt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors. Die Identifizierung der Alditolacetate wurde anhand der relativen Retentionszeiten, bezogen auf *myo*-Inosit und Erythrit, durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde die Methode des internen Standards verwendet.

Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Kapitel 5.1.1.1, die relativen Retentionszeiten, Korrekturfaktoren, Nachweisgrenzen und der Bereich für den linearen Detektorresponse Kapitel 5.4.1 zu entnehmen. Ein Standardchromatogramm ist in Kapitel 5.5.1 (Abb. 52) abgebildet.

2.2.4 Synthese phenolischer Standardsubstanzen

2.2.4.1 Isomerisierung von *trans*-Ferulasäure und *trans-p*-Cumarsäure zu den entsprechenden *cis*-Isomeren

Die aus der Biosynthese folgenden Isomeren von FS und pCS sind *trans*-FS und *trans-p*CS. Durch Lichteinfluß kann bereits in der Pflanze (YAMAMOTO & TOWERS, 1985), aber auch während der Analytik der phenolischen Säuren eine *trans-cis*-Isomerisierung stattfinden. Entsprechende Maßnahmen zur Minimierung des Lichteinflusses während der Analytik sollten aus diesem Grunde getroffen werden.

Im Gegensatz zu ihren *trans*-Isomeren sind *cis*-FS und *cis-p*CS nicht käuflich zu erwerben. Die Isomerisierung ist abhängig von der zu isomerisierenden PCS, dem Lösungsmittel und der Belichtungsdauer (HARTLEY & JONES, 1975). HARTLEY & JONES (1975) verwendeten Methanol, WALDRON et al. (1996) verdünnte Ammoniaklösung und PACKERT (1993) Ethylacetat als Lösungsmittel. Um eine optimale Ausbeute an *cis*-Isomeren zu erreichen, wurden für die Isomerisierung von *trans*-FS und *trans-p*CS drei unterschiedliche Lösungsmittel (Methanol, Methanol/Wasser:50/50 (v/v) und 0,5 M Ammoniaklösung) bei unterschiedlichen Belichtungszeiten getestet (2 und 4 h). Die Belichtung erfolgte mit einem UV-Strahler in einem Rundkolben. Das Isomerenverhältnis wurde nach flüssigchromatographischer Trennung und UV-Detektion bei 325 nm und 280 nm (s. Kapitel 2.3.7) bestimmt.

In allen Lösungsmitteln war der Anteil an beiden *cis*-Isomeren nach 4 h größer als nach 2 h. Für die Isomerisierung von *trans*-FS stellte sich Methanol als optimales Lösungsmittel heraus, für die Isomerisierung von *trans-p*CS 0,5 M Ammoniaklösung. Durch Verlängerung der Bestrahlungszeiten konnten nach 14 h Belichtung 46 % *cis*-FS und 83 % *cis-p*CS hergestellt werden. Weitere Verlängerung der Bestrahlungszeit beeinflusste das Isomerenverhältnis nicht mehr.

Die genaue Durchführung der optimierten Isomerisierung ist in Kapitel 5.3.1.4 beschrieben.

2.2.4.2 Synthese radikalisch gekoppelter Dehydrodiferulasäuren

Synthese von 5-5'-Dehydrodiferulasäure

Die direkte radikalische Umsetzung von FS oder Ferulasäureestern zu 5-5'-gekoppelten Dimerisierungsprodukten ist nicht möglich. Dies gilt allgemein für 4-OH-Phenylpropane mit ungesättigter Seitenkette (QUIDEAU, 1994). Da die Umsetzung von 4-OH-Phenylpropanen mit gesättigter Seitenkette oder einfachen Phenolen wie Vanillin zu 5-5'-gebundenen Strukturen möglich ist, erfolgte die Synthese von 5-5'-DFS ((*E,E*)-4,4'-Dihydroxy-5,5'-dimethoxy-3,3'-dizimtsäure) (Abb. 17) über einen Umweg. Nach enzymatischer Oxidation von Vanillin zu 5-5'-gebundenem Dehydrovanillin (BAUMGARTNER & NEUKOM, 1972) wurde dieses in einer KNOEVENAGEL-Reaktion mit Malonsäure zu 5-5'-DFS umgesetzt. Die Reinigung des Reaktionsgemisches erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (DC).

Die genaue Synthesevorschrift ist Anhang 5.3.1.5 zu entnehmen.

Synthese der 8-5'-Dehydrodiferulasäuren

Die Synthese der 8-5'-Dehydrodiferulasäuren wurde gemeinsam mit unseren Kooperationspartnern vom U.S. DFRC durchgeführt. Die Synthese wurde von unseren Kooperationspartnern entwickelt und publiziert (RALPH et al., 1994, RALPH et al., 1998).

FS wurde mit ethanolischer HCl (Erzeugung von HCl aus Acetylchlorid und absoluten Ethanol) zu Ferulasäureethylester umgesetzt. Die Umsetzung des Ferulasäureethylesters zu dem 2,3-Dehydrobenzofuran-Dimer erfolgte in einem gepufferten System mit H₂O₂ und Peroxidase (Abb. 10). Das Rohprodukt fiel aus der Lösung aus und wurde abgesaugt. Die Reinigung des Rohprodukts wurde mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel durchgeführt.

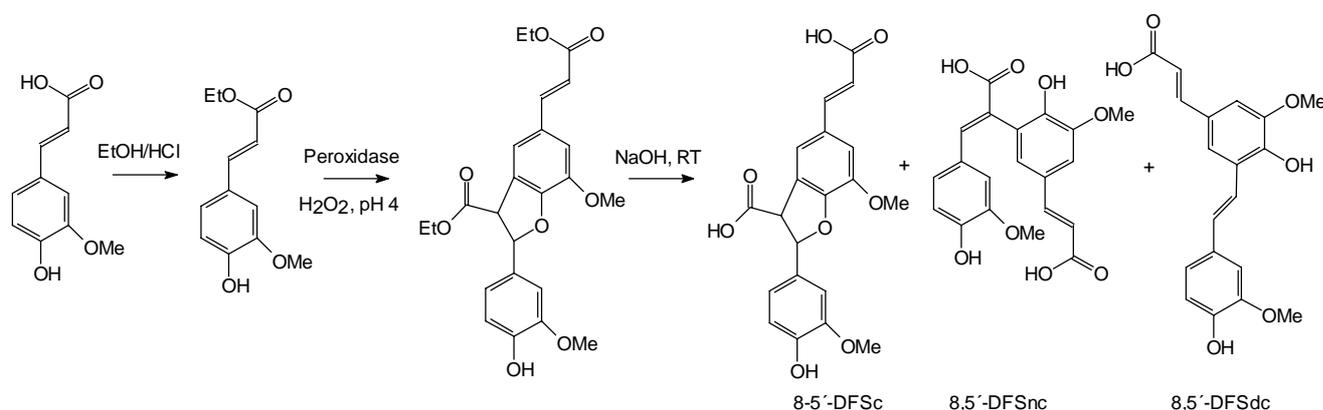


Abbildung 10: Syntheschema der 8-5'-gekoppelten Dehydrodiferulasäuren

Das 2,3-Dehydrobenzofuran-Dimer wurde verseift, und mit Ethylacetat wurden die benzofurane Form der 8-5'-Dehydrodiferulasäuren (8-5'-DFSc, *trans*-5-[(*E*)-2-Carboxyvinyl]-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzofuran-3-carbonsäure), die offene Form der 8-5'-Dehydrodiferulasäuren (8-5'-DFSnc, (*E,E*)-4,4'-Dihydroxy-3,5'-dimethoxy- β ,3'-dizimtsäure) und die decarboxylierte Form der 8-5'-Dehydrodiferulasäuren (8-5'-DFSdc, (*E*)-4-Hydroxy-3-{2-[(*E*)-4-hydroxy-3-methoxystyryl]}-5-methoxyzimtsäure) (Abb. 10 und Abb. 17) aus der angesäuerten Hydrolyselösung extrahiert. Die Isolierung erfolgte mittels präparativer DC.

Die Synthesevorschrift gemäß RALPH et al. (1994) und RALPH et al. (1998) ist in Anhang 5.3.1.6 beschrieben.

Synthesen der 8-O-4'-, 4-O-5'- und 8-8'-gekoppelten Diferulasäuren

Diese Synthesen wurden von unseren Kooperationspartnern vom U.S. DFRC durchgeführt (RALPH et al., 1994). Die 8-O-4'-Dehydrodiferulasäure (8-O-4'-DFS, (*Z*)- β -{4-[(*E*)-2-Carboxyvinyl]-2-methoxyphenoxy}-4-hydroxy-3-methoxyzimtsäure) (Abb. 17), die 4-O-5'-Dehydrodiferulasäure (4-O-5'-DFS, (*E*)-3-{4-[(*E*)-2-Carboxyvinyl]-2-methoxyphenoxy}-4-hydroxy-5-methoxyzimtsäure) (Abb. 17), die offene Form der 8-8'-Dehydrodiferulasäuren (8-8'-DFSnc, 4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy- β , β '-dizimtsäure) (Abb. 17) und die aryltetraline Form der 8-8'-Dehydrodiferulasäuren (8-8'-DFSc, *trans*-7-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-methoxy-1,2-dihydronaphtalin-2,3-dicarbonsäure) (Abb. 17) wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.4.3 Isomerisierung radikalisch gekoppelter Dehydrodiferulasäuren

Zur Herstellung von *cis*-Isomeren einiger DFS wurden 8-8'-DFSnc, 8-O-4'-DFS, 5-5'-DFS sowie eine Mischung der 8-5'-gekoppelten DFS jeweils in Methanol gelöst und 10 h auf einer UV-Lampe mit der Wellenlänge 254 nm bestrahlt.

2.2.4.4 Synthese radikalisch gekoppelter Dehydrodisinapinsäuren

Nach vorläufiger massenspektrometrischer Identifizierung zweier Dehydrodisinapinsäuren wurden vom U.S. DFRC Synthesen für die vorgeschlagenen Substanzen entwickelt. Die Synthesen wurden bislang nicht publiziert, so daß die Synthesewege hier kurz skizziert sind.

Synthese der cyclischen Form 8-8'-gekoppelter Dehydrodisinapinsäure

Zur Herstellung von Sinapinsäuremethylester wurde SA in MeOH gelöst, langsam mit Acetylchlorid versetzt und die Mischung 16 h gerührt. Die radikalische Kopplung wurde durch Zugabe von Wasser und FeCl₃*6H₂O erreicht. Die Umsatzkontrolle erfolgte mittels DC. Nach 48 h wurde MeOH teilweise entfernt und der Reaktionsansatz in Ethylacetat gegeben. Die organische Phase wurde mit 3 % HCl und NH₄Cl-Lösung gewaschen und das erhaltene Rohprodukt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (CHCl₃:EtOAc, 5:1 als Eluent) gereinigt. Der Methylester der cyclischen Form der 8-8'-gekoppelten Dehydrodisinapinsäure wurde in 54 % Ausbeute gewonnen. Nach Durchführung der in Kapitel 5.3.1.6 beschriebenen Verseifung wurde die freie Säure erhalten (8-8'-DSSc, *trans*-7-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-6,8-dimethoxy-1,2-dihydronaphtalin-2,3-dicarbonsäure) (Abb. 29). ¹H-NMR des Methylesters: δ 3,60 (3H, s, RCOOCH₃), 3,62 (3H, s, B3-OCH₃), 3,68 (6H, s, A3/5-OCH₃), 3,68 (3H, s, RCOOCH₃), 3,88 (3H, s, B5-OCH₃), 4,02 (1H, s, A-H8), 5,00 (1H, s, A-H7), 6,36 (2H, s, A-H2/6), 6,96 (1H, s, B-H2), 7,66 (1H, s, B-H7); ¹³C-NMR des Methylesters: δ 40,25 (B-C7), 47,46 (A-C8), 56,58 (B5-OCH₃), 56,64 (A3/5-OCH₃), 60,43 (B3-OCH₃), 106,10 (A-C2/6), 108,95 (B-C2), 123,30 (B-C6), 123,92 (B-C1), 124,59 (B-C8), 134,20 (A-C1), 135,79 (A-C4), 138,43 (B-C7), 142,83 (B-C4), 146,36 (B-C3), 148,49 (A-C3/5), 148,59 (B-C5), 167,46 (B-C9), 172,79 (A-C9).

Synthese der offenen Form 8-8'-gekoppelter Dehydrodisinapinsäure

Sinapinsäureethylester (Herstellung analog zum Ferulasäureethylester in Kapitel 2.2.4.2) wurde in Pyridin gelöst, und Mn(OAc)₃*2H₂O wurde langsam hinzugefügt. Nach 20 min wurde der größte Teil des Lösungsmittels durch Co-Evaporation mit Toluol entfernt. Das Produkt wurde mittels Ethylacetat extrahiert, und zur Entfernung der Mangansalze wurde die organische Phase mit NaCl/Na₂SO₃ gewaschen. Durch Verseifung des Ethylesters der offenen Form der 8-8'-gekoppelten Dehydrodisinapinsäure entsprechend Kapitel 5.3.1.6 wurde die Säure freigesetzt (8-8'-DSSnc, 4,4'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetramethoxy-β,β'-dizimtsäure) (Abb. 29). ¹H-NMR des Ethylesters: δ 1,11 (6H, t, CH₃-CH₂-), 3,75 (12H, s, -OCH₃), 4,12 (4H, q, CH₃-CH₂-), 6,95 (4H, s, H2/6), 7,81 (2H, s, H7); ¹³C-NMR des Ethylesters: δ 14,5 (CH₃-CH₂-), 56,5 (-OCH₃), 61,3 (CH₃-CH₂-), 108,7 (C2,6), 126,1 (C8), 126,6 (C1), 138,9 (C4), 142,6 (C7), 148,6 (C3,5), 167,6 (C9).

2.2.4.5 Synthese 4-O-β- und 8-β-gekoppelter Kreuzprodukte

Das U.S. DFRC hat mehrere mögliche Kreuzprodukte zwischen FS, pCS und SA als Phenolcarbonsäurekomponente und Coniferylalkohol und Sinapylalkohol als Monolignolkomponente synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert (HELM & RALPH, 1992, RALPH et al., 1992b). Des weiteren konnten sie einige Kreuzprodukte präparativ aus Pflanzenmaterial isolieren und identifizieren. Nach vorläufiger massenspektrometrischer Identifizierung von Kreuzprodukten im Untersu-

chungsmaterial wurden uns freundlicherweise folgende Substanzen zur Absicherung der Identifizierung zur Verfügung gestellt: a) eine Mischung der *threo*- und *erythro*-Stereoisomeren von einem 4-*O*- β -gekoppelten-Coniferylalkohol-Ferulasäureether (*threo/erythro*-4-*O*- β -CFE, (E)-4-[2-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(hydroxymethyl)ethyl]ferulasäure) (Abb. 30), Synthese gemäß HELM & RALPH (1992); b) eine Mischung zweier stereoisomerer 8- β -gekoppelter Coniferylalkohol-Ferulasäure-Kreuzprodukte mit Pinoresinolstruktur (MEL (von Monoepoxygignanolid), 4,8-*exo*-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-2-on und *iso*-MEL, 4-*endo*-8-*exo*-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octan-2-on) (Abb. 30), Synthese gemäß RALPH et al. (1992b); c) eine Mischung zweier stereoisomerer 8- β -gekoppelter Coniferylalkohol-Ferulasäure-Kreuzprodukte mit Tetrahydrofuranstruktur (8- β -THF-CF) (Abb. 30). Bei den beiden Stereoisomeren der 8- β -THF-CF handelt es sich wahrscheinlich um die *threo*- und *erythro*-Formen. Die 8- β -THF-CF Kreuzprodukte wurden nicht synthetisiert, sondern präparativ isoliert. Da die Isolierung und Identifizierung nicht publiziert sind, sollen sie hier kurz skizziert werden:

Pflanzenzellwände zur Isolierung der Kreuzprodukte wurden aus Maiszellkulturen gewonnen. Die Zellkulturen wurden mit [$^{13}\text{C}_9$]-markiertem Phenylalanin ernährt. Dadurch sind ca. 40 % der Ferulasäuremoleküle in den Zellwänden ^{13}C -markiert. Die Zellwände wurden durch Zugabe von Coniferylalkohol lignifiziert. H_2O_2 wurde aus Glucose und Glucoseoxidase generiert, als Peroxidase wurde nur die zellwandgebundene Peroxidase genutzt. Die gemahlene Zellwände wurden bei Raumtemperatur mit 2 M NaOH verseift. Aus dem Hydrolysat konnten mittels präparativer DC auf Kieselgel unter Verwendung des Laufmittels Ethylacetat:Chloroform:Essigsäure 6:3:1 verschiedene Kreuzprodukte von anderen phenolischen Substanzen getrennt werden. Durch ein weiteres präparatives DC-System (Kieselgel, Laufmittel Ethylacetat:Chloroform:Essigsäure 6:5:1) konnten zwei Stereoisomere von 8- β -THF-CF isoliert werden. Die Identifizierung erfolgte mittels ein- und zweidimensionaler (^1H , ^{13}C , total correlated spectroscopy (TOCSY), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)) NMR-Methoden.

Des Weiteren wurden die unter a) beschriebenen *trans-threo/erythro*-4-*O*- β -CFE durch Belichtung mit UV-Licht in Methanol teilweise in die entsprechenden *cis*-Isomeren umgesetzt.

2.2.4.6 Synthese des internen Standards (monomethoxylierte 5-5'-Dehydrodiferulasäure)

Monomethoxylierte 5-5'-Dehydrodiferulasäure (5-5'-Me-DFS, (*E,E*)-4-Hydroxy-4',5,5'-trimethoxy-3,3'-dizimtsäure) (Abb. 19) wurde von unseren Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. 5-5'-Me-DFS wurde durch Methylierung von 5-5'-Dehydrodiferulasäurediethylester mit Dimethylsulfat, anschließender Reinigung des Reaktionsansatzes mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel und Verseifung mit 2 M NaOH bei Raumtemperatur hergestellt. Die 5-5'-Me-DFS wurde durch Extraktion mit Diethylether aus dem angesäuerten Hydrolyseansatz gewonnen.

2.2.5 Identifizierung estergebundener monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren sowie estergebundener Kreuzprodukte

2.2.5.1 Hydrolyse und Extraktion

Hydrolyse

Die Esterbindung ist die einzige bisher beschriebene Bindung zwischen PCS und Zellwandpolysacchariden. Die theoretisch mögliche Etherbindung konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Zur Spaltung von Esterbindungen können sowohl alkalische als auch saure Hydrolysen eingesetzt werden. Die quantitative Erfassung der esterartig gebundenen PCS nach enzymatischer Hydrolyse mit Esterasen ist aufgrund der Enzymspezifitäten kritisch zu beurteilen. In der Praxis hat sich die alkalische Hydrolyse durchgesetzt. Variabel ist vor allem die Konzentration der Lauge und die Hydrolysezeit. So führten z.B. WALDRON et al. (1996) eine sequentielle Hydrolyse von Zellwandmaterial durch: 0,1 M NaOH für 1 h, 0,1 M NaOH für 24 h, 1 M NaOH für 24 h und 2 M für 24 h. PACKERT (1993) und RENGER & STEINHART (2000) hydrolysierten mit 1 M NaOH für 24 h und RALPH et al. (1994), SAULNIER et al. (1999) und ANDREASEN et al. (2000) mit 2 M NaOH für Zeiträume zwischen 1 h und 24 h. Da aus den Synthesen der DFS bekannt war, daß einige Dehydrodiferulasäureethylester sehr resistent gegenüber der alkalischen Hydrolyse sind, wurde bei diesen Untersuchungen eine Hydrolyse mit 2 M NaOH für 18 h bei Raumtemperatur angewendet. Um Oxidationsprozesse zu vermeiden, fand die Hydrolyse unter Stickstoffatmosphäre statt. Um lichtbedingte Isomerisierungen möglichst gering zu halten, wurde unter Lichtausschluß hydrolysiert.

Extraktion

Die einfachste Extraktionsmethode ist die flüssig-flüssig-Extraktion der PCS aus dem angesäuerten Hydrolyseansatz mit einem unpolaren, organischen Lösungsmittel. Als organisches Lösungsmittel bieten sich z.B. Ethylacetat oder Diethylether an. Es sind einige clean-up-Verfahren zur Reinigung des Extraktes wie Festphasen-Extraktion (RENGER & STEINHART, 2000) oder flüssig-flüssig-Extraktion mit Natriumhydrogencarbonatlösung (PACKERT, 1993) beschrieben worden. Bei Verwendung der hier geschilderten gaschromatographischen Bedingungen ist ein weiteres clean-up jedoch nicht erforderlich. So wurde die Extraktion, wie von RALPH et al. (1994) beschrieben, mit Diethylether ohne weitere Reinigungsschritte durchgeführt.

Die genauen Durchführungsbedingungen für die Hydrolyse und die Extraktion sind in Kapitel 5.3.1.7 aufgeführt.

2.2.5.2 Gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Identifizierung der Phenolcarbonsäuren und der Kreuzprodukte

Zur gaschromatographischen Trennung der PCS und der Kreuzprodukte müssen diese zur Erhöhung der Flüchtigkeit derivatisiert werden. Die einfachste und gebräuchlichste Art der Derivatisierung von PCS ist die Trimethylsilylierung (LETHONEN & KETOLA, 1986, RALPH et al., 1994, PACKERT & STEINHART, 1995, RENGER & STEINHART, 2000). Als Silylierungsreagenz findet *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) breite Verwendung. Zur Silylierung wird BSTFA allein oder zur Steigerung der Silylierungskraft in Kombination mit Trimethylchlorsilan oder Pyridin eingesetzt. In dieser Arbeit wird die Silylierung gemäß der Arbeitsvorschrift von RALPH et al. (1994) mit BSTFA und Pyridin bei 60 °C durchgeführt (s. Kapitel 5.3.1.7).

Die Trennung der trimethylsilylierten (TMS) PCS und Kreuzprodukte erfolgte an einer unpolaren DB-1 Kapillarsäule mit einem gegenüber dem in RALPH et al. (1994) beschriebenen leicht veränderten Temperaturprogramm.

Zur Identifizierung der TMS-Derivate wurde die massenspektrometrische Detektion mit Elektronenstoßionisation eingesetzt. Im Laufe der Arbeit wurden zwei GC-MS-Systeme genutzt, die sich v.a. in der Art der Ionentrennung unterschieden. Das erste GC-MS-System arbeitete mit einem Quadrupol-Massenspektrometer als Detektor, wohingegen im zweiten System ein Ion-Trap-Massenspektrometer integriert war. Da das erste System nach Defekt ausfiel, mußte auf dem Ion-

Trap-System weitergearbeitet werden. Die aus den beiden Systemen gelieferten Massenspektren unterschieden sich v.a. in der Intensität der gebildeten Ionen. Demzufolge ist bei Abbildungen immer der Hinweis enthalten, mit welchem Massenspektrometer die Detektion erfolgte.

Die Identifizierung der TMS-Derivate erfolgte aufgrund ihrer Massenspektren bzw. Ionenspuren im Vergleich mit den unter Kapitel 2.2.4 beschriebenen Standardsubstanzen und den relativen Retentionszeiten bezogen auf die internen Standardsubstanzen (IS) *o*-Cumarsäure (*o*CS) (für monomere PCS) und 5-5'-Me-DFS (für dimere PCS und Kreuzprodukte).

Die Identifizierung der TMS-Derivate aus den UBS erfolgte anhand der gesamten Massenspektren (m/z 45 - 800 bzw. 50 - 1000). Die Konzentrationen der aus den LBS hervorgehenden TMS-Derivate waren hingegen so gering, daß trotz reduziertem Split beim Aufgabesystem die Detektion mit dem Quadrupolgerät nur im Selected-Ion-Monitoring (SIM)-Modus durchgeführt werden konnte. Die Identifizierung konnte daher nur an ausgewählten Ionen erfolgen. Bei Verwendung eines Ion-Trap-Massenspektrometers kann durch den SIM-Modus keine Verbesserung der Empfindlichkeit erzielt werden. Das eingesetzte Gerät war jedoch in seiner Empfindlichkeit deutlich besser als das verwendete Quadrupolgerät, so daß die TMS-Derivate aus den LBS auch hier anhand der gesamten Spektren identifiziert werden konnten.

Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Kapitel 5.1.1.2, die relativen Retentionszeiten Kapitel 5.4.2 und die Massenspektren der DFS- und FS-Monolignol-Standardsubstanzen Kapitel 5.5.2, Abbildungen 59 und 60 zu entnehmen.

2.2.6 Quantifizierung estergebundener monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren

Zur Quantifizierung der PCS wurden die Hydrolyse, die Extraktion und die Silylierung wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die internen Standardsubstanzen *o*CS und 5-5'-Me-DFS wurden den Proben vor der Hydrolyse zugefügt.

Die gaschromatographischen Bedingungen (Säule, Temperaturprogramm, Injektor) entsprachen den unter Kapitel 2.2.5 dargestellten Bedingungen. Die Detektion hingegen erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors. Zur Auswertung wurde die Methode des internen Standards angewendet. Die das Responseverhältnis repräsentierenden Korrekturfaktoren wurden für die monomeren PCS auf den internen Standard *o*CS bezogen, die für die dimeren PCS auf den internen Standard 5-5'-Me-DFS. Da nur sehr geringe Mengen der Standardsubstanz von 4-*O*-5'-DFS zur Verfügung standen, konnte kein Korrekturfaktor bestimmt werden. Für quantitative Bestimmungen wurde dieser gleich 1,0 gesetzt.

Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind in Kapitel 5.1.1.3, die Korrekturfaktoren in Kapitel 5.4.2 dargestellt.

Abbildung 11 zeigt schematisch das analytische Vorgehen zur Identifizierung und Quantifizierung von PCS, zur Identifizierung von Kreuzprodukten sowie zur Bestimmung von Polysaccharidverknüpfungsgraden.

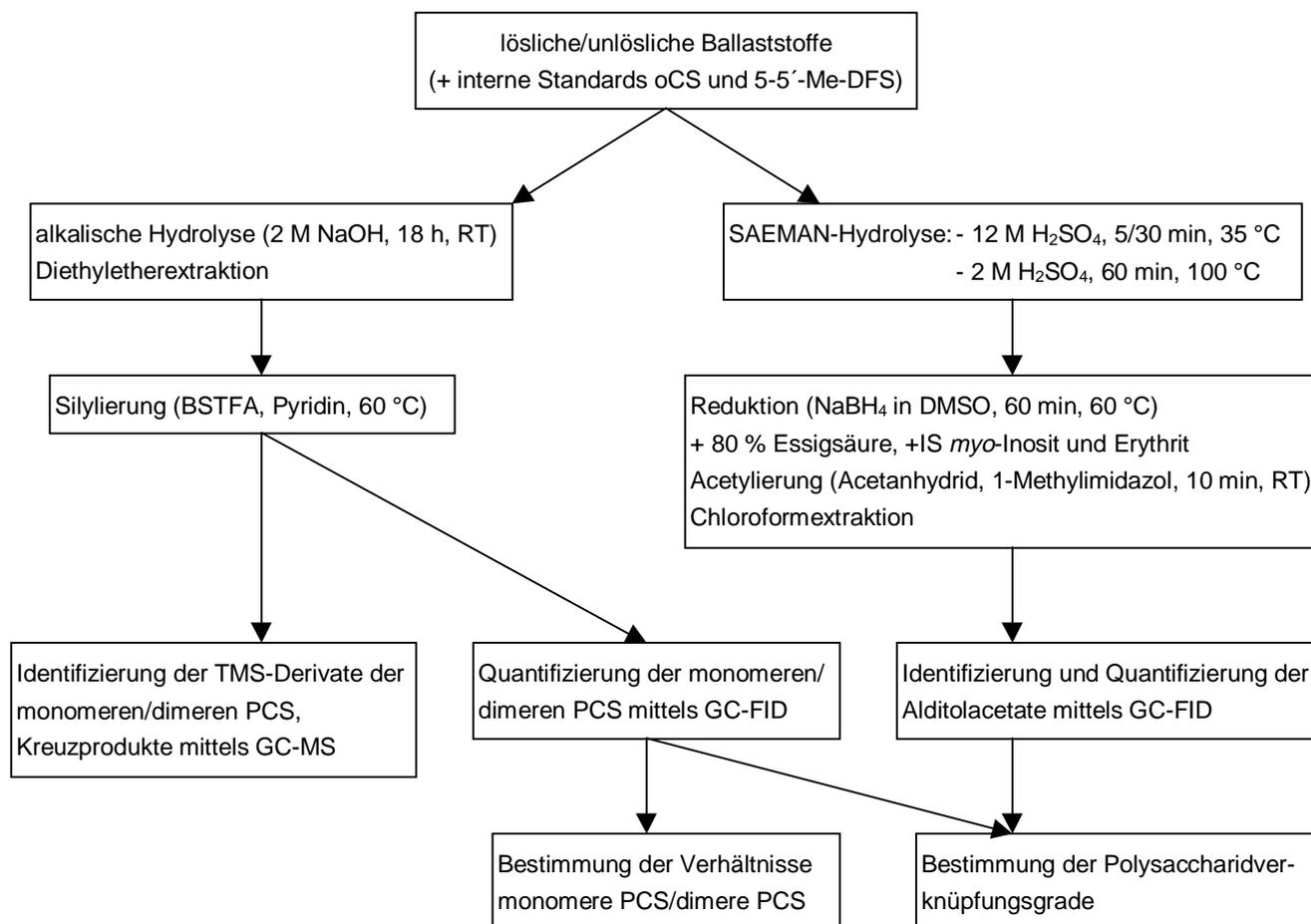


Abbildung 11: Schematische Darstellung des analytischen Vorgehens zur Bestimmung phenolischer Verbindungen und von Kohlenhydratkomponenten in Ballaststoffen

2.3 Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Verbindungen aus unlöslichen Ballaststoffen

2.3.1 Isolierung von unlöslichen Ballaststoffen

Die Isolierung von UBS wurde wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz die UBS aus 15 g Roggen- bzw. Wildreismehl gewonnen.

2.3.2 Hydrolyse der Ballaststoffe

Die Bindung zwischen PCS und Zellwandpolysacchariden kann durch die Analyse von löslichen, niedermolekularen PCS-Kohlenhydrat-Verbindungen bestimmt werden (ISHII, 1997). Dafür sind Methoden zur Hydrolyse der BS notwendig, die die glykosidischen Bindungen spalten, jedoch die Bindungen zwischen den PCS und den Polysacchariden, insbesondere die empfindlichen Esterbindungen, erhalten. Zur Spaltung der glykosidischen Bindungen können saure oder enzymatische Hydrolysemethoden angewendet werden. Besonders bei der sauren Hydrolyse müssen die Bedingungen so gewählt werden, daß keine Esterspaltungen auftreten, aber auch bei der enzymatischen Hydrolyse muß darauf geachtet werden, daß die verwendeten Enzyme keine Esteraseaktivitäten aufweisen. Da diese Hydrolysen zu unterschiedlichen Spaltprodukten führen (ISHII, 1997), wurden beide Hydrolysemethoden angewendet.

2.3.2.1 Enzymatische Hydrolyse von Ballaststoffen

Die verwendeten Enzyme sollten unterschiedliche Arten von glykosidischen Bindungen spalten, um die Bindung von PCS an möglichst viele verschiedene Zellwandpolysaccharide untersuchen zu können. In der Literatur werden unterschiedliche Enzympräparate eingesetzt. Oft werden aus *Trichoderma viride* gewonnene, als „Cellulase“ bezeichnete Mischungen unterschiedlicher Polysaccharidhydrolasen angewendet (TANNER & MORRISON, 1983, KATO et al., 1987, AZUMA et al., 1990). Häufiger findet jedoch noch das aus Basidiomyceten isolierte Enzymgemisch Driselase Verwendung (u.a. HARTLEY et al., 1990, BORNEMANN et al., 1990, ISHII, 1991a/b, ISHII, 1994, HIMMELSBACH et al., 1994, RALET et al., 1994). Driselase enthält verschiedene Endo- und Exocarbohydrasen inklusive Arabinanase, Cellulase, Xylanase, Galaktanase und Polygalakturonase (RALET et al., 1994). Des Weiteren erfüllt Driselase die oben genannten Voraussetzungen, indem sie keine Esterase-Aktivität aufweist (BORNEMANN et al., 1990, RALET et al., 1994). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die kommerziell erhältliche Driselase zur enzymatischen Hydrolyse eingesetzt. In den beschriebenen Arbeiten wird Driselase unter verschiedenen Bedingungen eingesetzt. Variabel sind die Parameter Enzym/Substrat-Verhältnis, Reaktionsdauer, Reaktionstemperatur sowie Art des Lösungsmittels und Substrat/Lösungsmittel-Verhältnis. Die enzymatische Hydrolyse der UBS fand 48 h bei 37 °C in demineralisiertem Wasser bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:10 (w/w) und einem Substrat/Lösungsmittel-Verhältnis von 1/90 (w/v) statt.

Den genauen Arbeitsablauf gibt Anhang 5.3.2.1 wieder.

2.3.2.2 Saure Hydrolyse von Ballaststoffen

Bei der sauren Hydrolyse müssen die Hydrolysebedingungen sorgfältig eingehalten werden, um eine Spaltung der glykosidischen Bindungen unter Erhalt der Esterbindungen zu erreichen. Zur sauren Hydrolyse wird vor allem der Einsatz von Trifluoressigsäure (TFA) (u.a. COLQUHOUN et al., 1994, SAULNIER et al., 1995, WENDE & FRY, 1997a/b, SAULNIER et al., 1999) und von Oxalsäure beschrieben (KATO & NEVINS, 1985, OHTA et al., 1994, WALLACE et al., 1995, SAULNIER et al., 1995). SAULNIER et al. (1995) optimierten die Einsatzbedingungen von TFA und Oxalsäure für die Hydrolyse von Maiskleie. Optimale Ergebnisse (maximale Spaltung von glykosidischen Bindungen bei minimaler Esterspaltung) erhielten sie bei Verwendung von 50 mM TFA und einer Reaktionsdauer von 2 oder 3 h bei 100 °C oder bei Verwendung von 32 mM Oxalsäure bei einer Reaktionstemperatur von 100 °C für 3 oder 4 h. In Anlehnung an diese Optimierung wurde die saure Hydrolyse der BS mit 50 mM TFA bei 100 °C für 3 h durchgeführt.

Die genaue Beschreibung der sauren Hydrolyse ist dem Anhang 5.3.2.2 zu entnehmen.

2.3.2.3 Bestimmung der Anteile freigesetzter monomerer Phenolcarbonsäuren

Zur Beurteilung der Hydrolysemethoden und um eventuelle Rückschlüsse auf die Bindungsarten zu ziehen, wurden die monomeren PCS in den zu hydrolysierenden BS und in den Hydrolyserückständen bestimmt. Die Bestimmungen erfolgten gemäß Kapitel 2.2.5. Zusätzlich wurde das enzymatische Hydrolysat aus unlöslichen Wildreisballaststoffen auf monomere PCS gemäß Kapitel 2.3.7 untersucht.

2.3.3 Reinigung der Hydrolysate

Die Hydrolysate müssen vor der gelchromatographischen Trennung von störenden Begleitsubstanzen befreit werden. Dazu gehören z.B. bei der Hydrolyse freigesetzte Mono- und Oligosaccharide. Je nach verwendeter stationärer Phase in der GPC (z.B. bei nur nach Molekülgröße trennenden stationären Phasen) können diese zusammen mit den PCS-Oligosacchariden eluieren. In jedem Fall erhöhen Mono- und Oligosaccharide die Viskosität der zu injizierenden Lösung, was zu unerwünschten Druckanstiegen auf der GPC-Säule nach der Injektion führen würde. Da man für schwierige Trennungen mittels GPC ein Verhältnis von Gel- zu Aufgabevolumen von 25 – 100 einhalten sollte, sind die Probelösungen auch nicht beliebig zu verdünnen, um eine geringere Viskosität einzustellen. Des Weiteren entstehen bei der sauren Hydrolyse Karamelisierungsprodukte, die auf den GPC-Säulen verbleiben, erst während mehrerer Läufe unreproduzierbar eluieren und die getrennten Fraktionen verunreinigen. Dasselbe Problem stellt sich bei Verwendung von Säulenmaterialien, die nicht nur nach Molekülgröße trennen, sondern die Stoffe auch aufgrund reversibler Adsorption retardieren. Bei der Elution mit Wasser verbleiben hydrophobere Stoffe auf der Säule und eluieren über mehrere Läufe.

Die Reinigung des Hydrolysats wurde an einer mit Amberlite XAD-2 gefüllten Säule durchgeführt. Amberlite XAD-2 ist ein polymeres Adsorbens, das v.a. aromatische Verbindungen bindet. Mit Wasser sollten Mono- und Oligosaccharide, mit Wasser:Methanol 50:50 PCS-Oligosaccharide und mit Methanol freie PCS sowie sonstige unpolarere, phenolische Verbindungen eluiert werden.

Die genaue Durchführung der Reinigung an Amberlite XAD-2 ist Anhang 5.3.2.3 zu entnehmen. Zur Überprüfung des Reinigungsschrittes wurden die Eluate auf monomere PCS untersucht. Dazu wurden die in Kapitel 2.3.7 beschriebene Probenvorbereitung und HPLC-Bestimmung genutzt.

2.3.4 Gelchromatographische Fraktionierung der Hydrolysate

Die GPC ist eine leistungsfähige, sehr schonende Trenntechnik, die überwiegend zur Trennung hochmolekularer Stoffe nach Molekülgröße eingesetzt wird. Säulenpackungen für die GPC bestehen typischerweise aus Polymeren, die ein Netzwerk aus gleichmäßigen Poren enthalten, in die gelöste Moleküle sowie Moleküle des Lösungsmittels hineindiffundieren können. Die durchschnittliche Aufenthaltszeit in den Poren hängt von der effektiven Größe der Analytmoleküle ab. Moleküle, die größer sind als die durchschnittliche Porengröße der Packung, werden ausgeschlossen und nicht retardiert. Sehr kleine Moleküle können in das ganze Porenlabyrinth eindringen und werden am längsten zurückgehalten. Zwischen diesen beiden Extremen liegen Moleküle mittlerer Größe, deren Retention in den Poren von ihrem Durchmesser abhängt. Innerhalb dieser Gruppe erfolgt eine Fraktionierung, die in direkter Beziehung zur Molekülgröße und zur Molekülform steht. Bei den meisten Trennproblemen werden große Anstrengungen unternommen, chemische oder physikalische Wechselwirkungen zwischen Analytmolekülen und Gelfüllung zu vermeiden, um eine Trennung rein nach Molekülgröße zu erhalten. In Spezialfällen können solche Affinitäten jedoch für bessere Trennungen ausgenutzt werden.

Zur Trennung von PCS-Oligosacchariden werden in der Literatur überwiegend zwei Säulenmaterialien beschrieben: Biogele unterschiedlicher Porengröße (u.a. SHIBUYA, 1984, FORD, 1989, RALET et al., 1994, KROON et al., 1997a) und Sephadex LH-20 (u.a. AZUMA et al., 1990, BORNEMANN et al., 1990, ISHII, 1991b, SAULNIER et al., 1995, KROON et al., 1997a, SAULNIER et al., 1999). Bei den Biogelen handelt es sich um Polyacrylamidgele, bei Sephadex LH-20 um ein modifiziertes Dextrangel (Umsetzung mit aliphatischen Epoxiden zu Hydroxyalkylethern).

Biogel P-2 mit einem Trennbereich von 100 – 1800 Dalton wurde in Kombination mit Wasser als Eluent für die Fraktionierung der Hydrolysate getestet. Biogel P-2 sollte theoretisch strikt nach Molekülgröße trennen. In eigenen Untersuchungen wurden jedoch geringfügige Wechselwirkungen mit phenolischen Substanzen beobachtet. Die mit Biogel P-2 erzielten Trennungen waren nicht ausreichend. Es mußten Nachfraktionierungen an Sephadex LH-20 (Trennbereich 100 – 5000 Dalton) durchgeführt werden. Diese Kombination lieferte keine besseren Ergebnisse als die alleinige Anwendung von Sephadex LH-20 als Gelmatrix. Aus diesem Grunde wurde die Gelfiltration an Sephadex LH-20 als Routinefraktionierung angewendet und soll im folgenden genauer beschrieben werden.

Wie bereits angedeutet, können auch Affinitäten der gelösten Stoffe zu bestimmten Gelphasen zur Trennung genutzt werden. Durch Adsorption und van der Waals'sche Kraftwirkungen zwischen den gelösten Molekülen und der Gelphase kann sich eine gelöste Substanz länger im Gelkorn aufhalten, als es ihr im Diffusionsgleichgewicht mit dem strömenden Lösungsmittel zukommt. In diesem Fall kann man durch entsprechende Wahl des Eluenten die Trennung nach Molekülgröße vollständig unterdrücken (Trennung ohne Größenunterschiede) oder als Trennergebnis eine Kombination aus den Regeln der Gelchromatographie und der Affinität zur Gelphase erhalten. Sephadex LH-20 hat eine besonders starke Affinität zu Phenolgruppierungen. Durch Anwendung organischer Lösungsmittel ist eine rein gelchromatographische Trennung zu erreichen, aber mit der hier angewendeten Elution mit Wasser erhält man eine Trennung nach den kombinierten Mechanismen. Diese führte bei der Anwendung auf die Hydrolysate zu sehr guten Trennungen, die allerdings sehr viel Zeit (bis zu 60 h) benötigen.

Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektors bei 325 und/oder 280 nm. Zur Kalibrierung mittels Dextrinen wurde ein Brechungsindex (RI)-Detektor integriert.

Mit Hilfe eines Fraktionensammlers wurden 12-Minuten-Fractionen gesammelt und gemäß den Chromatogrammen vereinigt.

Die Geräteparameter sind in Kapitel 5.1.2, die Kalibrationsdaten in Kapitel 5.4.3 und die genaue Versuchsdurchführung in Kapitel 5.3.2.4 dargestellt.

2.3.5 Screening-Methoden zur Prüfung der gelchromatographischen Fraktionen auf Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Verbindungen

Die erhaltenen GPC-Fraktionen sollten auf PCS-Oligosaccharid-Verbindungen überprüft werden, um erfolgversprechende Fraktionen gegebenenfalls mittels HPLC weiter zu fraktionieren bzw. zu reinigen.

2.3.5.1 Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatogramme der GPC-Fraktionen wurden auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit einem Acetonitril (MeCN)/Wasser-Fließmittelgemisch angefertigt. Zunächst wurden UV-aktive Verbindungen durch Löschung des Fluoreszenzindikators bei 254 nm detektiert, kohlenhydrathaltige Substanzen wurden anschließend mit Hilfe eines *p*-Anisidin/Diphenylamin/Phosphorsäure-Reagenz nachgewiesen (Durchführung s. Kapitel 5.3.2.5).

2.3.5.2 Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und UV-Detektion unter Verwendung eines Dioden-Array-Detektors

Das PCS-Oligosaccharid-Screening mittels HPLC und UV-Detektion wurde an C18-Reversed-Phase (RP)-Material als stationärer Phase und mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch als Eluenten

durchgeführt. Durch die Verwendung eines Dioden-Array-Detektors (DAD) kann nicht nur die Messung der Absorption bei bis zu vier Meßwellenlängen gleichzeitig erfolgen, sondern es wird auch die Möglichkeit geboten, eine Substanz anhand ihres UV-Spektrums zu charakterisieren. Die UV-Spektren der PCS (s. Kapitel 5.5.2, Abb. 58) unterscheiden sich nur geringfügig von denen der entsprechenden Phenolcarbonsäureester. Die Registrierung der UV-Spektren gibt somit erste Hinweise auf die in den GPC-Fractionen enthaltenen PCS bzw. deren Ester.

Die Geräte- und Meßparameter sind in Kapitel 5.1.3.1 dargestellt.

2.3.5.3 Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und massenspektrometrischer Detektion

Weitere Informationen über die in den GPC-Fractionen enthaltenen Substanzen können durch Ermittlung ihrer Molekülgewichte erhalten werden. Nach grober Trennung der Substanzen unter Verwendung einer RP18-Phase und eines Standardeluenten (s. Kapitel 2.3.5.2) erfolgte die massenspektrometrische Detektion mit Hilfe eines gekoppelten Quadrupol-Massenspektrometers. Als Ionisationsverfahren wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) eingesetzt. Bei diesem Ionisationsverfahren wird die Substanzlösung durch eine Kapillare versprüht. Dem Sprühnebel ist ein Trocken gasstrom entgegengerichtet. Durch das Anlegen eines Potentials von einigen Kilovolt entstehen geladenen Tröpfchen, die unter Verdampfung des Lösungsmittels kleiner werden. Durch das elektrische Feld getrieben, bewegen sich die geladenen Tröpfchen durch eine Glaskapillare in den Analysatorvorraum und werden nach Fokussierung in den Quadrupol-Massen-Analysator gelenkt, wo sie entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt werden.

Durch Ermittlung der Molekülmasse können neben Vermutungen über die phenolischen Bestandteile einiger Substanzen auch Mutmaßungen über eventuelle Kohlenhydratkomponenten angestellt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde entschieden, welche GPC-Fractionen weiter gereinigt bzw. fraktioniert werden sollten.

Die Geräte- und Meßparameter sind Kapitel 5.1.3.2 zu entnehmen.

2.3.6 Fraktionierung bzw. Reinigung der GPC-Fractionen mittels (semi)präparativer Hochleistungsflüssigchromatographie

Zur Identifizierung der PCS-Oligosaccharide sollten möglichst reine Substanzen vorliegen. Daher wurden die GPC-Fractionen mittels HPLC weiter fraktioniert bzw. gereinigt. Die Reinigung von PCS-Oligosacchariden mittels HPLC ist auch in der Literatur dargestellt. So sind Trennungen auf RP-Materialien mit einem Acetonitril/Wasser-Eluenten (SHIBUYA, 1984, ISHII & HIROI, 1990b, WENDE & FRY, 1997b) oder einem Methanol/Wasser-Eluenten (SMITH & HARTLEY, 1983, MÜLLER-HARVEY et al., 1986, ISHII & HIROI, 1990a, HARRISON et al., 1995) ebenso wie Trennungen auf Normalphasen (ISHII & HIROI, 1990b, ISHII, 1991b) beschrieben.

In dieser Arbeit wurden für alle ausgesuchten GPC-Fractionen die HPLC-Bedingungen von den Bedingungen der Screening-Methode ausgehend im analytischen Maßstab optimiert. Dementsprechend wurde eine RP-18-Phase in Kombination mit einem Acetonitril/Wasser-Eluenten verwendet. Da die analytische HPLC-Methode auf präparative Verhältnisse angepaßt werden sollte und Gradienten-Elutionen meistens nur schwer zu übertragen sind, wurde auf eine isokratische Elution geachtet.

Aus organisatorischen Gründen mußte auf zwei HPLC-Systeme zur (semi)präparativen Trennung zurückgegriffen werden:

- 1) Trennung auf einer präparativen RP-18 Säule, Eluentenförderung mit einer analytischen HPLC-Pumpe. Zunächst stand nur diese Kombination zur Verfügung. Problematisch an dieser Kombination war, daß mit Hilfe der analytischen HPLC-Pumpe nicht die für die 1:1 Übertragung nötige Flußrate erzielt werden konnte. Trotzdem konnten die Trennungen ausreichend gut übertragen werden, es verlängerten sich lediglich die Elutionszeiten.
- 2) Trennung auf einer semipräparativen RP-18 Säule, Eluentenförderung mit einer analytischen HPLC-Pumpe. Mit dieser Kombination konnten die analytischen Trennbedingungen gut auf die semipräparative Trennung übertragen werden.

In beiden Systemen erfolgte die Detektion mit Hilfe eines DAD bei Meßwellenlängen von 280 und 325 nm. Die Fraktionierung der Substanzen erfolgte per Hand gemäß den Chromatogrammen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden zur Trockne gebracht, auf dem analytischen HPLC-System auf ihre Reinheit überprüft und für die Identifizierungsreaktionen eingesetzt.

Die Optimierung der Trennbedingungen im analytischen Maßstab erfolgte mit den in Kapitel 2.3.5.2 beschriebenen Geräteparametern. Die Geräteparameter für die Systeme 1 und 2 sind Kapitel 5.1.3.3 und die Versuchsdurchführung Kapitel 5.3.2.6 zu entnehmen.

2.3.7 Identifizierung (und Quantifizierung) monomerer phenolischer Säuren aus löslichen Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Zur schnellen Bestimmung monomerer phenolischer Säuren in den nach Kapitel 2.3.6 zur Identifizierung bereitgestellten Fraktionen sollte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die alle in BS identifizierten monomeren phenolischen Säuren integriert und eine möglichst geringe Probenvorbereitung benötigt. Diese Methode sollte auch zur Überprüfung der Gehalte an monomeren PCS in den Reinigungsschritten (Kapitel 2.3.3) eingesetzt werden. Eine HPLC-Methode ist in diesem Fall der GC-Bestimmung vorzuziehen, da weder Extraktion noch Derivatisierung notwendig sind.

PACKERT (1993) untersuchte lösliche und unlösliche Getreideballaststoffe auf monomere phenolische Säuren mittels GC. Er konnte *trans*-FS, *cis*-FS, *trans*-pCS, *cis*-pCS, 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBS), 4-Hydroxyphenyllessigsäure (4-HPES), Vanillinsäure (VS), Syringasäure (SyS) und 4-Hydroxyphenylpropionsäure (4-HPPS) (Abb. 12) nachweisen. SA, die in dieser Arbeit in allen Getreideballaststoffen eindeutig identifiziert wurde, konnte nicht nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurden die von PACKERT (1993) identifizierten monomeren PCS und *trans*-SA in die Entwicklung der HPLC-Methode einbezogen. Die Trennung sollte an einer RP-18-Phase erfolgen. Als Eluent wurde ein ternäres Gradientengemisch, bestehend aus wässriger TFA (1 mM), Acetonitril und Methanol, gewählt. Der zunächst verwendete binäre Gradient aus 1 mM TFA und Acetonitril eignete sich gut zur Trennung der früh eluierenden 4-HBS, 4-HPES, VS und SyS, wohingegen die Trennung der anderen monomeren phenolischen Säuren nur bei sehr langen Analysenzeiten erreicht wurde. Durch Einführung von Methanol in den Eluenten konnte die Trennung der später eluierenden Säuren bei kürzeren Retentionszeiten verbessert werden. Das Temperieren der Säule auf 45 °C konnte die Trennung nochmals verbessern und die Elutionszeiten (max. 20 min) verkürzen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines DAD. Drei Meßwellenlängen (260, 280 und 325 nm) wurden ausgewählt. Entsprechend den Maxima ihrer UV-Absorption wurden *trans*-FS, *cis*-FS, *trans*-pCS und SA bei 325 nm, *cis*-pCS, 4-HPES, SyS und 4-HPPS bei 280 nm und 4-HBS und VS bei 260 nm bestimmt. Bei 280 nm werden alle monomeren phenolischen Säuren erfaßt. Für Übersichtschromatogramme bietet sich daher diese Wellenlänge an. Standardchromatogramme bei allen Meßwellenlängen sind in Kapitel 5.5.1, Abbildung 57 dargestellt. Die Identifizierung der Substan-

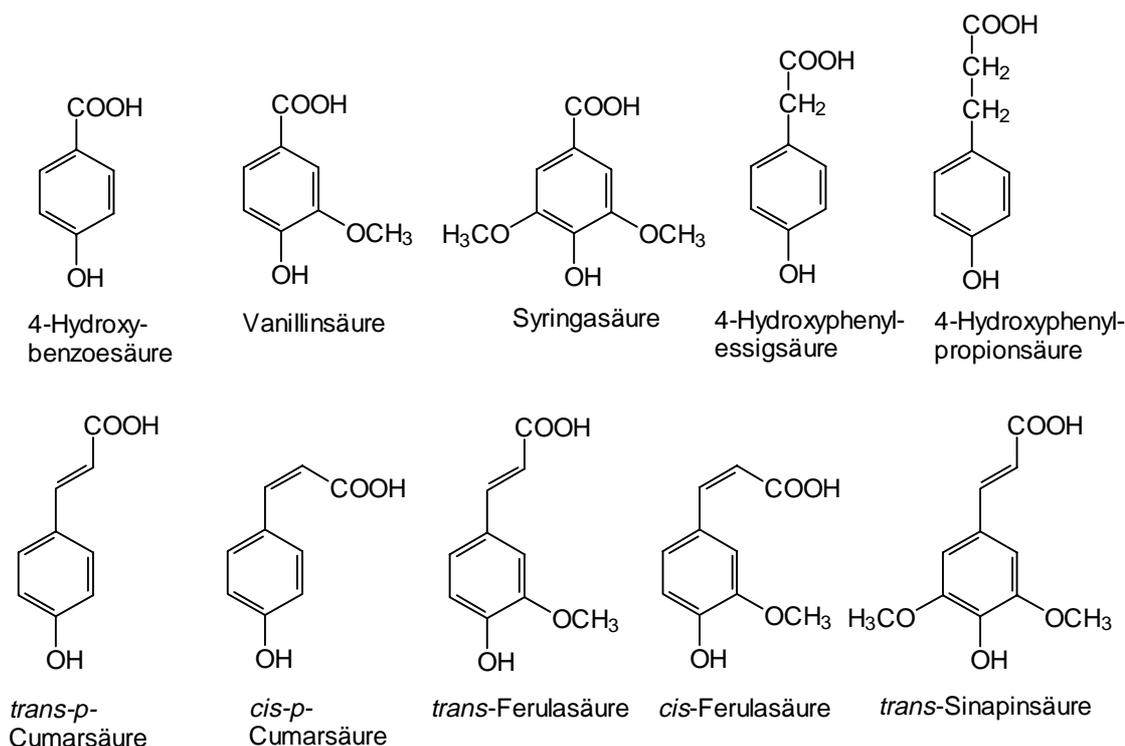


Abbildung 12: Zusammensetzung des Phenolsäurestandardgemisches zur HPLC Trennung

zen erfolgte anhand ihrer Retentionszeiten und ihrer UV-Spektren. Die Retentionszeiten und die relativen Retentionszeiten bezogen auf *trans*-FS sind in Kapitel 5.4.4, die UV-Spektren der untersuchten Substanzen in Kapitel 5.5.2, Abbildung 58 dargestellt. Aufgrund der einfachen Probenaufarbeitung (s.u.) ohne Extraktionsschritte etc. konnten Quantifizierungen mit Hilfe der Methode des externen Standards durchgeführt werden. Die linearen Bereiche und Nachweisgrenzen wurden bestimmt und sind in Kapitel 5.4.4 tabellarisch aufgeführt. Die Geräteparameter sind in Kapitel 5.1.3.4. dargestellt.

Zur Probenvorbereitung wurde ein Aliquot der zur bestimmenden PCS-Oligosaccharid Lösung unter einem Stickstoffstrom zur Trockne gebracht. Die Hydrolyse erfolgte mit 1 M NaOH für 2 h. Eine Verlängerung der Hydrolysezeit auf 4 h setzt keine weiteren phenolischen Säuren frei, kürzere Hydrolysezeiten resultieren jedoch in geringeren Gehalten an freigesetzten phenolischen Säuren (Optimierung anhand eines isolierten FS-Oligosaccharids). Unter den genannten Hydrolysebedingungen werden bereits freigesetzte phenolische Säuren nur geringfügig abgebaut. Werden die freien Säuren des Standardgemisches den Hydrolysebedingungen unterworfen, so erhält man mit Ausnahme der Ferulasäuren Wiederfindungsraten von 92 – 96 %. Die Wiederfindungsrate für *trans*-FS liegt bei 89 %, die für *cis*-FS nur bei 76 %. Hierbei handelt es sich jedoch primär nicht um einen Abbau der Ferulasäuren, sondern um die bereits erwähnte *cis/trans*-Isomerie, die die Differenzen zu den Wiederfindungsraten der anderen phenolischen Säuren ausmacht. Bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate von *cis*-FS wurde aufgrund der Isomerisierung *trans*-FS nachgewiesen.

Die Hydrolyselösung wurde mit dem 1,5fachen Volumen 2 M Phosphorsäure versetzt. Der resultierende pH-Wert von 2,2 entspricht ungefähr dem des Eluenten. Die Lösung wurde direkt oder nach Membranfiltration zur HPLC-Bestimmung eingesetzt. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Kapitel 5.3.2.7 zu entnehmen.

2.3.8 Identifizierung (und Quantifizierung) von Monosacchariden aus Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Gaschromatographie

Die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung in den PCS-Oligosacchariden entspricht prinzipiell der in Kapitel 2.2.3 dargestellten Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung der BS. Sowohl Reduktion und Acetylierung der freigesetzten Monosaccharide als auch die gaschromatographische Trennung und Bestimmung der Alditolacetate sind mit den in Kapitel 2.2.3.1 bzw. 2.2.3.2 vorgestellten Arbeitsweisen identisch. Unterschiede müssen lediglich bei der Hydrolyse gemacht werden. Eine Vorquellung mit 12 M Schwefelsäure ist nicht notwendig. Für den eigentlichen Hydrolyseschritt der PCS-Oligosaccharide sind unterschiedliche Hydrolysebedingungen beschrieben. Häufig eingesetzte Säuren sind 2 M TFA (u.a. ISHII, 1991b, RALET et al., 1994, WENDE & FRY, 1997a/b), 1 M Schwefelsäure (KROON et al., 1997a, SAULNIER et al., 1999) und 1 M Salzsäure (KATO & NEVINS, 1985) bei einer Hydrolysetemperatur von 100 – 121 °C und unterschiedlichen Hydrolysezeiten (20 min – 3 h). Für die weitere Aufarbeitung hat TFA den Vorteil, daß sie leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann. Aus diesem Grund wurde die Hydrolyse mit 2 M TFA optimiert. Die Wiederfindungsraten der Monosaccharide Glucose, Arabinose und Xylose wurden nach Behandlung mit 2 M TFA bei 120 °C und Hydrolysezeiten von 30, 60 und 120 min bestimmt. Des Weiteren wurde nach der Hydrolyse von Maltose für 30, 60 und 120 min die freigesetzte Glucose bestimmt. Es zeigte sich, daß nach 30 min ca. 90 % der Maltose hydrolysiert vorlag. Die Xylose- und Glucoseverluste lagen bei ca. 15 %, Arabinose wurde nur zu 7 % abgebaut. Nach 60 min und 90 min traten weitaus größere Verluste auf (60 % Xylose, 45 % Arabinose, 32 % Glucose). Die genaue Arbeitsvorschrift für die Hydrolyse der PCS-Oligosaccharide mit 2 M TFA für 30 min bei 120 °C ist in Kapitel 5.3.2.8 beschrieben. Die Arbeitsvorschriften für die Reduktion und Acetylierung und die Geräteparameter für die gaschromatographische Bestimmung entsprechen den in Kapitel 2.2.3 dargestellten.

2.3.9 Bestimmung der relativen Molekülmasse mittels Massenspektrometrie

Die Bestimmung der relativen Molekülmassen der isolierten PCS-Oligosaccharide erfolgte mittels Massenspektrometrie. Das bereits in Kapitel 2.3.5.3 vorgestellte LC-MS-System mit Elektrospray-Ionenquelle und Quadrupol-Massenanalysator wurde auch hier verwendet. Da Reinsubstanzen bestimmt wurden, konnte die HPLC-Trennsäule durch eine kurze Kapillare ersetzt werden (Fließinjektionsanalyse, FIA). Somit gelangte die vom Autosampler injizierte Probe ohne chromatographische Trennung zur Ionisierung und massenspektrometrischen Analyse.

Nach der Ionisierung können die Moleküle, bevor sie den Massenanalysator erreichen, in Bruchstücke zerfallen. Wenn die durch Kollisionen mit Stickstoffatomen aufgenommene Energie die zur Fragmentierung nötige Dissoziationsenergie überschreitet, entstehen geladene Fragmentionen, die wichtige Hinweise zur Identifizierung der Substanz liefern können. Der Zerfall der Moleküle kann durch Anlegen einer Spannung, der Fragmentorspannung, beeinflusst werden. Um den Zerfall bei verschiedenen Spannungen zu überprüfen, wurden alle Substanzen mittels FIA bei Fragmentorspannungen von 20 bis 200 V ($\Delta = 20$ V) untersucht.

Die Geräte- und Meßparameter für die massenspektrometrischen Untersuchungen sind Kapitel 5.1.4 zu entnehmen.

2.3.10 Strukturuntersuchungen mittels Kernresonanz-Spektroskopie

Die Kernresonanz-Spektroskopie stellt die wichtigste spektroskopische Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen dar. Werden viele NMR-Experimente im Bereich der organischen Chemie bereits routinemäßig durchgeführt, so ist die NMR-Spektroskopie für analytische Zwecke auf dem Gebiet der Lebensmittelchemie noch wenig verbreitet. Von daher sind im folgenden die Prinzipien der einzelnen NMR-Experimente kurz erläutert.

Zur Aufnahme von NMR-Spektren wird heutzutage die Puls-Fourier-Transform-Technik oder kurz das Impuls-Verfahren eingesetzt. Beim Impuls-Verfahren werden in der Meßprobe durch einen Hochfrequenzimpuls bestimmter Frequenz ν_I und bestimmter Einstrahlrichtung gleichzeitig alle Kerne einer Sorte angeregt (durch kurzen Impuls wird ein kontinuierliches Frequenzband symmetrisch zu der Frequenz ν_I erzeugt). Die Dauer der Hochfrequenz-Impulse liegt im μs -Bereich. Nach Abschalten des Hochfrequenz-Generators kehren alle Kerne in den Gleichgewichtszustand zurück. Die durch den Impuls erzeugte Quermagnetisierung wird abgebaut. Der Abfall der Quermagnetisierung wird gemessen (Free Induction Decay, FID^[NMR]) und stellt sich durch ein komplexes Interferogramm aus überlagerten, gedämpften Schwingungen dar. Durch Anwendung der Fourier-Transformation wird das Spektrum in der Zeitdomäne (mit einer Zeitachse als Abszisse) in ein normal auswertbares Spektrum in der Frequenzdomäne (mit einer Frequenzachse als Abszisse) überführt.

Ausgehend vom Impuls-Verfahren wurden viele Experimente mit komplexen Impulsfolgen entwickelt, durch deren Anwendung man unterschiedlichste Informationen über die Strukturen der untersuchten Substanzen erhalten kann. In dieser Arbeit wurden neben der ¹H-NMR-Spektroskopie und der ¹³C-NMR-Spektroskopie mit ¹H-Breitband-Entkopplung (¹³C-BB), das DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)-, das (H,H)-COSY (zweidimensional homonuklear (H,H)-korrelierte NMR-Spektroskopie)-, das TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)-, das HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)- und das HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)-Experiment angewendet (für die Geräte- und Meßparameter s. Kapitel 5.1.5).

Das gebräuchlichste Doppelresonanz-Experiment stellt die ¹H-Breitband-Entkopplung in der ¹³C-NMR-Spektroskopie dar. Durch die Entkopplung werden alle Multipletts, die auf ¹³C,¹H-Kopplungen zurückgehen, auf Singulettsignale reduziert. Die Intensitäten der ¹³C-Signale der Multipletts werden somit auf ein Signal fokussiert, was zur Vereinfachung der Spektren aber auch zu einer Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit führt. Des weiteren erzielt man zusätzlich einen Gewinn an Signalintensität durch den Kern-Overhauser-Effekt.

Nachteilig am ¹³C-BB-Experiment ist dementsprechend der Verlust an Information über die Bindungsverhältnisse der ¹³C-Kerne. Die Unterscheidung zwischen primären, sekundären, tertiären und quartären Kohlenstoffatomen gelingt aber z.B. mit Hilfe des DEPT-Experiments. Bei dem DEPT-Experiment hat man zusätzlich einen Intensitätsgewinn durch den Polarisationstransfer. Die Impulsfolge für dieses Experiment ist:

¹H-Kanal: $90^\circ_x - \tau - 180^\circ_x - \tau - \Theta_y - \tau - \text{BB-Entkopplung}$

¹³C-Kanal: $90^\circ_x - \tau - 180^\circ - \tau - \text{FID}^{\text{[NMR]}}(t_2)$

mit τ = Zeit zwischen zwei Impulsen und Θ = Impulswinkel. Mit Hilfe von drei Experimenten mit den Winkeln $\Theta_1 = 45^\circ$, $\Theta_2 = 90^\circ$ und $\Theta_3 = 135^\circ$ erhält man durch Kombination dieser drei Spektren drei Subspektren, die jeweils nur primäre, sekundäre oder tertiäre Kohlenstoffatome anzeigen. Quartäre Kohlenstoffe zeigen kein Signal. Führt man das Experiment, wie in der Arbeit geschehen, nur bei $\Theta = 135^\circ$ durch, erhält man ein Spektrum, bei dem die quartären Kohlenstoffe kein Signal

zeigen, die sekundären zeigen negative Signale und die primären und tertiären positive. Die Unterscheidung der primären und tertiären Kohlenstoffe gelingt jedoch mit nur einem Experiment nicht. Zweidimensionale Experimente können seit Anfang der neunziger Jahre routinemäßig durchgeführt werden. Zweidimensionale NMR-Spektren haben zwei Frequenzachsen, die Intensitäten entsprechen der dritten Dimension. Die hier aufgeführten Experimente führen zu zweidimensionalen (verschiebungs)korrelierten NMR-Spektren, bei denen auf beiden Frequenzachsen chemische Verschiebungen aufgetragen sind. Experimentell unterscheiden sich die zweidimensionalen Experimente von den eindimensionalen v.a. durch Einbindung einer Evolutions- und Mischphase zwischen die Präparationsphase (Einwirkung (komplexer) Impulsfolgen) und die Detektionsphase (Aufnahme des Interferogramms).

Das H,H-COSY-Experiment beruht auf der Impulsfolge $90^\circ_{x'} - t_1 - 90^\circ_{x'} - \text{FID}^{[\text{NMR}]}$. Der Impulswinkel des zweiten Impulses kann auch 45° oder 60° oder allgemein Θ betragen. t_1 steht für die variable Zeit bei 2D-Experimenten (Evolutionszeit). Das Empfängersignal ist eine Funktion von t_1 und von der Detektionszeit t_2 . Fourier-Transformationen bezüglich der Zeiten t_1 und t_2 führen zu einem zweidimensionalen Spektrum. Das Spektrum zeigt „Diagonalpeaks“ mit gleichen chemischen Verschiebungen auf der Ordinate wie auf der Abszisse. Diese liefern im Gegensatz zu den „Kreuz- oder Korrelationspeaks“ keine zusätzlichen Erkenntnisse. Die Korrelationspeaks lassen die indirekten (skalaren) Spin-Spin-Kopplungen zwischen den Protonen erkennen. Ausgehend von einem sicher zugeordneten Protonensignal kann man i.a. über 3 Bindungen (3J) koppelnde Protonen erkennen und somit Nachbarschaftsbeziehungen im Molekül aufdecken.

Die Impulsfolge für das TOCSY-Experiment ist $90^\circ - t_1 - \text{spin-lock} - \text{FID}^{[\text{NMR}]}$. Wie auch im H,H-COSY ist t_1 variabel, d.h. es werden mehrere Messungen mit ansteigenden Werten für t_1 durchgeführt. Das TOCSY-Experiment stellt die zweidimensionale Variante des „Homonuclear Hartmann-Hahn“-Experiments dar, bei dem man durch Einstrahlung eines selektiven Impulses mit der Resonanzfrequenz eines Protons alle Resonanzen von den Protonen bestimmen kann, die zu einem Spinsystem (= miteinander koppelnde Kerne) gehören (BAX & DAVIS, 1985). Das TOCSY-Experiment hat sich als sehr wertvoll für die Strukturbestimmung von Oligosacchariden herausgestellt, da die Korrelationspeaks es ermöglichen, die Protonen zu identifizieren, die zu einer Monosaccharideinheit gehören. Das Ausmaß innerhalb des Moleküls, in dem man Korrelationen erkennen kann, kann durch Variation in den Meßbedingungen verändert werden.

Das HMQC-Experiment (BAX & SUBRAMANIAN, 1986) gehört zu den inversen, zweidimensionalen, heteronuklear (C,H)-korrelierten Experimenten. Mit Hilfe des HMQC-Experiments können Kopplungen zwischen direkt gebundenen (1J) Protonen und Kohlenstoffatomen (^{13}C) erkannt werden. Nach sicherer Zuordnung eines Protonen- oder ^{13}C -Signals kann/können das Signal/die Signale des gebundenen Kohlenstoffs oder des/der gebundenen Protons/Protonen identifiziert werden. Als inverses Verfahren (Erzeugung von Kohärenzen im Kanal der unempfindlichen ^{13}C -Kerne und Übertragung auf die empfindlichen Protonen, Detektion von Protonensignalen) hat das HMQC-Experiment den Vorteil einer deutlich gesteigerten Nachweisempfindlichkeit (z.B. gegenüber dem normalen (C,H)-COSY-Experiment), wodurch dieses Experiment auch schon mit geringen Substanzmengen (1 – 2 mg) durchgeführt werden kann.

Im Gegensatz zum HMQC-Experiment kann man mit dem HMBC-Experiment (BAX & SUMMERS, 1986) auch Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Protonen und ^{13}C -Kernen aufstellen, die über zwei oder drei Bindungen ($^{2,3}J$) miteinander koppeln. Auf diese Weise erhält man Korrelationspeaks auch zu quartären Kohlenstoffen, deren Positionen so in dem zu untersuchenden Mole-

kül festgelegt werden können. Bedeutend ist das HMBC-Experiment v.a., da man auch Kopplungen über Sauerstoffatome mit kleinen Kopplungskonstanten erkennen kann. Somit bietet sich dieses Experiment an, die Ringform von Monosaccharideinheiten und insbesondere die Bindungsverhältnisse in Oligosacchariden zu untersuchen.

Abbildung 13 gibt den Ablauf der Isolierung und Identifizierung von PCS-Oligosaccharid-Verbindungen schematisch wieder.

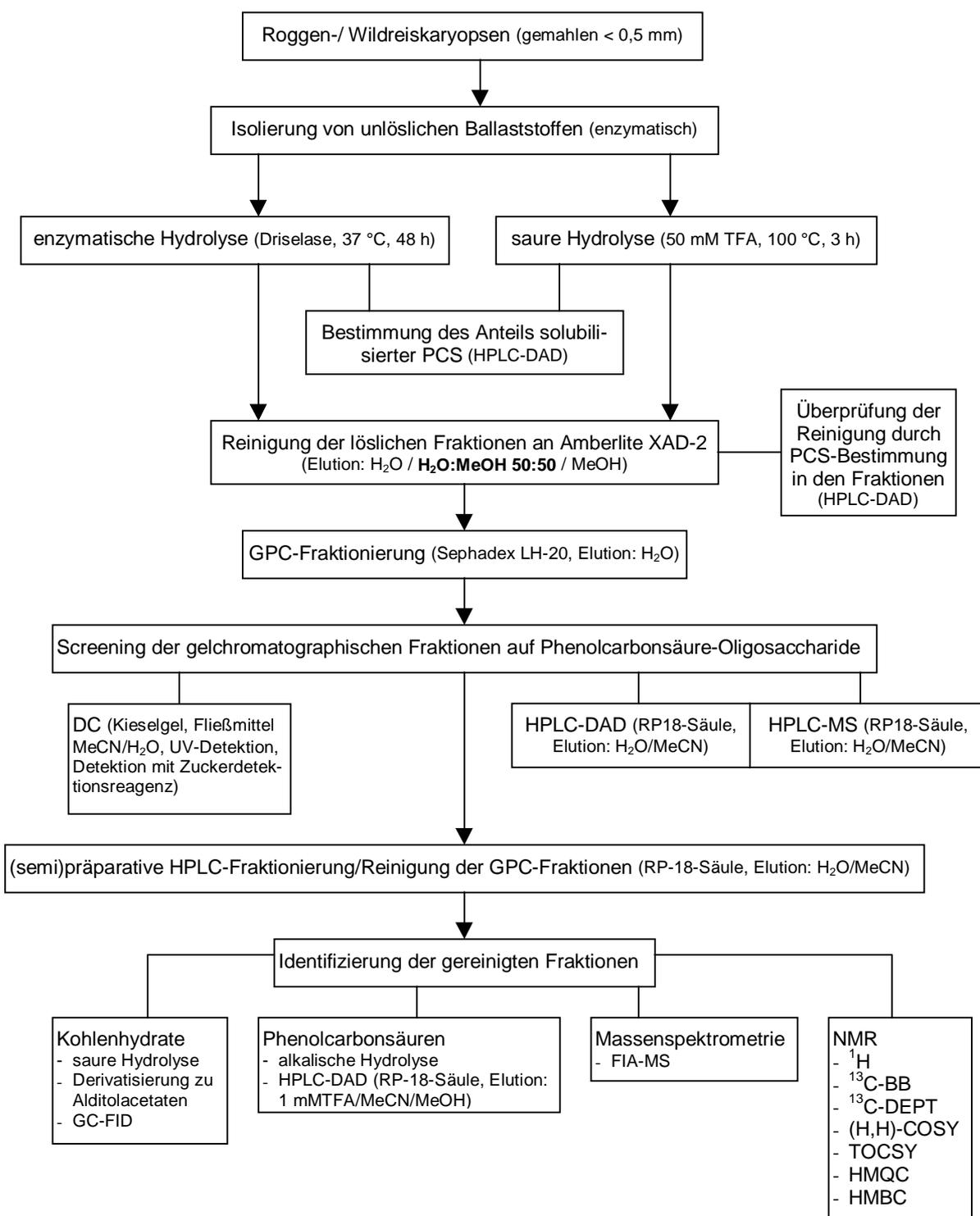


Abbildung 13: Schema zur Isolierung und Identifizierung von PCS-Oligosaccharid-Verbindungen

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Identifizierung und Quantifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren sowie von Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten in löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

3.1.1 Ballaststoffgehalte

Mit der auf präparative Verhältnisse angepaßten enzymatisch-gravimetrischen Methode wurden die in der Tabelle in Kapitel 5.4.5 aufgeführten Ballaststoffgehalte ermittelt. Neben den korrigierten Ballaststoffgehalten sind auch die nicht-korrigierten Ballaststoffgehalte sowie die Asche- und Proteingehalte angegeben. Erwartungsgemäß sind die Ballaststoffgehalte stark von dem untersuchten Getreide abhängig. Roggen und Mais (12,11 bzw. 11,73 g UBS 100 g⁻¹ Mehl) sind die Getreidearten mit den höchsten Gehalten an UBS, wohingegen Hirse, Reis und Wildreis nur geringe Mengen an UBS enthalten (2,93 – 3,34 g 100 g⁻¹ Mehl). Getreidekaryopsen enthalten deutlich weniger LBS als UBS, wie die ermittelten Gehalte von 0,78 (Hirse) bis 3,92 (Roggen) g 100g⁻¹ Mehl zeigen.

3.1.2 Kohlenhydratzusammensetzung der Ballaststoffe

Die Kohlenhydrat-Monomerenzusammensetzung der UBS und LBS ist in Kapitel 5.4.6 aufgeführt. Zu beachten ist, daß nur die neutralen Monomeren untersucht wurden, nicht jedoch die Uronsäuren, wie z.B. Galakturonsäure als Hauptmonomer der Pektine.

Fucose und Rhamnose können in Getreideballaststoffen als Bestandteile der Pektine vorkommen. Sie konnten allerdings, wenn überhaupt nur in Spuren nachgewiesen werden. Unter den UBS wurden Spuren von Rhamnose und Fucose nur in Wildreis identifiziert. Die LBS von Hafer, Mais, Hirse, Reis und Wildreis enthalten Spuren von Fucose, die LBS von Gerste Rhamnose und Fucose in Spuren. Die meisten Pektine sind mit heißem Wasser extrahierbar, weshalb viele LBS Spuren von Fucose und Rhamnose enthalten. Pektine, die über ionische Bindungen mit Calcium stabilisiert sind und normalerweise mit chelatbildenden Reagenzien wie Oxalat extrahiert werden, können aber auch Bestandteile der UBS bilden, wie z.B. bei den UBS aus Wildreis.

Abbildung 14 zeigt die relative Verteilung der mengenmäßig bedeutenden Monomere Arabinose, Xylose, Glucose, Mannose und Galaktose. In den UBS dominieren Arabinose, Xylose und Glucose. Arabinose und Xylose stammen hauptsächlich aus den neutralen Arabinoxylanen und den sauren Glucuronoarabinoxylanen, Glucose aus Cellulose und mixed-linked β -Glucanen. Galaktose stellt nur bis zu 6,5 %, Mannose bis zu 5,9 % der Monomeren. Galaktose kann z.B. vereinzelt an saure Glucuronoarabinoxylane gebunden sein (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995, SAULNIER et al., 1995), Mannose bildet das Grundgerüst der Mannane. Die Arabinose/Xylose-Verhältnisse variieren von 0,40 (Dinkel) bis 1,10 (Hirse) (Kapitel 5.4.6). Neben Hirse weisen Reis und Wildreis (0,80 bzw. 1,00) hohe Arabinose/Xylose-Verhältnisse auf. In der Literatur werden für alkaliextrahierbare Arabinoxylane aus Reisendospermgewebe bzw. Reiskleie ebenfalls hohe Arabinose/Xylose-Verhältnisse von 0,80 bzw. 0,93 beschrieben (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). Ein wie bei Hirse beobachtetes Verhältnis von >1 weist auf einen hohen Prozentsatz in 2- und 3-Stellung mit Arabinose substituierter Xyloseeinheiten oder auf das Vorhandensein kurzer Arabinoseseitenketten hin. WOOLARD et al. (1976) ermittelten für Sorghum-Hirse ein Verhältnis von 0,83

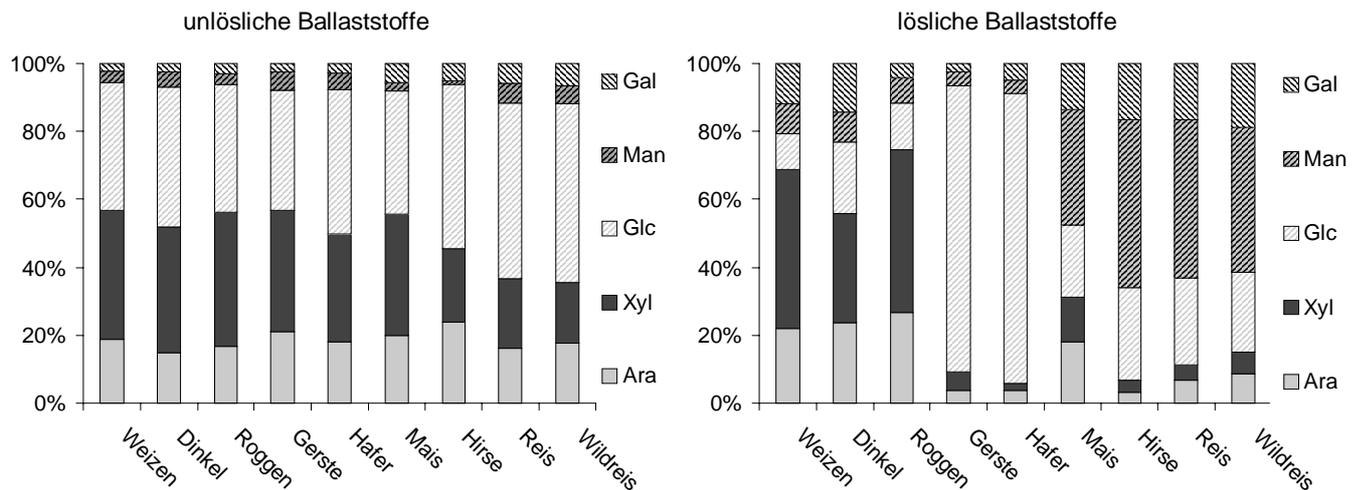


Abbildung 14: Relatives Monosaccharidverhältnis der unlöslichen (links) und löslichen (rechts) Ballaststoffe

und konnten derartige Arabinoseseitenketten nachweisen. Die für die anderen Getreidearten ermittelten Verhältnisse von 0,40 bis 0,60 bewegen sich in dem für Getreidearabinoxylane üblichen Rahmen (IZYDORCYK & BILIADERIS, 1995). Des Weiteren weisen Hirse, Reis und Wildreis im Gegensatz zu den anderen Getreiden einen erhöhten Anteil an Glucanen (Cellulose, mixed-linked β -Glucane) von ca. 50 % auf.

Die LBS lassen sich nach ihren Monosaccharidverhältnissen in drei Gruppen aufteilen. Die LBS von Weizen, Dinkel und Roggen werden von löslichen Arabinoxylanen dominiert. Das Arabinose/Xylose-Verhältnis beträgt zwischen 0,47 und 0,74. In den LBS aus Gerste und Hafer überwiegt Glucose mit 84,5 % bzw. 85,1 % bei weitem. Wie bereits in Kapitel 1.3.1.1 erwähnt, sind Hafer und Gerste typische Getreide, bei denen die mixed-linked β -Glucane die Hemicellulosefraktion dominieren. Durch die Anwesenheit von (1 \rightarrow 3)-Bindungen bekommen die Molekülketten eine unregelmäßige Form und sind im Gegensatz zu Cellulose in beträchtlichem Ausmaß wasserlöslich (CARPITA, 1990, THEANDER et al., 1993). Das Arabinose/Xylose-Verhältnis ist bei Hafer mit einem Wert von 1,57 extrem hoch. Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten der Mehrfacharabinose-substitution muß man bei den LBS noch die Möglichkeit berücksichtigen, daß lösliche Arabingalaktane vorliegen (THEANDER et al., 1993). Die LBS von Hirse, Reis und Wildreis zeichnen sich durch hohe Mannoseanteile aus. Mannane sind eigentlich keine typischen Hemicellulosen für Gramineae. Wie in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, unterscheidet sich jedoch Reis stark von den anderen Getreiden und seine Endospermwände zeigen deutliche Parallelen zu den Zellwänden parenchymatischer Gewebe von Dikotylen. Wildreis gehört wie Reis zur Unterfamilie Oryzoidae, was einen ähnlichen Zellwandaufbau begründen mag. Das Arabinose/Xylose-Verhältnis ist bei Reis und Wildreis vergleichbar hoch wie bei Hafer (1,57 bzw. 1,36). Die LBS aus Mais lassen sich aufgrund der relativ gleichmäßigen Monomerenverteilung keiner der drei Gruppen zuordnen.

3.1.3 Identifizierung und Quantifizierung monomerer Phenolcarbonsäuren

In dieser Arbeit waren v.a. die monomeren PCS von Interesse, die in der Lage sind, durch Dimerisierung Crosslinks auszubilden. Neben der Bestimmung von *trans/cis*-FS und *trans/cis*-pCS, deren Crosslink-Eigenschaften bekannt sind, sollte monomere SA (vgl. Kapitel 3.1.10) identifiziert und quantifiziert werden. Abbildung 15 zeigt den Bereich eines GC-MS-Chromatogramms von UBS aus Roggen, in dem die monomeren PCS eluieren.

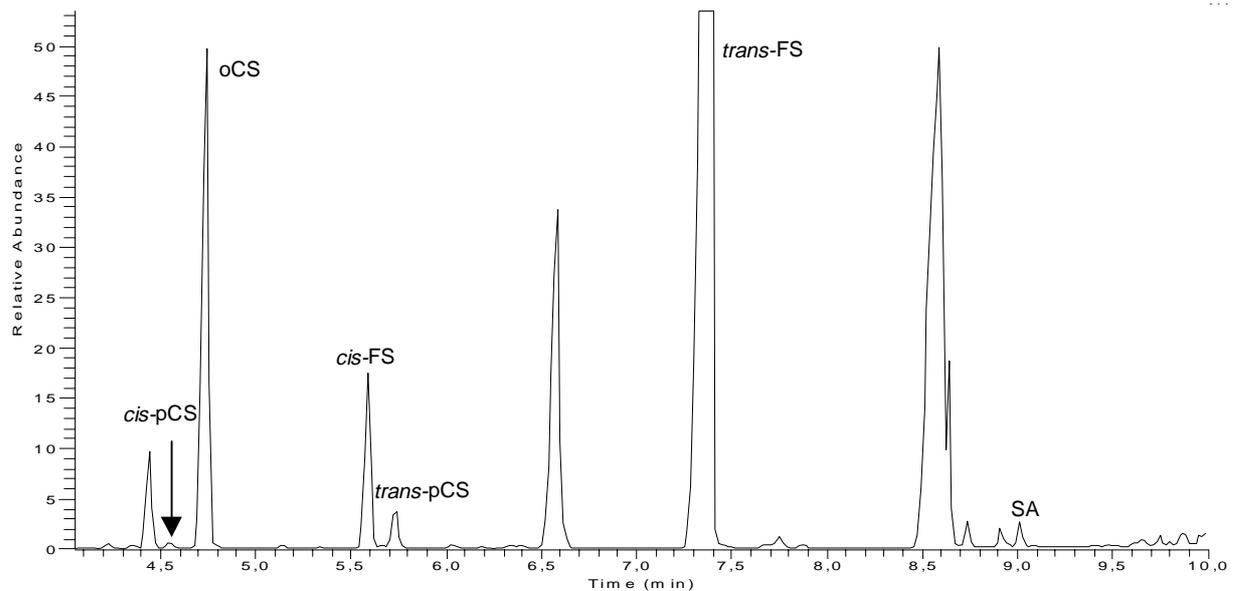


Abbildung 15: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von unlöslichen Roggenballaststoffen (Bereich der monomeren PCS)

Die Identifizierung der monomeren PCS erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten und ihrer Massenspektren. Wie erwartet und in der Literatur für einige Getreide vielfach beschrieben (u.a. SHIBUYA, 1984, RYBKA et al., 1993, PACKERT, 1993, ZUPFER et al., 1998, NISHIZAWA, 1998, ANDREASEN et al., 1999) wurden in allen UBS und LBS FS und pCS nachgewiesen. Die mittels GC-FID ermittelten Gehalte für alkaliextrahierbare *cis/trans*-FS in UBS liegen zwischen 4,4 (Hafer) und 8,3 (Hirse) mg g⁻¹ UBS, Mais mit einem Gehalt von 24,8 mg g⁻¹ UBS bildet eine Ausnahme. Für *cis/trans*-pCS wurden Werte zwischen 0,2 (Dinkel) und 0,5 (Gerste) mg g⁻¹ UBS bestimmt, wobei jedoch Mais und Reis mit 2,2 mg g⁻¹ UBS deutlich höhere Gehalte aufweisen.

In den LBS, deren Polysaccharide durch Arabinoxylane dominiert werden (Dinkel, Weizen, Roggen), wurden die höchsten Gehalte an *cis/trans*-FS bestimmt (0,7 – 1,8 mg g⁻¹ LBS). Da in den bisher untersuchten Getreidekaryopsen von Mais und Weizen (SMITH & HARTLEY, 1983, McCALLUM et al., 1991, SAULNIER et al., 1995) ebenso wie in den in dieser Arbeit untersuchten Getreidearten Roggen und Wildreis (Kapitel 3.2) die Bindung monomerer FS nur an Arabinoxylane nachgewiesen werden konnte, erscheint dies verständlich (s. auch Kapitel 3.1.6). Die LBS der anderen Getreide enthalten *cis/trans*-FS in Gehalten von 0,1 – 0,4 mg g⁻¹ LBS. Die *cis/trans*-pCS-Gehalte in den LBS sind mit 7 bis 25 µg g⁻¹ LBS unabhängig von der Getreideart sehr niedrig.

Trans-SA konnte sowohl in allen UBS als auch in allen untersuchten LBS eindeutig nachgewiesen werden. Der Nachweis alkaliextrahierbarer SA ist in der Literatur jedoch weitaus seltener als der für FS und pCS beschrieben. OHASHI et al. (1987) konnten in Mais- und Gerstenkeimlingen geringe Mengen alkalilabiler SA identifizieren. HE & TERASHIMA (1989), die signifikante Mengen SA in Zellwänden von Reis bestimmten, spekulieren, daß es sich um Abbauprodukte des Lignins handelt, die während der Extraktion entstanden sind. In Getreidekaryopsen wurde bisher noch keine alkaliextrahierbare SA identifiziert. PACKERT (1993) untersuchte eine Reihe von unlöslichen und löslichen Getreideballaststoffen u.a. auf SA, konnte jedoch keine nachweisen.

Die Gehalte für SA betragen zwischen 53 und 185 µg g⁻¹ UBS und 4 bis 22 µg g⁻¹ LBS. Größere Mengen SA enthalten nur die UBS aus Wildreis mit 445 µg g⁻¹ UBS. Die genauen Gehalte für alle monomeren PCS sind in Kapitel 5.4.7 tabellarisch dargestellt.

3.1.4 Identifizierung und Quantifizierung von 8-5', 8-8', 5-5', 8-O-4'- und 4-O-5'-gekoppelten *trans*-Dehydrodiferulasäuren

Die radikalische Kopplung von Ferulasäureestern in der Pflanzenzellwand verläuft unter Nutzung zellwandgebundener Peroxidase und H_2O_2 . Im ersten Schritt werden die Ferulasäureester in das entsprechende elektronendelokalisierte Phenoxyradikal überführt. Die wichtigsten mesomeren Grenzformeln zeigt Abbildung 16.

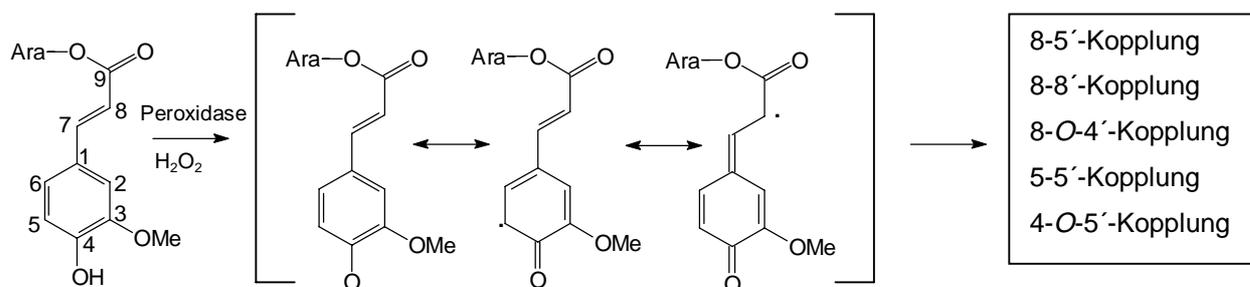


Abbildung 16: Peroxidase-vermittelte Dehydrogenierung von Ferulasäureestern. Dimerisierung über verschiedene mesomere Grenzformeln des Phenoxyradikals.

Die formale Dimerisierung der Phenoxyradikale über die verschiedenen mesomeren Grenzformeln führt zur Bildung 8-5', 8-8', 8-O-4', 5-5'- und 4-O-5'-gekoppelter Zwischenprodukte, die in der Zellwand zu Dehydrodiferulasäureestern reagieren. Die alkalische Hydrolyse führt zu den in Abbildung 17 dargestellten DFS. Bei 8-5'-DFSdc handelt es sich um keine DFS mehr, da sie das De-

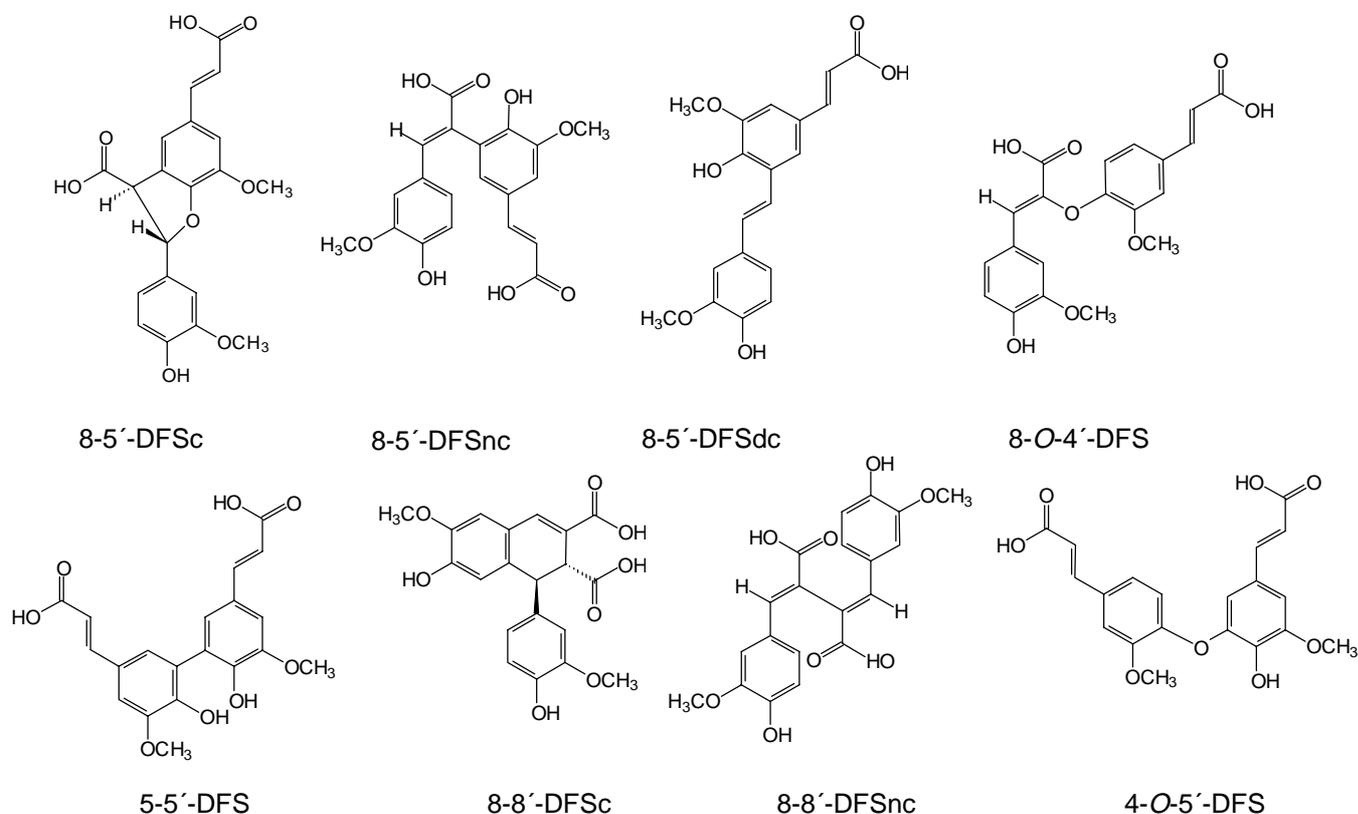


Abbildung 17: Strukturen von Dehydrodiferulasäuren

carboxylierungsprodukt von 8-5'-DFSnc darstellt. Da sie jedoch aus einer Diferulasäureesterstruktur stammt, ist sie als solche bezeichnet.

In den UBS von Mais, Weizen, Dinkel, Roggen, Reis, Wildreis und Gerste konnte das gesamte Spektrum der DFS nach alkalischer Hydrolyse durch Vergleich der relativen Retentionszeiten (GC-MS und GC-FID) sowie der Massenspektren mit denen der synthetisierten Standardsubstanzen identifiziert werden. Mit Ausnahme der hier erstmalig nachgewiesenen 4-O-5'-DFS konnte der Vergleich der Massenspektren immer am gesamten Spektrum erfolgen. Bei der Identifizierung der 4-O-5'-DFS gelang die Identifizierung anhand des gesamten Spektrums nur bei den UBS aus Mais, die Identifizierung in den anderen UBS erfolgte über die relativen Retentionszeiten und Detektion des Molekül-Ionenpeaks m/z 602. Abbildung 18 zeigt den Dimerenbereich des GC-FID-Chromatogramms des alkalischen Hydrolysats von UBS aus Mais.

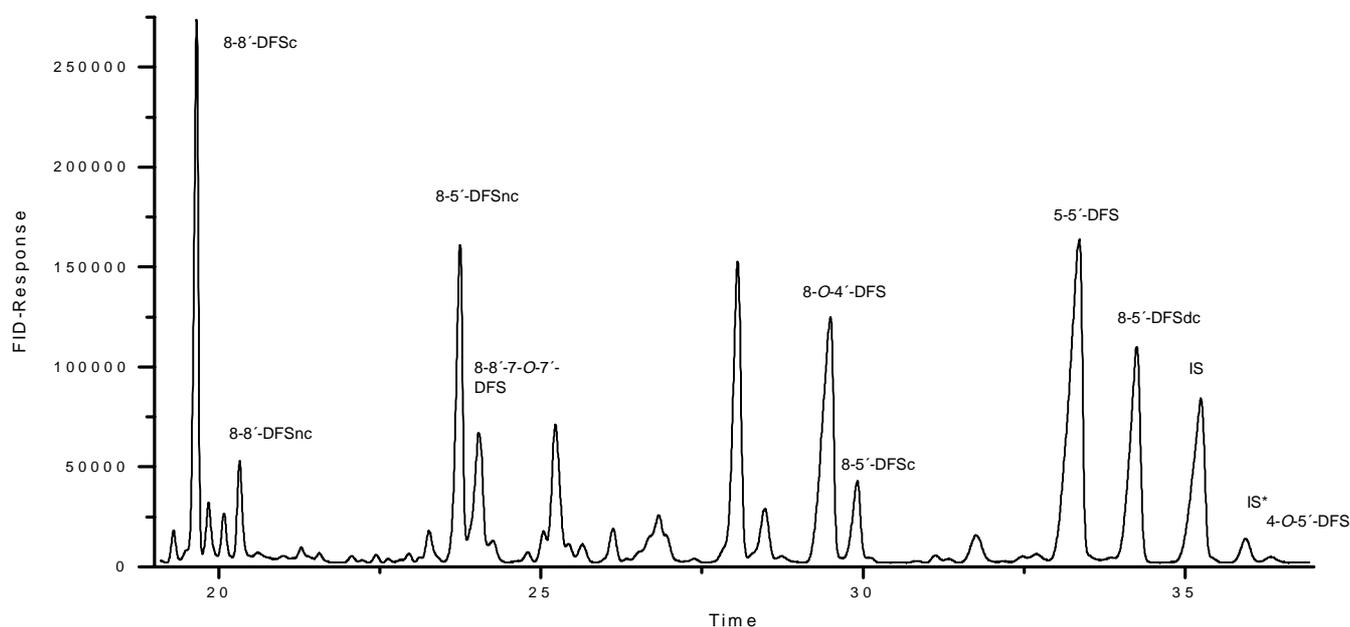


Abbildung 18: GC-FID-Chromatogramm von unlöslichen Maisballaststoffen (Bereich der dimeren PCS); zur Identifizierung von 8-8'-7-O-7'-DFS s. Kapitel 3.1.9

In den alkalischen Hydrolysaten der UBS von Hirse und Hafer konnten mit Ausnahme der 4-O-5'-DFS alle genannten DFS nachgewiesen werden.

Wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben, erfolgte die Identifizierung der DFS aus den alkalischen Hydrolysaten der LBS anhand der relativen Retentionszeiten und anhand charakteristischer Ionen im SIM-Modus bei Verwendung des Quadrupol-Massenspektrometers oder anhand der gesamten Spektren bei Verwendung des Ion-Trap-Massenspektrometers. In Kapitel 5.5.1, Abbildung 53 ist das GC-MS-Chromatogramm im SIM-Modus von LBS aus Weizen abgebildet. In den LBS aus allen untersuchten Getreiden konnten mit Ausnahme der 4-O-5'-DFS alle DFS identifiziert werden. Die Quantifizierung der DFS erfolgte unter Verwendung eines neuen IS. Zur Bestimmung der dimeren PCS hatte der bisher verwendete Standard oCS weder ideale Elutionseigenschaften noch waren die Responsefaktoren (0,10 – 0,37 (RALPH et al., 1994)) befriedigend. Die Verwendung eines monomeren IS zur Bestimmung dimerer PCS kann des weiteren Fehler bei der Quantifizierung aufgrund unterschiedlicher Verteilungseigenschaften bei der Aufarbeitung ergeben. Ein besser

geeigneter IS war kommerziell nicht erhältlich. Monomethylierte 5-5'-DFS (Abb. 19) sollte aufgrund ihrer Struktur einen geeigneten Standard darstellen. Diese Substanz wurde von unseren Kooperationspartnern synthetisiert und zur Bestimmung eingesetzt. Später wurde im Verlauf der Analysen bemerkt, daß der im NMR-Spektrum zunächst rein erscheinende IS durch geringe Mengen des dimethylierten Produkts (IS*) verunreinigt war. Da die Responsefaktoren mit derselben Charge des IS bestimmt wurden, mit der die Analysen durchgeführt wurden, sind die quantitativen Ergebnisse zweifellos richtig. Um in Zukunft jedoch „allgemein gültige“ Responsefaktoren zu bestimmen, sollte der IS eine Reinheit von >99 % aufweisen. Die Reinigung des monomethylierten Produkts von dem dimethylierten Produkt ist schwierig, so daß die Synthese und Verwendung des dimethylierten Produkts eine Alternative darstellen kann.

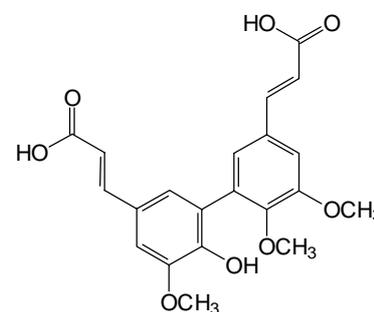


Abbildung 19: Struktur von 5-5'-Me-DFS

Wie man Abbildung 18 entnehmen kann, wurden trotz der einfachen Aufarbeitung durch Extraktion mit Diethylether ohne weiteres Clean-up alle Komponenten gut getrennt und konnten ohne Schwierigkeiten integriert werden. Auch wenn sich die Chromatogramme einiger BS komplexer darstellten (z.B. alkalisches Hydrolysat von UBS aus Dinkel, Kapitel 5.5.1, Abb. 54), traten bei der Auswertung keine Schwierigkeiten auf. Unter den dargestellten chromatographischen Bedingungen co-eluierten keine Verunreinigungen mit den DFS, wie mittels GC-MS überprüft wurde. Obwohl einige weitergehende Clean-up-Methoden wie Festphasen-Extraktion (RENGER & STEINHART, 2000) oder flüssig-flüssig-Extraktion mit Natriumhydrogencarbonatlösung (PACKERT, 1993) beschrieben wurden, ist ihre Anwendung nicht notwendig, wenn die beschriebenen GC-Bedingungen eingehalten werden.

Die bestimmten Gehalte für die Summe der DFS in den Hydrolysaten der UBS variieren beträchtlich zwischen den untersuchten Getreidearten (Abb. 20). Die Gehalte betragen zwischen 12,6 mg g⁻¹ UBS in Mais bis zu 2,4 mg g⁻¹ UBS in Weizen. Auch wenn der hohe Wert für die UBS von Mais außer acht gelassen wird, schwanken die Gehalte erheblich. So enthalten z.B. die UBS von Hirse doppelt so viele DFS wie die von Weizen, Dinkel und Wildreis.

In den meisten Fällen war eine Quantifizierung der DFS in den alkalischen Hydrolysaten der LBS möglich. In den LBS von Reis und Wildreis konnten DFS eindeutig nachgewiesen werden, die Gehalte lagen jedoch unter der Bestimmungsgrenze von ca. 3 µg/g LBS/UBS. Die Gehalte für die Summe der DFS für die anderen

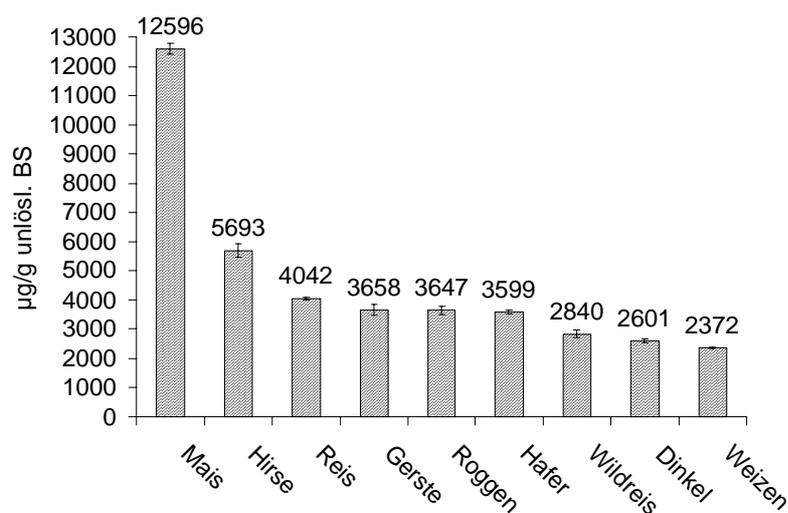


Abbildung 20: Gehalte für die Summe der DFS in unlöslichen BS

Getreide variieren zwischen ca. $230 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS in Dinkel und $40 \mu\text{g g}^{-1}$ in Hafer (Abb. 21). Es besteht kein Zusammenhang zwischen hohen absoluten DFS-Gehalten in LBS und UBS. So enthalten die LBS von Mais nur ca. $60 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS, wohingegen die UBS von Mais mit Abstand den größten Gehalt an DFS aufweisen. Wie bereits bei der Bestimmung der monomeren PCS erwähnt, werden die

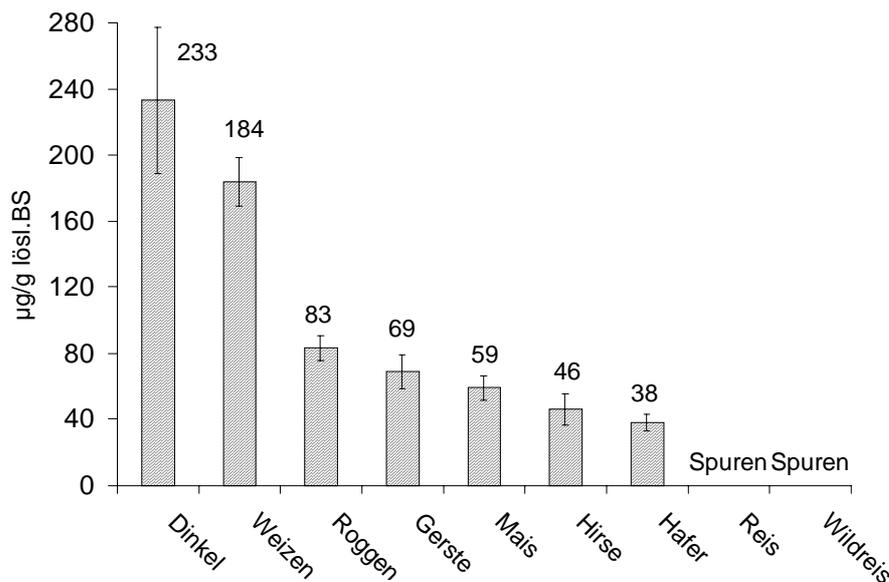


Abbildung 21: Gehalte für die Summe der DFS in löslichen BS

relativen Gehalte bezogen auf die Arabinoxylane in Kapitel 3.1.6 bestimmt und diskutiert. Unabhängig von den relativen Gehalten sind die absoluten Gehalte an DFS in den LBS von Dinkel um den Faktor 50 kleiner als in den UBS von Mais und immerhin noch um den Faktor 10 kleiner als in den UBS von Weizen. Die Gesamt-DFS-Gehalte mit Standardabweichungen und der Verteilung auf die einzelnen Säuren sind in Kapitel 5.4.8 tabellarisch aufgeführt.

Detaillierte Untersuchungen über die DFS-Gehalte in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen sind selten. RENGGER & STEINHART (2000) untersuchten die UBS von Mais (*Zea mays* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.), Reis (*Oryza sativa* L.), Gerste (*Hordeum vulgare* L.), Roggen (*Secale cereale* L.), Hafer (*Avena sativa* L.) und Hirse (*Panicum miliaceum* L.) auf DFS und bestimmten die Gehalte der ester gebundenen DFS halbquantitativ. Da keine Standardsubstanzen zur Verfügung standen, wurde die halbquantitative Bestimmung durchgeführt, indem die Responsefaktoren der DFS gegenüber oCS als internen Standard gleich 1,0 gesetzt wurden. Sehr niedrige absolute Gehalte für die Summe der DFS von 150 (Hafer) bis 950 (Hirse) $\mu\text{g g}^{-1}$ UBS wurden ermittelt. Wie bereits erwähnt, bestimmten RALPH et al. (1994) für die Responsefaktoren der DFS gegenüber oCS Werte von 0,10 bis 0,37. Die Berechnung der Gehalte mit einem Responsefaktor von 1,0 führt somit zu erheblichen Ungenauigkeiten. Verluste an DFS können durch das weitere Clean-up mittels Festphasen-Extraktion entstehen, wenn dieses Clean-up nicht anhand von Standardsubstanzen optimiert wird. Des Weiteren konnten in dieser Studie weder 8-5'-DFSc noch 8-5'-DFSdc nachgewiesen werden. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, können aber eventuell ebenfalls auf Verluste bei dem weiteren Reinigungsschritt zurückgeführt werden. Die UBS von Dinkel und Wildreis wurden ebenso wie lösliche Getreideballaststoffe nicht in die Untersuchungen einbezogen.

Entsprechende Studien mit BS als Ausgangsmaterial sind rar. In den folgenden diskutierten Studien ist das Untersuchungsmaterial nur begrenzt vergleichbar.

SAULNIER et al. (1999) untersuchten mit Amylase und Protease behandelte Maiskleie. Sie bestimmten einen DFS-Gehalt von $13,3 \text{ mg g}^{-1}$. Dieser Gehalt ist durchaus vergleichbar mit dem hier bestimmten. Es ist jedoch zu beachten, daß Maiskleie und nicht das gesamte Korn untersucht wurde und daß der Asche- und Restproteingehalt bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurden. Des

weiteren konnten keine 8-8'-gekoppelten Diferulasäuren bestimmt werden und die Möglichkeit des Vorliegens der decarboxylierten Form von 8-5'-DFS wurde nicht in Betracht gezogen. Der negative Nachweis 8-8'-gekoppelter Diferulasäuren ist ein generelles Problem in Studien, die zur Bestimmung der DFS HPLC-Methoden anwenden, da die HPLC nicht die Trennleistung erbringen kann, die durch gaschromatographische Methoden möglich ist. Die meisten angewendeten HPLC-Methoden basieren auf der von WALDRON et al. (1996) publizierten Methode. Die Trennung der DFS erfolgt anhand einer RP18-Phase mit einem ternären Eluenten, bestehend aus wäßriger TFA, Methanol und Acetonitril, zur Detektion wird ein Dioden-Array-Detektor eingesetzt. Problematisch ist immer die Trennung von monomerer FS von den 8-8'-gekoppelten DFS. Große Substanzmengen von monomerer FS können die 8-8'-gekoppelten DFS überlagern und ihre Identifizierung verhindern. Die gaschromatographische Analytik der DFS ist daher trotz des Nachteils der notwendigen Derivatisierung der flüssigchromatographischen Bestimmung vorzuziehen. Allerdings könnte die flüssigchromatographische Trennung mit massenspektrometrischer Detektion v.a. im SIM-Modus neue Möglichkeiten eröffnen.

BARTOLOMÉ et al. (1997) identifizierten und quantifizierten DFS aus mit Amylase behandeltem Weizenmehl (*Triticum aestivum* L.) (volles Korn) und aus Treber des Brauprozesses (Gerste (*Hordeum vulgare* L.)). Sie bestimmten mittels HPLC 1,4 mg g⁻¹ Gesamt-DFS im Treber und 1,6 mg g⁻¹ Gesamt-DFS im behandelten Weizenmehl. Aufgrund der zuvor diskutierten Gründe sind die Ergebnisse nur sehr begrenzt vergleichbar. GARCIA-CONESA et al. (1998) ermittelten den Gesamt-DFS-Gehalt in amylyasebehandelter Weizenkleie (*Triticum aestivum* L.) zu 1,3 mg g⁻¹. Unter den von ihnen gewählten analytischen Bedingungen (HPLC-Bestimmung) konnten sie jedoch weder 8-8'-gekoppelte DFS noch 8-5'-DFSnc und 8-5'-DFSdc nachweisen. Kürzlich untersuchten ANDREASEN et al. (2000) Roggenkleie (*Secale cereale* L.) mit einer HPLC-Methode auf DFS. Sie wiesen 8-5'-DFSnc, 8-5'-DFSdc, 8-O-4'-DFS und 5-5'-DFS nach und bestimmten den Gesamt-DFS-Gehalt zu 307 µg g⁻¹ (bezogen auf Trockengewicht, nicht amylyasebehandelt, nicht proteasebehandelt). LEMPEREUR et al. (1998) identifizierten die gleichen DFS wie ANDREASEN et al. (2000) im vollen Korn sowie in Mahlfractionen von Hartweizen (*Triticum durum* Desf.), einer hier nicht untersuchten Getreideart.

FIGUEROA-ESPINOZA & ROUAU (1998) und DERVILLY et al. (2000) konnten kleine Mengen DFS (bis zu 350 µg g⁻¹) in wasserlöslichen Arabinoxylanen aus Weizen (*Triticum aestivum* L.) bestimmen.

Bei all diesen Studien ist zu berücksichtigen, daß nicht nur das Ausgangsmaterial meist wenig vergleichbar ist. Wie bereits erwähnt, kann die Anwendung der HPLC-Methode zu falsch negativen Befunden für einige DFS führen. Außerdem sind in allen Untersuchungen voneinander abweichende Hydrolysebedingungen angewendet worden (vgl. auch Kapitel 2.2.5.1). Um Vergleiche zwischen den Getreidearten ziehen zu können, muß man, wie hier geschehen, von einheitlich gewonnenen Untersuchungsmaterialien ausgehen und alle Proben der gleichen Aufarbeitung unterziehen.

In fast allen Studien wurde auch nicht zwischen wasserlöslichen und -unlöslichen Anteilen des Getreidekorns differenziert, so daß aus diesen Arbeiten der eventuelle Einfluß von DFS auf die Löslichkeit von Polysacchariden nicht herausgearbeitet werden kann (s. Kapitel 3.1.5 und 3.1.6). Lediglich die Arbeiten von FIGUEROA-ESPINOZA & ROUAU (1998) und DERVILLY et al. (2000) konnten zeigen, daß auch wasserlösliche Arabinoxylane DFS (wenn auch nur in geringen Mengen) enthalten.

3.1.5 Verhältnisse monomerer Ferulasäure zu Dehydrodiferulasäuren

Ein strukturelles Merkmal für LBS und UBS ist neben dem Substitutionsgrad der Arabinoxylane mit FS und DFS (folgendes Kapitel) der Dimerisierungsgrad der gebundenen FS. Zur Abschätzung, welcher Anteil der „Gesamtferulasäureverbindungen“ (= FS+DFS) in dimerisierter Form vorliegt, kann man unterschiedliche Faktoren bilden. Ein einfacher Faktor ist $(\sum \text{DFS} [\text{mg g}^{-1}] / (\text{cis/trans-FS} [\text{mg g}^{-1}] + \sum \text{DFS} [\text{mg g}^{-1}])) \times 100$. Dieser entspricht ungefähr dem prozentualen Anteil der dimeren FS an den Gesamtferulasäureverbindungen und ist ein Maß für den Dimerisierungsgrad. Werte für die genaue molare Berechnung sind in Kapitel 5.4.9 angegeben. Diese unterscheiden sich von dem hier diskutierten Faktor jedoch kaum. Allerdings ist auf die begrenzte Aussagekraft dieses Faktors hinzuweisen. Durch die Reaktion der monomeren und dimeren FS in der Pflanzenzellwand mit Monolignolen können diese in die Lignifizierung mit einbezogen werden und werden bei der hier durchgeführten Analytik nicht erfaßt, da die Einbindung über Etherbindungen oder C-C-Bindungen erfolgt. Dieser Faktor bezieht sich also nur auf monomere und dimere FS, die ausschließlich in Esterbindung vorliegen. Den in den Lignifizierungsprozeß

einbezogenen Anteil erfaßt man nicht. Abbildung 22 stellt die Faktoren für die LBS und UBS gegenüber. Die Werte für den Faktor und damit die ungefähren prozentuale Anteile der DFS an den Gesamtferulasäureverbindungen betragen in den UBS zwischen 26 in Dinkel und 45 in Hafer und in den LBS zwischen 5 in Roggen und 24 in Dinkel. Man erkennt deutlich, daß in den UBS der Anteil der DFS an den Gesamtferulasäureverbindungen höher ist als in den LBS. Mit der Ausnahme von Dinkel und Roggen ist der Dimerisierungsgrad in den UBS zwei bis dreimal höher als in den LBS. Der Dimerisierungsgrad für UBS aus Dinkel ist nur um den Faktor 1,1 höher als in den LBS, der Dimerisierungsgrad in UBS aus Roggen hingegen ist um den Faktor 6,6 größer als in den LBS. Der Dimerisierungsgrad zeigt somit strukturelle Unterschiede zwischen UBS und LBS auf.

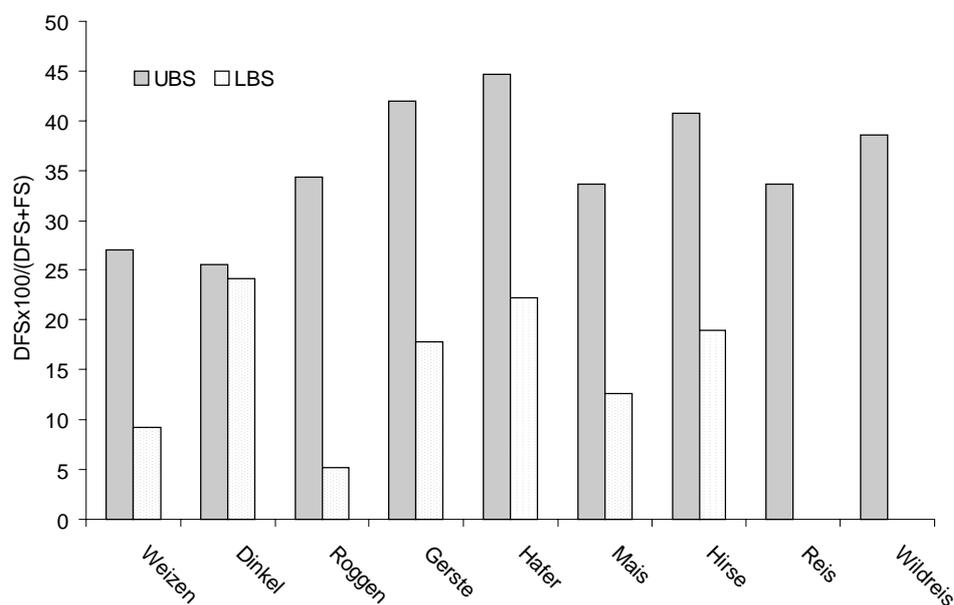


Abbildung 22: Vergleich der Dimerisierungsgrade von UBS und LBS

Aus einigen der in Kapitel 3.1.4 diskutierten Untersuchungen läßt sich der hier vorgestellte Faktor vergleichsweise berechnen:

SAULNIER et al., 1999: Maiskleie: 33,8

ANDREASEN et al., 2000: Roggenmehl (volles Korn): 23,1; Roggenkleie: 20,9

BARTOLOMÉ et al., 1997: Weizenmehl: 18,5; Treber: 31,1

GARCIA-CONESA et al., 1998: Weizenkleie: 22,5

FIGUEROA-ESPINOZA & ROUAU, 1998: wasserlösliche Arabinoxylane aus Weizen: 11,1

Der direkte Vergleich ist nur mit den wasserlöslichen Arabinoxylanen aus Weizen möglich, da diese vollständig in den LBS vorliegen würden, wobei die anderen untersuchten Materialien Arabinoxylane enthalten, die sich auf die UBS und LBS verteilen würden. Der Faktor für die wasserlöslichen Arabinoxylane aus Weizenmehl (11,1) stimmt recht gut mit dem für LBS aus Weizen bestimmten (9,2) überein.

3.1.6 Gehalte an monomerer und dimerer Ferulasäure in bezug auf den Arabinoxylangehalt der Ballaststoffe

In den bisher auf die Bindungsverhältnisse untersuchten Getreidekaryopsen von Mais und Weizen (SMITH & HARTLEY, 1983, McCALLUM et al., 1991, SAULNIER et al., 1995) konnte die Bindung monomerer FS nur an Arabinoxylane nachgewiesen werden. Die in Kapitel 3.2 vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß auch in den untersuchten Getreiden Roggen und Wildreis die Bindung der FS an Arabinoxylane erfolgt. Sowohl in Mais und Weizen als auch in Roggen und Wildreis ist FS über die Arabinosesubstituenten an die Arabinoxylane gebunden. Die absoluten Gehalte an monomerer und dimerer FS sagen weder etwas über den Substitutionsgrad der Arabinoxylane mit FS noch über den Verknüpfungsgrad der Arabinoxylane über DFS aus, da die Arabinoxylangehalte in den verschiedenen BS unterschiedlich sind. Aus diesem Grund müssen die ermittelten FS- und DFS-Gehalte auf den Arabinoxylangehalt bezogen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, einen Faktor zu bilden, der den FS/DFS-Gehalt auf den ermittelten Gehalt an Arabinose bezieht (RENGER, 1999). Die Bildung dieses Faktors erscheint zunächst einleuchtend, da FS wie erwähnt an die Arabinosesubstituenten gebunden ist und über diese die Xylanketten verknüpft. Jedoch kann dieser Faktor ungenau werden, wenn man Arabinoxylane mit stark differierendem Arabinose/Xylose-Verhältnis betrachtet. Das makromolekulare Verhalten der Arabinoxylane beruht hauptsächlich auf der linearen Hauptkette, bestehend aus Xylose-Einheiten. Arabinose bildet lediglich monomere oder oligomere Seitenketten. Das Crosslinking von Arabinoxylanen besteht aus der Verknüpfung von Xylanketten durch Arabinose-DFS-Arabinose Einheiten unabhängig davon, wie viele Arabinose-Seitenketten die Xylankette trägt. Man kann sich z.B. ein lineares Xylan mit wenigen Seitenketten vorstellen, das jedoch dieselbe Anzahl an DFS enthält wie ein stark mit Arabinose substituiertes Xylan. In diesem Fall wäre das DFS/Arabinose-Verhältnis zwischen zwei Getreidearten unterschiedlich, obwohl das Ausmaß des Crosslinkings dasselbe wäre. Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, variieren die Arabinose/Xylose-Verhältnisse beträchtlich, so daß der DFS/Arabinose-Faktor ungeeignet erscheint. Der DFS/Arabinose-Faktor weist eine weitere Schwierigkeit auf. So können Arabinogalaktane Bestandteile von löslichen Getreideballaststoffen sein, so daß das Ausmaß des Crosslinkings unterschätzt würde. Aus den genannten Gründen bietet sich die Bestimmung des Verhältnisses von FS bzw. DFS zu Xylose als bessere Alternative an. Jedoch muß man auch hier mit (vergleichsweise geringen) Ungenauigkeiten bei den BS aus Reis rechnen, da sich, wie in Kapitel 1.3.1.1 erwähnt, Reis von den anderen Getreiden unterscheidet, indem die Zellwandpolysaccharide auch Xyloglucane beinhalten. In Tabelle 3 sind die molaren Quotienten FS/Xyl, $(FS+2xDFS)/Xyl$ und DFS/Xyl aufgeführt. Auch hier ist zu berücksichtigen, daß diese Faktoren nur Aussagen über die Anteile der FS bzw. DFS machen, die nicht in den Lignifizierungsprozeß einbezogen sind. Der Faktor $(FS+2xDFS)/Xyl$ stellt das Verhältnis der (hypothetischen) „Gesamtferulasäureverbindungen“ vor der Dimerisierung zum Arabinoxylangehalt dar.

Tabelle 3: Molare Verhältnisse von FS und DFS zu Arabinoxylangehalten

UBS	FS/Xyl*	(FS+2xDFS)/Xyl**	DFS/Xyl***	LBS	FS/Xyl*	(FS+2xDFS)/Xyl**	DFS/Xyl***
Weizen	23,8	32,9	4,6	Weizen	7,0	8,1	0,4
Dinkel	28,6	38,7	5,0	Dinkel	3,7	5,1	0,6
Roggen	22,5	34,9	6,2	Roggen	5,6	6,0	0,2
Gerste	20,5	35,8	7,7	Gerste	7,9	9,8	0,9
Hafer	22,8	41,9	9,5	Hafer	6,2	7,0	0,8
Mais	94,5	143,6	24,5	Mais	16,8	19,8	1,3
Hirse	88,3	151,2	31,4	Hirse	29,3	37,0	3,6
Reis	72,5	110,0	18,8	Reis	15,1	-	-
Wildreis	45,1	74,3	14,6	Wildreis	11,6	-	-

* - $(cis/trans\text{-FS [mol g}^{-1}]/Xyl [mol g^{-1}]) \times 1000$

** - $((cis/trans\text{-FS [mol g}^{-1}] + 2 \times \sum DFS [mol g^{-1}]) / Xyl [mol g^{-1}]) \times 1000$

*** - $(\sum DFS [mol g^{-1}] / Xyl [mol g^{-1}]) \times 1000$

Die Werte für den Faktor $(FS+2xDFS)/Xyl$ unterscheiden sich erheblich für LBS und UBS. Jedoch auch innerhalb der UBS bzw. LBS gibt es in Abhängigkeit von der Getreideart große Schwankungen. So sind die Arabinoxylane der UBS aus Hirse am meisten mit FS verestert (vor Dimerisierung), obwohl Mais mit Abstand die höchsten absoluten Gehalte sowohl für FS als auch für DFS aufweist. Das gleiche gilt für die LBS. Aufgrund des niedrigen Arabinoxylangehalts in den LBS von Hirse berechnet sich für die Hirsearabinoxylane ein ungefähr fünfmal höherer Ferulasäuresubstitutionsgrad als für die der LBS von Weizen. Die LBS von Weizen weisen jedoch einen neunmal höheren absoluten Gehalt an FS und auch einen viermal höheren absoluten Gehalt an DFS auf, allerdings dominieren die Arabinoxylane die Polysaccharide, was in den relativen Werten zum Ausdruck kommt.

Die weitaus geringere Veresterung der Arabinoxylane der LBS mit FS, verbunden mit einem ebenfalls niedrigeren Dimerisierungsgrad (s. vorheriges Kapitel) führt zu viel niedrigeren Verknüpfungsgraden der Arabinoxylane über DFS, ausgedrückt durch den Faktor DFS/Xyl . Die Arabinoxylane der UBS aus Hirse und Mais sind mit Abstand am stärksten über Diferulasäurebrücken verbunden. Innerhalb der UBS sind die Arabinoxylane aus Dinkel und Weizen am wenigsten verknüpft. In der Gruppe der LBS weisen ebenfalls Hirse- und Mais-Arabinoxylane den größten Verknüpfungsgrad auf, wohingegen die Arabinoxylane von Roggen nur sehr wenig verknüpft sind. Die Arabinoxylane der UBS sind zwischen 8 (Dinkel) und 39 (Roggen) mal stärker über Diferulasäurebrücken miteinander verbunden als die in den entsprechenden LBS. Dies kann einen wesentlichen Faktor für die Unlöslichkeit der Arabinoxylane als Bestandteile der UBS darstellen.

Die Kopplung von FS-Arabinoxylan-Verbindungen über DFS führt zur Gelierung der Arabinoxylane (GEISSMANN & NEUKOM, 1973, IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995, NG et al., 1997). NG et al. (1997) versetzten eine Lösung eines Glucuronoarabinoxylans mit Peroxidase und Wasserstoffperoxid bis zur Gelierung. Sie konnten die Gelbildung in direkten Zusammenhang mit einer Abnahme des Gehaltes an FS und einer Zunahme an DFS setzen. Sie berechneten, daß die Arabinoxylane in Gelform um den Faktor zehn stärker über Diferulasäurebrücken verknüpft waren als die in Lösung. Auf die gleiche Weise können DFS teilweise für die Unlöslichkeit der Arabinoxylane als Bestandteile der UBS verantwortlich sein (SAULNIER et al., 1995). Auch wenn bisher all-

gemein angenommen wurde, daß die Löslichkeit der Arabinoxylane hauptsächlich von ihrem Arabinosesubstitutionsgrad beeinflußt wird, zeigen die hier erzielten Ergebnisse, daß die Löslichkeit der Arabinoxylane stark von dem Verknüpfungsgrad über DFS abhängt. Dies erscheint logisch, da durch Verknüpfung von Arabinoxylanen durch nur wenige DFS-Brücken das Molekulargewicht der Arabinoxylane immens steigt.

Das Ergebnis, daß der FS-Dimerisierungsgrad (s. vorheriges Kapitel) der Arabinoxylane der LBS geringer ist als der der Arabinoxylane der UBS, steht in Gegensatz zu den Ergebnissen von GRABBER et al. (1995). Diese Arbeitsgruppe zeigte anhand von Zellsuspensionen von Mais, daß die Zellwand auf eine Drosselung der Ferulasäuregehalte der Arabinoxylane mit einer erhöhten Dimerisierung der wenigen Ferulasäuregruppen reagiert. Durch Manipulationen mittels Enzyminhibitoren wurde der Ferulasäuregehalt in der Zellwand auf ein Viertel des ursprünglichen Gehaltes verringert. Der Dimerisierungsgrad stieg parallel von 15 auf 27 % an. Die Arabinoxylane der hier untersuchten LBS, die einen deutlich geringeren FS-Gehalt besitzen, weisen jedoch auch geringere Dimerisierungsgrade als die Arabinoxylane der UBS auf. Ein Grund dafür kann sein, daß die Verteilung der FS über das Arabinoxylan in den manipulierten Zellwänden als Reaktion auf das verminderte Ferulasäure-CoA-Angebot regelmäßiger angelegt wird, um die Möglichkeit des Crosslinking über DFS zu maximieren (GRABBER et al., 1995). Die LBS stammen jedoch aus nicht manipulierten Zellwänden, die sowohl Arabinoxylane mit hohem Ferulasäuregehalt als auch solche mit niedrigem Substitutionsgrad besitzen. Der direkte Vergleich mit dem Modell aus manipulierten Maiszellsuspensionen erscheint daher schwierig.

3.1.7 Vergleich der Diferulasäuremuster von löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

Die prozentuale Verteilung der Gesamtdiferulasäuren auf 8-5'-, 8-8'-, 8-O-4'-, 5-5'- und 4-O-5'-gekoppelte Diferulasäuren ist in Kapitel 5.4.10 tabellarisch dargestellt. RALPH et al. (1994) weisen deutlich darauf hin, daß 8-5'-DFSc, 8-5'-DFSnc und 8-5'-DFSdc in der Pflanzenzellwand den Diester von 8-5'-DFSc als gemeinsamen Vorläufer haben. Während der alkalischen Hydrolyse können aus dem cyclischen Diester sowohl 8-5'-DFSc als auch 8-5'-DFSnc entstehen. Durch Decarboxylierung von 8-5'-DFSnc kann im weiteren Verlauf der Hydrolyse 8-5'-DFSdc gebildet werden. Bei der Bestimmung sollten diese drei Säuren immer addiert werden. Ein Vergleich der Einzelsäuren macht keinen Sinn, da die Säuren für die Kopplung der Arabinoxylane nicht relevant sind, sondern nur der eine cyclische Diester, aus dem sie hervorgehen. Des weiteren hängen die Anteile der drei Säuren von den angewendeten Hydrolysebedingungen ab, so daß Vergleiche der Einzelsäuren wenn überhaupt nur bei Einhaltung exakt gleicher Hydrolysebedingungen gestattet wären. Bei Analysemethoden, die die Derivatisierung der DFS mit einer Mischung aus BSTFA und Pyridin vorsehen, besteht auch bei diesem Schritt die Möglichkeit der Umwandlung von 8-5'-DFSc zu 8-5'-DFSnc (RALPH et al., 1994). Ebenso sollten die Werte der beiden 8-8'-gekoppelten DFS addiert und gemeinsam behandelt werden, da die Vorläufer dieser Verbindung in der Pflanze nicht bekannt sind (s. unten).

Die Diferulasäuremuster für die UBS aus den verschiedenen Getreidearten sind sehr ähnlich. Abbildung 23 zeigt die prozentuale Verteilung der DFS für UBS und LBS aus Roggen. Das DFS-Muster für die UBS aus Roggen ist typisch für die UBS. In allen UBS dominieren die 8-5'-gebundenen DFS mit bis zu 54 % der DFS in Roggen. Danach folgen die 8-O-4'-DFS mit bis zu 21 % in Hafer oder die 8-8'-DFS mit bis zu 26 % in Wildreis. Die lange Zeit allein bekannte DFS, die 5-5'-DFS, trägt nur bis zu 16 % der DFS (Weizen) bei. Der Anteil der 4-O-5'-DFS ist mit bis zu

0,5 % in Weizen und Dinkel äußerst gering. Das Diferulasäuremuster der UBS aus Mais weicht geringfügig ab. Auch hier dominieren die 8-5'-DFS, 5-5'-DFS trägt jedoch 25 % zu den DFS bei.

Die Diferulasäuremuster der LBS sind untereinander auch sehr ähnlich, unterscheiden sich aber erheblich von denen der UBS. Die Anteile der 8-8'-DFS sind größer und häufig bilden sie die Hauptfraktion mit bis zu 46 % in Dinkel. Die

Anteile der 8-5'-DFS betragen bis zu 45 % in Hafer, wohingegen 5-5'-DFS und 8-O-4'-DFS nur mit bis zu 17 % (Gerste) bzw. 12 % (Mais) zu den DFS beitragen.

Die erhöhten Gehalte an 8-8'-DFS in den LBS sind sehr interessant in Hinblick auf die Struktur der 8-8'-DFS-Ester in der Pflanze. Der radikalische Kopplungsmechanismus führt bei der 8-8'-Kopplung der Phenoxyradikale zunächst zu einer Bis-Chinonmethidstruktur **1** (Abb. 24). Hiervon ausgehend können theoretisch drei mögliche Wege eingeschlagen werden, die zu den Verbindungen **2-4** führen (RALPH et al., 1994). Die beobachteten 8-8'-DFS können bei der alkalischen Hydrolyse entweder nur aus der Struktur **3**, einer Mischung der Strukturen **2** und **4** oder natürlich aus einer Mischung aller drei Strukturen hervorgehen.

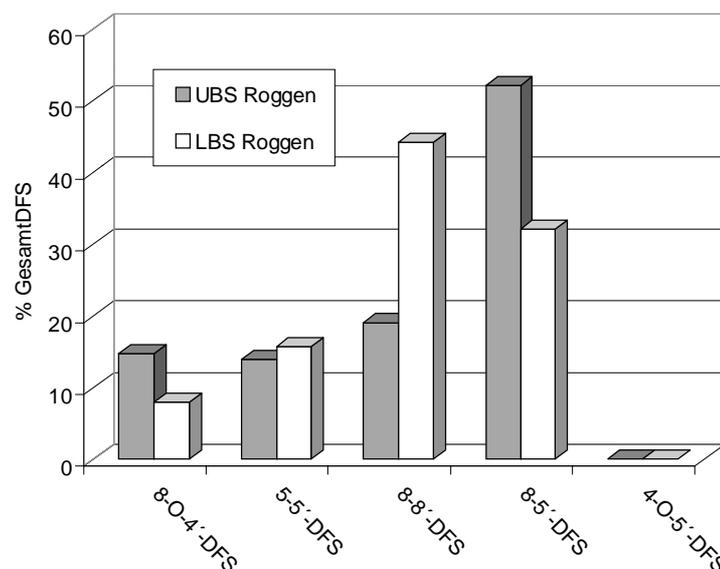


Abbildung 23: Diferulasäuremuster der UBS und LBS aus Roggen

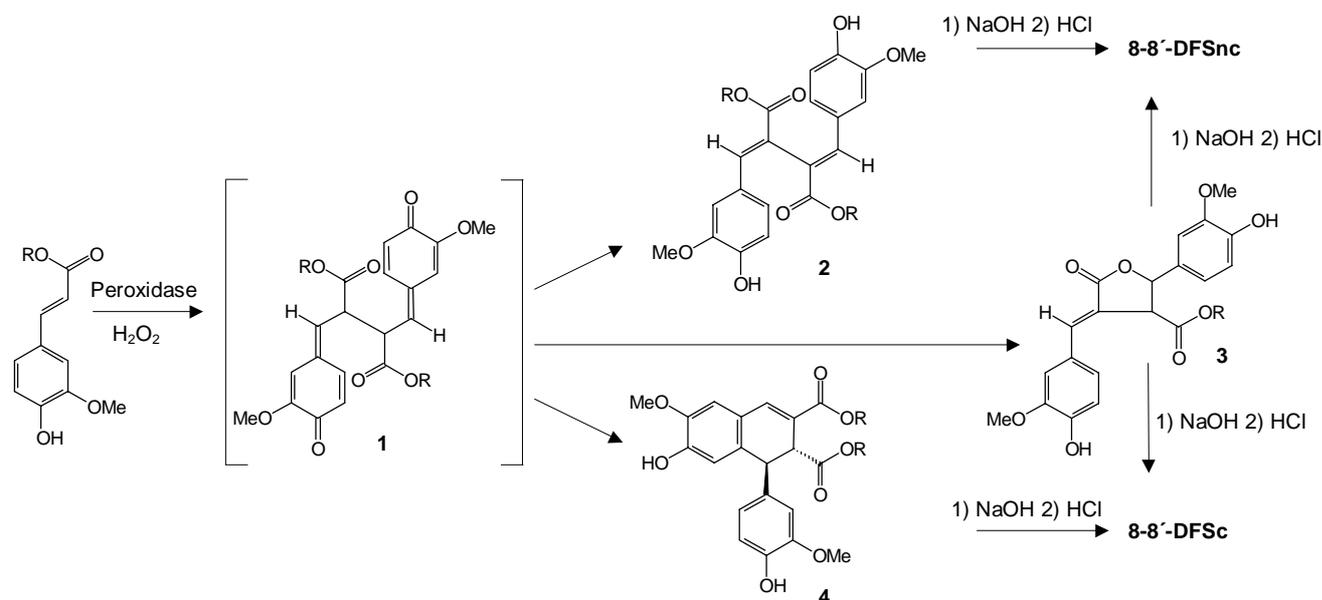


Abbildung 24: Bildungsweg 8-8'-gekoppelter Diferulasäureester und Bildung der freien Säuren (alkalische Hydrolyse)

Welche der drei 8-8'-DFS-Ester-Strukturen in der Pflanze (und damit in den BS) vorliegen, ist bislang nicht bekannt. Die Bedeutung der Klärung dieser Frage liegt darin, daß die Verbindungen **2** und **4** Crosslink Strukturen darstellen. Bei der Bildung von Struktur **3** findet jedoch eine intramolekulare Umesterung mit Bildung des γ -Lactons statt. Bei der Umesterung wird eine Polysaccharid-

kette abgespalten, so daß man Struktur **3** nicht mehr als eine Crosslink Struktur betrachten kann. Das heißt, wenn nur Struktur **3** allein in der Pflanze vorliegt, würden über 8-8'-Strukturen keine Polysaccharide miteinander verknüpft. Dies könnte eine Erklärung für die erhöhten Gehalte an 8-8'-DFS in den LBS, in denen man nur einen niedrigen Verknüpfungsgrad erwartet, darstellen.

3.1.8 Identifizierung von „cis“-Dehydrodiferulasäuren

Durch Belichtung der monomeren PCS wird eine *cis/trans*-Isomerisierung erreicht. Unter Einwirkung von Licht sollten daher auch die DFS teilweise in die *cis*-Formen überführt werden. Die einzige DFS, die keiner Isomerisierung unterliegen kann, ist 8-8'-DFS_c. Für die anderen DFS ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten der Isomerisierung. Vor allem ist zu unterscheiden, ob die Isomerisierung die disubstituierte Alkenylgruppe betrifft, die nicht in den radikalischen Kopplungsprozeß einbezogen ist, oder die durch Kopplung trisubstituierte Alkenylgruppe. Wie Abbildung 25 zeigt, bestehen bei der Belichtung von 8-5'-DFS_{nc} beide Möglichkeiten.

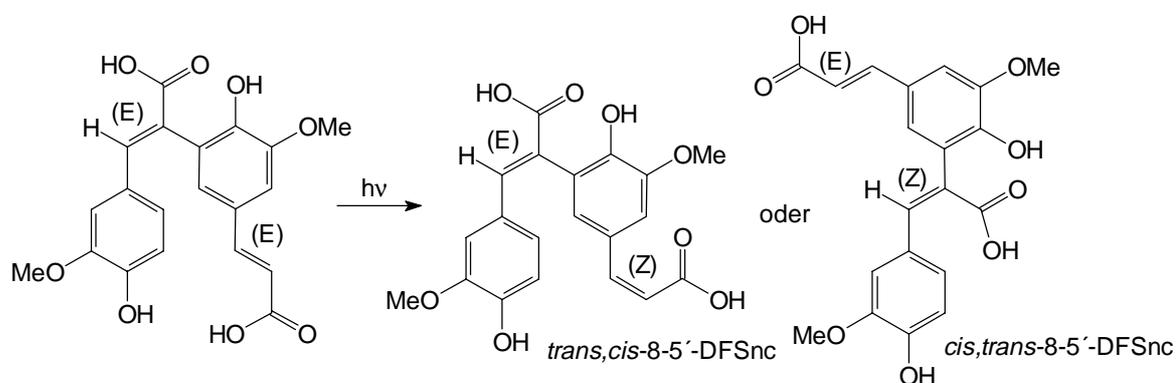


Abbildung 25: Lichtbedingte Isomerisierung von *trans,trans*-8-5'-DFS_{nc}

Natürlich besteht auch die Möglichkeit der Isomerisierung beider Doppelbindungen zum *cis,cis*-Produkt. PACKERT (1993) stellte fest, daß monomere Zimtsäuren in *cis*-Konfiguration in der GC bei Trennung auf einer DB-5-Säule vor den entsprechenden *trans*-Säuren eluieren. Das gleiche Elutionsverhalten konnte hier für pCS und FS auch auf einer DB-1-Säule beobachtet werden. Dementsprechend wurden auch in einer bestrahlten Probe von 5-5'-DFS zwei weitere Peaks beobachtet, die vor dem *trans,trans*-Produkt eluieren, nämlich *cis,trans*-5-5'-DFS und *cis,cis*-5-5'-DFS. Hierbei sollte die *cis,cis*-Säure vor der *cis,trans*-Säure eluieren. Aus dem Bestrahlungsansatz von *trans,trans*-8-8'-DFS_{nc} erhält man jedoch zwei weitere Produkte, die nach der *trans,trans*-8-8'-DFS_{nc} eluieren. Für die Isomerisierung der dreifach substituierten, in die radikalische Kopplung einbezogene Alkenylgruppe ist das beschriebene Elutionsverhalten nicht gültig. Aufgrund dieser Elutionsverhalten kann man über die Lage der isomerisierten Doppelbindung im Molekül spekulieren, ein Strukturbeweis ist so jedoch nicht möglich.

In allen untersuchten LBS und UBS konnten geringe Mengen an „cis“-DFS durch Vergleich der relativen Retentionszeiten mit denen bestrahlter Proben und durch Vergleich der Massenspektren nachgewiesen werden. Insgesamt wurden drei „cis“-DFS identifiziert: „cis“-5-5'-DFS (RRT_{5-5'-Me-DFS} 0,722), „cis“-8-5'-DFS_{nc} (RRT_{5-5'-Me-DFS} 0,888) und *cis*-8-5'-DFS_c. Für die Isomerisierung der 8-5'-DFS_c gibt es nur eine Möglichkeit. Bei der „cis“-5-5'-DFS scheint es sich nach dem Elutionsverhalten um *cis,trans*-5-5'-DFS zu handeln, bei der „cis“-8-5'-DFS_{nc} um die *cis,trans*-8-5'-DFS_{nc} (Abb. 25) (Elution nach der entsprechenden *trans,trans*-Säure). Die Gehalte der „cis“-DFS wurden

aus zwei Gründen nicht in die Quantifizierung der DFS und damit in die Betrachtungen der vorhergehenden Kapitel einbezogen:

1. Unter den angegebenen gaschromatographischen Bedingungen, die zur Bestimmung der „*trans*“-DFS optimiert wurden, können bei einigen Untersuchungsmaterialien Verunreinigungen mit den „*cis*“-DFS co-eluierten.
2. Es sollten nur sicher identifizierte Verbindungen in die quantitativen Betrachtungen einbezogen werden. Diese Voraussetzung ist für die „*cis*“-DFS nicht gegeben (s.o.).

Der Fehler, der durch Nichtbeachtung der „*cis*“-DFS bei den quantitativen Bestimmungen entsteht, sollte aber vergleichsweise gering sein. Eine Abschätzung der Peakflächen ergibt, daß der Anteil der „*cis*“-DFS in den UBS maximal 3 %, in den meisten Fällen sogar weniger als 1 % ausmacht. In den LBS ist der Anteil der „*cis*“-DFS teilweise etwas größer (z.B. LBS aus Gerste), aber auch hier beträgt der abgeschätzte Anteil maximal 5 %, in den meisten Fällen unter 3 %.

3.1.9 Vorläufige Identifizierung und semiquantitative Bestimmung von 8-8'-7-O-7'-gekoppelter Dehydrodiferulasäure

In allen UBS und LBS konnte eine Substanz mit einem Molekül-Ionenpeak von m/z 692 nachgewiesen werden (Abb. 26). Im Gegensatz zu den nicht über die phenolische Hydroxylgruppe gekop-

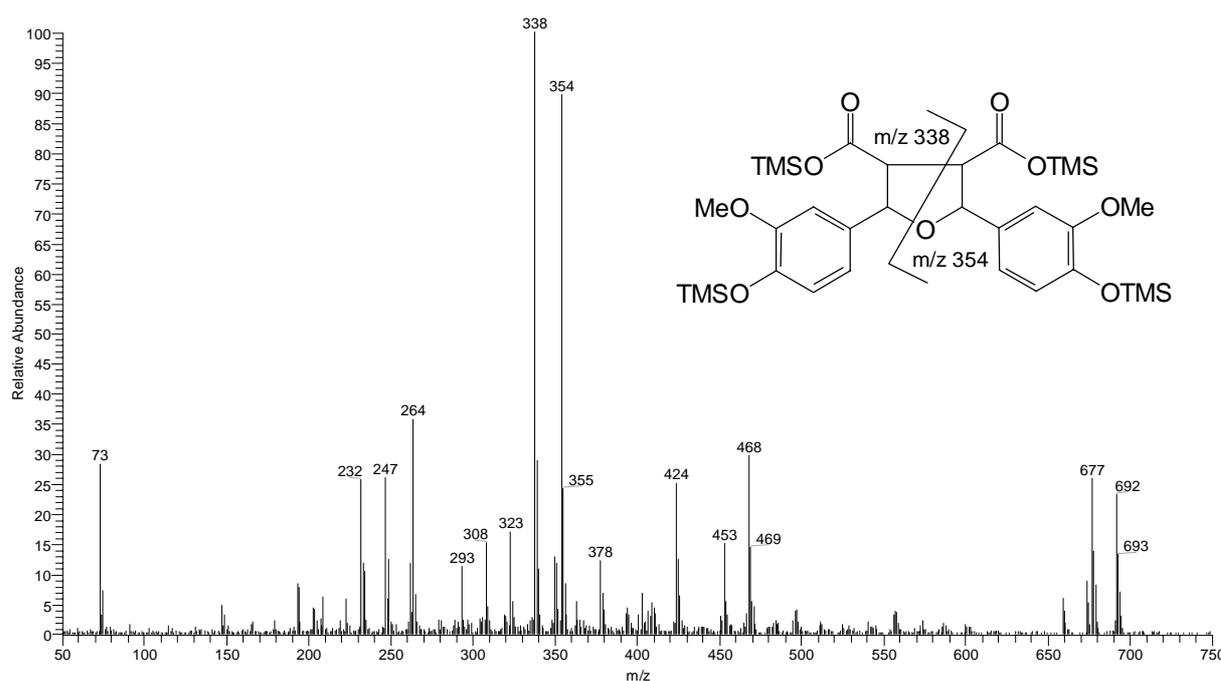


Abbildung 26: Massenspektrum (Ion-Trap-Massenspektrometer) von 8-8'-7-O-7'-DFS

pelten DFS weist diese Substanz ein um 18 erhöhtes Molekulargewicht auf, was auf die Addition von Wasser hindeutet. Bei der radikalischen Kopplung von Monolignolen mit Ligninoligomeren ist die Addition von Wasser an die α -Position der intermediär entstehenden Chinonmethide häufig beschrieben und steht in Konkurrenz zur Anlagerung anderer Nucleophile wie freier Säuren und Alkohole (vgl. Kapitel 1.3.1.5). Die Anlagerung von Wasser sollte daher ebenfalls an die 7-Position der während der Kopplung der Ferulasäureradikale gebildeten Chinonmethide möglich sein. Es sind mehrere Wege denkbar, über die Wasser an Chinonmethide angelagert werden kann und über die letztendlich ein Molekül mit dem Molekulargewicht von 692 entsteht. Die Addition von Wasser

kann an Chinonmethide, die über die phenolische Hydroxylgruppe gekoppelt sind, in 7-Position erfolgen. Die Addition von Wasser an das 8-O-4'-gekoppelte Chinonmethid würde zu einem Produkt führen, dessen TMS-Derivat das geforderte Molekulargewicht besitzt (602 + HOTMS) (Abb. 27).

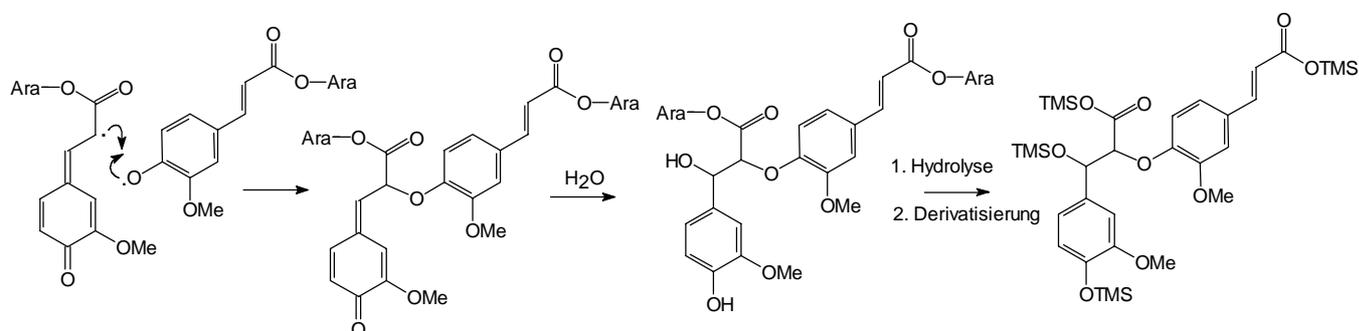


Abbildung 27: Hypothetischer Mechanismus zur Bildung eines 8-O-4'-gekoppelten DFS-TMS-Derivats mit der Molekülmasse 692

Der Vergleich der Massenspektren von Verbindungen, die dem hypothetischen 8-O-4'-Produkt strukturell ähnlich sind, mit dem in Abbildung 26 dargestellten läßt diese Variante jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Bei der Addition von Wasser an Chinonmethide, die nicht über die phenolische Hydroxylgruppe gekoppelt sind, müßte das addierte Wasser cyclisch in das Molekül z.B. als Ether integriert werden, da ein Produkt mit einer neuen Hydroxylgruppe aufgrund der Derivatisierung zum TMS-Derivat das Molekulargewicht von 692 übertreffen würde. Die Addition von Wasser an das 8-8'-gekoppelte Chinonmethidintermediat mit der anschließenden Cyclisierung zu einem Tetrahydrofuranderivat (Abb. 28) stellt einen geeigneten Mechanismus dar.

Die bei der Massenspektrometrie gebildeten Fragmente sind ebenfalls mit dem Strukturvorschlag vereinbar. Ein drittes mögliches Produkt, das durch die Anlagerung von Wasser an das 8-8'-gekoppelte Chinonmethid, der Bildung eines Lactons unter Abspaltung eines Polysaccharidrests und der darauffolgenden Anlagerung eines zweiten Wassermoleküls entsteht, ist mit dem Massenspektrum der beobachteten Verbindung nicht vereinbar. Nach den vorgestellten Überlegungen handelt es sich bei der erstmalig beobachteten DFS somit um 8-8'-7-O-7'-DFS. Gemäß dem Bildungsmechanismus würde diese Säure in der Pflanze als Diester vorliegen

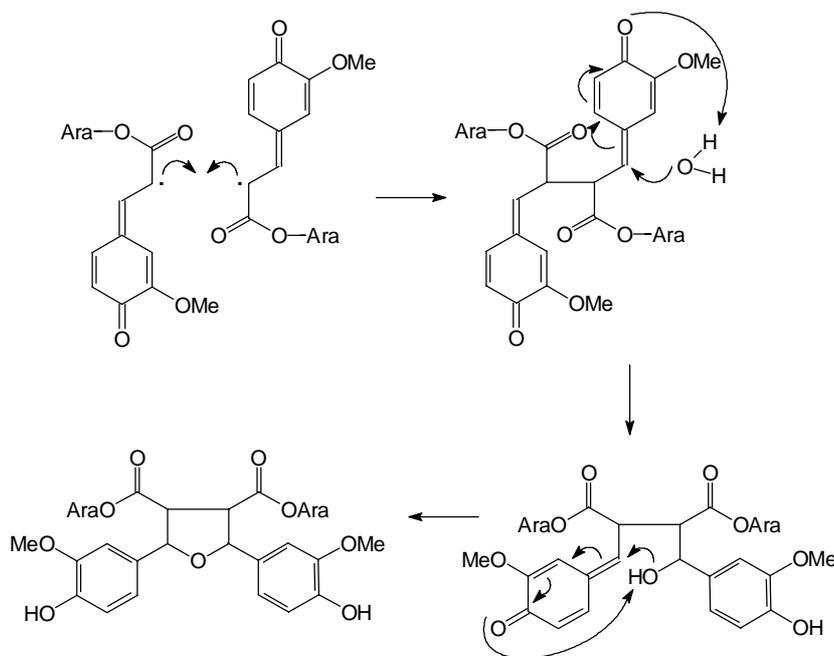


Abbildung 28: Mechanismus der Bildung des 8-8'-7-O-7'-DFS-Diesters

und somit eine weitere Crosslink Struktur darstellen. Eine eindeutige Identifizierung dieser Substanz durch unabhängige Synthese und NMR-Identifizierung bzw. die präparative Isolierung von Mengen, die eine eindeutige Strukturaufklärung gewährleisten, ist bislang jedoch nicht gelungen.

Die semiquantitative Bestimmung von 8-8'-7-O-7'-DFS erfolgte, indem der Korrekturfaktor bezogen auf den IS 5-5'-Me-DFS gleich 1,0 gesetzt wurde. Die Gehalte in den UBS variieren zwischen $113 \mu\text{g g}^{-1}$ in Weizen und $927 \mu\text{g g}^{-1}$ in Mais. Die Getreidearten, die einen niedrigen absoluten Gesamt-DFS-Gehalt besitzen, weisen auch niedrige Gehalte an 8-8'-7-O-7'-DFS auf, die mit einem hohen absoluten Gesamt-DFS-Gehalt zeigen hohe 8-8'-7-O-7'-DFS-Gehalte. So weist Hirse, die nach Mais den zweithöchsten Gehalt an Gesamt-DFS besitzt, mit $324 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS auch den zweithöchsten Gehalt an 8-8'-7-O-7'-DFS auf. Die Gehalte für 8-8'-7-O-7'-DFS sind ca. zwei bis dreimal niedriger als die Gehalte für 5-5'-DFS, die (bei Vernachlässigung der 4-O-5'-DFS) den geringsten Beitrag zu den Gesamt-DFS leistet. Die genauen Gehalte aller anderen Getreidearten sind in Kapitel 5.4.11 tabellarisch aufgeführt.

In den LBS konnte 8-8'-7-O-7'-DFS zwar in allen Getreidearten nachgewiesen werden, die Gehalte lagen jedoch bei fast allen Getreidearten unterhalb der Bestimmungsgrenze mittels GC-FID von ca. $3 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS. Eine Ausnahme bildeten die LBS aus Weizen, in denen der Gehalt von 8-8'-7-O-7'-DFS zu $10 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS bestimmt wurde.

Die semiquantitativ bestimmten Gehalte der 8-8'-7-O-7'-DFS wurden ebenso wie die „cis“-DFS nicht in die quantitativen Betrachtungen der vorherigen Kapitel einbezogen, da hierfür, wie bereits erwähnt, nur sicher identifizierte DFS verwendet werden sollten.

3.1.10 Identifizierung und semiquantitative Bestimmung 8-8'-gekoppelter Dehydrodisinapsäuren

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, konnten in den LBS und UBS neben FS alkaliextrahierbare pCS und SA nachgewiesen werden. Es ist bekannt, daß pCS über die Bildung von Cyclobutandimeren dimerisiert und dadurch in geringem Maße zum Crosslinking beitragen kann (FORD & HARTLEY, 1990, PACKERT, 1993). Radikalische Dimerisierungsprodukte von pCS konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (QUIDEAU, 1994). Ein Grund dafür kann darin bestehen, daß pCS im Gegensatz zu FS hauptsächlich an Lignin gebunden vorliegt und auch erst spät im Lignifizierungsprozeß eingelagert wird. Untersuchungen auf Dimerisierungsprodukte der SA wurden bisher noch nicht durchgeführt. Die radikalische Dimerisierung von Sinapinsäureestern sollte nur zu zwei Zwischenprodukten führen, den 8-O-4'- und den 8-8'-gekoppelten Chinonmethiden. Im Gegensatz zu den DFS ist eine Kopplung in 5-Stellung aufgrund der zusätzlichen Methoxygruppe nicht möglich. Über das 8-O-4'-gekoppelte Chinonmethid entsteht nach mechanistischen Überlegungen durch Eliminierung des Protons in 8-Stellung der zu den DFS analoge 8-O-4'-gebundene Diester, aus dem man nach Verseifung die zu 8-O-4'-DFS analoge Säure erhalten sollte. Wie bei den Ferulasäuredimeren ist der Reaktionsweg nach Bildung des 8-8'-gekoppelten Chinonmethids weniger klar. Die Bildungswege des in Kapitel 3.1.7, Abbildung 24 dargestellten Schemas sind in Analogie auch für die 8-8'-DSS bzw. deren Ester denkbar. Im alkalischen Hydrolysat sollten dann die cyclische Form der 8-8'-gekoppelten DSS (8-8'-DSSc, Abb. 29), die offene Form der 8-8'-gekoppelten DSS (8-8'-DSSnc, Abb. 29) oder beide Formen nachweisbar sein.

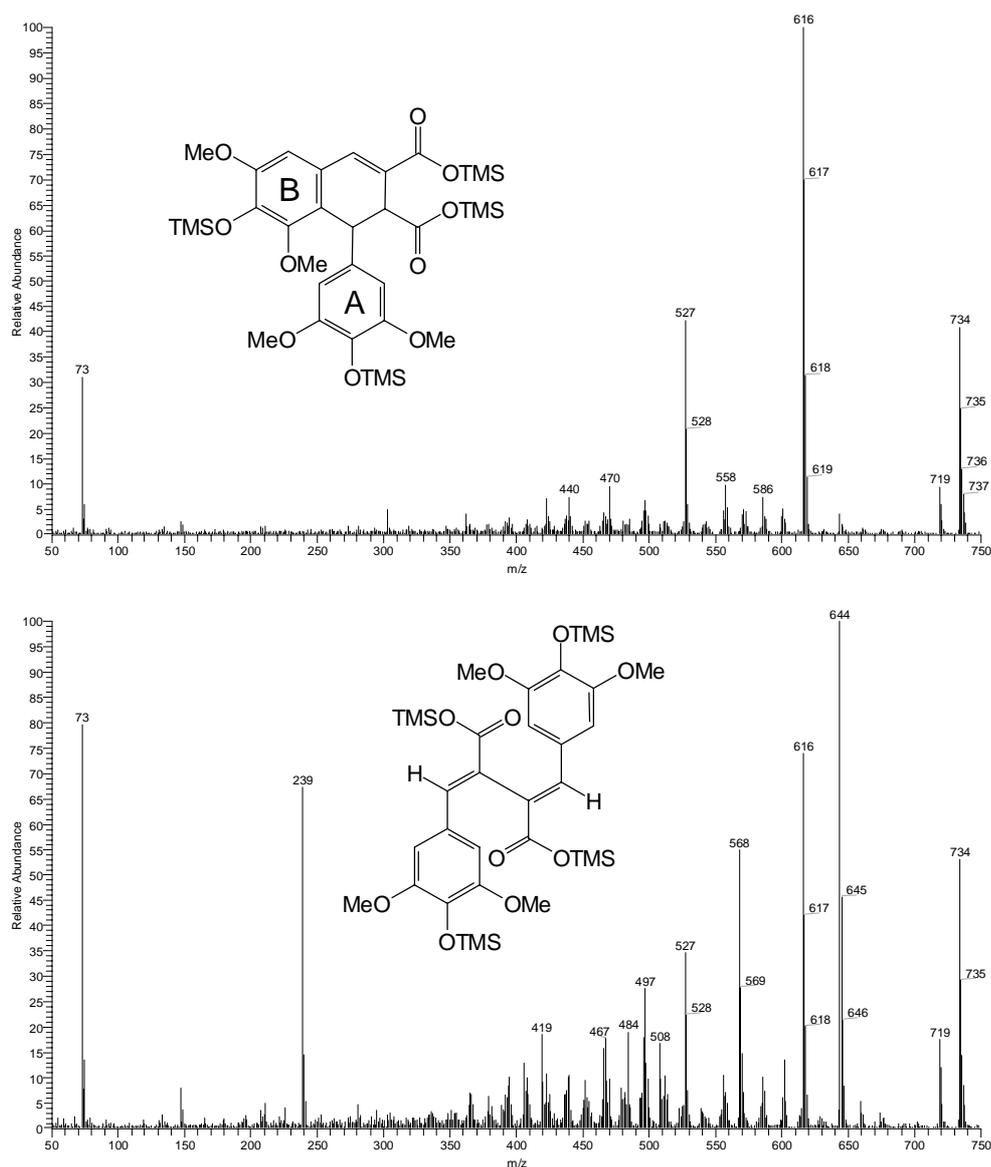


Abbildung 29: Strukturen und Massenspektren der TMS-Derivate von 8-8'-DSSc (oben) und 8-8'-DSSnc (unten)

Beim Screening auf die vorgestellten Verbindungen fielen vor allem im Dimerenbereich des GC-MS-Chromatogramms der UBS aus Wildreis zwei Peaks auf (Kapitel 5.5.1, Abb. 55). Die Massenspektren (Abb. 29) zeigten Molekül-Ionenpeaks von m/z 734, was den Massen analoger DFS zusätzlich zweier Methoxygruppen entspricht. Im Vergleich mit den Massenspektren der DFS wiesen die Spektren große Ähnlichkeiten zu den Spektren der 8-8'-DFS_c und 8-8'-DFS_{nc} auf, mit dem Unterschied, daß sich viele Fragmente um m/z 30 oder 60 (entsprechend einer oder zweier zusätzlicher Methoxygruppen) unterschieden. Ein Peak mit einem der 8-O-4'-DFS analogen Massenspektrum wurde nicht beobachtet.

Durch radikalische Kopplung von Sinapinsäureethylester mittels $Mn(OAc)_3$ wurde eine Reihe von Kopplungsprodukten erzeugt. Nach alkalischer Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung der aus ihren Estern freigesetzten Kopplungsprodukte wurden in den GC-MS-Chromatogrammen unter anderen die entsprechenden Peaks mit den in Abbildung 29 gezeigten Massenspektren beobachtet. Dies deutete darauf hin, daß es sich bei den zu identifizierenden Substanzen tatsächlich um radikalische Kopplungsprodukte der SA handelte.

Zur sicheren Identifizierung der vermuteten DSS wurden Synthesen für 8-8'-DSSc und 8-8'-DSSnc entwickelt. Durch radikalische Kopplung von Sinapinsäuremethylester unter Verwendung von Eisen(III)-chlorid konnte das cyclische 8-8'-gekoppelte Dimer hergestellt werden. Nach Reinigung des Rohprodukts und Verseifung wurde 8-8'-DSSc erhalten. Die Struktur der synthetisierten Substanz wurde durch NMR-Untersuchungen abgesichert. Die Synthese von 8-8'-DSSnc erfolgte durch radikalische Kopplung von Sinapinsäureethylester mittels Mangan(III)-acetat und anschließender Verseifung des Esters. Auch hier wurde die Absicherung der Struktur der synthetisierten Substanz mittels NMR durchgeführt (s. Kapitel 2.2.4.4).

Durch Vergleich der relativen Retentionszeiten und der Massenspektren mit denen der synthetisierten Standardsubstanzen konnten die beiden in den UBS aus Wildreis erstmalig nachgewiesenen Substanzen als 8-8'-DSSc und 8-8'-DSSnc identifiziert werden.

In der Folge wurden alle anderen UBS und LBS auf DSS untersucht. Des Weiteren wurden ihre Gehalte halbquantitativ bestimmt, indem die Responsefaktoren von 8-8'-DSSc und 8-8'-DSSnc gegenüber 5-5'-Me-DFS gleich 1,0 gesetzt wurden.

8-8'-DSSc wurde in den UBS von Weizen, Dinkel, Roggen, Gerste, Mais, Reis und Wildreis nachgewiesen, 8-8'-DSSnc in den UBS von Weizen, Dinkel und Wildreis. Die quantitative Bestimmung der 8-8'-DSS konnte nur in Weizen, Dinkel, Reis und Wildreis erfolgen. Die Gesamtgehalte liegen zwischen $32 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS in Dinkel und $692 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS in Wildreis. Dabei stellt nur der Wert für Wildreis wirklich die Summe dar. In Reis konnte nur die cyclische Form identifiziert werden und in Weizen und Dinkel konnten die Peaks für 8-8'-DSSnc wegen Peaküberlagerungen nicht ausgewertet werden. Da die überlagerten Peaks jedoch vergleichsweise klein sind, können die Gehalte an 8-8'-DSSnc nicht viel zu dem Gesamtgehalt beitragen. In den UBS von Roggen, Gerste und Mais lagen die Gehalte an 8-8'-DSSc unterhalb der Bestimmungsgrenze von ca. $3 \mu\text{g g}^{-1}$ UBS.

In den LBS von Weizen, Dinkel, Roggen, Gerste, Reis und Wildreis wurde 8-8'-DSSc nachgewiesen, in den LBS von Weizen, Dinkel, Roggen und Wildreis 8-8'-DSSnc. In Gerste und Reis konnten nur Spuren bestimmt werden, die Gesamtgehalte für 8-8'-DSS in den LBS der anderen Getreide liegen zwischen 5 und $31 \mu\text{g g}^{-1}$ LBS. Eine tabellarische Übersicht der Gehalte ist in Kapitel 5.4.12 gegeben.

Ob SA tatsächlich an Polysaccharide oder an andere Biopolymere in der pflanzlichen Zellwand gebunden ist, bleibt zunächst ungeklärt. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, existieren zwar Hinweise darauf, daß SA zumindest teilweise an Polysaccharide gebunden ist, der Beweis hierfür steht jedoch noch aus. Sollte SA an Polysaccharide gebunden sein, so können die DSS unter den bereits für die 8-8'-gekoppelten DFS beschriebenen Vorbehalten als Crosslinks fungieren. Die Natur des/der 8-8'-gekoppelten DSS-(Di)ester(s) in der Pflanzenzellwand ist genauso ungeklärt wie für die/den 8-8'-DFS-(Di)ester. Sollten den 8-8'-Estern Crosslink-Funktionen zukommen, so ist der Einfluß der DSS (mit Ausnahme der UBS aus Wildreis) gegenüber den DFS vergleichsweise gering. Die Summe der DSS beträgt in den UBS nur zwischen 1 und 3 % der Summe der DFS. Die Ausnahme bilden die UBS aus Wildreis. Hier beträgt die Summe der DSS 24 % der Summe der DFS. Warum nur in Wildreis größere Gehalte an monomerer und dimerer SA vorhanden sind, ist unbekannt. In den LBS ist der Anteil der DSS (in denen sie identifiziert und quantifiziert werden konnten) mit 6 – 14 % der DFS etwas höher als in den UBS.

In Kapitel 5.4.12 sind tabellarisch Faktoren zur Abschätzung des Dimerisierungsgrades der SA aufgeführt. Im Gegensatz zur FS können hier keine generellen Unterschiede zwischen LBS und UBS festgestellt werden. Auch innerhalb der UBS bzw. der LBS sind große Schwankungen für den Di-

merisierungsgrad festzustellen. Der höchste Dimerisierungsgrad wurde für die SA in den UBS aus Wildreis mit einem ungefähren prozentualen Anteil der DSS von 61 % der Gesamtsinapinsäureverbindungen bestimmt. Ausgehend vom Konzept der freien radikalischen Kopplung, d.h. radikalische Kopplung ohne die Steuerung durch Enzyme oder „dirigierende Proteine“ (DAVIN et al., 1997), können derartig hohe Dimerisierungsgrade nur durch eine sehr regelmäßige Anordnung der SA erreicht werden.

3.1.11 Gemischte Ferulasäure-Sinapinsäure- und Ferulasäure-*para*-Cumarsäure-Dimere

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, daß sowohl Ferulasäureester als auch Sinapinsäureester radikalisch dimerisieren können. Daraus leitet sich die Fragestellung ab, ob die Möglichkeit besteht, durch radikalische Kopplung auch Dimere, bestehend aus einem Ferulasäureester und einem Sinapinsäureester, zu bilden. Da estergebundene FS in einem großen Überschuß in der Pflanzenzellwand vorliegt, erscheint es wahrscheinlicher, daß die wenigen Sinapinsäureester mit einem Ferulasäureester koppeln, als daß sie eine Homokopplung eingehen. Die gleiche Überlegung gilt für die an Polysaccharide gebundenen pCS. Im Gegensatz zu der SA konnte man bislang jedoch auch keine radikalisch gekoppelten Homodimere der pCS nachweisen.

Für die Kreuzkopplung zwischen Ferulasäure- und Sinapinsäureestern kommen mit Ausnahme der 5-5'-Kopplung die gleichen Kopplungsmöglichkeiten wie für die Homokopplung der Ferulasäureester in Frage, wobei natürlich bei der Kreuzkopplung nur die Ferulasäureester eine Kopplung in 5-Stellung eingehen können. Die nach Hydrolyse und Derivatisierung erhaltenen Ferulasäure-Sinapinsäure-Dimere (FS-SA) sollten im Massenspektrum einen Molekül-Ionenpeak mit m/z 632 oder 704 zeigen.

Die GC-MS-Chromatogramme der untersuchten UBS und LBS wurden auf Peaks, deren Massenspektren als Molekül-Ionenpeak m/z 632 oder 704 enthalten, untersucht. Zwei Peaks (FS-SA I und FS-SA II) mit einem Molekül-Ionenpeak von m/z 704 konnten nachgewiesen werden ($RRT_{5-5'-Me-DFS}$ (FS-SA I) 0,595; $RRT_{5-5'-Me-DFS}$ (FS-SA II) 0,767 (s. Kapitel 5.5.1, Abb. 56)). Sowohl FS-SA I als auch FS-SA II wurden in Spuren in den UBS aus Dinkel, Roggen, Weizen und Wildreis und in den LBS von Reis, Dinkel und Weizen detektiert. Die Detektion der vermutlichen FS-SA erfolgte somit nur in Materialien, in denen auch DSS identifiziert wurden. Das Massenspektrum von FS-SA I (s. Kapitel 5.5.2, Abb. 61) zeigt Ähnlichkeiten zu dem von 8-8'-DFSc. Der Molekül-Ionenpeak und die Hauptfragmente sind jedoch um m/z 30 (entsprechend einer Methoxygruppe) verschoben. Das Massenspektrum von FS-SA II weist neben dem Molekül-Ionenpeak und dem Fragment m/z 689 (M-CH₃) keine charakteristischen Fragmente auf. Von den analogen DFS zeigt nur 8-5'-DFSnc ein ähnlich linienarmes Massenspektrum. Eine auch nur vorläufige Identifizierung von FS-SA II aufgrund eines uncharakteristischen Massenspektrums wäre jedoch spekulativ. Da beide Substanzen allerdings nur im Spurenbereich detektiert wurden und ihre Bedeutung als Crosslink Substanz als gering eingeschätzt wird, wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, die exakte Struktur der möglichen FS-SA zu klären.

Für die Kreuzkopplung zwischen FS und pCS zu Ferulasäure-*para*-Cumarsäure-Dimeren (FS-pCS) bestehen die gleichen Kopplungsmöglichkeiten wie für die FS-Homokopplung. Die nach Hydrolyse und Derivatisierung erhaltenen FS-pCS sollten im Massenspektrum einen Molekül-Ionenpeak mit m/z 644 oder 572 zeigen. Beim Screening der GC-MS-Chromatogramme der untersuchten UBS und LBS auf entsprechende Peaks konnten nur in den UBS von Mais und Reis Spuren einer Substanz nachgewiesen werden, dessen Massenspektrum (s. Kapitel 5.5.2, Abb. 62) den Molekül-

Ionenpeak m/z 644 aufweist ($RRT_{5-5'-Me-DFS}$ 0,800). Ferner zeigt das Massenspektrum die zwei Hauptfragmente der analogen 5-5'-DFS, jedoch um m/z 30 zum niedrigeren Masse-Ladungs-Verhältnis verschoben. Da die UBS von Mais und Reis die höchsten Gehalte an pCS aufweisen, sollte ein Nachweis möglicher FS-pCS in diesen Materialien auch am wahrscheinlichsten sein. Diese Substanz wurde jedoch wie die FS-SA nur im Spurenbereich detektiert, so daß auch hier darauf verzichtet wurde, die Identifizierung durch Synthese einer Standardsubstanz abzusichern.

Da nur Spuren der gemischten Säuren detektiert wurden, scheint die Homokopplung der FS- und SA-Ester im Gegensatz zu der gemischten Kopplung bevorzugt. Dieses Phänomen ist ebenfalls aus der Ligninchemie bekannt. So zieht z.B. Coniferylalkohol ebenfalls die Homokopplung der gemischten Kopplung mit den anderen Monolignolen vor. SYRJÄNEN & BRUNOW (1998) untersuchten die Neigung der Monolignole zur radikalischen Kopplung mit verschiedenen Dimeren aus Zimtalkoholen, um Hinweise darauf zu bekommen, warum einige phenolische Substanzen bevorzugt miteinander koppeln. Sie konnten zeigen, daß die Bereitschaft der verschiedenen phenolischen Substanzen zur radikalischen Kopplung von ihrem Oxidationspotential und der Reaktivität der entsprechenden Radikale abhängt. Vor allem das Oxidationspotential hat einen großen Einfluß. Koppelungsreaktionen finden bevorzugt zwischen phenolischen Substanzen mit ähnlichem oder gleichem Oxidationspotential statt. Die radikalische Kopplung entspricht also nicht einem vollständig zufälligen Prozeß. Ausgehend von dieser Theorie überrascht es nicht, daß nur geringe Mengen an FS-SA (und FS-pCS) nachgewiesen werden konnten.

3.1.12 Identifizierung von Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten aus unlöslichen Ballaststoffen

Wie in Kapitel 1.3.1.5 bereits erwähnt, kann monomere FS als Crosslink zwischen Polysacchariden und Lignin fungieren. Mittels NMR-Studien konnte gezeigt werden, daß der aktive Mechanismus (Einbeziehung der FS-Polysaccharide in den radikalischen Prozeß) zur Kopplung von Lignin und Polysacchariden zumindest neben dem passiven Mechanismus (Addition der FS-Polysaccharide an intermediär entstehende Chinonmethide) abläuft, jedoch wahrscheinlich den Hauptmechanismus darstellt (RALPH et al., 1992a, RALPH et al., 1992 b, RALPH et al., 1995, GRABBER et al., 1995, QUIDEAU & RALPH, 1997). Unabhängig von der Arbeitsgruppe von RALPH konnten JACQUET et al. (1995) den Beweis für den aktiven Mechanismus erbringen, indem sie nach alkalischer Hydrolyse von Weizen- und Haferstroh erstmalig ein Kreuzprodukt aus FS und Coniferylalkohol mittels GC-MS nachweisen konnten. Bei dem Kreuzprodukt handelte es sich um das 4-*O*- β -gekoppelte Produkt (Abb. 30), das nach dem in Kapitel 1.3.1.5, Abbildung 8 dargestellten Mechanismus gebildet wird. RENGER (1999) konnte dieses Kreuzprodukt ebenfalls in verschiedenen Getreidekaryopsen mittels GC-MS identifizieren. Der Nachweis dieser Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte stellt eine elegante Methode dar, um die Bindungsverhältnisse zwischen Polysacchariden und Lignin zu klären, da die Kreuzprodukte die „Lignifizierung“ im Dimerenstadium repräsentieren. Aus diesem Grund wurden die GC-MS-Chromatogramme der alkalischen Hydrolysate der unlöslichen Getreideballaststoffe auf weitere Kreuzprodukte untersucht. Hierzu wurden die Massenspektren der Peaks im Dimerenbereich der Chromatogramme analysiert und in Verbindung zu möglichen Kreuzprodukten gebracht. Die sichere Identifizierung der Kreuzprodukte erfolgte dann durch Vergleich der relativen Retentionszeiten und der Massenspektren (gesamte Spektren oder charakteristische Fragmente) mit denen der synthetisierten bzw. isolierten Standardsubstanzen, deren Strukturen mittels NMR abgesichert wurden.

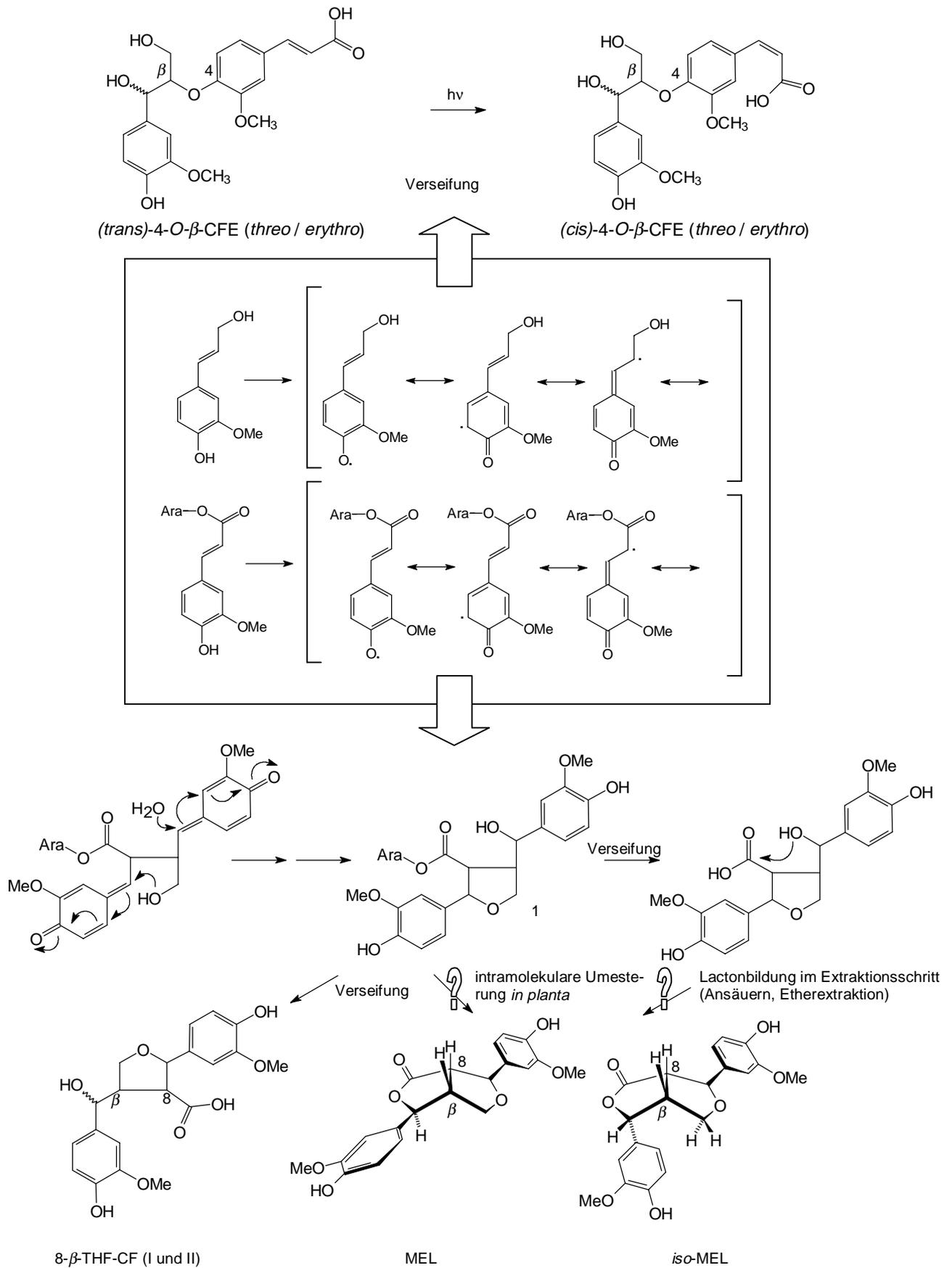


Abbildung 30: Bildung von Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukten und ihr Verhalten während der Analytik

So konnten in den UBS folgende Kreuzprodukte (für die Strukturformeln s. Abb. 30) identifiziert werden:

UBS aus Dinkel:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>), 8- β -THF-CF (II), MEL
UBS aus Hafer:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>), 8- β -THF-CF (II)
UBS aus Hirse:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>)
UBS aus Gerste:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>)
UBS aus Mais:	nicht nachweisbar
UBS aus Reis:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>)
UBS aus Roggen:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>), <i>(cis)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i>), 8- β -THF-CF (I und II), MEL, <i>iso</i> -MEL
UBS aus Weizen:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>), 8- β -THF-CF (II), MEL
UBS aus Wildreis:	<i>(trans)</i> -4- <i>O</i> - β -CFE (<i>threo</i> und <i>erythro</i>)

Maiskleie ist fast frei von Lignin (SAULNIER et al., 1995). Dies erklärt, warum in den UBS aus Mais im Gegensatz zu den anderen Getreiden keine Kreuzprodukte identifiziert wurden. Auch die Körner von nicht poliertem Reis sollten arm an Lignin sein, was hier wie auch beim Wildreis in nur äußerst geringen nachgewiesenen Mengen an *(trans)*-4-*O*- β -CFE zum Ausdruck kommt. Dahingegen werden die unlöslichen Weizen- und Roggenballaststoffe als „stark“ lignifiziert beschrieben (RYDEN & ROBERTSON, 1995b, BACH KNUDSEN et al., 1997). Entsprechend konnten in diesen UBS problemlos mehrere Kreuzprodukte nachgewiesen werden.

Die Identifizierung der isomeren Kreuzprodukte *(trans)*-4-*O*- β -CFE (*threo* und *erythro*) bestätigt die Ergebnisse von JACQUET et al. (1995) und RENGER (1999). In Roggen wurde zusätzlich die unter Lichteinwirkung entstehende *cis*-Form des *threo*-Isomeren identifiziert. Diese Verbindungen zeigen, daß Lignin über eine 4-*O*- β -Etherbindung an FS-Polysaccharide gebunden sein kann. Dieser Nachweis konnte mit den oben erwähnten NMR-Studien in der Arbeitsgruppe von RALPH nicht erbracht werden. Sie konnten zwar anhand eines 8- β -gekoppelten Produktes den aktiven Mechanismus sicher nachweisen, die 4-*O*- β -Bindung konnten sie jedoch nicht von der 4-*O*- α -Bindung aus dem passiven Mechanismus unterscheiden.

8- β -gekoppelte dimere Kreuzprodukte wurden bislang nicht nachgewiesen. Mittels NMR-Studien (v.a. mit Hilfe des HMBC-Experiments) konnte die Arbeitsgruppe von RALPH jedoch eindeutig nachweisen, daß die FS im „oligomeren“ und „polymeren“ Lignin über eine 8- β -Bindung an Lignin assoziiert ist, indem sie im Lignin eingebaute MEL-Strukturen identifizieren konnten. Hier wurde die dimere Struktur von MEL und *iso*-MEL nachgewiesen. Dies ist überraschend, da während des Bildungsmechanismus der MEL-Isomeren durch die intramolekulare Umesterung (s. Abb. 30) das Dimer von dem Polysaccharid abgelöst wird. Im Verlauf der Ballaststoffisolierung sollte diese Verbindung spätestens bei den Waschschrritten mit Ethanol und Aceton extrahiert werden. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich nur um Extraktionsrückstände handelt, wurden die aus Roggenkleie isolierten BS nach der enzymatischen Behandlung unterschiedlichen Methoden der Extraktion unterzogen. Die BS wurden 1. nur einmal mit Wasser gewaschen, 2. je einmal mit Wasser, Ethanol und Aceton gewaschen und 3. zweimal mit Wasser gewaschen und im Anschluß je 5 h mit Ethanol und Aceton in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. In den alkalischen Hydrolysaten aus allen der unterschiedlich behandelten BS konnten MEL und *iso*-MEL in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. Von daher erscheint es unwahrscheinlich, daß es sich um Extraktionsrückstände handelt. Eine andere Möglichkeit ist, daß MEL und *iso*-MEL (zumindest teilweise) erst unter den Be-

dingungen der Analyse der phenolischen Substanzen (Verseifung, Ansäuern, Extraktion, Derivatisierung) aus einem Vorläufer gebildet werden. Nach mechanistischen Überlegungen sollte die Verbindung **1** in Abbildung 30 den Vorläufer von MEL und *iso*-MEL darstellen. Diese Verbindung ist noch mit dem Polysaccharid assoziiert und stellt somit eine Crosslink-Verbindung zwischen Polysacchariden und Lignin dar. Nach der Verseifung mit der einhergehenden Abspaltung von dem Polysaccharid würden z.B. in der sauren Lösung vor/während der Extraktion geeignete Bedingungen für die Lactonbildung vorliegen. Ein solcher Mechanismus stände mit den oben dargestellten Ergebnissen der Extraktionsversuche im Einklang. Untermauert wird diese Theorie dadurch, daß in allen BS, in denen MEL (und *iso*-MEL) nachweisbar waren, ebenfalls 8- β -THF-CF identifiziert wurde. Bei 8- β -THF-CF I und II handelt es sich um zwei Isomere, wahrscheinlich, wie in Abbildung 30 angedeutet, um die *threo*- und *erythro*-Isomere. 8- β -THF-CF entsteht durch Verseifung aus **1** und beweist die Existenz eines Lignin-Polysaccharid-Crosslinks über eine 8- β -Bindung. Des Weiteren kann, wie bereits erwähnt, MEL (und *iso*-MEL) aus 8- β -THF-CF durch Bildung des Lactons hervorgehen.

RALPH et al. (1995) vermuteten, daß die FS-Polysaccharide als Initiierungsstellen für die Lignifizierung dienen. Sie begründeten ihre Vermutung damit, daß sie in ihren NMR Studien keine Strukturen finden konnten, die nur durch Kopplung von einem Ferulasäureester an ein bereits gebildetes Lignin-„Dimer“ oder -„Oligomer“ entstehen können. Dienen Ferulasäureester tatsächlich als Initiierungsstellen für die Lignifizierung, so reagieren sie nur mit Coniferylalkoholmonomeren (oder entsprechend mit Sinapylalkoholmonomeren). Bei Kreuzkopplungen mit monomeren Coniferylalkohol koppelt dieser bevorzugt in β -Stellung und dirigiert seinen Kopplungspartner (außer bei 8- β -Kopplungen) in die weniger bevorzugten 4- oder 5- Stellungen (QUIDEAU & RALPH, 1994). Danach ist außer den hier identifizierten 4-*O*- β - und 8- β -Kopplungen nur noch eine 5- β -Kopplung möglich (Abb. 31). Dimere Kreuzprodukte, die über eine 5- β -Bindung gekoppelt sind, konnten jedoch in keinem Fall nachgewiesen werden. Ebenso konnten keine dimeren Kreuzprodukte, bestehend aus Ferulasäure und Sinapylalkohol, identifiziert werden.

Die Kopplung von Polysacchariden an Lignin hat einen erheblichen Einfluß auf die physikochemischen Eigenschaften der Polysaccharide. Diese Einflüsse und die möglichen Bedeutungen für die physiologischen Eigenschaften werden in Kapitel 3.3 näher diskutiert.

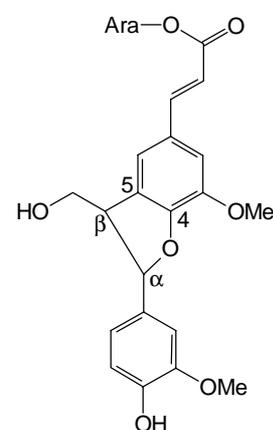


Abbildung 31: Hypothetisches 5- β -Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukt

3.2 Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Verbindungen aus unlöslichen Ballaststoffen

3.2.1 Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Verbindungen aus unlöslichen Ballaststoffen aus Roggenkaryopsen

3.2.1.1 Hydrolyse der unlöslichen Roggenballaststoffe und Reinigung des Hydrolysats

Durch die enzymatische Hydrolyse der UBS aus Roggen mit Driselase bei 37 °C für 48 h werden durchschnittlich 49 % des Ausgangsmaterials hydrolysiert. 44 % der pCS, 64 % der *trans*-FS und 76 % der *cis*-FS (bezogen auf die Gehalte in den UBS aus Roggen) gehen während der enzymatischen Hydrolyse in Lösung. pCS ist teilweise über Esterbindungen an Lignin assoziiert. Von daher ist es verständlich, daß durch Anwendung von Carbohydrasen prozentual weniger pCS hydrolysiert wird als FS, die vorwiegend an Polysaccharide gebunden ist. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, daß die Bindung von pCS an Polysaccharide den Abbau der Polysaccharide durch die Carbohydrasen stärker hemmt als die Bindung von FS.

Die Reinigung des Hydrolysats wurde an einer Amberlite XAD-2 Säule durchgeführt. Die Elution der aufgegebenen Substanzen erfolgte mittels H₂O, MeOH/H₂O 50/50 und MeOH. Mit der H₂O-Fraktion eluieren 3 % *trans*-pCS, 9 % *trans*-FS und 3 % *cis*-FS (bezogen auf die jeweilige PCS im Hydrolysats). Die PCS in dieser Fraktion sollten an höhermolekulare Oligosaccharide gebunden sein, die das Verhalten der PCS-Oligosaccharide auf der Säule diktieren. Solche PCS-Oligosaccharide werden nicht retardiert und eluieren zusammen mit den Mono- und Oligosacchariden. Die MeOH/H₂O-Fraktion enthält 90 % der *trans*-pCS, 89 % der *trans*-FS und 93 % der *cis*-FS. In dieser Fraktion eluieren die PCS-Oligosaccharide, deren Eigenschaften bei der Reinigung von der jeweiligen PCS bestimmt werden. Entsprechend handelt es sich bei dem Oligosaccharidanteil um niedermolekulare Oligosaccharide. Mit MeOH werden die freien PCS sowie andere hydrophobe Substanzen eluiert. Diese Fraktion enthält 7 % *trans*-pCS, 3 % *trans*-FS und 4 % *cis*-FS. Da Driselase keine Esteraseaktivität aufweist (BORNEMANN et al., 1990, RALET et al., 1994), handelt es sich bei der eluierten FS wahrscheinlich nicht um freie FS. Ebenfalls erscheint die Bindung der FS an andere hydrophobe Substanzen unwahrscheinlich, da diese unter den Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse nicht in Lösung gehen sollten. So ist es möglich, daß es sich hier um Reste von PCS-Oligosacchariden handelt, die von dem vorherigen Elutionsschritt auf der Säule verblieben sind.

Durch die Behandlung der UBS aus Roggen mit 50 mM TFA bei 100 °C für 3 h werden durchschnittlich 56 % des Ausgangsmaterials hydrolysiert. SAULNIER et al. (1995) konnten bei Anwendung der genannten Bedingungen auf Maiskleie feststellen, daß sich der Rückstand hauptsächlich aus Cellulose zusammensetzt, wohingegen die Heteroxylane zu 80 – 90 % in Lösung gehen. Ähnliche Verhältnisse können auch hier angenommen werden. Die Bestimmung der PCS ergab, daß bei der Hydrolyse 60 % *trans*-pCS, 75 % *trans*-FS und 90 % *cis*-pCS in Lösung gehen.

Bei der Reinigung an Amberlite XAD-2 eluieren 11 % der *trans*-pCS, 4 % der *trans*-FS und 9 % der *cis*-FS in der H₂O-Fraktion und sind folglich an höhermolekulare Oligosaccharide gebunden. 82 % der *trans*-pCS, 89 % der *trans*-FS und 86 % der *cis*-FS sind in der MeOH/H₂O-Fraktion vor-

handen, und 7 % der *trans*-pCS, 7 % der *trans*-FS und 5 % der *cis*-FS werden mit MeOH eluiert. Der prozentuale Anteil der PCS in der MeOH-Fraktion nach saurer Hydrolyse ist nur geringfügig höher als der nach enzymatischer Hydrolyse. Dies zeigt, daß unter den angewendeten Bedingungen die glykosidischen Bindungen gespalten werden, die Esterbindungen der PCS zu den Biopolymeren jedoch nur geringfügig hydrolysiert werden.

Für die Gelpermeationschromatographischen Fraktionierungen wurden die MeOH/H₂O-Fractionen weiter verwendet.

3.2.1.2 Gelpermeationschromatographische Fraktionierung der gereinigten Hydrolysate

Die GPC-Fraktionierung der gereinigten Hydrolysate wurde an Sephadex LH-20 als stationärer Phase und mit Wasser als Eluenten durchgeführt. Abbildung 32 zeigt die GPC-Chromatogramme für die Fraktionierung der enzymatischen und der sauren Hydrolysate.

Zur weiteren Untersuchung wurden aus dem enzymatischen Hydrolysat elf Fraktionen (E1 – E11) und aus dem sauren Hydrolysat vier Fraktionen (S1 – S4) gesammelt (Abb. 32). Um für die Identifizierung ausreichende Substanzmengen zu erhalten, mußten sechs enzymatische und vier saure Hydrolysate chromatografiert werden. Die GPC-Trennungen waren ausreichend reproduzierbar,

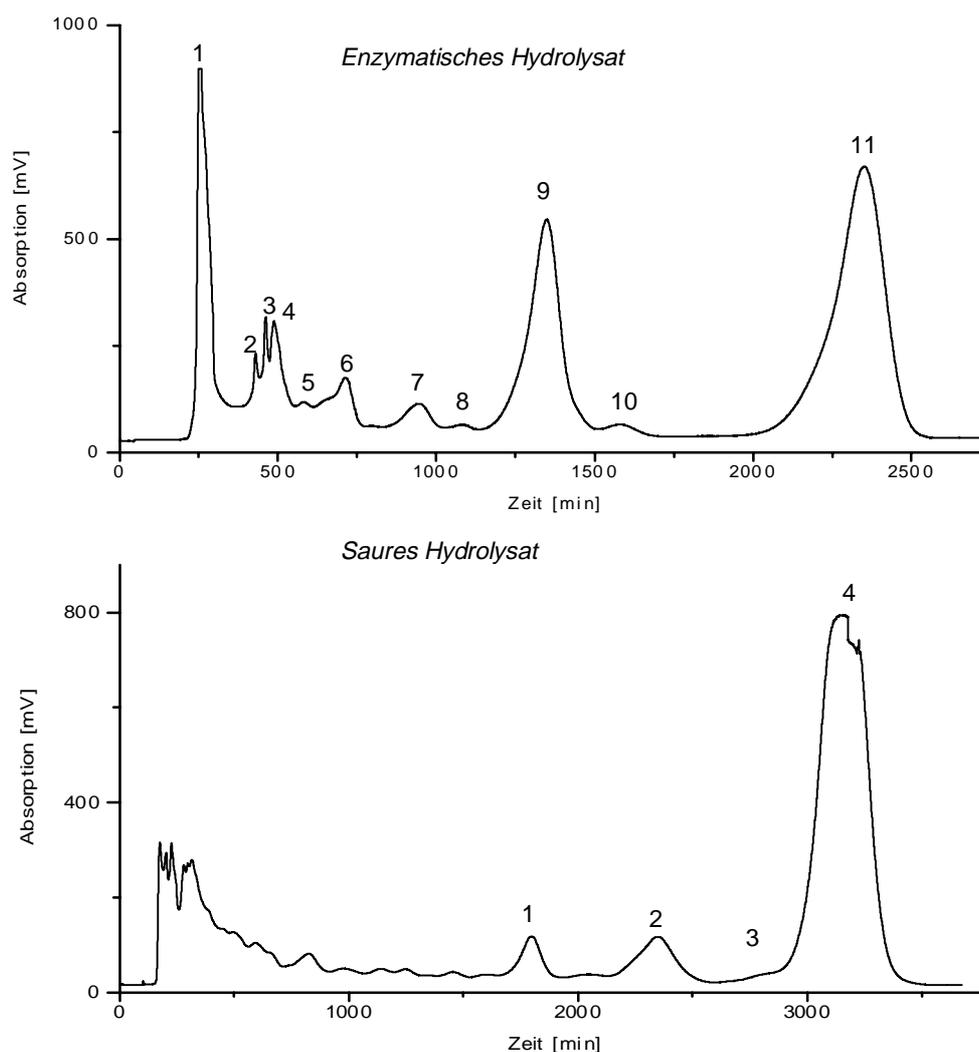


Abbildung 32: GPC-Chromatogramme der enzymatischen (oben) und sauren (unten) Hydrolysate (MeOH/H₂O-Fraktion) der UBS aus Roggen

um die Fraktionen aus den unterschiedlichen Läufen zu vereinigen.

Unter den Bedingungen der Fraktionierung des enzymatischen Hydrolysats würde Xylose als Molekül, das in das gesamte Porenlabyrinth eindringt, nach ca. 540 min eluieren, unter den Bedingungen der Fraktionierung des sauren Hydrolysats nach ca. 390 min. Die stark verlängerten Elutionszeiten (bis zu 42 h bei der Fraktionierung des enzymatischen Hydrolysats bzw. 58 h bei der Fraktionierung des sauren Hydrolysats) zeigen deutlich das Auftreten der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen sekundären Wechselwirkungen zwischen phenolischen Substanzen und Sephadex LH-20 als stationärer Phase.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Screening-Methoden und die weitergehende Fraktionierung bzw. Reinigung nur für die Fraktionen vorgestellt, aus denen identifizierbare Verbindungen gewonnen wurden.

3.2.1.3 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Tetrasaccharids aus der Fraktion E9

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktion E9 ($K_{av} = 2,40$) ergab erste Hinweise auf das Vorliegen einer PCS-Oligosaccharid-Verbindung. Eine Substanz mit dem R_f -Wert von 0,34 konnte sowohl durch Löschen des Fluoreszenzindikators als auch durch Detektion mittels Zuckerdetektionsreagenz nachgewiesen werden.

Beim PCS-Oligosaccharid-Screening mittels HPLC-DAD konnten zwei Hauptpeaks (**1** und **2** in Abb. 33) mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum beobachtet werden. Des Weiteren wiesen einige der kleineren Peaks ebenfalls Spektren auf, die der *trans*-FS oder der *cis*-FS ähnlich waren. Die Peaks **1** und **2** konnten nicht durch Variation der chromatographischen Bedingungen getrennt werden. Es wurde lediglich eine Plateaubildung zwischen den beiden Peaks erreicht, was darauf hinweist, daß es sich bei den beiden Peaks um eine Substanz im Gleichgewicht handelt. Sowohl Peak **1** als auch Peak **2** zeigten bei den massenspektrometrischen Untersuchungen Quasi-Molekül-Ionen mit m/z 745 $(M+Na)^+$ und m/z 761 $(M+K)^+$. Daraus läßt sich das Molekulargewicht der den Peaks entsprechenden Substanzen zu 722 bestimmen. Dies entspricht einer Verbindung, bestehend aus FS und vier Pentosen. Um zu überprüfen, ob die beiden Peaks **1** und **2** tatsächlich einer Substanz im Gleichgewicht entsprechen, wurden die den Peaks zuge-

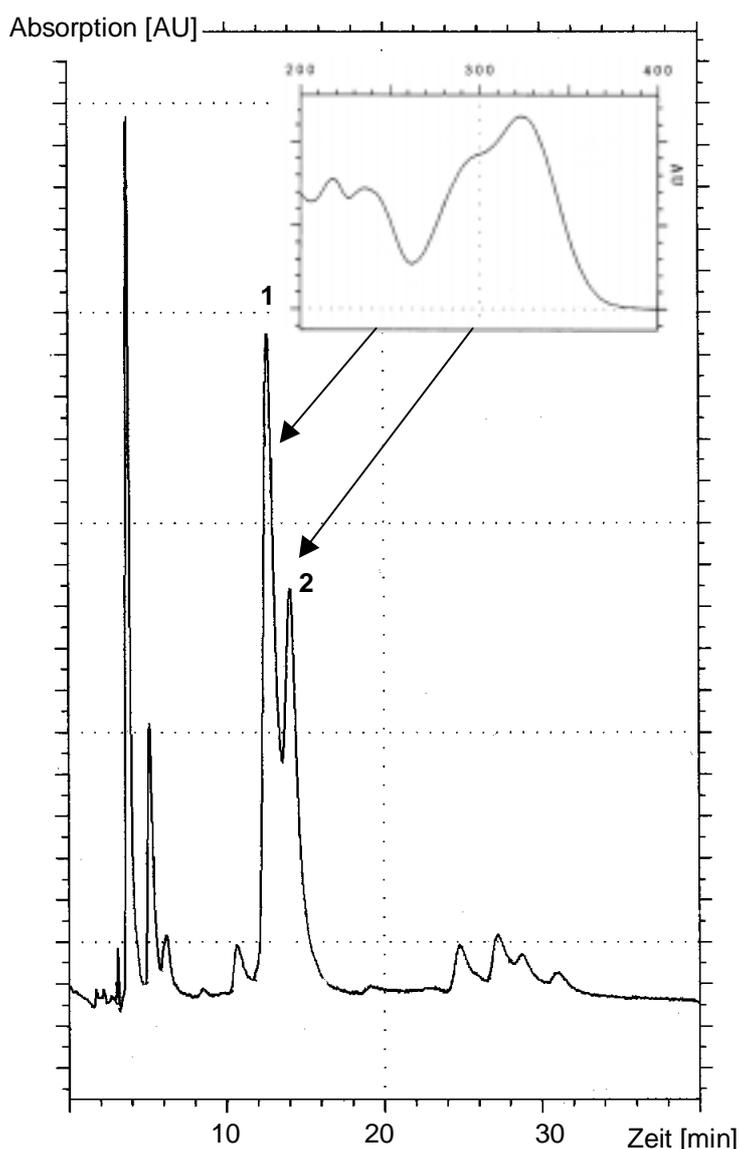


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm der Fraktion E9 (UV-Detektion bei 280 nm)

ordneten Fraktionen gesammelt und erneut injiziert. Aus beiden den Peaks **1** und **2** entsprechenden Substanzen wurden wiederum Chromatogramme erhalten, die beide Peaks im gleichen Verhältnis zueinander aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigten die Theorie, daß es sich um eine Substanz im Gleichgewicht handelt, wahrscheinlich um die α - und β -Anomeren einer reduzierenden Zuckerkomponente.

Nach Optimierung der chromatographischen Bedingungen für die präparative HPLC-Trennung, wurden die den Peaks **1** und **2** entsprechenden Substanzen auf dem präparativen HPLC-System 1 (s. Kapitel 2.3.6) isoliert, vereinigt und für die Identifizierungsreaktionen bereitgestellt.

Die phenolische Komponente der isolierten Verbindung wurde nach alkalischer Hydrolyse mittels HPLC-DAD bestimmt. Im alkalischen Hydrolysat wurden nur *trans*-FS und *cis*-FS nachgewiesen. Das Verhältnis zwischen *trans*- und *cis*-FS beträgt 39:1. Die *cis*-FS kann während der Analyse aus *trans*-FS entstanden sein, obwohl versucht wurde, den Lichteinfluß soweit wie möglich zu reduzieren. Die Hydrolyse unter milden alkalischen Bedingungen weist außerdem auf eine Esterbindung zwischen der FS und der Kohlenhydratkomponente hin.

Die Zuckerkomponenten wurden nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung als Alditolacetate mittels GC-FID bestimmt. Über den Vergleich der relativen Retentionszeiten, bezogen auf die internen Standardsubstanzen Erythrit und *myo*-Inosit, konnten Arabinose und Xylose im ungefähren Verhältnis 1:3 identifiziert werden.

Aus der massenspektrometrischen Analyse der Substanz mittels FIA-MS wurden nur wenige neue Erkenntnisse abgeleitet, da trotz Variation der Fragmentorspannung kaum Fragmente beobachtet werden konnten. Bei einer Fragmentorspannung von 80 V bildet m/z 745 ($M+Na$)⁺ den Basispeak. Das Quasi-Molekül-Ion ($M+K$)⁺ mit m/z 761 zeigt eine Intensität von ca. 10 %. Mit einer Intensität von ca. 5 % wird m/z 132 beobachtet, was einer abgespaltenen Pentoseeinheit entspricht. Signale mit Intensitäten kleiner 5 % wie m/z 613 oder m/z 349 können ausgehend von ($M+Na$)⁺ durch den Verlust einer oder drei Pentoseeinheiten erklärt werden.

Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse, vor allem aber zu Klärung der Bindungsverhältnisse wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Folgende Experimente wurden mit der zu identifizierenden Substanz durchgeführt: ¹H-, ¹³C-BB, DEPT, (H,H)-COSY, HMQC und HMBC.

Abbildung 34 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum der zu identifizierenden Verbindung, die vorgegriffen auf die Resultate bereits mit FAXXX (Abb. 35) bezeichnet sei. Man kann das Spektrum in die Phenolcarbonsäureregion (ca. 6,3 – 7,7 ppm) und die Kohlenhydratregion (ca. 3,2 – 5,4 ppm) unterteilen. Wie man Tabelle 4 entnehmen kann, wurden folgenden Signalen Ferulasäureprotonen zugeordnet: δ 7,66 ppm (d, $J_{7,8}$ 15,9 Hz, H7), 7,23 ppm (s, H2), 7,15 ppm (d, H6), 6,90 ppm (d, $J_{5,6}$ 8,0 Hz, H5), 6,40 ppm (d, H8). Diese Zuordnung erfolgte im Vergleich mit publizierten Daten (KATO et al., 1987), kann aber auch einfach mit Hilfe von Inkrementsystemen und den Informationen aus den 2D-Experimenten vorgenommen bzw. bestätigt werden.

Die Kopplungskonstante $J_{7,8}$ kann zur Unterscheidung von *trans*- und *cis*-FS herangezogen werden. In Ethylenderivaten ist die Kopplung zwischen *cis*-ständigen Protonen ($^3J_{cis} = 6 - 14$ Hz, meist 10) kleiner als die zwischen *trans*-ständigen ($^3J_{trans} = 14 - 20$ Hz, meist 16). Die hier bestimmte Kopplungskonstante von $^3J_{7,8} = 15,9$ Hz bestätigt das HPLC-Ergebnis, daß das *trans*-Isomer der FS vorliegt. Des weiteren kann eine Kopplung zwischen H5 und H6 beobachtet werden. Die Kopplungskonstante $J_{5,6} = 8,0$ Hz bestätigt ihre *ortho*-Stellung im Aromaten (ZANGER, 1972).

Die Zuordnung der Signale der Kohlenhydratprotonen ist ungleich aufwendiger, da sich der Kohlenhydratbereich sehr viel komplexer gestaltet. Bei der Zuordnung der Protonensignale von

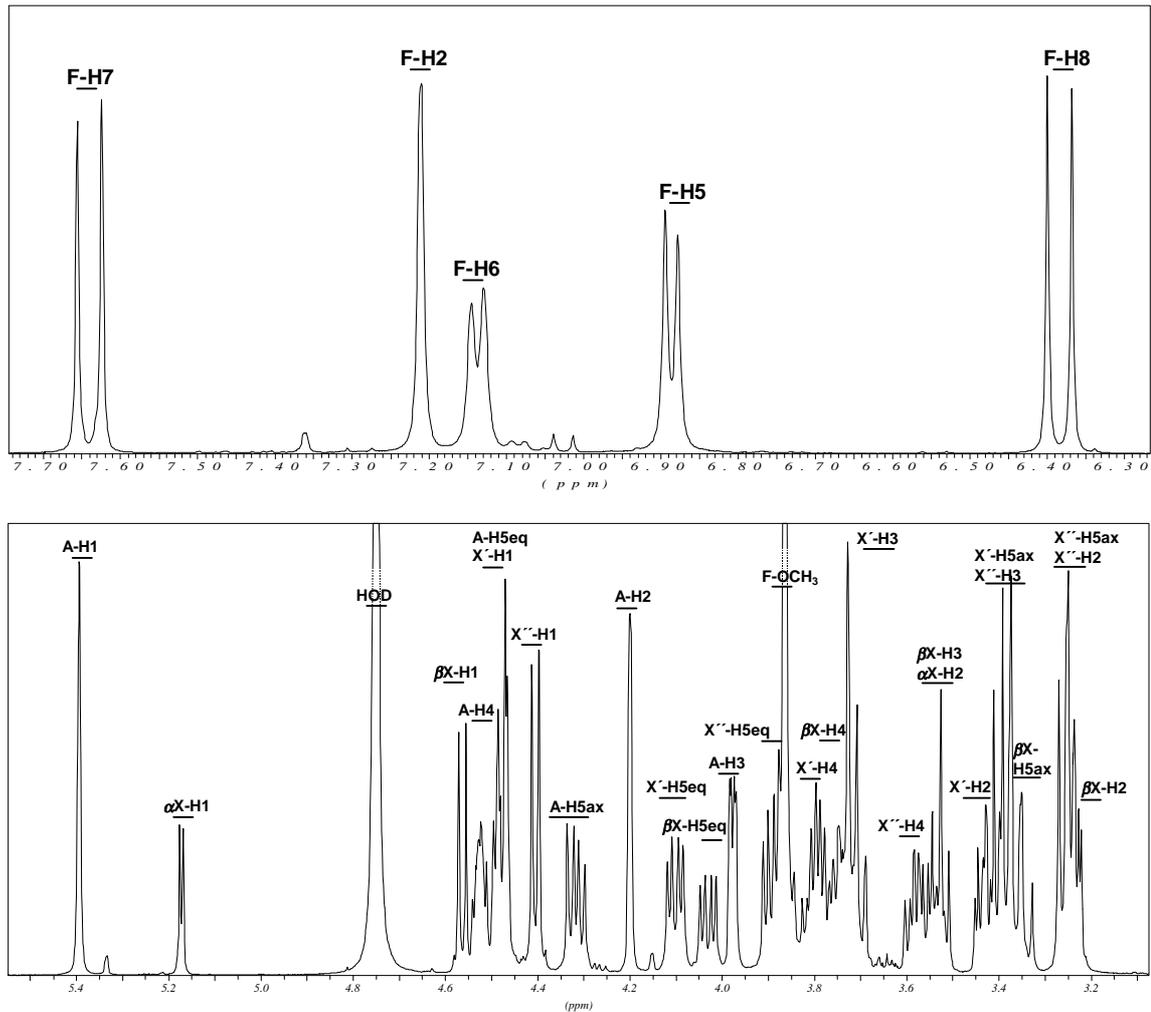


Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FAXXX unterteilt in die Phenolcarbonsäureregion (oben) und die Kohlenhydratregion (unten)

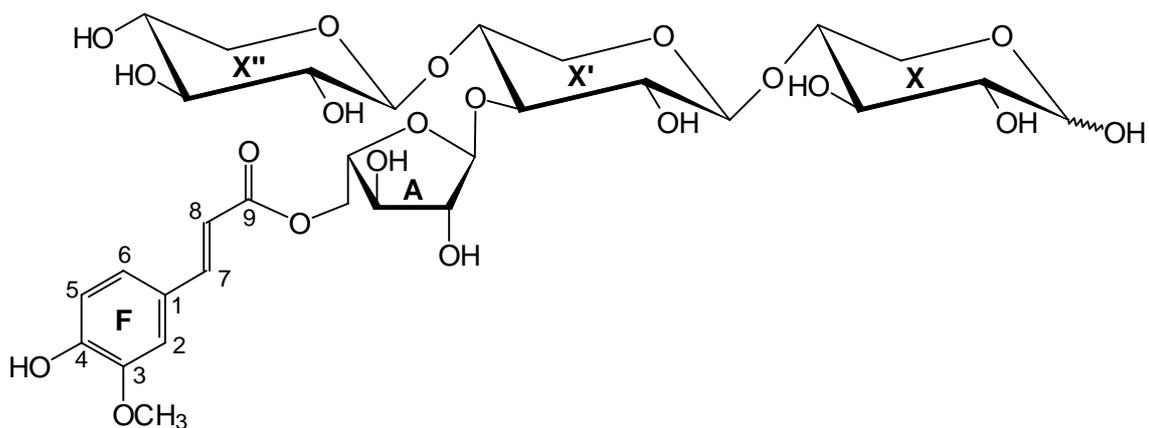


Abbildung 35: Strukturformel von O- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-[5-O-(trans-feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose (FAXXX)

Oligosacchariden geht man typischerweise von den anomeren Protonen aus. Diese sind normalerweise leicht aufzufinden, da sie durch die zwei α -ständigen Sauerstoffatome am schwächsten abgeschirmt und somit tieffeldverschoben sind. Darüber hinaus koppeln die anomeren Protonen nur mit einem weiteren Proton und ergeben daher als einzige Protonen im Kohlenhydratbereich Dubletts. In dem erwarteten Molekül sollten fünf Dubletts zu erkennen sein ($A\text{-H}1$, $\alpha X\text{-H}1$, $\beta X\text{-H}1$, $X'\text{-H}1$ und $X''\text{-H}1$). Tatsächlich sind nur vier Dubletts sowie ein verbreitertes Singulett zu erkennen. Die Zuordnung der Dubletts bzw. des Singulett erfolgte anhand von Literaturdaten (KATO et al., 1987, ISHII & HIROI, 1990a, HOFFMANN et al., 1991, HOFFMANN et al., 1992a, HOFFMANN et al., 1992b, GRUPPEN et al., 1992), sie kann aber auch nach Klärung der Bindungsverhältnisse mit Hilfe des HMBC-Experiments erfolgen. Anhand der Korrelationspeaks im (H,H)-COSY-Spektrum können die Kopplungen der Protonen durch die gesamte Monomereinheit verfolgt werden. Die Zuordnung der Signale, die chemischen Verschiebungen sowie die Kopplungskonstanten (nur für die anomeren Protonen bestimmt) können Tabelle 4 entnommen werden. Das (H,H)-COSY-Spektrum von FAXXX ist beispielhaft für die Kohlenhydratregion (ohne Arabinose H1-Singulett) in Abbildung 36 dargestellt. Die den Protonen zugeordneten Signale sind markiert. Ausgehend von den sicher zugeordneten Protonensignalen können die ^{13}C -Signale den entspre-

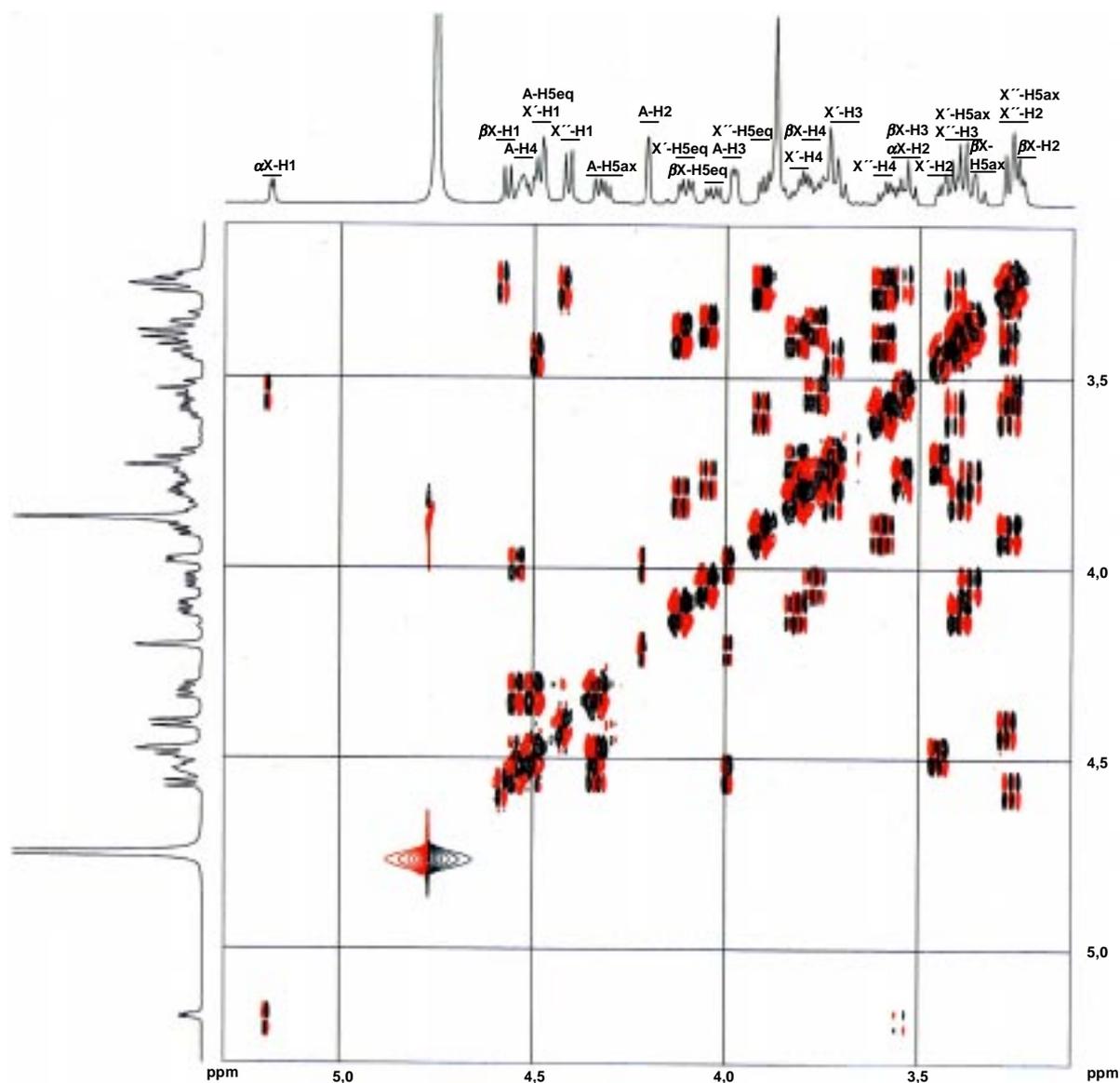


Abbildung 36: (H,H)-COSY-Spektrum von FAXXX (Kohlenhydratregion)

chenden Kohlenstoffatomen mit Hilfe des HMQC-Spektrums zugeordnet werden. Im HMQC-Spektrum zeigen Korrelationspeaks die Kopplung von Protonen an Kohlenstoffatome über eine Bindung an. Abbildung 37 zeigt das HMQC-Spektrum von FAXXX.

Hilfreich für die Zuordnung ist, daß die dunkelblauen/schwarzen Korrelationspeaks die Kopplung von sekundären Kohlenstoffatomen, die roten die Kopplung von primären oder tertiären Kohlenstoffatomen anzeigen. Die Zuordnung sekundärer Kohlenstoffatome kann alternativ auch mit Hilfe des DEPT-Spektrums erfolgen, in dem die sekundären Kohlenstoffatome ebenfalls negative Signale zeigen. In Abbildung 37 sind die Zuordnungen für die Kohlenstoffatome der FS sowie für die anomeren Kohlenstoffatome markiert. Die Zuordnung der Korrelationspeaks für die übrigen Kohlenstoffatome erfolgt in einem vergrößerten Ausschnitt. Quartäre Kohlenstoffatome sind aufgrund mangelnder $^1J(C,H)$ nicht zu erkennen, können aber im HMBC-Spektrum zugeordnet werden. Die Zuordnung aller Protonen- und Kohlenstoffsignale ist in Tabelle 4 dargestellt.

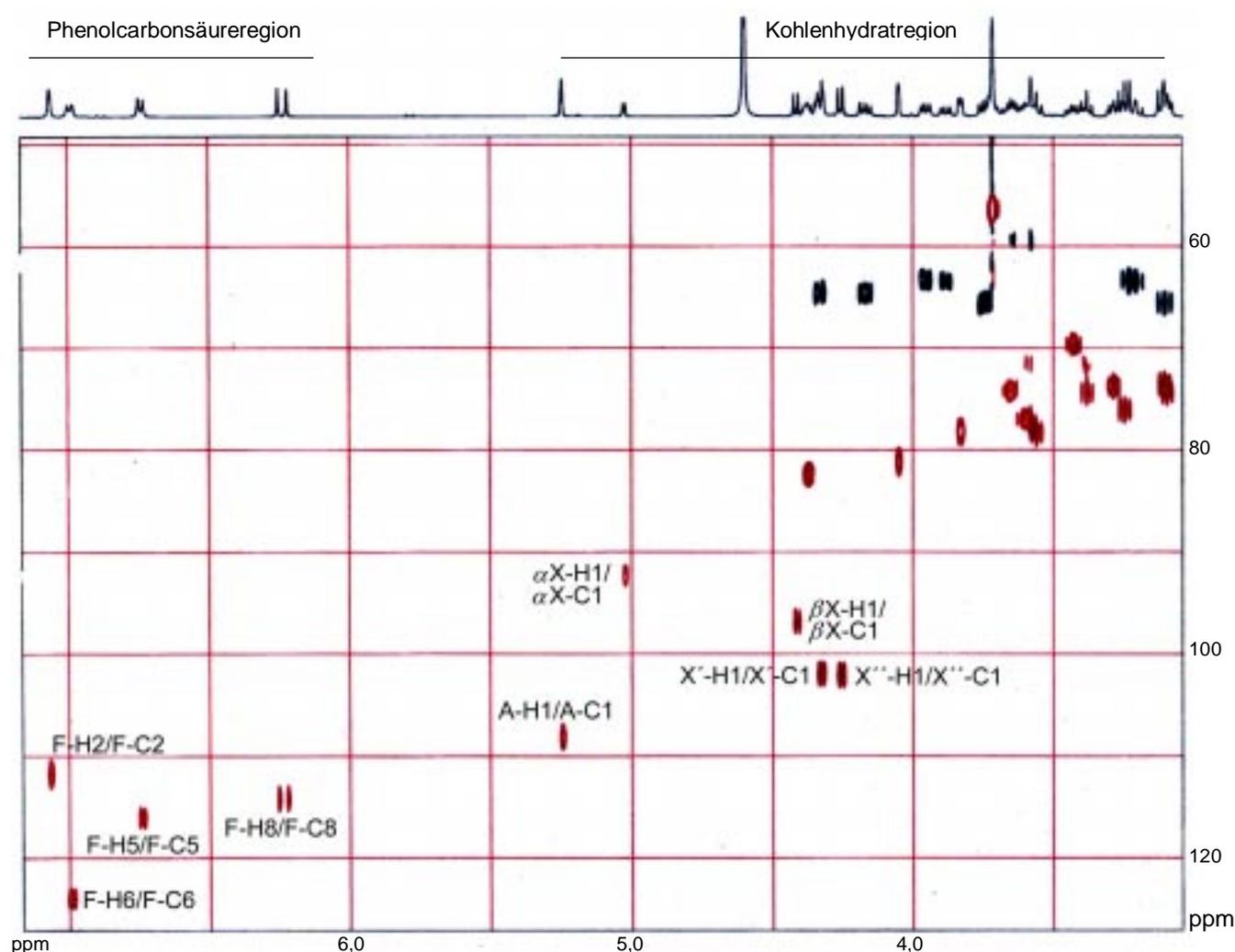


Abbildung 37: HMQC-Spektrum von FAXXX (ohne F-H7/F-C7)

Tabelle 4: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für FAXXX

	δH1 ($^3J_{1,2}$)	δH2	δH3	δH4	$\delta \text{H5}_{\text{EQ}}$	$\delta \text{H5}_{\text{AX}}$
$\beta\text{-D-Xyl } p$	4,58 (7,9)	3,24	3,54	3,76	4,05	3,36
$\alpha\text{-D-Xyl } p$	5,18 (3,6)	3,54	na	na	na	na
$\beta\text{-D-Xyl}' p$	4,49 (7,7)	3,44	3,72	3,82	4,12	3,38
$\beta\text{-D-Xyl}'' p$	4,42 (7,8)	3,27	3,41	3,60	3,91	3,26
$\alpha\text{-L-Ara } f$	5,40 (-)	4,22	4,00	4,54	4,50	4,32
	δH2	δH5 ($^3J_{5,6}$)	δH6	δH7 ($^3J_{7,8}$)	δH8	δOMe
FS	7,23	6,90 (8,0)	7,15	7,66 (15,9)	6,40	3,87

	δC1	δC2	δC3	δC4	δC5
$\beta\text{-D-Xyl } p$	96,97	74,38!	74,45!	76,92	63,45
$\alpha\text{-D-Xyl } p$	92,48	71,41!	71,85!	77,10	59,31
$\beta\text{-D-Xyl}' p$	102,07	73,71	78,35	74,23	63,32
$\beta\text{-D-Xyl}'' p$	102,15	73,50	76,07	69,68	65,57
$\alpha\text{-L-Ara } f$	108,38	81,24	78,19	82,47	64,69
FS	127,15	111,85	148,3*	148,8*	116,40
	δC6	δC7	δC8	δC9	δOMe
FS	124,02	147,16	114,41	169,59	56,36

! - Zuordnung kann vertauscht sein na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten * - Wert aus HMBC entnommen

Zur Diskussion der chemischen Verschiebungen werden die aus dem HMBC-Experiment (s.u.) erhaltenen Informationen über die Ringform (Xylopyranose und Arabinofuranose) und daraus resultierend über die anomere Konfiguration (α -Arabinose, α/β -Xylose, β -Xylose', β -Xylose'') vorausgesetzt.

Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der anomeren Kohlenstoffatome mit Literaturdaten für α -L-Arabinofuranose und α/β -D-Xylopyranose (BOCK & PEDERSEN, 1983) zeigt, welche Monomeren in 1-Stellung verknüpft sind. In der Literatur sind für δC1 α -Araf, δC1 α -Xylp und δC1 β -Xylp Werte von 101,9, 93,1 und 97,5 ppm angegeben. Die C1-Signale für α -L-Ara sowie β -D-Xyl' und β -D-Xyl'' sind deutlich (5 – 6 ppm) tieffeldverschoben, was auf eine Bindung über die 1-Position hinweist. Die C4-Signale der reduzierenden Kohlenhydratkomponente α/β -D-Xyl sind gegenüber den Literaturwerten für α/β -Xylopyranose um ca. 7 ppm tieffeldverschoben. Dies deutet auf eine Verknüpfung über die 4-Position hin.

Der Vergleich der weiteren chemischen Verschiebungen der 1-gebundenen Kohlenhydratkomponenten erfolgt anhand der Literaturwerte für die entsprechenden 1-Methylpyranoside bzw. -furanoside (BOCK & PEDERSEN, 1983). Daraus läßt sich für β -D-Xyl' ebenfalls eine weitere Bindung in 4-Stellung ableiten. Des weiteren ist die chemische Verschiebung von C3 um ca. 1,5 ppm tieffeldverschoben. Hieraus kann jedoch nicht sicher eine Bindung über die 3-Stellung nachgewiesen werden. Für β -D-Xyl'' wird keine weitere Bindung mehr angenommen. Die chemische Verschiebung von C5 von α -L-Ara ist im Gegensatz zum Literaturwert um 2,3 ppm zu höheren Werten verschoben, was eine Verknüpfung der Arabinose über C5 andeutet.

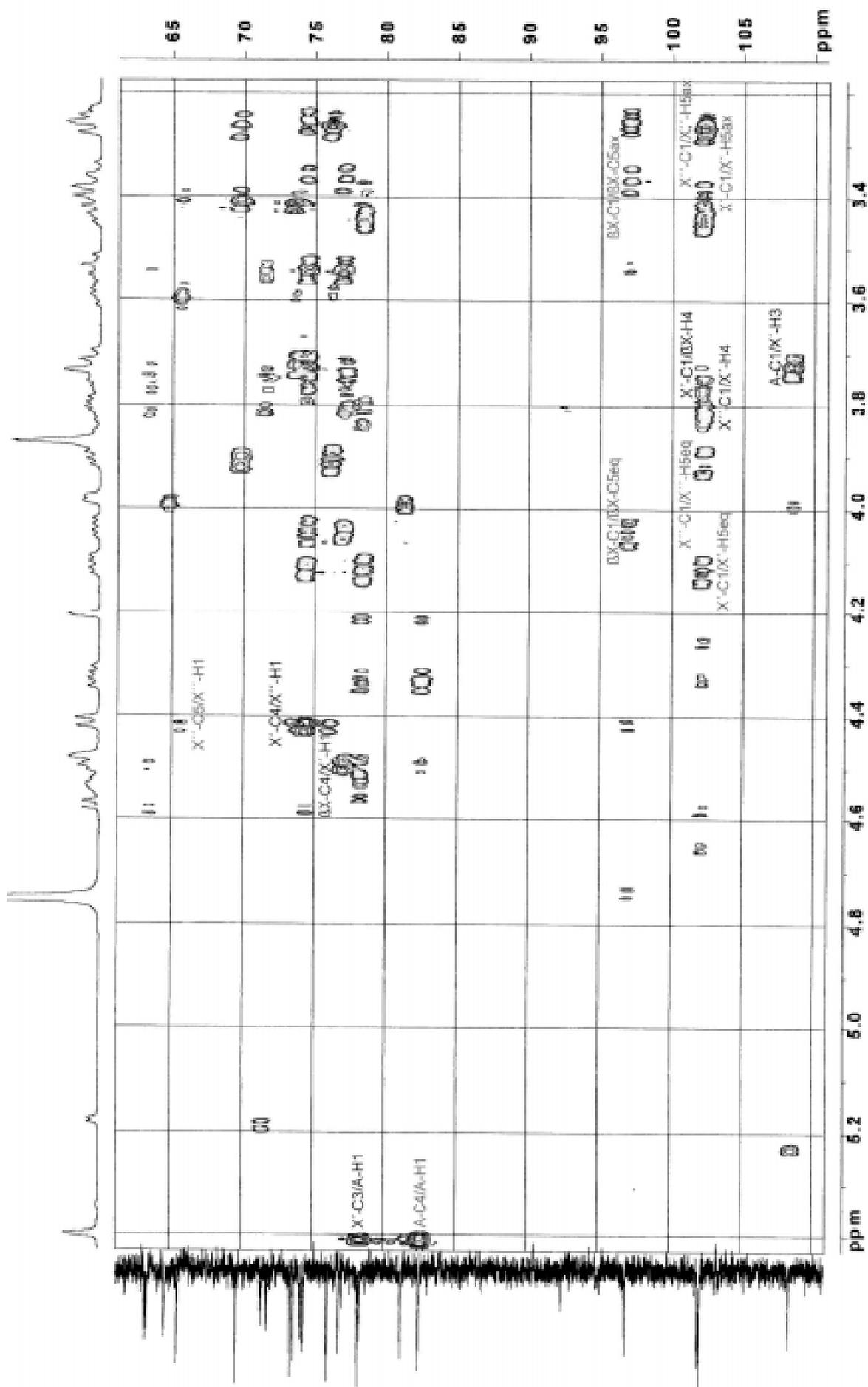


Abbildung 38: HMBC-Spektrum von FAXXX (Kohlenhydratregion)

Zur Bestätigung der aus den ^{13}C -NMR-Daten abgeleiteten Bindungsverhältnisse kann das HMBC-Spektrum herangezogen werden. Mit Hilfe des HMBC-Experiments können C-H-Kopplungen über zwei oder drei Bindungen erkannt werden. Damit eignet sich dieses Experiment nicht nur zur Aufklärung der Bindungen zwischen den Kohlenhydrateinheiten untereinander und zur FS (Beispiel in Abb. 39), sondern auch zur Klärung der Ringformen der Kohlenhydrate (Abb. 39).

Abbildung 38 zeigt die Kohlenhydratregion des HMBC-Spektrums von FAXXX. Die Korrelationspeaks, die Aufschluß über die Bindungen der Kohlenhydratkomponenten untereinander oder an die FS geben, sind rot beschriftet, diejenigen, die zur Bestimmung der Ringform geeignet sind, schwarz.

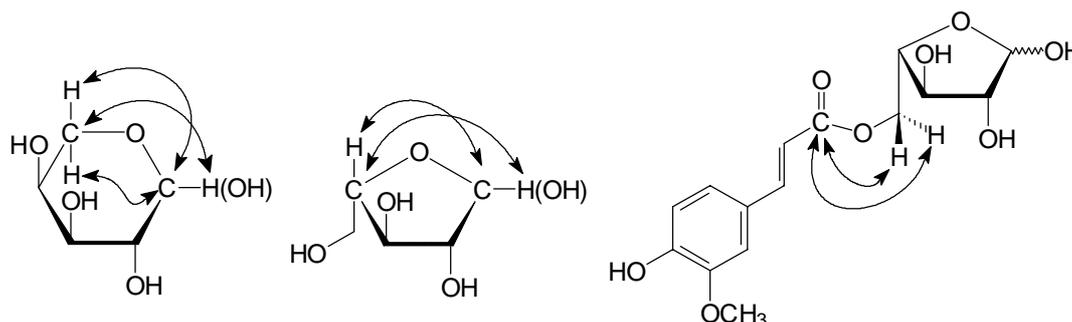


Abbildung 39: Im HMBC-Spektrum erkennbare Kopplungen über drei Bindungen am Beispiel der Pyranoseform (links) und der Furanoseform (Mitte) von Arabinose sowie der Esterbindung zwischen FS und Arabinose (rechts)

In allen Xyloseeinheiten (Xyl, Xyl', Xyl'') sind Kopplungen zwischen C1 und H5eq und H5ax zu erkennen. Nach Abbildung 39 können solche Korrelationspeaks nur bei Xylosen in der Pyranoseform auftreten. Für die Arabinoseeinheit ist eine Kopplung zwischen C4 und H1 zu erkennen, was gemäß Abbildung 39 die Ringform der Arabinose als furanosidisch ausweist. Nach Feststellung der Ringform kann auch die anomere Konfiguration bestimmt werden.

Für Pyranosen kann zur Bestimmung der anomeren Konfiguration die KARPLUS-Beziehung angewendet werden (KARPLUS, 1959, KARPLUS, 1963). Aufgrund von theoretischen Berechnungen gab KARPLUS die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstanten vom Torsionswinkel an (Abb. 40).

Auf Sechsringe angewendet heißt das, daß zwischen der äquatorialen bzw. axialen Stellung der Protonen anhand ihrer Kopplungskonstanten unterschieden werden kann. Koppeln zwei in axialer Stellung stehende Protonen miteinander ($^3J_{aa}$), so liegt die Kopplungskonstante zwischen 7 und 9 Hz. Koppeln zwei Protonen, die beide in äquatorialer Stellung stehen, oder befindet sich eins in axialer und das andere in äquatorialer Stellung ($^3J_{ee}$, $^3J_{ae}$), so beträgt die Kopplungskonstante zwischen 2 und 5 Hz. In D-Xylose ist das Proton in 2-Stellung axial angeordnet. Die Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ betragen für Xyl 7,9 Hz bzw. 3,6 Hz, für Xyl' 7,7 Hz und für Xyl'' 7,8 Hz.

Entsprechend ergibt sich für Xyl' und Xyl'' die β -Konfiguration. Das Signal bei δ 4,58 ppm kann man β -Xyl H1 zuordnen und das Signal bei δ 5,18 ppm α -Xyl H1. Die Integration der Peaks liefert ein Anomerenverhältnis α -Xyl zu β -Xyl von ca. 40 zu 60. Für die Arabinoseeinheit kann die KARPLUS-Beziehung aufgrund ihrer Furanoseform nicht angewendet werden. Für α -Arabinofuranose ist in der Literatur eine Kopplungskonstante von 1,8 Hz beschrieben, oder es ist nur ein verbreiter-

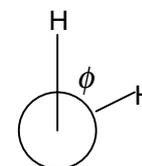


Abbildung 40: Torsionswinkel ϕ

tes Singulett zu erkennen (ANGYAL, 1979). Hier ist das H1 Signal der Arabinose lediglich als verbreitertes Singulett zu erkennen, was auf die α -Form hinweist. Bestätigen läßt sich die Zuordnung durch Vergleich der chemischen Verschiebung δ C1 im ^{13}C -NMR-Spektrum mit Literaturdaten. Die beobachtete chemische Verschiebung von 108,38 ppm stimmt gut mit dem Literaturwert für (1 \rightarrow 5)-verknüpfte α -Arabinofuranose von 108,4 ppm (COLQUHOUN et al., 1994) überein.

Wie bereits erwähnt, können mit Hilfe des HMBC-Experiments die Bindungen der Kohlenhydratkomponenten untereinander und zur FS identifiziert werden. Die Bindung der FS erfolgt esterartig an das C5 der Arabinoseeinheit. Dies kann durch Korrelationspeaks zwischen F-C9 und A-H5_{ax} und A-H5_{eq} nachgewiesen werden (nicht auf dem Ausschnitt von Abb. 38 dargestellt). Die entsprechenden Kopplungen über drei Bindungen sind in Abbildung 39 angedeutet. Die Arabinoseeinheit ist außerdem über eine (1 \rightarrow 3)-Bindung an Xylose' gebunden. Dies beweisen die Korrelationspeaks A-C1/X'-H3 und X'-C3/A-H1 (Abb. 39). Die Xylose'-Einheit ist ihrerseits über eine (1 \rightarrow 4)-Bindung an die reduzierende Xylose-Einheit gebunden, was die Korrelationspeaks zwischen X'-C1/ β X-H4 und β X-C4/X'-H1 verdeutlichen. Außerdem ist die Xylose'-Einheit über ihre 4-Stellung an die Xylose''-Einheit gebunden (Korrelationspeaks X'-C4/X''-H1 und X''-C1/X'-H4).

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse läßt sich die Verbindung eindeutig als *O*- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-[5-*O*-(*trans*-feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose (FAXXX) (Abb. 35) identifizieren. Diese Substanz konnte zuvor bereits aus Bambussproßlingen (ISHII & HIROI, 1990a) und Zuckerrohrbagasse (KATO et al., 1987) isoliert werden. In zur menschlichen Ernährung geeignetem Material konnte diese Verbindung bisher lediglich in Weizenkleie von RALET et al. (1994) nachgewiesen werden. Ein vollständiger NMR-Datensatz für diese Verbindung existierte bislang nicht.

3.2.1.4 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Trisaccharids aus der Fraktion E11

Die dünnschichtchromatographische Trennung der Fraktion E11 ($K_{av} = 4,71$) zeigte einen Hauptspot mit dem R_f -Wert 0,49, der sowohl durch Löschung des Fluoreszenzindikators als auch durch Detektion mittels Zuckerdetektionsreagenz nachgewiesen wurde. Beim Screening auf PCS-Oligosaccharide mittels HPLC-DAD wurden zwei Hauptpeaks in einem Verhältnis von ca. 2:1 beobachtet, die beide ein der *trans*-FS ähnliches Spektrum aufwiesen. Wie bereits in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben, wurde auch hier durch Variation der chromatographischen Bedingungen lediglich eine Plateaubildung zwischen den beiden Peaks aber keine Trennung erreicht. Durch Fraktionierung der Peaks und erneute Injektion konnte gezeigt werden, daß es sich auch hier um eine Substanz im Gleichgewicht handelt. Des Weiteren wurden kleine Peaks mit *trans*-pCS und *cis*-FS ähnlichem Spektrum beobachtet, bei denen die gleiche Plateaubildung beobachtet wurde. Die Hauptpeaks mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum zeigten bei den massenspektrometrischen Untersuchungen Quasi-Molekül-Ionen mit m/z 613 ($M+Na$)⁺ und m/z 629 ($M+K$)⁺. Das Molekulargewicht der entsprechenden Substanz beträgt folglich 590. Das Molekulargewicht und das UV-Spektrum läßt eine Verbindung, bestehend aus *trans*-FS und drei Pentosen, vermuten. Die Peaks mit *trans*-pCS ähnlichem Spektrum zeigten ein Quasi-Molekül-Ionen mit m/z 583 ($M+Na$)⁺. Die Molekulargewichte von 560 und die UV-Spektren der Verbindungen deuten auf Substanzen (wahrscheinlich auf eine Verbindung im Gleichgewicht), bestehend aus *trans*-pCS und drei Pentosen, hin. Aufgrund der sehr geringen Mengen dieser Verbindung und vor dem Hintergrund, daß pCS wahrscheinlich nur eine vernachlässigbare Bedeutung beim Polysaccharid-Crosslinking spielt, wurde die eindeutige Identifizierung dieser Verbindung nicht weiterverfolgt.

Zur Identifizierung des vermutlichen FS-Trisaccharids wurde die Substanz nach Optimierung des Gradienten mittels präparativer HPLC (System 1) isoliert.

Durch Bestimmung der phenolischen Komponenten mittels HPLC-DAD nach alkalischer Hydrolyse wurden nur *trans*-FS und *cis*-FS im Verhältnis 29:1 nachgewiesen. Als Kohlenhydratkomponenten wurden Arabinose und Xylose im ungefähren Verhältnis von 1:2 identifiziert. Ebenso wie FAXXX wurde die untersuchte Substanz während der FIA-MS nur geringfügig fragmentiert. Höhere Intensitäten (bis ca. 25 % bei m/z 613 als Basispeak) erreichte lediglich m/z 132, was einer abgespaltenen Pentoseeinheit entspricht.

Zur endgültigen Identifizierung der Substanz wurden folgende NMR-Experimente durchgeführt: ¹H, ¹³C-BB, DEPT, (H,H)-COSY, HMQC und HMBC.

Die Auswertung der NMR-Daten erfolgt prinzipiell wie in Kapitel 3.2.1.3 für FAXXX ausführlich dargestellt. Aus diesem Grund wird hier und bei den folgenden zu identifizierenden Substanzen lediglich auf Besonderheiten eingegangen.

Die Phenolcarbonsäureregion im ¹H-NMR-Spektrum ähnelt sehr stark der von FAXXX (Abb. 34). Die Kohlenhydratregionen des ¹H-NMR-Spektrums sowie des ¹³C-NMR-Spektrums sind in Kapitel 5.5.2, Abbildungen 63 und 64 abgebildet. Die Zuordnung der Signale im ¹H- und im ¹³C-NMR-Spektrum, sowie die Kopplungskonstanten sind Tabelle 5 zu entnehmen. Aus den NMR-Daten inklusive den Ergebnissen der Integration der Signale (nicht gezeigt) läßt sich die Vermutung bestätigen, daß die Verbindung aus *trans*-FS, einer Arabinose- und zwei Xylose-Einheiten besteht.

Das HMBC-Experiment ergab, daß die Arabinose als Furanose und die Xylosen als Pyranosen vorliegen. In Verbindung mit den anderen NMR-Daten wurde für Arabinose die α -Konfiguration und

Tabelle 5: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für FAXX (O-[5-O-(trans-Feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose)

	δH1 ($^3J_{1,2}$)	δH2	δH3	δH4	$\delta \text{H5}_{\text{EQ}}$	$\delta \text{H5}_{\text{AX}}$
β -D-Xyl p	4,60 (7,9)	3,26	3,55	3,78	4,05	3,33
α -D-Xyl p	5,13 (3,6)	na	na	na	na	na
β -D-Xyl' p	4,46 (8,0)	3,42	3,58	3,70	4,01	3,33
α -L-Ara f	5,37 (-)	4,24	4,07	4,42	4,49	4,31
	δH2	δH5 ($^3J_{5,6}$)	δH6	δH7 ($^3J_{7,8}$)	δH8	δOMe
FS	7,12	6,86 (8,4)	7,06	7,56 (15,9)	6,30	3,83

	δC1	δC2	δC3	δC4	δC5
β -D-Xyl p	96,97	74,45!	74,38!	76,96	63,46
α -D-Xyl p	92,48	71,84!	71,42!	77,13	59,30
β -D-Xyl' p	102,20	73,22	82,28	68,20	65,48
α -L-Ara f	108,66	81,59	77,30	81,87	64,34
FS	127,13	111,67	148,09	148,80	116,03
	δC6	δC7	δC8	δC9	δOMe
FS	123,91	146,99	114,26	169,53	56,25

! - Zuordnung kann vertauscht sein na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten

für Xylose' die β -Konfiguration ermittelt. Das Anomerenverhältnis von α -Xylose zu β -Xylose läßt sich durch Integration zu ca. 40:60 bestimmen.

Aufgrund der Korrelationspeaks im HMBC-Spektrum (nicht abgebildet) werden folgende Bindungen zwischen den Kohlenhydratkomponenten untereinander und zur FS bestimmt:

FS (\rightarrow 5) Ara (Esterbindung), Ara (1 \rightarrow 3) Xyl', Xyl' (1 \rightarrow 4) Xyl.

Somit läßt sich die isolierte Verbindung als O-[5-O-(trans-Feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose identifizieren (Abb. 41).

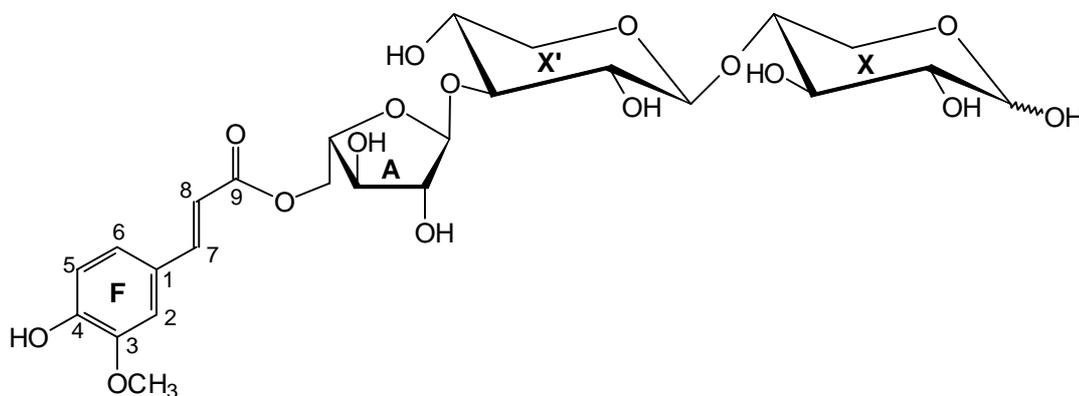


Abbildung 41: Strukturformel von FAXX

In der Gruppe der zur menschlichen Ernährung geeigneten Getreide wurde FAXX bisher auch in Zellwandmaterial aus Weizenkleie (RALET et al., 1994), Maiskleie (McCALLUM et al., 1991, OHTA et al., 1994) und aus Gerstenaleuron (GUBLER et al., 1985) nachgewiesen.

3.2.1.5 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Disaccharids aus der Fraktion S2

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktion S2 ($K_{av} = 6,82$) lieferte erste Hinweise auf PCS-Kohlenhydrat-Verbindungen. Das später isolierte und identifizierte FS-Disaccharid besitzt einen R_f -Wert von 0,55. Das HPLC-DAD-Screening zeigte einen Peak mit *trans*-FS ähnlichem UV-Spektrum (Peak 1, Abb. 42). Auffällig ist, daß die Substanz bei der chromatographischen Trennung nicht die bei FAXX und FAXXX beobachtete Plateaubildung zeigte, die durch die Gleichgewichtseinstellung der reduzierenden Xyloseeinheit verursacht wurde. Mittels HPLC-MS-Screening wurde das Molekulargewicht der Peak 1 entsprechenden Substanz zu 458 bestimmt (Quasi-Molekül-Ionen bei m/z 481 ($M+Na$)⁺ und m/z 497 ($M+K$)⁺). Das Molekulargewicht kann mit einer Verbindung, bestehend aus FS und zwei Pentosen, in Einklang gebracht werden.

Zur Isolierung der Peak 1 entsprechenden Substanz wurden die optimierten analytischen HPLC-Bedingungen auf ein semipräparatives System (HPLC-System 2) übertragen. Die Untersuchung der isolierten Substanz auf phenolische Bestandteile und Kohlenhydratkomponenten ergab, daß die Substanz aus *trans*-FS, Arabinose und Xylose besteht. Die Durchführung der FIA-MS brachte keine weiteren Erkenntnisse.

Zur Bestätigung der Ergebnisse und zur Klärung der Bindungsverhältnisse wurden folgende NMR-Experimente durchgeführt: ¹H-, (H,H)-COSY, TOCSY, HMQC und HMBC. Auf das direkte ¹³C-BB-Experiment wurde aufgrund der geringen Menge an isolierter Substanz (ca. 2 mg) verzichtet. Die ¹³C-NMR-Daten wurden aus dem HMQC (Kapitel 5.5.2, Abb. 65) bzw. HMBC-Experiment entnommen.

Bereits im Phenolcarbonsäurebereich des ¹H-NMR-Spektrums waren Abweichungen zu denen von FAXX und FAXXX zu erkennen (Abb. 43). So sind die Dubletts der olefinischen Protonen F-H7 und F-H8 weiter aufgespalten. Diese Tatsache wurde bereits von COLQUHOUN et al. (1994) beschrieben. Sie beobachteten die Aufspaltung der olefinischen Protonen nur dann, wenn die FS an reduzierende Arabinose gebunden war und führten die Aufspaltung auf den Einfluß der beiden Anomeren zurück. Die Vermutung, daß eine reduzierende Arabinose-Einheit vorliegt, lag somit nahe und wurde durch die beiden der α - bzw. β -Arabinose zugeordneten Dubletts bei δ 5,40 ppm und δ 5,36 ppm bestätigt (Abb. 43, Kohlenhydratregion). Zusätzlich wurden zwei weitere Dubletts in der Kohlenhydratregion bei δ 4,58 ppm und δ 4,54 ppm beobachtet. Die Möglichkeit, daß auch Xylose in reduzierender Form vorliegt, konnte jedoch bereits anhand der Kopplungskonstanten

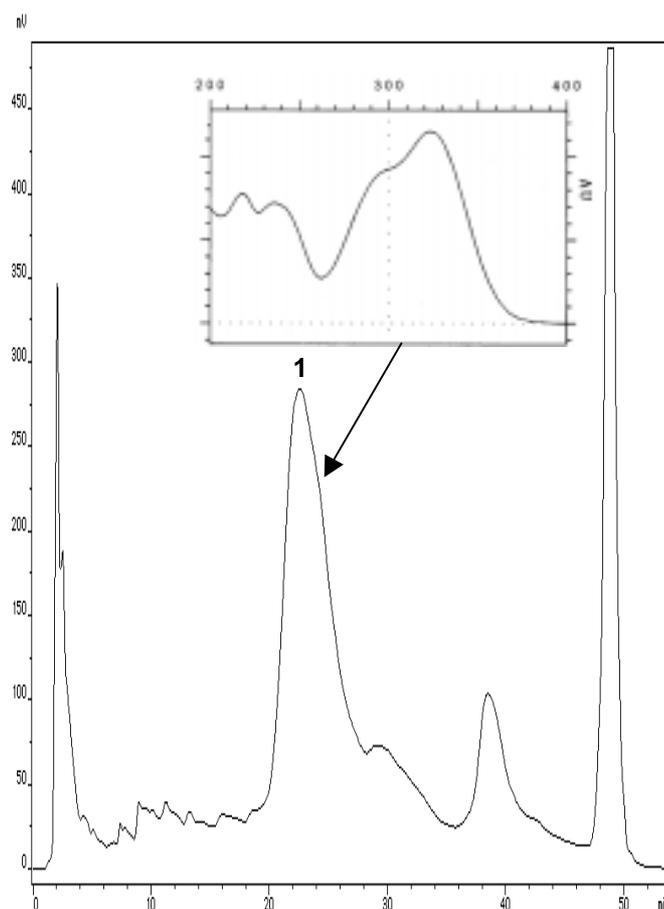


Abbildung 42: HPLC-Chromatogramm der Fraktion S2 (UV-Detektion bei 280 nm)

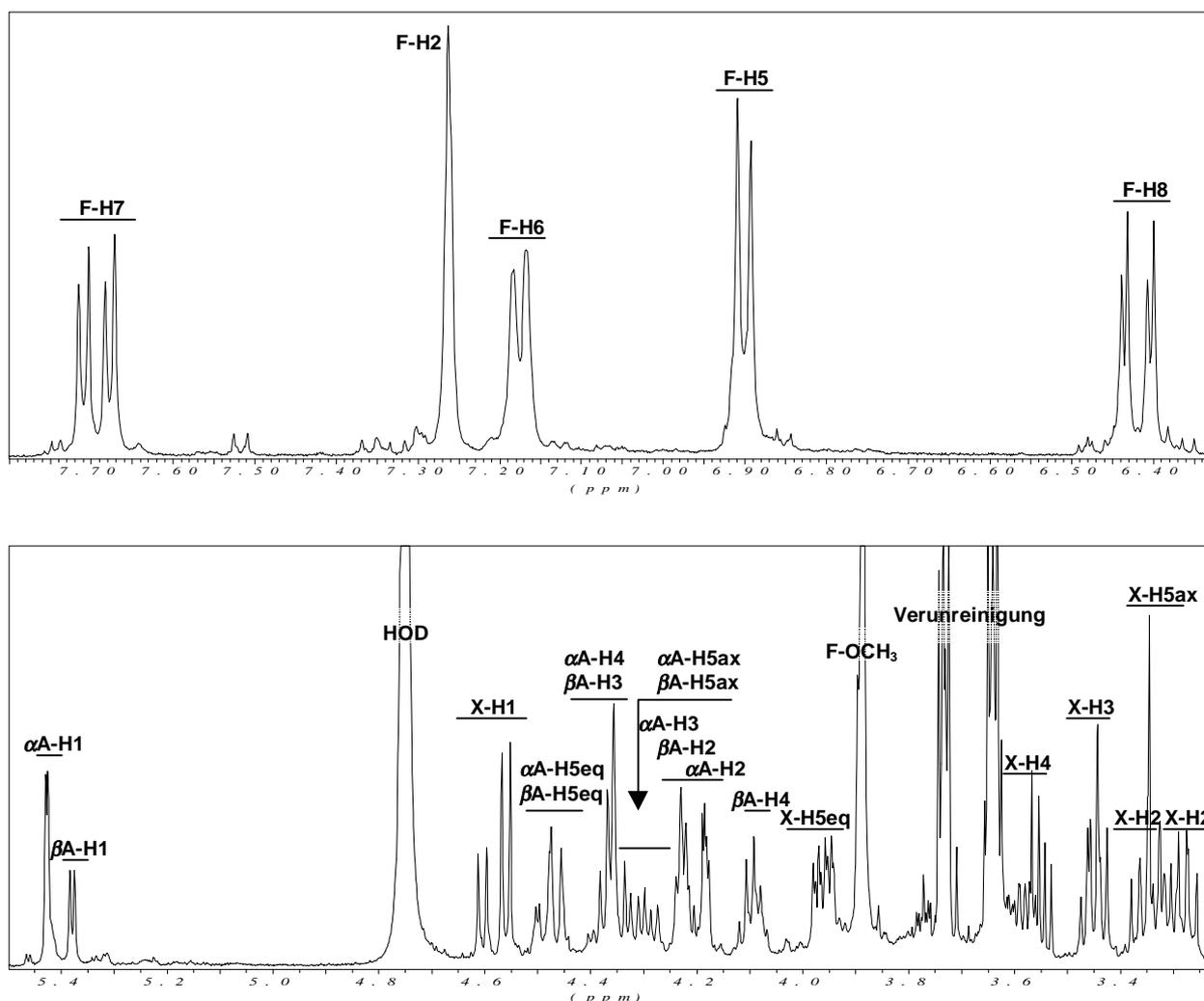


Abbildung 43: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FAX ($\text{O-}\beta\text{-D-Xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-O-[5-O-(trans-feruloyl)-L-arabinofuranose]$) unterteilt in die Phenolcarbonsäureregion (oben) und die Kohlenhydratregion (unten)

ausgeschlossen werden, die für beide Dubletts zu 7,9 Hz bestimmt wurden. Da Xylose als Pyranose vorliegt (aus HMBC-Spektrum ersichtlich) entsprechen beide Dubletts β -Xylose. Dementsprechend ist das Signal des anomeren Protons der Xylose unter dem Einfluß der anomeren Protonen der Arabinose aufgespalten. Die Tatsache, daß Arabinose und nicht Xylose als reduzierende Kohlenhydratkomponente vorliegt, mag das von FAXX und FAXXX abweichende chromatographische Verhalten bei der HPLC-Trennung erklären.

Die Zuordnung der weiteren Protonensignale (Tab. 6) erfolgte mit Hilfe des (H,H)-COSY-Experiments. Die Zuordnung der Protonen α -Ara H3 und H4 war schwierig. Unter Zuhilfenahme der anderen 2D-Experimente und unter Berücksichtigung der $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten mußte man schließen, daß die Signale für α -Ara H3 und β -Ara H2 sowie für α -Ara H4 und β -Ara H3 fast übereinanderliegen, was die Auswertung des COSY-Spektrums erschwerte. So konnte die Zuordnung der Protonen α -Ara H3 und H4 nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden. Die darauf basierende Zuordnung der ^{13}C -Signale für α -Ara C3 und C4 mit Hilfe des HMQC-Experiments (Tab. 6) steht jedoch im Einklang mit der Literatur (SAULNIER et al., 1995, WENDE & FRY, 1997b).

Aufgrund der $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten läßt sich vermuten, daß die Arabinose-Einheit in 2- und 5-Stellung substituiert ist. Im Vergleich zu Literaturwerten für nichtsubstituierte Arabinofuranose (BOCK &

Tabelle 6: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für FAX

	δH1 ($^3J_{1,2}$)	δH2	δH3	δH4	$\delta \text{H5}_{\text{EQ}}$	$\delta \text{H5}_{\text{AX}}$
$\alpha\text{-L-Ara } f$	5,40 (2,1)	4,16	4,21*	4,32*	4,44!	4,32!
$\beta\text{-L-Ara } f$	5,36 (4,7)	4,20	4,34	4,08	4,46!	4,27!
$\beta\text{-D-Xyl } p$	4,58 ^d (7,9) 4,54 ^d (7,9)	3,34 ^d 3,24 ^d	3,43	3,62	3,94	3,29
	δH2	δH5 ($^3J_{5,6}$)	δH6	δH7 ($^3J_{7,8}$)	δH8	δOMe
FS	7,24	6,88 (7,8)	7,16	7,67 ^d (16,0)	6,40 ^d	3,84

	δC1	δC2	δC3	δC4	δC5
$\alpha\text{-L-Ara } f$	100,6**	89,7**	75,9**	81,0**	64,3**
$\beta\text{-L-Ara } f$	95,5**	84,1**	73,7**	79,0**	65,3**
$\beta\text{-D-Xyl } p$	103,8 ^{d,**} 103,3 ^{d,**}	73,7**	76,2**	69,7**	65,9**
FS	126,8***	111,8**	148,8***	150,1***	116,4**
	δC6	δC7	δC8	δC9	δOMe
FS	124,3**	147,2**	114,1**	169,9***	56,4**

! - Zuordnung kann vertauscht sein * - siehe Text ** - Daten aus HMQC-Spektrum entnommen *** - Daten aus HMBC-Spektrum entnommen ^d - Peaks „doppelt“ unter Einfluß der reduzierenden Kohlenhydratkomponente

PEDERSEN, 1983) sind die Signale für $\alpha\text{-Ara C2}$ und $\beta\text{-Ara C2}$ um ca. 7 ppm tieffeldverschoben. Die Signale für C5 sind um ca. 2-3 ppm tieffeldverschoben.

Die Bindungsverhältnisse ließen sich durch das HMBC-Experiment bestätigen. Die Korrelationspeaks F-C9/A-H5_{ax/eq} und $\alpha/\beta\text{-A-C2/X-H1}$ zeigen die Bindung der FS über eine Esterbindung an die 5-Position der Arabinose sowie die Bindung der Xylose an die 2-Position der Arabinose.

Das isolierte FS-Disaccharid wurde somit eindeutig als *O*- $\beta\text{-D-Xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-[5-O-(trans-feruloyl)-L-arabinofuranose]}$ (FAX) identifiziert (Abb. 44). Diese Verbindung konnte bereits von WENDE & FRY (1997b) in Blättern verschiedener Gräser identifiziert werden. Die Isolierung und Identifizierung von FAX aus zur menschlichen Ernährung geeignetem Material erfolgte bislang nur aus Maiskleie (SAULNIER et al., 1995).

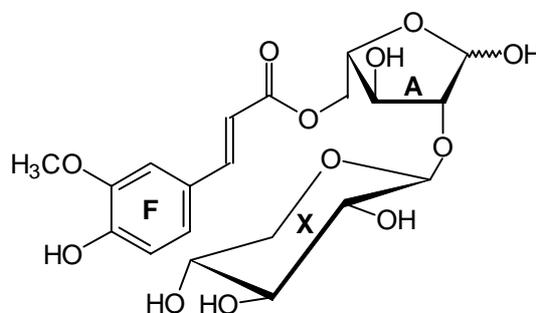


Abbildung 44: Strukturformel von FAX

3.2.1.6 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Monosaccharids aus der Fraktion S4

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fraktion S4 ($K_{\text{av}} = 9,41$) zeigte einen Hauptspot mit dem R_f -Wert 0,63, der sowohl durch Löschung des Fluoreszenzindikators als auch durch Detektion mittels Zuckerdetektionsreagenz nachweisbar war. Beim PCS-Oligosaccharid-Screening mittels HPLC-DAD wurde ein Hauptpeak mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum (Peak 1, nicht abgebildet) beobachtet. Des weiteren fiel ein kleinerer Peak mit *trans*-pCS ähnlichem Spektrum auf, der jedoch nicht weiter untersucht wurde. Peak 1 zeigte nicht die bei der chromatographi-

schen Trennung von FAXX und FAXXX beobachtete Plateaubildung. Das Molekulargewicht der Peak 1 entsprechenden Substanz wurde mittels LC-MS (Natriumaddukt mit m/z 349 bzw. Kaliumaddukt mit m/z 365) zu 326 ermittelt. Die Isolierung von Peak 1 erfolgte auf dem (semi)präparativen HPLC-System 2. *Trans*-FS wurde neben vernachlässigbaren Mengen an *cis*-FS (Verhältnis *trans*-FS:*cis*-FS = 25:1) als phenolische Komponente der Verbindung identifiziert. Arabinose wurde als einzige Kohlenhydratkomponente bestimmt. Mittels FIA-MS wurden Fragmente mit m/z 132 und m/z 177 erzeugt (ca. 10 % Intensität bei 80 V Fragmentorspannung). Diese Fragmente können der abgespaltenen Pentoseeinheit bzw. der abgespaltenen Ferulasäureeinheit zugeordnet werden.

Die abschließende Identifizierung der Substanz erfolgte anhand folgender NMR-Experimente: ^1H , ^{13}C -BB, DEPT, (H,H)-COSY, HMQC und HMBC.

Die Phenolcarbonsäureregion des ^1H -NMR-Spektrums ist der von FAX sehr ähnlich. Die Dubletts der Signale für die olefinischen Protonen werden weiter aufgespalten. Stellt sich das Signal für F-H2 im ^1H -NMR-Spektrum von FAX jedoch nur als verbreitertes Singulett dar, so kann im Spektrum der zu identifizierenden Substanz eine Aufspaltung des Signals unter dem Einfluß der reduzierenden Arabinoseeinheit erkannt werden. Im Kohlenhydratbereich des Protonenspektrums (Kapitel 5.5.2, Abb. 66) werden die beiden Dubletts bei δ 5,31 und δ 5,28 als Signale für β - bzw. α -Arabinose identifiziert. Im Vergleich zu FAX ist deren Reihenfolge vertauscht. Die restlichen Protonensignale werden entsprechend Tabelle 7 zugeordnet. Die Zuordnung der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum, dessen Kohlenhydratregion in Kapitel 5.5.2, Abbildung 67 dargestellt ist, erfolgte anhand der HMQC- bzw. HMBC-Spektren (Tab. 7).

Tabelle 7: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für FA (5-O-(*trans*-Feruloyl)-L-Arabinofuranose)

	δ H1 ($^3J_{1,2}$)	δ H2	δ H3	δ H4	δ H5 _{EQ}	δ H5 _{AX}
α -L-Ara f	5,28 (2,5)	4,06	4,04	4,31	4,38	4,22
β -L-Ara f	5,31 (4,0)	4,11	4,13	4,00	4,39	4,19
	δ H2	δ H5 ($^3J_{5,6}$)	δ H6	δ H7 ($^3J_{7,8}$)	δ H8	δ OMe
FS	6,93 ^d	6,76 (8,0)	6,91	7,39 ^d (16,0)	6,14 ^d	3,82

	δ C1	δ C2	δ C3	δ C4	δ C5
α -L-Ara f	101,94	81,95	76,63	81,35	64,70
β -L-Ara f	96,03	76,77	75,11	79,32	65,93
FS	127,28 ^d 127,25 ^d	111,70	148,07	148,56	116,04
	δ C6	δ C7	δ C8	δ C9	δ OMe
FS	124,00	147,07 ^d 147,01 ^d	114,30 ^d 113,37 ^d	169,72 ^d 169,67 ^d	56,31

^d – Peaks „doppeln“ unter Einfluß der reduzierenden Kohlenhydratkomponente

Mit Hilfe des HMBC-Experiments konnte die Ringform der Arabinose als furanosidisch bestimmt werden. Die Korrelationspeaks F-C9/A-H5_{ax} und F-C9/A-H5_{eq} zeigen die Esterbindung der FS an die 5-Position der Arabinose.

Bei der isolierten Substanz handelt es sich somit um 5-*O*-(*trans*-Feruloyl)-L-arabinofuranose (FA) (Abb. 45). Dieses relativ uncharakteristische Fragment wurde bereits häufig isoliert und identifiziert. So wurde FA in der Gruppe der Getreide in Maiskleie (OHTA et al., 1994, SAULNIER et al., 1995) und Weizenkleie (McCALLUM et al., 1991, RALET et al., 1994) nachgewiesen.

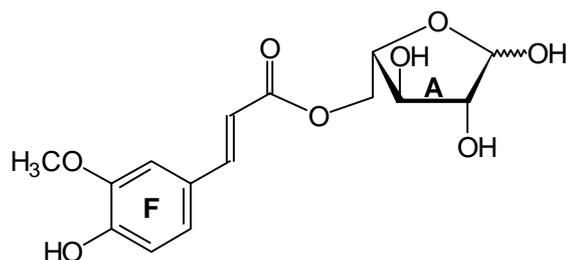


Abbildung 45: Strukturformel von FA

3.2.1.7 Rückschlüsse aus den identifizierten Verbindungen auf die Arabinoxylanstruktur von Roggen

Arabinoxylane aus Roggen bestehen aus linearen (1→4)-D-Xylanketten, die in *O*-3 oder in *O*-2-Stellung mit Arabinose monosubstituiert oder in *O*-2- und *O*-3-Stellung disubstituiert sind. Dabei sind in *O*-2-Stellung monosubstituierte Xyloseeinheiten selten, wohingegen *O*-3 monosubstituierte Xyloseeinheiten dominieren. Disubstituierte Xyloseeinheiten liegen weitaus häufiger vor als in *O*-2-Stellung monosubstituierte Xyloseeinheiten, erreichen aber nicht die Bedeutung der in *O*-3-Stellung monosubstituierten Xyloseeinheiten (VINKX & DELCOUR, 1996).

Die isolierte Verbindung FAXX stammt eindeutig aus einer solchen Arabinoxylanstruktur (Abb. 46). Die drei (1→4)-β-D-gebundenen Xylopyranosen repräsentieren die Xylankette, die Arabinofu-

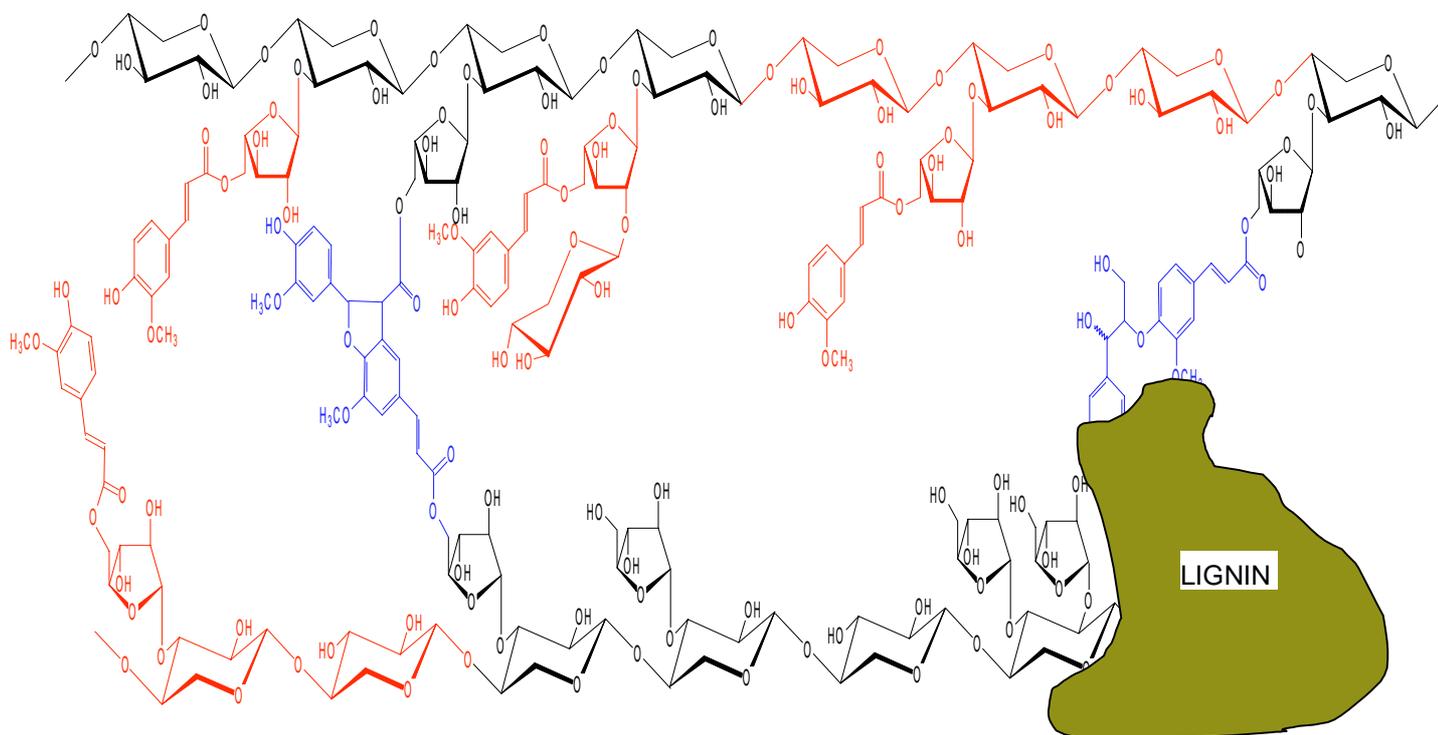


Abbildung 46: Schematische Darstellung von Arabinoxylanen aus UBS aus Roggen

ranose ist typischerweise an die *O*-3-Position der Xylose gebunden. FS ist an die *O*-5-Position der Arabinose gekoppelt. Da FAXX und FAXXX dieselben Strukturen repräsentieren und keine anderen Strukturen nachgewiesen wurden, scheint die FS in Roggenarabinoxylanen nur an solche Arabinoseeinheiten gebunden zu sein, die über eine (1→3)-Bindung an Xylose gebunden sind. Erstaunlicherweise konnten auch keine FS-Oligosaccharide, die eine mit Arabinose disubstituierte Xylose-

einheit enthalten, nachgewiesen werden. Entweder wird FS tatsächlich spezifisch an die vorgestellten Strukturen gekoppelt, oder ein Nachweis anderer Strukturen ist mit den angewendeten Methoden nicht möglich. So besteht die Möglichkeit, daß die Carbohydrasen aus dem Enzymgemisch Driselase nicht in der Lage sind, FS-Oligosaccharide, die eine mit Arabinose disubstituierte Xyloseeinheit enthalten, derart freizusetzen, daß sie als niedermolekulare FS-Oligosaccharide nachweisbar sind. Auch nach saurer Hydrolyse würden solche Strukturen nicht zu isolieren sein, da glykosidische Bindungen zu Furanosen säurelabiler sind und Arabinose entsprechend zuerst abgespalten wird. Demzufolge konnte nach saurer Hydrolyse auch hauptsächlich FA nachgewiesen werden, eine relativ uncharakteristische Verbindung, die keine neuen Strukturinformationen enthält. Interessant hingegen ist die aus dem sauren Hydrolysat isolierte Verbindung FAX. Bei der Arabinose handelt es sich wahrscheinlich auch um eine an die Xylankette gebundene Seitenkette, die jedoch neben FS ebenfalls mit einer Xyloseeinheit verknüpft ist. Ob die Xylose immer nur als einzelner Substituent vorliegt oder ob die Möglichkeit gegeben ist, daß über die Arabinose eine weitere Xylankette an die Hauptkette gebunden ist, ist fraglich. Zweifelsohne wird jedoch durch die Bindung der Xylose an die Arabinose, die molekulare Umgebung der FS geändert, was Einfluß auf die enzymatische Abbaubarkeit der Arabinoxylane, aber auch auf die FS-Dimerisierung haben kann. So konnten WENDE & FRY (1997b) bereits zeigen, daß die zusätzliche Xyloseeinheit z.B. die alkalische Hydrolyse des FS-Esters beeinflusst.

Wie in Abbildung 46 dargestellt, können die Xylanketten über die in Kapitel 3.1 identifizierten DFS miteinander verbunden werden. Außerdem besteht die Möglichkeit der Kopplung der Xylanketten an Lignin z.B. über das identifizierte Kreuzprodukt 4-*O*- β -CFE.

3.2.2 Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Verbindungen aus unlöslichen Ballaststoffen aus Wildreiskaryopsen

3.2.2.1 Hydrolyse der unlöslichen Wildreisballaststoffe und Reinigung des Hydrolysats

Mittels enzymatischer Hydrolyse der UBS aus Wildreis werden durchschnittlich 46 % des Ausgangsmaterials hydrolysiert. Dabei gehen 71 % *trans*-FS und 61 % *cis*-FS, jedoch nur jeweils ca. 15 % pCA und SA in Lösung. Die niedrigen prozentualen Gehalte an hydrolysiertes pCS und SA deuten darauf hin, daß die beiden Säuren hauptsächlich nicht an Polysaccharide, sondern an andere Biopolymere gebunden sind oder daß die Carbohydrasen durch die Bindung der Säuren an die Polysaccharide gehemmt werden.

Bei der Reinigung des Hydrolysats an der Amberlite XAD-2 Säule eluieren mit der H₂O-Fraktion 75 % *trans*-FS, 57 % *cis*-FS und 57 % SA. Dieses Ergebnis ist überraschend und steht im Gegensatz zu den aus der Roggenhydrolyse erhaltenen Resultaten. Die Tatsache, daß 75 % der *trans*-FS mit der H₂O-Fraktion eluieren, bedeutet, daß bei der enzymatischen Hydrolyse überwiegend FS-Ester höhermolekularer Oligosaccharide gebildet werden. Dementsprechend scheinen die Wildreis-arabinoxylane Strukturen zu enthalten, die die Enzyme unter den gewählten Versuchsbedingungen weitestgehend hindern, die Arabinoxylane zu niedermolekularen FS-Oligosacchariden abzubauen. Dieselben Schlußfolgerungen sind für SA zu ziehen, die ebenfalls überwiegend an höhermolekulare Oligosaccharide gebunden vorzuliegen scheint.

Mit der MeOH/H₂O-Fraktion eluieren nur 21 % der *trans*-FS, 33 % der *cis*-FS und 24 % der SA. Die MeOH-Fraktion enthält 5 % der hydrolysierten *trans*-FS, 15 % der SA und 20 % der *cis*-FS.

Durch die saure Hydrolyse werden 41 % SA und 43 % pCS hydrolysiert, deutlich mehr als mit der enzymatischen Hydrolyse. Des weiteren werden ca. 74 % *trans*-FS und 61 % *cis*-FS in Lösung gebracht. Bei der Reinigung an Amberlite XAD-2 eluieren 7 % der *trans*-FS, 8 % der *cis*-FS, 5 % der pCS und 26 % der SA mit der H₂O-Fraktion. 89 % der *trans*-FS, 81 % der *cis*-FS, 66 % der pCS und 62 % der SA sind in der MeOH/H₂O-Fraktion vorhanden und folglich an niedermolekulare Oligosaccharide oder Monosaccharide gebunden. Mit der MeOH-Fraktion eluieren nur noch 12 % der hydrolysierten *trans*-FS, 27 % der *cis*-FS, 6% der pCS und 13 % der SA.

Für die gelchromatographischen Fraktionierungen werden die H₂O/MeOH-Fractionen weiter verwendet.

3.2.2.2 Gelpermeationschromatographische Fraktionierung der gereinigten Hydrolysate

Abbildung 47 zeigt die bei der GPC-Fraktionierung an Sephadex LH-20 erhaltenen Chromatogramme für die enzymatischen und sauren Hydrolysate. Das enzymatische Hydrolysat wurde gemäß Abbildung 47 in sieben Fraktionen (E1 – E7) unterteilt, vom sauren Hydrolysat wurden die neun markierten Fraktionen (S1 – S9) gesammelt und weiter untersucht. Die Wiederholungen der GPC-Trennungen waren ausreichend reproduzierbar. So wurden sieben enzymatische und drei sau-

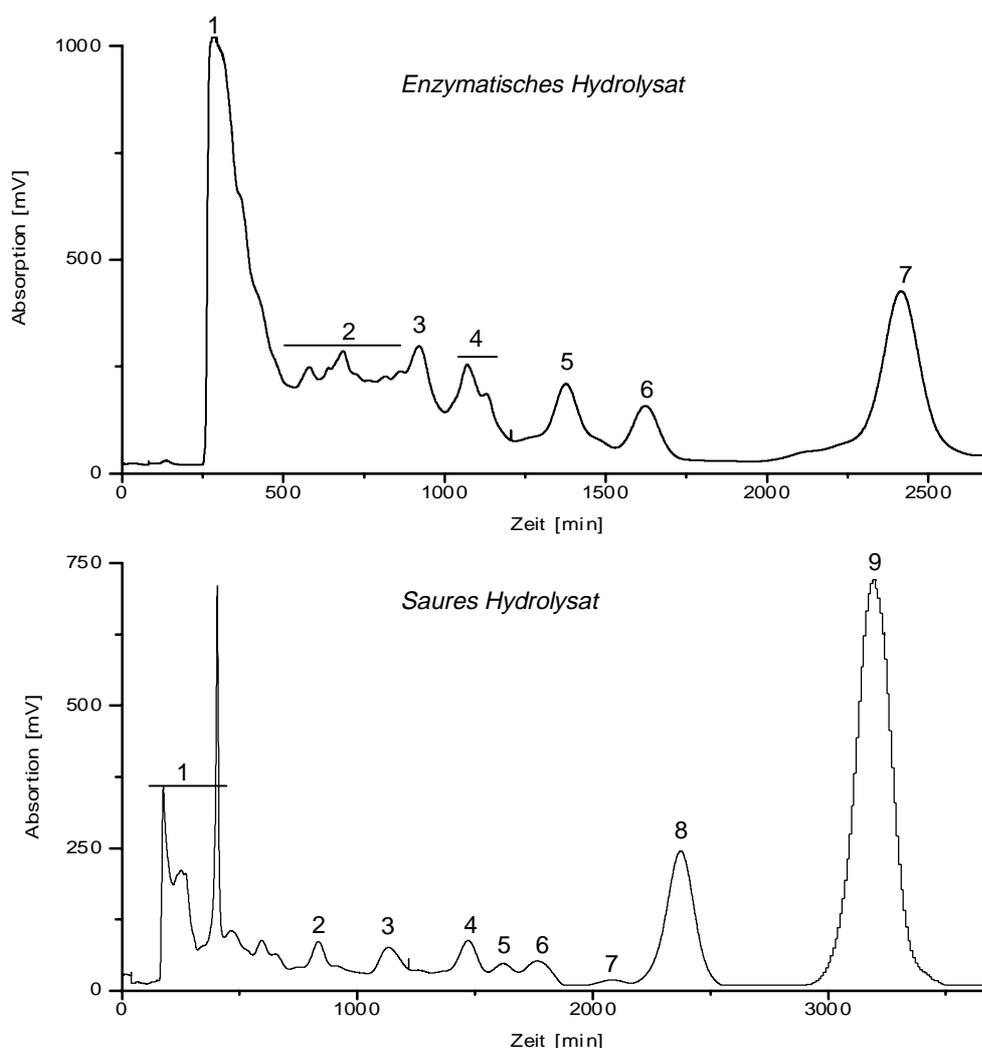


Abbildung 47: GPC-Chromatogramme der enzymatischen (oben) und sauren (unten) Hydrolysate (MeOH/H₂O-Fraktion) der UBS aus Wildreis

re Hydrolysate gelchromatographisch fraktioniert, um ausreichende Substanzmengen für die weitere Reinigung und die anschließenden Identifizierungsreaktionen bereitstellen zu können.

Das Chromatogramm des enzymatischen Hydrolysats weist erhebliche Unterschiede zu dem des enzymatischen Hydrolysats der UBS aus Roggen auf. So eluieren weitaus größere Mengen UV-aktiven Materials, vermutlich FS gebunden an höhermolekulare Oligosaccharide, die dennoch Bestandteile der MeOH/H₂O-Fraktion bei der Reinigung sind, direkt nach dem Totvolumen. Den niedermolekularen UV-aktiven Substanzen mit höheren K_{av} -Werten entsprechen vergleichsweise kleine Peaks. Das GPC-Chromatogramm des enzymatischen Hydrolysats der UBS aus Roggen zeigt umgekehrte Verhältnisse. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus dem Reinigungsschritt an Amberlite XAD-2 überein. Sie verdeutlicht, daß die Arabinoxylane aus Wildreis durch das Enzymgemisch Driselase nur unzureichend abgebaut werden.

Im folgenden werden nur die Fraktionen weiter besprochen, aus denen identifizierbare Strukturen isoliert werden konnten.

3.2.2.3 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Tetrasaccharids aus der Fraktion E5

Die Fraktion E5 weist einen K_{av} -Wert von 2,53 auf. Fraktion E9 aus dem enzymatischen Roggenhydrolysat, aus der FAXXX isoliert wurde, hat einen K_{av} -Wert von 2,40. Fraktion E5 zeigte bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung einen Hauptspot mit einem R_f -Wert von 0,34, der durch Fluoreszenzlöschung und Zuckerdetektionsreagenz nachgewiesen wurde. Dieser R_f -Wert stimmt mit dem von FAXXX überein. Beim Screening mittels HPLC-DAD wurden zwei Hauptpeaks im ungefähren Verhältnis 2:1 beobachtet, die beide ein *trans*-FS ähnliches Spektrum aufweisen (Peak **1** und **2**, nicht abgebildet). Durch Variation der Chromatographiebedingungen konnte die für FAXXX und FAXX typische Plateaubildung zwischen den Peaks erreicht werden. Die massenspektrometrische Untersuchung ergab für beide den Peaks **1** und **2** entsprechenden Substanzen ein Molekulargewicht von 722 (Quasi-Molekül-Ionen bei m/z 745 (M+Na)⁺ und m/z 761 (M+K)⁺). Die Peaks **1** und **2** wurden auf dem (semi)präparativen HPLC-System 2 isoliert und die entsprechenden Fraktionen vereinigt.

Trans-FS wurde neben geringen Mengen *cis*-FS (Verhältnis ca. 15:1) als phenolische Komponente der Verbindung nachgewiesen. Als Kohlenhydratkomponenten wurden Arabinose und Xylose identifiziert.

Folgende NMR-Experimente wurden zur Strukturaufklärung durchgeführt: ¹H-, (H,H)-COSY, TOCSY, HMQC und HMBC. Aufgrund der geringen Probenmenge (ca. 4 mg) wurde auf ein direktes ¹³C-NMR-Spektrum verzichtet.

Das Protonenspektrum entspricht dem von FAXXX. Es sind nur geringe Verunreinigungen zu erkennen. Die Zuordnung der Protonensignale ist in Kapitel 5.4.13 aufgeführt. Die ebenfalls in Kapitel 5.4.13 aufgeführten ¹³C-NMR-Daten wurden dem HMQC-Spektrum und für quartäre Kohlenstoffatome dem HMBC-Spektrum entnommen. Die NMR-Daten stimmen komplett mit den für FAXXX in Kapitel 3.2.1.3 ermittelten Daten überein.

Die Bindung der FS an die O-5-Position der Arabinose sowie die (1→3)-Bindung der Arabinose an die Xylose konnte eindeutig im HMBC-Spektrum nachgewiesen werden. Ebenso konnten die Ringformen bestimmt werden. Die Korrelationspeaks für die Bindungen der Xylosen untereinander wurden jedoch nicht beobachtet. Dies kann trotz relativ langer Meßzeit (ca. 8 h) mit der für dieses Experiment geringen Probenmenge erklärt werden und stellt die Identifizierung der Verbindung als FAXXX (Abb. 35) nicht in Frage.

3.2.2.4 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Tetrasaccharids aus der Fraktion E6

Der K_{av} -Wert der Fraktion E6 beträgt 3,11. Hierzu gibt es kein Pendant bei der GPC-Trennung des enzymatischen Roggenhydrolysats. Der R_f -Wert von 0,35 des bei der Dünnschichtchromatographie erhaltenen Hauptspots weicht nur geringfügig von dem von FAXXX (0,34) ab. Beim PCS-Oligosaccharid-Screening mittels HPLC-DAD wurden zwei Hauptpeaks mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum beobachtet, die die für FAXXX typische Plateaubildung zeigen. Die Überprüfung gemäß Kapitel 3.2.1.3 zeigte, daß beide Peaks eine Substanz repräsentieren. Das mit Hilfe der HPLC-MS ermittelte Molekulargewicht von 722 (Natriumaddukt mit m/z 745 und Kaliumaddukt mit m/z 761) steht im Einklang mit einer Verbindung, bestehend aus FS und vier Pentosen. Die Isolierung der den Peaks entsprechenden Substanz erfolgte mittels semipräparativer HPLC (System 2).

Im alkalischen Hydrolysat der Verbindung wurden *trans*-FS und *cis*-FS im Verhältnis von 18:1 als phenolische Komponenten nachgewiesen. Als Kohlenhydratkomponenten wurden nur Arabinose und Xylose ermittelt. Die FIA-MS lieferte nur wenige Fragmente, die keine weiteren Rückschlüsse auf die Substanz erlaubten.

Die zu identifizierende Substanz besteht somit aus den gleichen Bestandteilen wie FAXXX, wird jedoch während der GPC von FAXXX getrennt. Dies deutet darauf hin, daß sich die zu bestimende Verbindung in der räumlichen Anordnung der Komponenten unterscheidet.

Zur eindeutigen Identifizierung der Substanz wurden folgende NMR-Experimente durchgeführt: ^1H , (H,H)-COSY, TOCSY, HMQC und HMBC. Auch hier wurde aufgrund der geringen Probenmenge (ca. 4 mg) kein direktes ^{13}C -NMR-Spektrum erhalten.

Im Phenolcarbonsäurebereich des Protonenspektrums sind die Dubletts für F-H7 und F-H8 verbreitert, zeigen aber nicht die in FAX oder FA festgestellte Aufspaltung.

Den Kohlenhydratbereich des ^1H -NMR-Spektrums zeigt Abbildung 48.

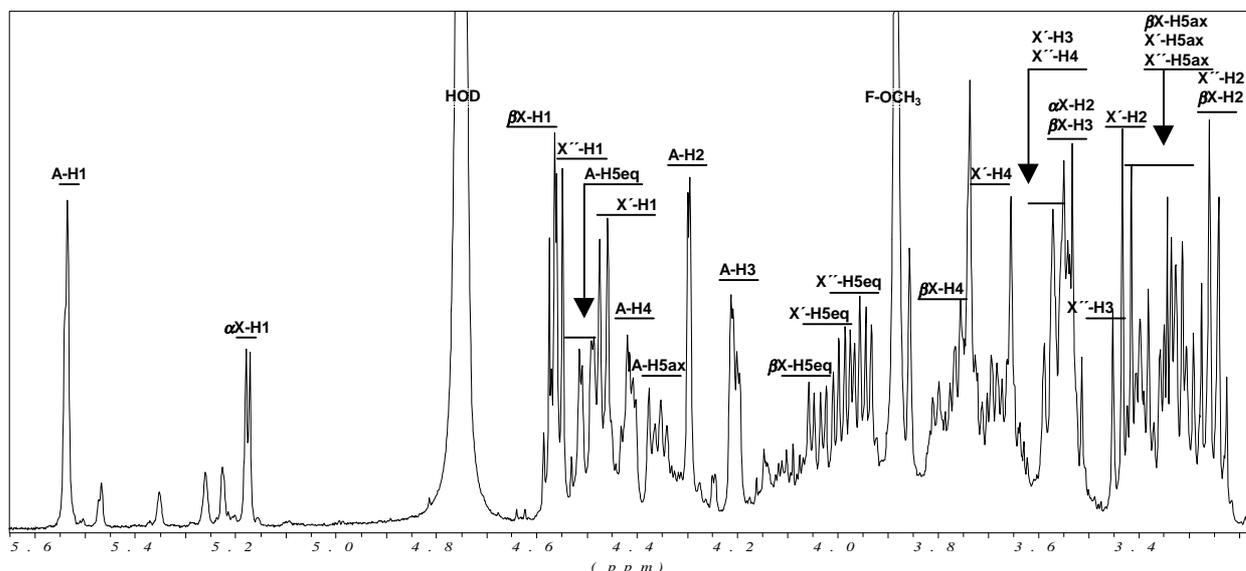


Abbildung 48: ^1H -NMR-Spektrum (Kohlenhydratregion) von XFAXX ($\{[5\text{-O}-(\text{trans-Feruloyl})][\text{O}-\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)]-\text{O}-\alpha\text{-L-arabinofuranosyl-(1\rightarrow3)]-\text{O}-\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow4)}\text{-D-xylopyranose}$)

Die vier erkennbaren Dubletts und das verbreiterte Singulett bei δ 5,54 ppm wurden den anomeren Protonen, wie in Abbildung 48 markiert, zugeordnet. Daraus erkennt man, daß Xylose als reduzierende Kohlenhydratkomponente vorliegt, wodurch das chromatographische Verhalten beim HPLC-Screening erklärt wird. Probleme ergaben sich bei der weiteren Zuordnung der Protonensignale mit

Hilfe des (H,H)-COSY-Experiments. Die Kopplungen der Protonen der Kohlenhydratkomponenten β -Xyl und Xyl'' können ab dem jeweiligen Proton H2 nicht mehr zweifelsfrei weiter verfolgt werden. Die Zuordnung der Signale zu den Protonen gelingt jedoch, wenn man das TOCSY-Spektrum (Abb. 49) in Verbindung mit dem HMQC-Spektrum zur Identifizierung heranzieht. In Abbildung 49 sind die vertikalen Protonenspuren ausgehend von den anomeren Protonen β X-H1 und X''-H1 (X''-H1 zur Vervollständigung) markiert. Sie zeigen die Protonen an, die innerhalb eines Spinsystems (hier innerhalb der Monosaccharideinheit) miteinander koppeln. So erkennt man, welche Protonensignale zu welcher Monosaccharideinheit gehören. Die H5-Protonen können im HMQC-Spektrum identifiziert werden, so daß die Zuordnung der Protonen innerhalb einer Monosaccharideinheit erleichtert wird. Die so erhaltenen ^1H -NMR-Daten können Tabelle 8 entnommen werden.

Die ebenfalls in Tabelle 8 dargestellten ^{13}C -NMR-Daten wurden nach der Zuordnung den HMQC- und

HMBC-Spektren entnommen. Der Kohlenhydratbereich des HMQC-Spektrums ist in Kapitel 5.5.2, Abbildung 68 dargestellt

Der Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit den Daten von FAXXX zeigt zwei erhebliche Unterschiede. Die chemische Verschiebung von Xyl'-C4 ist im Vergleich zu FAXXX um ca. 6 ppm zum hohen Feld verschoben, die chemische Verschiebung von Ara-C2 hingegen ist um ca. 8 ppm tieffeldverschoben. Das deutet darauf hin, daß Xyl' nicht in 4-Position gebunden ist, dafür aber Ara in 2-Stellung einen Substituenten, wahrscheinlich Xyl'', trägt.

Diese Vermutung ließ sich mit Hilfe des HMBC-Experiments bestätigen. Folgende Korrelationspeaks wurden beobachtet: β X-C4/X'-H1, X'-C1/ β X-H4, A-C1/X'-H3, A-C2/X''-H1, X''-C1/A-H2, F-C9/A-H5_{ax}, F-C9/A-H5_{eq}.

Die Ringformen der Kohlenhydratkomponenten konnten ebenfalls anhand des HMBC-Spektrums bestimmt werden.

Aufgrund dieser Daten läßt sich die Verbindung als {[5-O-(*trans*-Feruloyl)][O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-O- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose (XFAXX) (Abb. 50) identifizieren.

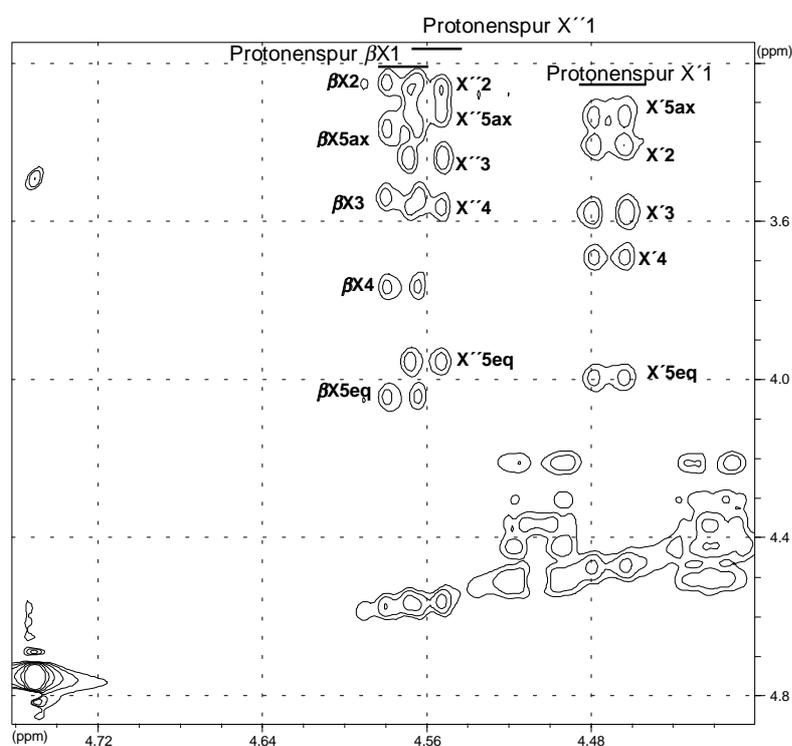


Abbildung 49: Ausschnitt aus dem TOCSY-Spektrum von XFAXX

Dieses Strukturelement wurde zum ersten Mal aus zur menschlichen Ernährung geeignetem Material isoliert. Insgesamt konnte XFAXX bislang nur einmal in Bermudagrass nachgewiesen werden (HIMMELSBACH et al., 1994).

Tabelle 8: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von XFAXX

	δH1 ($^3J_{1,2}$)	δH2	δH3	δH4	$\delta \text{H5}_{\text{EQ}}$	$\delta \text{H5}_{\text{AX}}$
$\beta\text{-D-Xyl } p$	4,58 (7,9)	3,25	3,54	3,76	4,04	3,37
$\alpha\text{-D-Xyl } p$	5,18 (3,7)	3,54	3,76	na	na	na
$\beta\text{-D-Xyl}' p$	4,47 (7,9)	3,40	3,57	3,70	4,00	3,33
$\beta\text{-D-Xyl}'' p$	4,57 (7,9)	3,26	3,44	3,56	3,96	3,32
$\alpha\text{-L-Ara } f$	5,54 (-)	4,30	4,20	4,40	4,50	4,36
	δH2	δH5 ($^3J_{5,6}$)	δH6	δH7 ($^3J_{7,8}$)	δH8	δOMe
FS	7,25	6,90 (7,9)	7,17	7,67 (16,4)	6,40	3,89

	δC1	δC2	δC3	δC4	δC5
$\beta\text{-D-Xyl } p$	96,5*	73,9*	74,3*	76,9*	63,3*
$\alpha\text{-D-Xyl } p$	92,1*	72,0*	71,5*	na	na
$\beta\text{-D-Xyl}' p$	101,8*	73,2*	81,9*	68,1*	65,5*
$\beta\text{-D-Xyl}'' p$	103,1*	73,2*	76,0*	69,4*	65,5*
$\alpha\text{-L-Ara } f$	106,9*	89,4*	76,3*	81,5*	63,9*
FS	126,1**	111,5*	148,3**	150,1**	116,1*
	δC6	δC7	δC8	δC9	δOMe
FS	123,8**	147,0*	113,7*	169,8**	56,5*

na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten

* - Wert aus HMQC-Spektrum entnommen

** - Wert aus HMBC-Spektrum entnommen

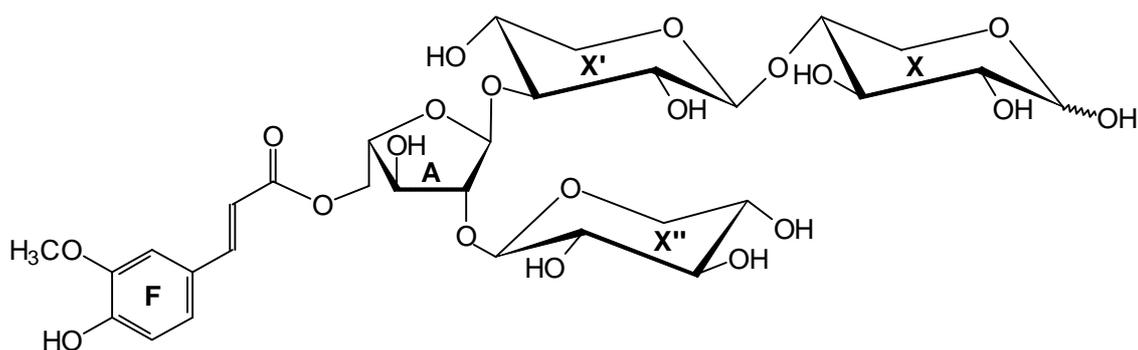


Abbildung 50: Strukturformel von XFAXX

3.2.2.5 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Trisaccharids aus der Fraktion E7

Der K_{av} -Wert der Fraktion E7 entspricht mit 4,95 ungefähr dem der Fraktion E11 aus dem enzymatischen Roggenhydrolysat. Der R_f -Wert des Hauptspots bei der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung ist mit 0,50 fast identisch mit dem von FAXX. Auch das Screening mittels HPLC-DAD und HPLC-MS deutet darauf hin, daß FAXX die Hauptkomponente der Fraktion E11 dar-

stellt. So wurden zwei Hauptpeaks im ungefähren Verhältnis 2:1 mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum beobachtet, die bei der massenspektrometrischen Untersuchung Quasi-Molekül-Ionen mit m/z 613 $(M+Na)^+$ und m/z 629 $(M+K)^+$ zeigten.

Die weiteren Untersuchungen der mittels semipräparativer HPLC (HPLC-System 2) isolierten Verbindung ergaben, daß sie aus *trans*-FS (neben vernachlässigbaren Mengen *cis*-FS, Verhältnis ca. 23:1), Arabinose und Xylose aufgebaut ist.

Zur Verifizierung der Annahme, daß es sich bei der isolierten Verbindung um FAXX handelt, wurden folgende NMR-Experimente durchgeführt: 1H , ^{13}C -BB, DEPT, (H,H)-COSY, HMQC und HMBC. Die NMR-Spektren zeigten, daß die Substanz mit hohem Reinheitsgrad ($> 95\%$) isoliert wurde. Die Zuordnung der Signale im Protonenspektrum und im ^{13}C -NMR-Spektrum erfolgte wie beschrieben. Die ^{13}C -NMR-Daten wurden teilweise aus den zweidimensionalen Experimenten HMQC und HMBC entnommen. Die so erhaltenen Daten sind in Kapitel 5.4.13 aufgelistet und entsprechen denen von FAXX. Die Ringformen und Bindungsverhältnisse konnten des Weiteren mit Hilfe des HMBC-Experiments bestätigt werden.

Bei der aus der Fraktion E7 isolierten Verbindung handelt es sich somit um FAXX (Abb. 41).

3.2.2.6 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Disaccharids aus der Fraktion S8

Die Fraktion S8 eluiert bei der gelchromatographischen Trennung des sauren Hydrolysats der UBS aus Wildreis bei einem K_{av} -Wert von 6,86. Die bei der GPC-Trennung des sauren Hydrolysats der UBS aus Roggen erhaltene Fraktion S2, aus der FAX isoliert wurde, weist mit 6,82 einen ähnlichen K_{av} -Wert auf. Auch der R_f -Wert des Hauptspots der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von 0,54 (FAX aus Roggen 0,55) deutete darauf hin, daß FAX in der Fraktion S8 enthalten ist. Dementsprechend wurde auch beim HPLC-DAD-Screening auf PCS-Oligosaccharide nur ein Hauptpeak mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum beobachtet. Weitere jedoch vergleichsweise kleine Peaks mit *trans*-FS, *cis*-FS oder uncharakteristischen Spektren wurden detektiert. Das Molekulargewicht der dem Hauptpeak entsprechenden Substanz wurde zu 458 bestimmt (beobachtetes Natriumaddukt mit m/z 481 und Kaliumaddukt mit m/z 497).

Die semipräparative Isolierung der Verbindung erfolgte auf dem HPLC-System 2. Wie erwartet wurden *trans*-FS (neben sehr geringen Mengen *cis*-FS), Arabinose und Xylose als Komponenten der zu identifizierenden Substanz identifiziert. Die FIA-MS ergab keine Hinweise auf größere Verunreinigungen in der isolierten Substanz, die aus anderen Bausteinen als FS und zwei Pentosen aufgebaut sind.

Die Identifizierung der Verbindung sollte mit Hilfe folgender NMR-Experimente gewährleistet werden: 1H , (H,H)-COSY, HMQC und HMBC. Der Phenolcarbonsäurebereich des Protonenspektrums zeigte die auch bei FAX beobachtete Aufspaltung der Dubletts für F-H7 und F-H8. Der Kohlenhydratbereich des Protonenspektrums stellt sich unübersichtlich dar und zeigt, daß die Verbindung unerwarteterweise nicht rein vorliegt, sondern zu ca. 30 % verunreinigt ist. Nach der in Kapitel 3.2.1.5 getroffenen Zuordnung der anomeren Protonen für FAX konnten auch hier die Signale für die reduzierende Arabinoseeinheit bei δ 5,43 ppm (αA -H1) und δ 5,38 ppm (βA -H1) sowie das Signal für die nichtreduzierende Xylose (βX -H1), das unter Einfluß der reduzierenden Arabinose aufgespalten wird, bei δ 4,60 ppm und δ 4,56 ppm beobachtet werden. Die Zuordnung wurde mit Hilfe der ^{13}C -Signale überprüft. Neben den zugeordneten Signalen befinden sich in der Region des Protonenspektrums, in der Signale für die anomeren Protonen der Arabinose und Xylose zu erwarten sind, noch weitere Dubletts. Diese Protonenspuren können jedoch nicht weiter verfolgt werden,

so daß keine Aussagen über die Herkunft dieser Signale getroffen werden können. Auch die Zuordnung weiterer Protonensignale, die aus FAX stammen können, ist aufgrund der Verunreinigungen schwierig. So kann Kapitel 5.4.13 entnommen werden, daß nur für β -Arabinose alle Protonen zugeordnet werden konnten, wohingegen dies für α -Arabinose und die Xylose ab dem jeweiligen Proton H2 nicht mehr gelang. Dementsprechend konnten auch nur die Signale für die Kohlenstoffatome zugeordnet werden, an die sicher bestimmte Protonen gebunden sind (Kapitel 5.4.13). Die so erhaltenen, unvollständigen NMR-Daten stimmen jedoch mit denen für FAX überein. Weitere Hinweise, daß es sich bei der Hauptsubstanz um FAX handelt, ergeben sich aus dem HMBC-Spektrum. Auf Grundlage der identifizierten Signale lassen sich folgende Korrelationspeaks bestimmen: β A-C4/ β A-H1, α A-C2/X-H1(„ α “), β A-C2/X-H1(„ β “), F-C9/ β A-H5_{ax}, F-C9/ β A-H5_{eq}. Diese Kopplungen geben Auskunft darüber, daß Arabinose in der Furanoseform vorliegt, daß Xylose über eine (1 \rightarrow 2)-Bindung an Arabinose gebunden ist und daß FS über eine Esterbindung an die 5-Position der Arabinose gebunden ist. Auf Basis der aufgeführten Ergebnisse ist es wahrscheinlich, daß es sich bei der Hauptsubstanz um FAX handelt. Eine eindeutige Identifizierung ist jedoch aus dem Gemisch heraus nicht möglich.

Bei den Verunreinigungen muß es sich ebenfalls um Substanzen handeln, die aus FS und aus zwei Pentosen aufgebaut sind. Dies geht aus den Ergebnissen der FIA-MS hervor. Des weiteren sind als Kohlenhydratkomponenten nur Arabinose und Xylose denkbar, da keine anderen Kohlenhydratkomponenten identifiziert wurden. Weitergehende Aussagen über die Verunreinigungen können jedoch nicht gemacht werden.

3.2.2.7 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Monosaccharids aus der Fraktion S9

Mit einem K_{av} -Wert von 9,52 stellt Fraktion S9 das Pendant zu Fraktion S4 aus der sauren Hydrolyse der UBS aus Roggen dar. Mittels DC wurde ein Hauptspot mit einem R_f -Wert von 0,61 nachgewiesen. Beim HPLC-Screening wurde ein Hauptpeak mit *trans*-FS ähnlichem Spektrum erhalten. Des weiteren konnte u.a. ein kleiner Peak mit *trans*-pCS ähnlichem Spektrum beobachtet werden, dessen Identifizierung jedoch nicht weiter verfolgt wurde. Das Molekulargewicht der dem Hauptpeak entsprechenden Substanz wurde zu 326 bestimmt (Quasi-Molekül-Ionen mit m/z 349 und m/z 365). Die Identifizierungsreaktionen nach semipräparativer Reinigung des Hauptpeaks (HPLC-System 2) ergaben, daß die Substanz aus *trans*-FS, vernachlässigbaren Mengen *cis*-FS (Verhältnis ca. 15:1) und Arabinose besteht.

Die eindeutige Identifizierung der Substanz als FA ließ sich mittels NMR erreichen. Hierzu wurden folgende Experimente durchgeführt: ^1H , ^{13}C -BB, DEPT, (H,H)-COSY, HMQC und HMBC. Die Zuordnung der Signale und die so erhaltenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind Kapitel 5.4.13 zu entnehmen. Die NMR-Daten stimmen mit denen von FA überein. Ergänzend konnten im HMBC-Spektrum die Korrelationspeaks, die die Esterbindung der FS an die 5-Position der Arabinose zeigen, nachgewiesen werden.

Dementsprechend lieferte Fraktion S9 als Hauptkomponente erwartungsgemäß die relativ uncharakteristische Verbindung FA.

3.2.2.8 Rückschlüsse aus den identifizierten Verbindungen auf die Arabinoxylanstruktur von Wildreis

Die Struktur von Wildreisarabinoxylanen wurde bisher nicht beschrieben. Die UBS aus Wildreis besitzen ein sehr hohes Arabinose/Xylose-Verhältnis von 1,00 (Kapitel 3.1.2). Inwieweit andere mögliche Polysaccharide, wie z.B. Pektine oder Xyloglucane, dieses Verhältnis beeinflussen ist

unbekannt, da wenig über die Polysaccharidzusammensetzung der Zellwände von Wildreis bekannt ist. Durch diesen hohen Wert für das Arabinose/Xylose-Verhältnis unterscheiden sich die UBS aus Wildreis bereits erheblich von denen aus Roggen mit einem Verhältnis von 0,43.

Die Isolierung und Identifizierung von FAXXX läßt vermuten, daß die Arabinoxylane von Wildreis ebenfalls aus einer Kette (1→4)-gebundener Xylopyranoseeinheiten bestehen, an die Arabinofuranosesubstituenten über (1→3)-Bindungen assoziiert sind. Die Isolierung der Verbindungen FAX und XFAXX zeigt eindeutig, daß die Arabinoseeinheit teilweise zusätzlich über ihre *O*-2-Position mit einer weiteren Xyloseeinheit (oder einer Xylankette) verbunden ist. Auch wenn quantitative Aspekte nur schwer abzuschätzen sind, scheint dieses Strukturmerkmal deutlich häufiger aufzutreten als z.B. in den UBS aus Roggen. Hinweise auf eine Substitution der Xylanhauptkette in *O*-2-Position oder eine Disubstitution in *O*-2- und *O*-3-Position durch Arabinose haben sich nicht ergeben. Wie bei den anderen Getreiden auch, scheint die FS ausschließlich über eine Esterbindung an die *O*-5-Stellung der Arabinose gebunden zu sein.

Große Unterschiede haben sich bei der enzymatischen Hydrolyse der UBS aus Roggen und aus Wildreis gezeigt. So lassen sich die Arabinoxylane des Wildreis nur unvollständig hydrolysieren. FS-Oligosaccharide mit geringem Polymerisationsgrad sind nur in geringer Ausbeute zu erhalten. Dies bedeutet, daß die Arabinoxylane aus Wildreis Struktureinheiten besitzen, die die in dem Enzymgemisch Driselase enthaltenen Carbohydrasen hemmen. Ein gravierender Unterschied besteht in dem Arabinose/Xylose-Verhältnis. Eine erhöhte Substitution der Xylankette kann den enzymatischen Abbau verhindern oder zumindest verzögern. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die häufig auftretende Struktureinheit XFAXX die Carbohydrasen hemmt. Wie bereits erwähnt, konnten WENDE & FRY (1997b) feststellen, daß die zusätzliche Xyloseeinheit die alkalische Hydrolyse der Substanz negativ beeinflusst und sie vermuteten, daß dies auch einen Einfluß auf die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Arabinoxylane haben könnte. Ein Indiz in diese Richtung mag die Beobachtung sein, daß Maiskleie, in der die Struktureinheit FAX in vergleichsweise bedeutendem Maßstab nachgewiesen wurde (SAULNIER et al., 1995), durch Carbohydrasen nur schwer abgebaut wird (SAULNIER & THIBAUT, 1999). Jedoch weisen auch die Heteroxylane aus Maiskleie einen hohen Substitutionsgrad der Xylankette auf. Die Überprüfung des Einflusses der Struktureinheit FAX bzw. XFAXX auf die enzymatische Abbaubarkeit der Arabinoxylane bleibt somit Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten.

Eindeutige Aussagen über die Bindung von SA an die Biopolymere des Wildreis sind nach den durchgeführten Untersuchungen nicht möglich. Geringe Mengen SA waren in dem enzymatischen Hydrolysat nachweisbar, was bedeutet, daß durch Spaltung von Polysacchariden SA solubilisiert wird. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß SA an Polysaccharide gebunden vorliegt und die Dimeren der SA auch als Crosslinks zwischen Polysacchariden fungieren können. Ein eindeutiger Beweis hierfür in Form der Isolierung eines SA-Mono/Oligosaccharids konnte jedoch nicht erbracht werden. Die Tatsache, daß durch das Enzymgemisch Driselase auch nur ca. 15 % des SA in Lösung gebracht wurden, wirft die Frage auf, ob SA hauptsächlich an Polysaccharide oder in der Mehrheit doch an andere Biopolymere gebunden ist. Allerdings muß auch hier wieder berücksichtigt werden, daß unbekannt ist, welchen Einfluß gebundene SA auf die Aktivität der Carbohydrasen hat. Die zukünftige Untersuchung auf SA-Oligosaccharide sollte zunächst an Materialien durchgeführt werden, die eventuell einen höheren Gehalt an estergebundener SA besitzt. Auf alle Fälle sollten aus diesen Materialien große Mengen BS bzw. Zellwände einfach gewonnen werden können. Durch die mühsame Isolierung der BS aus den Wildreiskaryopsen in geringen Ausbeuten sind die Aussichten

auf die Isolierung für die Identifizierung ausreichender Mengen an SA-Oligosacchariden gering. Als mögliche Ausgangsmaterialien sollten somit z.B. Blätter, Stengel oder Sprößlinge von Wildreis geprüft werden. Des weiteren erscheint zunächst nur die Anwendung der sauren Hydrolyse sinnvoll, da man hierdurch die Probleme der Enzymspezifitäten umgeht. Erst wenn eine Möglichkeit zur Isolierung von SA-Oligosacchariden anhand dieser Materialien entwickelt wurde, sollten wieder die weitaus mühsamer zu analysierenden Karyopsen in die Untersuchungen einbezogen werden. Abbildung 51 zeigt einen möglichen Ausschnitt aus einer Arabinoxylankette, der noch viele Fragen beinhaltet.

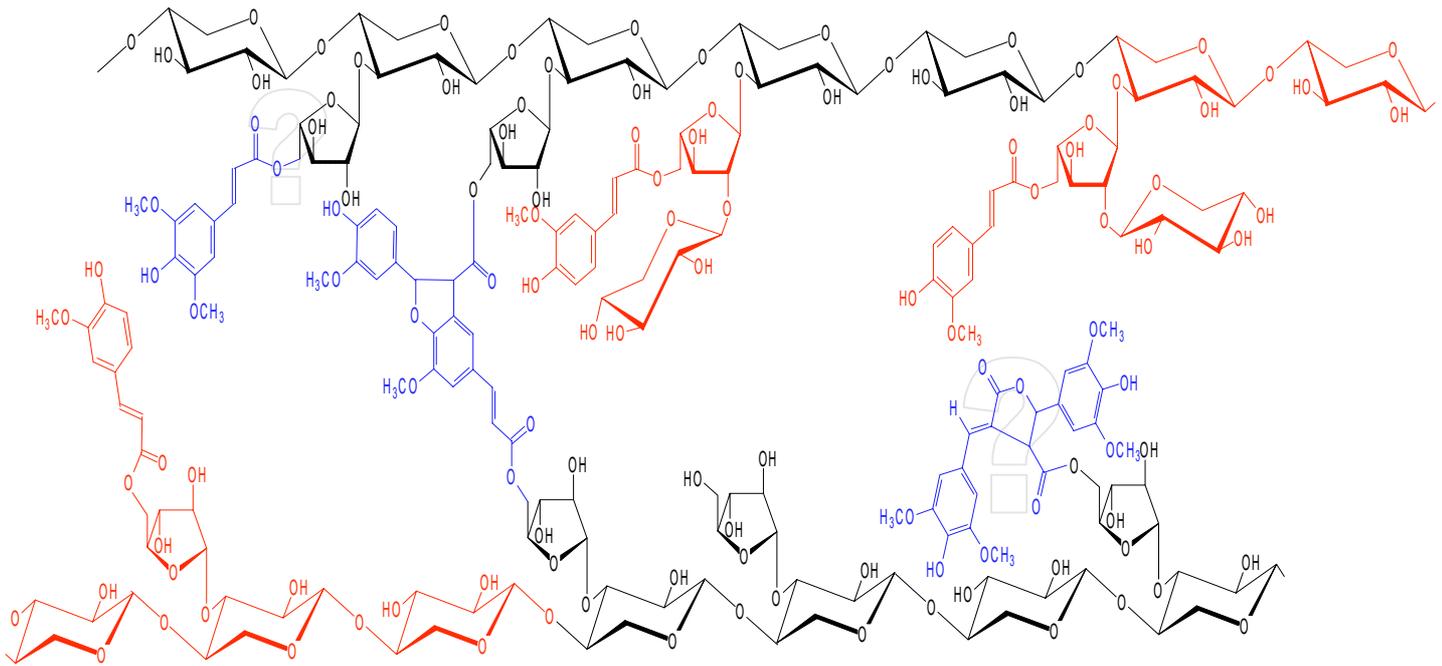


Abbildung 51: Schematische Darstellung von Arabinoxylanen aus UBS aus Wildreis

3.3 Mögliche Einflüsse von Phenolcarbonsäuren auf die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, ist das Ausmaß der Fermentation der BS durch die im Dickdarm ansässigen Mikroorganismen von der chemischen Struktur, der Löslichkeit und dem Grad der Lignifizierung abhängig. Die Effekte der während der Fermentation gebildeten kurzkettigen Fettsäuren sind vielfältig und sie scheinen eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Gesundheit der Dickdarmmucosa zu besitzen (PLAAMI, 1997). Andererseits ist das Bulkvermögen der BS umgekehrt proportional zu ihrer Fermentierbarkeit.

Zum vollständigen Abbau der FS-Arabinoxylane müssen diese zunächst mittels Endoxylanasen zu kurzkettigen FS-Oligosacchariden hydrolysiert und anschließend die FS mittels Esterasen abgespalten werden. Ein weiterer Abbau der FS-Oligosaccharide durch Carbohydrasen ohne vorherige Abspaltung der FS ist nicht möglich, da die FS-Oligosaccharide aufgrund des phenolischen Anteils resistent gegenüber Carbohydrasen sind (HESPELL & O'BRYAN, 1992, KROON et al., 1997b). Denkbar ist allerdings auch die Hydrolyse der FS bevor die Xylankette abgebaut wird. Bis vor kurzem wurde in der Literatur nur von FS-Esterasen berichtet, die nur dann in der Lage sind, FS abzuspalten, wenn die Zellwände bzw. Polysaccharide zuvor so behandelt wurden, daß die Polysaccha-

ride zumindest teilweise gespalten wurden (FAULDS et al., 1995, FAULDS & WILLIAMSON, 1995, KROON, 2000). Die Freisetzung der FS aus solchen FS-Oligosacchariden ist abhängig von der Art der Bindung der FS und der sie umgebenden Kohlenhydrate. So konnten z.B. FAULDS et al. (1995) zeigen, daß FS mittels einer FS-Esterase aus *Aspergillus niger* aus FAX deutlich langsamer freigesetzt wird als z.B. aus FAXX. So kann die chemische Umgebung der FS deren Freisetzung (vorausgesetzt die Strukturen der Xylane lassen einen Abbau der Polysaccharide mittels Xylanasen zu, s.u.) und die Fermentation und Verwertbarkeit der Oligosaccharide durch Mikroorganismen beeinflussen. Inwieweit monomere FS den Abbau der Xylane durch Endoxylanasen zu FS-Oligosacchariden hemmt, ist strittig. So sehen SAULNIER und THIBAUT (1999) es noch als wahrscheinlich an, daß bereits ein hoher Substitutionsgrad der Arabinoxylane mit monomerer FS deren enzymatische Abbaubarkeit negativ beeinflußt. KROON (2000) schließt jedoch aus den bisherigen Studien, daß monomere FS keinen Einfluß auf die Abbaubarkeit der Xylane hat.

KROON et al. (1997b) untersuchten die Freisetzung von FS und löslicher FS-Verbindungen aus Weizenkleie in einem Modell-Magen-Darm-Trakt. Anhand dieser *in vitro* Untersuchungen konnten sie zeigen, daß während der Passage der Weizenkleie durch den Magen und den Dünndarm nur 2,6 % der alkalilabilen FS in Form von freier FS oder von löslichen FS-Oligosacchariden solubiliert werden. Im Dickdarm wurde die Weizenkleie zu ca. 60 % fermentiert. Aus dem Ferulasäuregehalt des Rückstands wurde geschlossen, daß während der Fermentation auch beträchtliche Anteile an FS solubiliert wurden. Die freigesetzte FS konnte jedoch nur zu geringen Anteilen nachgewiesen werden, woraus die Autoren schlossen, daß die FS von den Mikroorganismen weiter metabolisiert wird. Aus den vorgestellten Ergebnissen leiteten die Autoren weiter ab, daß im menschlichen Dickdarm sowohl mikrobielle Xylanase- als auch FS-Esterase-Aktivität vorhanden ist. Jedoch muß auch erwähnt werden, daß ca. 40 % der alkalilabilen FS nach Passage des gesamten Magen-Darm-Traktes nicht freigesetzt wurden, d.h. mit dem unlöslichen Rückstand assoziiert waren. Des Weiteren wurden diese Untersuchungen an Weizenkleie durchgeführt, in dessen Arabinoxylanen man im Gegensatz zu Maiskleie oder Wildreis die Strukturelemente FAX oder XFAXX nicht nachweisen konnte.

Ein möglicher toxischer Effekt der freigesetzten phenolischen Säuren und FS-Oligosaccharide auf Mikroorganismen wurde bisher nur anhand der Mikroorganismenflora der Wiederkäuer untersucht. CHESSON et al. (1982) stellten fest, daß FS die cellulolytische Aktivität von *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens* unterdrückt. Jedoch muß dieser *in vitro* Test mit der nötigen Vorsicht betrachtet werden. JUNG et al. (1983) stellten fest, daß während der *in vivo* Zellwandverdauung durch Wiederkäuer nur geringe Konzentrationen an freien PCS vorhanden sind (entsprechend KROON et al., 1997b für menschliches *in vitro* System, s.o.). Die in der von CHESSON et al. (1982) durchgeführten Studie eingesetzten Ferulasäurekonzentrationen lagen um den Faktor 10 höher als die *in vivo* bestimmten. DEETZ et al. (1993) zeigten anhand von *in vitro* Versuchen mit der synthetisierten Modellsubstanz Methyl-5-*O*-feruloyl- α -L-arabinofuranosid, daß lösliche PCS-Mono/Oligosaccharide keinen nennenswerten Einfluß auf die Zellwandpolysaccharidverdauung haben.

Auch wenn wie erwähnt die Bedeutung der Substitution der Arabinoxylane mit monomerer FS für deren Abbaubarkeit noch umstritten ist, so werden andere limitierende Strukturmerkmale diskutiert, über deren Einfluß mehr Einigkeit herrscht. Hierbei ist jedoch anzumerken, daß die meisten der Untersuchungen auf Wiederkäuer bezogen oder mittels gereinigter Enzymmischungen verschieden-

ster mikrobieller Herkunft durchgeführt wurden, so daß man bei der Übertragung auf den menschlichen Magen-Darm-Trakt vorsichtig sein muß.

GRABBER et al. (1998a) untersuchten den Einfluß des Crosslinkings von Arabinoxylanen über DFS auf die Abbaubarkeit von Primärzellwänden aus Maiszellsuspensionen durch Enzymmischungen aus Pilzkulturen. Sie konnten zeigen, daß durch Erhöhung des Dimerisierungsgrades und der damit verbundenen Erhöhung des Vernetzungsgrades sowohl Ausmaß als auch Geschwindigkeit des Polysaccharidabbaus herabgesetzt werden. Durch erhöhte Vernetzung der Polysaccharide wird möglicherweise die Anlagerung der Endoxylanasen an ihr Substrat erschwert, was die Arabinoxylanabbaubarkeit begrenzt. Des weiteren kann die Vernetzung verhindern, daß begrenzte Abschnitte der Polysaccharide quellen und so Schlüsselenzyme für den Abbau der BS ausgeschlossen werden. Berücksichtigt werden muß auch, daß nach erfolgter Freisetzung von DFS-Oligosacchariden wiederum die DFS durch geeignete Esterasen hydrolysiert werden müssen, um den vollständigen Abbau der solubilisierten Oligosaccharide zu erreichen. FS-Esterasen sind jedoch teilweise nicht in der Lage, DFS zu hydrolysieren. So zeigten KROON et al. (1999), daß von vier untersuchten FS-Esterasen, die aus unterschiedlichen Mikroorganismen gewonnen wurden, nur zwei in der Lage sind, DFS zu hydrolysieren. Jedoch muß auch bei diesen Esterasen die Einschränkung gemacht werden, daß eine nur 5-5'-DFS und die andere nur 5-5'-DFS und 8-O-4'-DFS freisetzen kann. Weder die Freisetzung von 8-5'-DFS, die hier als dominierende DFS in den UBS aus Getreiden erkannt wurden, noch die von 8-8'-DFS konnte beobachtet werden.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Arabinoxylane der UBS signifikant höher über DFS verknüpft sind als die von LBS. Unter anderem kann dies ein Grund dafür sein, daß Ballaststoffquellen, die reich an UBS sind, sich als besonders effektiv in der Erhöhung des Stuhlgewichtes aufgrund ihres Bulkvermögens erwiesen, wohingegen in Wasser lösliche BS extensiv durch die Mikroorganismenflora fermentiert werden (SCHNEEMAN, 1998). Neben dem Einfluß der DFS-Crosslinks auf die Fermentation können sie z.B. noch die Gelbildungseigenschaften der Arabinoxylane beeinflussen. NG et al. (1997) zeigten, daß bei der Behandlung einer Arabinoxylanlösung mit Peroxidase und H_2O_2 eine Gelbildung eintritt, die auf die Bildung von DFS-Crosslinks zurückzuführen ist. Die Viskosität der BS wird vor allem mit den physiologischen Effekten der Blutzuckerregulierung und der Senkung des Blutcholesterins in Verbindung gebracht (s. Kapitel 1.2).

Die durchgeführten Untersuchungen haben Möglichkeiten aufgezeigt, über welche Bindungen Polysaccharide an Lignin gebunden sein können. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Lignin sollten Arabinoxylane, die an Lignin gebunden sind, stets Bestandteile der UBS sein. Bereits 1938 beobachteten WAKSMAN und CORDON einen inhibitorischen Effekt von Lignin auf die Celluloseabbaubarkeit durch Bodenmikroorganismen. Bis heute haben viele Forschungsarbeiten die negative Korrelation zwischen Ligningehalt in Futtermitteln und der *in vitro* Zellwandverdaulichkeit bestätigt. GRABBER et al. (1998b) konnten zeigen, daß der Einbau von Lignin in die Zellwandmatrix die Zellwandabbaubarkeit mittels unterschiedlicher hydrolytischer Enzyme (s.o) noch stärker herabsetzt als die selektive Verknüpfung der Polysaccharide über DFS ohne Lignifizierung. GLITSØ et al. (2000) führten Versuche mit Schweinen durch, denen unterhalb des Ileums Kanülen gelegt wurden. Die Schweine wurden mit Roggenbrot gefüttert, das entweder mit Pericarp/Testa-, Aleuron- oder Endosperm-Mahlfraktionen angereichert war. Nach Passage des Dünndarms wurde mit dem entsprechenden Material eine *in vitro* Fermentation durchgeführt. Hierzu wurde das Material mit fäkalem Inokulum von Schweinen versetzt. Ein Teil des Materials wurde vor der Fermenta-

tion entweder „delignifiziert“ (bzw. in seinem Ligningehalt reduziert) oder einer alkalischen Hydrolyse unterworfen. Die Autoren konnten feststellen, daß die Arabinoxylane des Endosperms bis zu 77 % abgebaut wurden, wohingegen die der Pericarp/Testa-Mahlfraktion überhaupt nicht fermentiert wurden. Die Fermentation der Pericarp/Testa-Arabinosylane wurde durch die alkalische Vorbehandlung signifikant gesteigert, so daß bis zu 49 % der Arabinoxylane abgebaut wurden, wohingegen die Delignifizierung nur zu einer 4 %igen Fermentation der Arabinoxylane führte. Die Alkalibehandlung führt zu einer Abspaltung der estergebundenen phenolischen Säuren. Somit wird die Vernetzung der Arabinoxylane über DFS aufgehoben und die Bindung der Arabinoxylane an Lignin gelöst. Die Alkalibehandlung zeigte sich auch deutlich effektiver als die „Delignifizierung“, bei der zwar der Ligningehalt reduziert wird, die Bindung des Restlignins an die Arabinoxylane jedoch im Gegensatz zur Alkalivorbehandlung beibehalten wird. Diese Ergebnisse bestätigen den großen Einfluß von DFS-Crosslinks und Ligninbindung auf die Fermentation der Arabinoxylane aus Getreideballaststoffen.

PCS als Bestandteile der Getreideballaststoffe haben somit vielfältige Möglichkeiten, die Strukturen der BS zu beeinflussen. Es wurde versucht zu verdeutlichen, daß die Strukturen der BS einen großen Einfluß auf ihre physiologischen Wirkungen haben können. Bedeutende Unterschiede bestehen so zwischen den LBS und den UBS. Anhand von UBS aus Roggen- und Wildreisballaststoffen wurde jedoch auch gezeigt, daß die Strukturen der Arabinoxylane der UBS unterschiedlich sein können und daß man nicht ohne weiteres von der Arabinoxylanstruktur des einen Getreides auf die eines anderen schließen kann. Dies wird auch beim Vergleich der bisher untersuchten Strukturen aus Weizen- und Maiskleie deutlich. Hieraus ergibt sich die Aufgabe künftiger Forschungsarbeiten, in Fortführung dieser Arbeit die Strukturen der unterschiedlichen Getreideballaststoffe genau zu charakterisieren. Des weiteren ist es notwendig, den Einfluß definierter Strukturmerkmale innerhalb der BS auf die physiologischen Wirkungen beim Menschen zu untersuchen. So kann z.B. die Fermentierbarkeit von Arabinoxylanstrukturen, die mit FS bzw. DFS substituiert sind, und von kontrolliert lignifizierten Pflanzenzellwänden durch unterschiedliche Einzelbakterienstämme des menschlichen Darms bzw. einer der Darmflora entsprechenden Kultur untersucht werden.

4 Zusammenfassung

Die physiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen (BS) stehen im engen Zusammenhang mit ihrer chemischen Struktur. Phenolcarbonsäuren stellen innerhalb der BS nur Minorkomponenten dar, können jedoch aufgrund ihrer Eigenschaft, Crosslinks auszubilden, großen Einfluß auf die physikochemischen Eigenschaften der Ballaststoffkomponenten haben.

In dieser Arbeit wurden lösliche und unlösliche Getreideballaststoffe aus Weizen, Dinkel, Roggen, Hafer, Gerste, Mais, Hirse, Reis und Wildreis auf monomere und dimere Phenolcarbonsäuren untersucht. Des weiteren sollten neue Erkenntnisse über die Bindung von Polysacchariden an Lignin durch die Identifizierung von Kreuzprodukten, bestehend aus Ferulasäure (FS) und Monolignoleinheiten, gewonnen werden. Durch die Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden aus Getreideballaststoffen sollte die Bindung der monomeren Phenolcarbonsäuren an Biopolymere charakterisiert werden.

Die Identifizierung der monomeren und dimeren Phenolcarbonsäuren erfolgte nach alkalischer Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung mittels GC-MS, die Quantifizierung wurde mittels GC-FID durchgeführt. FS, *p*-Cumarsäure (pCS) und Sinapinsäure (SA) wurden in allen löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen identifiziert, wobei FS mit bis zu 24,8 mg g⁻¹ unlösliche BS (UBS) bzw. 1,8 mg g⁻¹ lösliche BS (LBS) dominiert. Größere Mengen SA enthalten nur die UBS aus Wildreis (445 µg g⁻¹ UBS).

In den alkalischen Hydrolysaten der meisten UBS konnte das gesamte Spektrum der Dehydrodiferulasäuren (DFS), das nach radikalischer Kopplung erwartet wurde, nachgewiesen werden. So wurden neben der cyclischen, der offenen und der decarboxylierten Form der 8-5'-gekoppelten DFS, die cyclische und offene Form der 8-8'-gekoppelten DFS, die 5-5'-gekoppelte DFS, die 8-O-4'-gekoppelte DFS und erstmalig die 4-O-5'-gekoppelte DFS identifiziert. Die absoluten Gehalte der Summe der DFS betragen zwischen 2,4 und 12,6 mg g⁻¹ UBS. In allen LBS wurde mit Ausnahme der 4-O-5'-DFS das gesamte Spektrum der erwarteten DFS nachgewiesen. Die Gehalte für die Summe der DFS wurden zu 40 bis 230 µg g⁻¹ LBS bestimmt.

Zur Abschätzung der Kopplung von Arabinoxylanen über DFS wurde die Kohlenhydratzusammensetzung der unterschiedlichen LBS und UBS analysiert.

Zwischen LBS und UBS ergeben sich aus zuvor genannten Untersuchungen folgende Unterschiede:

- FS liegt in den UBS zu einem deutlich höheren Anteil in dimerisierter Form vor als in den LBS. Der Dimerisierungsgrad ist in den UBS typischerweise zwei- bis dreimal höher als in den entsprechenden LBS.
- Die Arabinoxylane der UBS sind um den Faktor 4-8 häufiger mit FS substituiert als die der entsprechenden LBS.
- Die Arabinoxylane der UBS sind zwischen 8 und 39 mal stärker über Diferulasäurebrücken miteinander verbunden als die der entsprechenden LBS.
- UBS und LBS unterscheiden sich in der Verteilung der Gesamtdiferulasäuren. Während in den UBS die 8-5'-gebundenen DFS dominieren, stellen die 8-8'-gebundenen DFS die Hauptfraktion innerhalb der LBS dar.

Ferner wurden in den Getreideballaststoffen eine 8-8'-7-O-7'-gebundene DFS sowie drei „*cis*“-DFS vorläufig identifiziert. In einigen UBS und LBS, v.a. aber in den UBS aus Wildreis, wurden zwei

Disinapinsäuren (DSS) (cyclische und offene Form der 8-8'-gekoppelten Dehydrodisinapinsäure) identifiziert und semiquantitativ bestimmt. Die Gehalte der Summe der DSS betragen in den LBS 6 – 14 % der Summe der DFS und in den UBS 1 – 3 %. Die UBS aus Wildreis stellen eine Ausnahme dar. Hier beträgt die Summe der DSS 24 % der Summe der DFS.

Durch die Identifizierung von FS-Coniferylalkohol-Kreuzprodukten konnte gezeigt werden, daß die Kopplung der Polysaccharide an Lignin in den UBS einiger Getreide über FS erfolgt. Hierbei werden zwischen der FS und den Monolignolen 4-*O*- β - und 8- β -Bindungen ausgebildet. Die Bindung der Polysaccharide an Lignin beeinflußt deren physikochemische Eigenschaften erheblich.

Durch enzymatische bzw. saure Hydrolyse der UBS aus Roggen und Wildreis wurden Phenolcarbonsäure-Oligosaccharide freigesetzt. Definierte Verbindungen wurden mittels GPC und (semi)präparativer HPLC isoliert. Die Identifizierung der Phenolcarbonsäure-Oligosaccharide erfolgte durch Bestimmung des phenolischen Anteils (HPLC-DAD), des Kohlenhydratanteils (GC-FID nach Derivatisierung) sowie durch massenspektrometrische und NMR-Untersuchungen.

Aus den UBS aus Roggen wurden folgende FS-Oligo/Monosaccharide identifiziert:

- FA: 5-*O*-(*trans*-Feruloyl)-L-Ara *f*
- FAX: *O*- β -D-Xyl *p*-(1→2)-[5-*O*-(*trans*-Feruloyl)-L-Ara *f*]
- FAXX: *O*-[5-*O*-(*trans*-Feruloyl)- α -L-Ara *f*](1→3)-*O*- β -D-Xyl *p*-(1→4)-D-Xyl *p*
- FAXXX: *O*- β -D-Xyl *p*-(1→4)-*O*-[5-*O*-(*trans*-Feruloyl)- α -L-Ara *f*](1→3)]-*O*- β -D-Xyl *p*-(1→4)-D-Xyl *p*

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß FS in den UBS aus Roggen nur an Arabinoxylane gebunden vorliegt. Hinweise auf die Assoziation zu anderen Polysacchariden wurden nicht beobachtet. FS scheint in Roggenarabinoxylanen ausschließlich an die C5-Position solcher Arabinoseeinheiten gebunden zu sein, die über eine (1→3)-Bindung an die Xylan-Hauptkette gebunden sind. Die Struktureinheit FAX weist darauf hin, daß die FS-Arabinose-Einheit einen Verknüpfungspunkt in den Arabinoxylanen darstellen kann.

Aus den UBS aus Wildreis wurden wie aus den UBS aus Roggen FA, FAX, FAXX und FAXXX isoliert und identifiziert. Des weiteren wurde das FS-Tetrasaccharid XFAXX ($\{[5-*O*-(*trans*-Feruloyl)][*O*- β -D-Xyl *p*-(1→2)]-*O*- α -L-Ara *f*-(1→3)]-*O*- β -D-Xyl *p*-(1→4)-D-Xyl *p*\}$) nachgewiesen.

Auch in Wildreis konnte somit nur die Bindung von FS an Arabinoxylane bestimmt werden. Die Isolierung von FAX und XFAXX zeigt, daß die FS-Arabinose-Einheit neben der Assoziation an die Xylan-Hauptkette eine weitere Bindung zu Xylose (oder einer weiteren Xylankette) aufweist. Dieses Strukturmerkmal tritt in Wildreis weitaus häufiger auf als in Roggen. Große Unterschiede wurden bei der enzymatischen Hydrolyse der UBS aus Roggen und Wildreis beobachtet, die in den unterschiedlichen Strukturen begründet sind.

Bei der Untersuchung der Wildreisballaststoffe haben sich Hinweise darauf ergeben, daß SA wie FS an Polysaccharide gebunden vorliegt. Ein Beweis in Form von Isolierung und Identifizierung von SA-Oligosacchariden konnte jedoch nicht erbracht werden.

Phenolcarbonsäuren als Bestandteile der Getreideballaststoffe haben somit vielfältige Möglichkeiten, die Strukturen der Ballaststoffkomponenten und damit ihre physiologischen Wirkungen, z.B. die Wirkungen, die auf der mikrobiellen Fermentation der BS im Dickdarm beruhen, zu beeinflussen.

4 Summary

Physiological effects of dietary fiber (DF) are thought to be based on their chemical structure. Phenolic acids are minor components of cereal DF. Due to their ability for cross-linking polymers, phenolic acids may have a substantial effect on the physicochemical properties of DF compounds. The aim of this study was to investigate soluble and insoluble cereal dietary fiber from wheat, spelt, rye, oat, barley, corn, millet, rice and wild rice for monomeric and dimeric phenolic acids. Furthermore, the identification of cross-products consisting of ferulic acid (FA) and monolignols should improve the knowledge about coupling polysaccharides to lignin. The isolation and identification of phenolic acid-oligosaccharides should characterize possible linkages of monomeric phenolic acids to DF polymers.

Monomeric and dimeric acids were identified by GC-MS after alkaline hydrolysis, extraction and derivatisation. Quantitative determinations were carried out by GC-FID. FA, *p*-coumaric acid (pCA) and sinapic acid (SA) were identified in all soluble and insoluble cereal DF investigated. Among the monomeric acids ferulic acid dominates with up to 24.8 mg g⁻¹ insoluble DF (IDF) and 1.8 mg g⁻¹ soluble DF (SDF), respectively. Solely wild rice dietary fiber contains considerable amounts of SA (445 µg g⁻¹ IDF).

In most cereal IDF the whole range of expected dehydrodiferulic acids (DFA), stemmed from a radical coupling mechanism of the corresponding esters, was detected after alkaline hydrolysis. In this way the cyclic, open, and decarboxylated form of 8-5'-coupled DFA, the cyclic and open form of 8-8'-coupled DFA, 5-5'-coupled DFA, 8-*O*-4'-coupled DFA and for the first time 4-*O*-5'-coupled DFA were identified. The absolute contents of total DFA from cereal IDF range between 2.4 and 12.6 mg g⁻¹ IDF. With the exception of 4-*O*-5'-coupled DFA the whole range of DFA was also detected from cereal SDF but only in amounts of 40 – 230 µg g⁻¹ SDF. To estimate the extent of cross-linking of arabinoxylans by DFA, the carbohydrate composition of SDF and IDF was determined for SDF and IDF.

Under consideration of the above-mentioned investigations the following differences between cereal IDF and SDF were determined:

- FA in IDF is substantially more dimerised than FA in SDF. Typically, the degree of dimerisation in IDF is two to threefold higher than in the corresponding SDF.
- Arabinoxylans as part of IDF are four to eightfold more substituted with FA than arabinoxylans as part of SDF.
- Arabinoxylans of IDF are 8 to 39 times more cross-linked by DFA than arabinoxylans of SDF.
- The diferulate distribution patterns vary between IDF and SDF. In all cereal IDF 8-5'-coupled DFA dominate, whereas in cereal SDF 8-8'-DFA become the major dimers.

Furthermore, an 8-8'-7-*O*-7'-coupled DFA as well as three "cis"-DFA were identified tentatively in cereal DF. In some IDF and SDF, predominantly in wild rice IDF, two dehydrodisinapic acids (DSA) (cyclic and open form of the 8-8'-coupled DSA) were identified and their contents were determined semiquantitatively. Levels of total DSA in SDF are 6 to 14 % of total DFA and 1 to 3 % in IDF with the exception of wild rice IDF. In wild rice IDF the level of total DSA is 24 % of total DFA.

The identification of ferulic acid-coniferyl alcohol cross-products shows the FA mediated coupling of polysaccharides to lignin in IDF of some cereals. This process involves 8- β - and 4-*O*- β -linkages between FA and monolignols. Physicochemical properties of polysaccharides are changed considerably by cross-linking polysaccharides to lignin.

Phenolic acid-oligosaccharides were liberated from rye IDF and wild rice IDF by enzymatic and acidic hydrolysis. Defined compounds were isolated using GPC and (semi)preparative HPLC. The structures were determined by identifying the phenolic compound (HPLC-DAD) and the carbohydrate compounds (GC-FID after derivatisation) as well as using mass-spectrometric and NMR-methods.

The following FA-oligosaccharides were identified from rye IDF:

- FA: 5-*O*-(*trans*-feruloyl)-L-Ara *f*
- FAX: *O*- β -D-Xyl *p*-(1 \rightarrow 2)-[5-*O*-(*trans*-feruloyl)-L-Ara *f*]
- FAXX: *O*-[5-*O*-(*trans*-feruloyl)- α -L-Ara *f*]- (1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-Xyl *p*-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl *p*
- FAXXX: *O*- β -D-Xyl *p*-(1 \rightarrow 4)-*O*-[5-*O*-(*trans*-feruloyl)- α -L-Ara *f*-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-Xyl *p*-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl *p*

In rye IDF ferulic acid seems to be attached exclusively to arabinoxylans. Attachments of FA to other polysaccharides were not detected. Probably, in rye arabinoxylans FA is linked exclusively to the C5-position of those arabinose residues, which are glycosidically linked to the C3-positions of a xylan backbone. The structural element FAX points out that the FA-arabinose residue may be a branching point within the arabinoxylan.

FA, FAX, FAXX and FAXXX were also isolated and identified from wild rice IDF. Furthermore, the ferulic acid-tetrasaccharide XFAXX ($\{[5-*O*-(*trans*-feruloyl)][*O*- β -D-Xyl *p*-(1 \rightarrow 2)]-*O*- α -L-Ara *f*-(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-Xyl *p*-(1 \rightarrow 4)-D-Xyl *p*$) was released and detected.

Consequently, in wild rice IDF FA is attached as an ester to arabinoxylans. The isolation of FAX and XFAXX shows that the FA-arabinose residue may be not only linked to the xylan backbone but may be further linked to another xylose (or even to another xylan chain). This structural element seems to be much more important in wild rice IDF than in rye IDF. Differences observed in the enzymatic hydrolysis of wild rice IDF and rye IDF are due to their different structures.

Indications to the attachment of SA to polysaccharides were observed during analysis of wild rice IDF but the isolation of SA-oligosaccharides which would be proof for the attachment of SA to polysaccharides did not succeed.

Phenolic acids as components of cereal DF play an important role by influencing the structures of DF compounds in different ways. Consequently, they can change the physiological properties of DF components, e.g. their properties depending on the fermentation in the large bowel by a mixed flora of anaerobic bacteria.

5 Anhang

5.1 Geräte und Meßparameter

5.1.1 Gaschromatographie

5.1.1.1 Bestimmung der Alditolacetate

zur Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung der BS sowie der Monosaccharide aus Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden

<i>Gaschromatograph:</i>	HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Säule:</i>	HP-5MS-Fused-Silica-Kapillarsäule (Methylpolysiloxan mit 5 % Phenylgruppen), 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Vorsäule:</i>	Fused-Silica-Kapillarsäule, Methyl-Silyl-desaktiviert, 1 m, 0,32 mm ID (Macherey-Nagel, Düren)
<i>Injektion:</i>	on-column
<i>Injektionsvolumen:</i>	1 µl
<i>Detektor:</i>	FID, 300 °C
<i>Trägergas:</i>	Helium, 1,5 ml/min
<i>Make-up-Gas:</i>	Helium
<i>Brenngase:</i>	Sauerstoff, Wasserstoff
<i>Auswerteeinheit:</i>	PC mit HP 3365 Series II Chem Station-Software, Version A.03 (Hewlett Packard, Waldbronn)

Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur: 65 °C, Anfangszeit: 1 min			
	<i>Aufheizrate [°C/min]</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	30	165	12
<i>Level 2</i>	10	220	3
<i>Level 3</i>	20	240	3

5.1.1.2 Identifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren sowie von Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten

System 1:

<i>Gaschromatograph:</i>	HP 5980, Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA)
<i>Säule:</i>	DB-1-Fused-Silica-Kapillarsäule (100 % Dimethylpolysiloxan), 25 m, 0,2 mm ID, 0,33 µm Filmdicke (J&W Scientific, Folsom, TX, USA)
<i>Vorsäule:</i>	-
<i>Injektor:</i>	split 1:15, 1:50, 300 °C Identifizierung monomere/dimere PCS, Kreuzprodukte aus UBS: 1:50

Identifizierung monomere/dimere PCS aus LBS: 1:15

Injektionsvolumen: 1 – 2 µl

Trägergas: Helium, 0,54 ml/min

Massenspektrometer: HP 5970 Mass Selective Detector (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)
 Ionisationsenergie: 70 eV
 Scanbereich (Identifizierung PCS / Kreuzprodukte aus UBS): m/z 45 – 800
 Selected Ion Monitoring (Identifizierung dimerer PCS aus LBS):
 3 Zeitfenster:
 1) 15 – 17,5 min: m/z 674, 602, 556, 512, 467, 389
 2) 17,5 – 26 min: m/z 674, 602, 512
 3) 26 – 30 min: m/z 674, 616, 602, 558

Auswerteeinheit: PC mit HP Chem Station-Software, Version B 00.01 (Hewlett Packard, Waldbronn)

System 2:

Gaschromatograph: Trace 2000 (Thermoquest, Austin, TX, USA)

Säule: DB-1-Fused-Silica-Kapillarsäule (100 % Dimethylpolysiloxan), 25 m, 0,2 mm ID, 0,33 µm Filmdicke (J&W Scientific, Folsom, TX, USA)

Vorsäule: -

Injektor: split 1:12, 1:50, 300 °C
 Identifizierung monomerer/dimerer PCS, Kreuzprodukte aus UBS: 1:50
 Identifizierung monomerer/dimerer PCS aus LBS: 1:12

Injektionsvolumen: 1 – 2,5 µl

Trägergas: Helium, 0,54 ml/min

Massenspektrometer: QSC Ion Trap (Thermoquest, Austin, TX, USA)
 Ionisationsenergie: 70 eV
 Scanbereich: m/z 50 – 1000

Auswerteeinheit: PC mit Xcalibur-Software, Version 1.1 (Finnigan, Austin, TX, USA)

Temperaturprogramm: für System 1 und System 2

Anfangstemperatur: 220 °C, Anfangszeit: 1 min			
	<i>Aufheizrate [°C/min]</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	4	248	0
<i>Level 2</i>	30	300	40

5.1.1.3 Quantifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren

Gaschromatograph: HP 5980 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)

Säule: DB-1-Fused-Silica-Kapillarsäule (100 % Dimethylpolysiloxan), 25 m, 0,2 mm ID, 0,33 µm Filmdicke (J&W Scientific, Folsom, TX, USA)

Vorsäule: -

Injektor: split 1:15, 1:50, 300 °C
 Quantifizierung monomerer/dimerer PCS aus UBS: 1:50
 Quantifizierung monomerer/dimerer PCS aus LBS: 1:15

<i>Injektionsvolumen:</i>	1 – 2 µl
<i>Detektor:</i>	FID, 300 °C
<i>Trägergas:</i>	Helium, 0,4 ml/min
<i>Make-up-Gas:</i>	Helium
<i>Brenngase:</i>	Sauerstoff, Wasserstoff
<i>Auswerteeinheit:</i>	Apple Computer mit GC Work Mate-Software

Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur: 220 °C, Anfangszeit: 1 min			
	<i>Aufheizrate [°C/min]</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	4	248	0
<i>Level 2</i>	30	300	40

5.1.2 Gelpermeationschromatographie

<i>Säule:</i>	GPC-Glassäule (100 cm x 2,5 cm ID) (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
<i>Säulenfüllung:</i>	Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Gelbett: 2,5 cm ID, 70 cm Höhe
<i>Pumpe:</i>	L-6000 Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt)
<i>Eluent:</i>	bidest. Wasser, Raumtemperatur
<i>Fluß:</i>	Fraktionierung enzymatischer Hydrolysate: 0,5 ml/min Fraktionierung saurer Hydrolysate: 0,7 ml/min
<i>Probenaufgabe:</i>	6-Wege-Ventil, 5 ml Probenschleife
<i>Detektor:</i>	UV-Detektor: Variable Wavelength Monitor 2141 (LKB/Amersham Pharmacia, Freiburg) Meßwellenlänge 325 nm/280 nm RI-Detektor: Differential-Refraktometer (Knauer, Berlin)
<i>Auswerteeinheit:</i>	UV-Signal: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr) RI-Signal: D-2000 Chromato-Integrator (Merck/Hitachi, Darmstadt)
<i>Fraktionensammler:</i>	Fraktionensammler RE III (Roth, Nienwohld)

5.1.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

5.1.3.1 Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening (HPLC-UVD)

<i>Säule:</i>	LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), Länge 250 mm, 4 mm ID (Merck, Darmstadt)
<i>Pumpe:</i>	L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt)
<i>Injektion:</i>	Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 20 µl Probenschleife
<i>Detektor:</i>	Waters 994 Programmable Photodiode Array Detector (Waters, Eschborn), Meßwellenlängen: 260, 280 und 325 nm
<i>Auswerteeinheit:</i>	PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr), Waters 5200 Printer Plotter (Waters, Eschborn)
<i>Eluent:</i>	MeCN:bidest. H ₂ O 13:87 (45 min) + Spülprogramm
<i>Fluß:</i>	1 ml/min
<i>Temperatur:</i>	Raumtemperatur

5.1.3.2 Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening (HPLC-MSD)

<i>Säule:</i>	LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), Länge 250 mm, 4 mm ID (Merck, Darmstadt)
<i>Pumpe:</i>	HP Series 1100, G 1312A BinPump mit Degasser G 1322A (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Autosampler:</i>	HP Series 1100, G 1313 (Hewlett Packard, Waldbronn), Injektionsvolumen: 20 µl
<i>UV-Detektor:</i>	HP Series 1100, G 1314A (Hewlett Packard, Waldbronn), Meßwellenlänge: 280 oder 325 nm
<i>Massenspektrometrischer Detektor:</i>	HP Series 1100, G 1946A (Hewlett Packard, Waldbronn) Ionenquelle: AP-ESI Polarität: positiv Dry gas flow: 10 l/min Nebulizer pressure: 50 psig Dry gas temperature: 350 °C Capillary Voltage: 4000 V Fragmentorspannung: 80 V Scanbereich: m/z 80 – 1000
<i>Auswerteeinheit:</i>	PC mit LC/MSD Chem Station Software, Version A06.01 (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Eluent:</i>	MeCN:bidest. H ₂ O 13:87 (45 min) + Spülprogramm
<i>Fluß:</i>	1 ml/min
<i>Temperatur:</i>	Raumtemperatur

5.1.3.3 Fraktionierung bzw. Reinigung der GPC-Fraktionen ((semi)präparative HPLC)**System 1:**

<i>Säule:</i>	LiChrospher RP-18 (7 µm), Länge 250 mm, 25 mm ID (Merck, Darmstadt)
<i>Pumpe:</i>	L-6250 (Merck/Hitachi, Darmstadt)
<i>Injektion:</i>	Rheodyne (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 1 ml Probenschleife
<i>Detektor:</i>	L-3000 Dioden-Array-Detektor (Merck/Hitachi, Darmstadt), Meßwellenlängen 280 und 325 nm
<i>Auswerteeinheit:</i>	PC mit D6 DAD Manager-Software (Merck/Hitachi, Darmstadt)
<i>Fluß:</i>	10 ml/min
<i>Temperatur:</i>	Raumtemperatur
<i>Eluenten:</i>	Fraktionen aus enzymatischer Hydrolyse Roggenballaststoffe: E9: MeCN:bidest. H ₂ O 9:91 (30 min) + Spülprogramm E11: MeCN:bidest. H ₂ O 11:89 (30 min) + Spülprogramm

System 2:

<i>Säule:</i>	Nucleosil 100-5 C18 (5 µm), Länge 250 mm, 8 mm ID (CS-Chromatographieservice, Langerwehe)
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------------

Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt)
Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 100 µl Probenschleife
Detektor: Waters 994 Programmable Photodiode Array Detector (Waters, Eschborn),
 Meßwellenlängen: 280 und 325 nm
Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr), Waters 5200
 Printer Plotter (Waters, Eschborn)
Fluß: 4 ml/min
Temperatur: Raumtemperatur
Eluenten:
 Fraktionen aus saurer Hydrolyse Roggenballaststoffe:
 S2: MeCN:bidest. H₂O 11:89 (45 min) + Spülprogramm
 S4: MeCN:bidest. H₂O 13:87 (30 min) + Spülprogramm
 Fraktionen aus enzymatischer Hydrolyse Wildreisballaststoffe:
 E5: MeCN:bidest. H₂O 11:89 (30 min) + Spülprogramm
 E6: MeCN:bidest. H₂O 12:88 (45 min) + Spülprogramm
 E7: MeCN:bidest. H₂O 14:86 (45 min) + Spülprogramm
 Fraktionen aus saurer Hydrolyse Wildreisballaststoffe:
 S11: MeCN:bidest. H₂O 12:88 (30 min) + Spülprogramm
 S12: MeCN:bidest. H₂O 11:89 (45 min) + Spülprogramm

5.1.3.4 Identifizierung und Quantifizierung monomerer phenolischer Säuren

Säule: Nucleosil 100-5 C18 HD (5 µm), Länge 250 mm, 4 mm ID (Macherey-Nagel, Düren)
Säulenofen: T-6300 Column Thermostat (Merck/Hitachi, Darmstadt)
Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt)
Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 20 µl Probenschleife
Detektor: Waters 994 Programmable Photodiode Array Detector (Waters, Eschborn),
 Meßwellenlängen: 260, 280 und 325 nm
Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr), Waters 5200
 Printer Plotter (Waters, Eschborn)
Fluß: 1 ml/min
Temperatur: 45 °C
Gradientenprogramm:

Zeit [min]	MeCN	MeOH	1 mM TFA
0	11	0	89
5	11	8	81
20	11	8	81
25	40	35	25
30	40	35	25
35	11	0	89
45	11	0	89

5.1.4 Massenspektrometrie (Fließinjektionsanalyse)

<i>Pumpe:</i>	HP Series 1100, G 1312A BinPump mit Degasser G 1322A (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Autosampler:</i>	HP Series 1100, G 1313 (Hewlett Packard, Waldbronn), Injektionsvolumen: 10 µl (Lösung: ca. 0,1 mg/ml)
<i>Massenspektrometrischer Detektor:</i>	HP Series 1100, G 1946A (Hewlett Packard, Waldbronn) Ionenquelle: AP-ESI Polarität: positiv Dry gas flow: 10 l/min Nebulizer pressure: 50 psig Dry gas temperature: 350 °C Capillary Voltage: 4000 V Fragmentorspannung: 20-200 V (Schritte in 20 V) Scanbereich: m/z 80 – 1000
<i>Auswerteeinheit:</i>	PC mit LC/MSD Chem Station Software, Version A06.01 (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Fließmittel:</i>	MeOH:bidest. H ₂ O 50:50

5.1.5 Kernresonanzspektroskopie

<i>NMR-Gerät:</i>	Bruker DRX 500
<i>Meßfrequenzen:</i>	¹ H: 500,13 MHz, ¹³ C: 125,75 MHz
<i>Kalibrierung:</i>	relativ zu Aceton als internen Standard mit δ H = 2,20 ppm und δ C (-CH ₃) = 30,89 ppm bezogen auf Trimethylsilan
<i>Probenvorbereitung:</i>	zweifacher Protonenaustausch mit D ₂ O, Messung in D ₂ O

5.1.6 Sonstige Geräte

<i>Ethanolbad:</i>	FOC-1 K40 (Christ, Osterode)
<i>Gefriertrocknung:</i>	LOC-2 Beta1-16 (Christ, Osterode) und LOC-1 Alpha1-4 (Christ, Osterode)
<i>Kjeldahl-</i>	
<i>Aufschlußblock:</i>	1007 Digestor (Tecator, Schweden)
<i>Kjeldahl-Destillations-</i>	
<i>apparatur:</i>	Vapodest 12 (Gerhardt, Bonn)
<i>Muffelofen:</i>	(Heraeus, Hanau)
<i>Vakuumtrockenschrank:</i>	RVT 6030 (Heraeus, Hanau)
<i>Trockenschrank:</i>	(Heraeus, Hanau)
<i>Rotationsverdampfer:</i>	VV 2000 (Heidolph, Schwabach)
<i>Vakuumcontroller:</i>	CVC 24 (Vacuubrand, Wertheim)
<i>Waage:</i>	P1210 (Mettler, Gießen)
<i>Analysenwaage:</i>	Typ 2842 (Sartorius, Göttingen)
<i>Schlagmessermühle:</i>	Typ A10S (Janke & Kunkel/IKA, Staufen i. Br.)
<i>pH-Meter:</i>	pH-Digi 520 (WTW, Weilheim)
<i>Wasserbad/Thermostat:</i>	Typ 1012 (GFL, Hannover)

<i>Magnetrührer:</i>	Ikamag RCT (IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.)
<i>UV-Strahler:</i>	Ultravitalux-Sonnenstrahler, 300 W (Osram, München)
<i>Zentrifuge:</i>	UJ III (Heraeus, Hanau)
<i>Ultraschallbad:</i>	Bransonic 12 (Elma, Singen)

5.2 Verwendete Chemikalien

Stoff	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Aceton	F+	R:11	S:9-16-23-33	Merck
Acetonitril	F,T	R:11-23/24/25	S:16-27-45	Baker
Acetylchlorid	C,F	R:11-14-34	S:9-16-26	Aldrich
Albumin	-	-	-	Pierce
Alcalase (Protease) 2,4 AU/g	-	-	-	Novo Nordisk
Amberlite XAD-2	-	-	-	Serva
Ammoniaklösung 25 %	C	R:34-37	S:7-26-36/37/39-45	Merck
AMG (Amyloglucosidase) 300 AGU/g	-	-	-	Novo Nordisk
<i>p</i> -Anisidin	T+	R:45-26/27/28-33- 50	S:53-28.1-36/37-45- 61	Merck
L-Arabinose	-	-	-	Sigma
Borsäure	-	-	-	Merck
BSTFA	C	R:10-34	S:26-36/37/39-45	Pierce
Chloroform	Xn	R:22-38-40- 48/20/22	S:36/37	Merck
Citronensäure-Monohydrat	Xi	R:36	S:24/25	Merck
Coomassie-Protein-Reagenz	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Pierce
<i>trans-p</i> -Cumarsäure	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Sigma
<i>o</i> -Cumarsäure	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Sigma
Deuteriumoxid	-	-	-	Deuterio
Dichlormethan	Xn	R:20-40	S:24	Merck
Diethylether	F+	R:12-19	S:9-16-29-33	Merck
Dimethylsulfoxid	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Fluka
1,4-Dioxan	Xn,F	R:11-19-20-40	S:9-16-33	Aldrich
Diphenylamin	T	R: 23/24/25-33	S:28.1-36/37-44	Merck
Driselase	-	-	-	Sigma
<i>meso</i> -Erythrit	-	-	-	Merck
Essigsäure 100%	C	R:10-35	S:23-26-45	Merck
Essigsäureanhydrid	C	R:10-34	S:26	Merck
Ethanol	F	R:11	S:7-16	Merck
Ethylacetat	F	R:11	S:16-23.2-29-33	Aldrich

Stoff	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
<i>trans</i> -Ferulasäure	-	-	-	Sigma
L-Fucose	-	-	-	Sigma
D-Galaktose	-	-	-	Merck
D-Glucose-Monohydrat	-	-	-	Merck
<i>n</i> -Hexan	F, Xn	R:11-20-48	S:9-16-24/25-29-51	Merck
4-Hydroxybenzoesäure	Xi	R:36	S:26-36	Fluka
4-Hydroxyphenyl- essigsäure	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Fluka
4-Hydroxyphenylpropion- säure	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Fluka
<i>myo</i> -Inosit	-	-	-	Merck
Malonsäure	Xn	R:22-36	S:22-24	Merck
D-Mannose	-	-	-	Merck
Methanol	T,F	R:11-23/25	S:16-24-45-7	Baker
1-Methylimidazol	C	R:21/22-34	S:26-36	Merck
Natriumazid	T+	R:28-32	S:28	Merck
Natriumborhydrid	T,F+	R:15.1-25-34	S:26-36/37/39-43.12- 45	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat	-	-	-	Merck
<i>di</i> -Natriumhydrogenphos- phat-Dihydrat	-	-	-	Merck
Natriumhydroxid	C	R:35	S:26-37/39-45	Merck
Natriumsulfat	-	-	-	Merck
Peroxidase (from horsera- dish)	-	-	-	Sigma
Petrolether 35-60 °C	F	R:11	S:9-16-29-33	Aldrich
Phosphorsäure 85 %	C	R:34	S:26	Merck
Piperidin	F,T	R:11-23/24-34	S:16-26-27-45	Fluka
Pyridin	F,Xn	R:11-20/21/22	S:26-28	Merck
L-Rhamnose	-	-	-	Merck
Salzsäure rauchend	F,Xn	R:11-20/21/22	S:26-28	Merck
Salzsäure 0,1 M	-	-	-	Merck
Schwefelsäure 95-97 %	C	R:35	S:2-26-30	Merck
Selenreaktionsgemisch	T	R:23/25-33	S:20/21-28.1-44	Merck
Sinapinsäure	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Fluka
Syringasäure	-	-	-	Fluka
Tashiro-Indikator	F+	R:11	S:7-16	Riedel
Termamyl (α -Amylase) 120 KNU/g	-	-	-	Novo Nordisk

Stoff	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Trifluoressigsäure	C	R:20-36-52/53	S:9-26-27-28-45-61	Merck
Vanillin	Xn	R:22-36	S:26-36	Merck
Vanillinsäure	Xi	R:36/37/38	S:26-36	Sigma
Wasserstoffperoxid 30 %	C	R:34	S:28-39	Merck
D-Xylose	-	-	-	Merck

5.3 Arbeitsvorschriften

Sind keine anderen Angaben gemacht, handelt es sich bei Wasser immer um demineralisiertes Wasser.

5.3.1 Arbeitsvorschriften zur Identifizierung und Quantifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren sowie von Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten in löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

5.3.1.1 Isolierung unlöslicher und löslicher Getreideballaststoffe

Die Aktivitäten der für die Isolierung der UBS und LBS eingesetzten Enzyme wurden gemäß der amtlichen Methode nach §35 LMBG L 00.00-18 (BgVV, 1997) überprüft.

Mengen- bzw. Zeitangaben in Klammern beziehen sich auf die Aufarbeitung von 15 g Mehl.

Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

- Getreidekaryopsen mit Labormühle < 0,5 mm vermahlen
- Hafer- und Maismehl aufgrund von Fettgehalten > 5 % zweimal mit *n*-Hexan extrahieren, Lösungsmittelrückstände im Vakuumtrockenschrank (40 °C) entfernen

Enzymatischer Abbau

- 10 g (15 g) des Untersuchungsmaterials in einen 500 ml Jodzahlkolben einwiegen
- Untersuchungsmaterial in 300 ml 0,08 M Phosphatpuffer (pH 6,0) suspendieren
- 750 µl (1225 µl) Termamyl (hitzestabile α -Amylase) hinzufügen
- 20 min (25 min) bei 100 °C im Wasserbad erhitzen, alle 5 min leicht umschwenken
- abkühlen auf Raumtemperatur, pH-Wert mit ca. 60 ml 0,275 M NaOH auf $7,5 \pm 0,1$ einstellen
- 300 µl (450 µl) Alcalase (Protease) hinzufügen
- 30 min bei 60 °C unter ständiger Bewegung (z.B. rotieren am Rotationsverdampfer) inkubieren
- abkühlen auf Raumtemperatur, pH-Wert mit ca. 60 ml 0,325 M HCl auf $4,5 \pm 0,1$ einstellen
- 350 µl (525 µl) Amyloglucosidase hinzufügen
- 30 min bei 60 °C unter ständiger Bewegung inkubieren
- Suspension 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsrückstand zweimal mit 70 °C heißem Wasser waschen, jeweils 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsüberstand sowie Waschwasser vereinigen und zur Gewinnung der LBS aufbewahren

Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe

- Zentrifugationsrückstand aus enzymatischem Abbau mit 95 % Ethanol waschen, 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsrückstand mit Aceton waschen, 10 min zentrifugieren
- Rückstand für 16 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (25 mbar) trocknen und auswiegen
- UBS zur Untersuchung auf Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte in Soxhletapparatur 5 h mit Ethanol und 5 h mit Aceton extrahieren

Isolierung der löslichen Ballaststoffe

- vereinigten Zentrifugationsüberstand und Waschwasser filtrieren und Volumen bestimmen
- in 3000 ml Becherglas mit dem vierfachen Volumen 95 % Ethanol (auf 60 °C erwärmt) versetzen, über Nacht stehen lassen
- überstehende Lösung abdekantieren, Rückstand 10 min zentrifugieren
- Rückstand zweimal mit 78 % Ethanol waschen, jeweils 10 min zentrifugieren
- Rückstand mit 95 % Ethanol waschen, 10 min zentrifugieren
- Rückstand mit Aceton waschen, 10 min zentrifugieren
- Rückstand für 16 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank (25 mbar) trocknen und auswiegen

5.3.1.2 Bestimmung der Restprotein- und Aschegehalte von unlöslichen und löslichen Ballaststoffen***Bestimmung des Restproteingehalts in unlöslichen Ballaststoffen***

- 150 – 350 mg UBS in einen Kjeldahl-Aufschlußkolben einwiegen
- 2 g Selenreaktionsgemisch nach Wieninger und 20 ml konz. Schwefelsäure hinzufügen
- im Aufschlußblock erhitzen bis eine klare Lösung vorliegt
- in Kjeldahldestillationsapparatur ca. 20 ml Wasser und ca. 80 ml Natronlauge (c = 330 g/l) hinzufügen
- 9 min in 50 ml Borsäurevorlage (c = 40 g/l), die Tashiro-Indikator enthält, destillieren
- mit 0,1 M Salzsäure auf pH 7,0 titrieren (unter Verwendung eines Titrios)

Bestimmung des Restproteingehalts in löslichen Ballaststoffen

- 5 – 10 mg LBS genau einwiegen und in 2 ml 0,1 M NaOH lösen (Ultraschallbehandlung), von dieser Lösung 50 µl zur Bestimmung einsetzen
- zu der Probelösung 1,25 ml Coomassie Protein-Reagenz geben
- nach 10 min Bestimmung der Absorption bei 595 nm gegen eine Reagenzienblindlösung
- die Kalibration erfolgt mit einem Albuminstandard, hierzu werden Albuminlösungen mit Konzentrationen von 500, 250, 125, 62,5 und 31,25 µg/ml wie die Probe behandelt

Bestimmung des Aschegehaltes unlöslicher und löslicher Ballaststoffe

- 150 – 300 mg LBS bzw. UBS in eine Porzellanglühschale einwiegen
- über der Bunsenbrennerflamme vorveraschen
- 18 h bei 525 °C im Muffelofen veraschen
- Rückstand abkühlen, auswiegen

5.3.1.3 Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung der Ballaststoffe – Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung

Hydrolyse

- 25 – 50 mg UBS bzw. LBS in ein Pyrexglas einwiegen
- 500 µl 12 M Schwefelsäure zufügen, auf vollständige Benetzung achten
- 5 min (LBS) bzw. 30 min (UBS) bei 35 °C inkubieren
- Suspension mit 2,5 ml Wasser verdünnen
- 60 min bei 100 °C im Trockenschrank erhitzen, gelegentlich umschwenken
- nach dem Abkühlen mit 1,2 ml 25 % Ammoniak versetzen, die resultierende Suspension sollte leicht alkalisch sein
- in 10 ml Meßkolben überführen und mit Wasser auffüllen

Reduktion

- 100 µl des membranfiltrierten Hydrolysats in ein Pyrexglas pipettieren
- mit 1 ml 2 % Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid (frisch angesetzt) versetzen
- verschlossene Pyrexgläser 60 min bei 60 °C im Wasserbad rühren (Verwendung von Miniaturrührstäbchen)
- nach dem Abkühlen 100 µl 80 % Essigsäure, die die internen Standardsubstanzen Erythrit und myo-Inosit (ca. 0,8 mg/ml) enthält, hinzufügen

Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate

- Reduktionsansatz mit 2 ml Acetanhydrid und 200 µl 1-Methylimidazol versetzen
- 10 min bei RT reagieren lassen
- im Eisbad 5 ml Wasser hinzufügen
- nach dem Abkühlen Alditolacetate mit 2 ml Chloroform extrahieren, wäßrige Phase verwerfen
- organische Phase zweimal mit Wasser waschen
- Wasserreste bei –18 °C ausfrieren
- 100 µl der Chloroformphase mit 200 µl Chloroform verdünnen
- gaschromatographische Analyse

Behandlung der Standardsubstanzen (Bestimmung von Korrekturfaktoren)

- 100 µl einer Standardlösung, die Xylose, Arabinose, Glucose, Rhamnose, Mannose, Galaktose und Fucose in einer Konzentration von je ca. 0,5 mg/ml enthält, in ein Pyrexglas pipettieren
- Entfernung des Wassers im Stickstoffstrom
- Monosaccharide in 100 µl 0,1 M Ammoniaklösung aufnehmen
- 1 ml 2 % Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid hinzufügen und Reduktion, Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate wie beschrieben durchführen

5.3.1.4 Isomerisierung von *trans*-Ferulasäure und *trans-p*-Cumarsäure zu den entsprechenden *cis*-Isomeren

- 500 mg *trans*-FS bzw. *trans-p*CS in einen 250 ml Rundkolben einwiegen
- 100 ml 0,5 M Ammoniaklösung (*trans-p*CS) bzw. Methanol (*trans*-FS) hinzufügen
- 14 h mit einem UV-Strahler bestrahlen, Abstand Strahler – Bestrahlungsgut: 30 cm
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und Lösungsmittelreste im Vakuumtrockenschrank über Nacht (40 °C) entfernen

- Isomerenverhältnis mittels HPLC bestimmen

5.3.1.5 Synthese von 5-5'-Dehydrodiferulasäure

- 3 g Vanillin in 300 ml 0,5 M Citratpuffer (pH 4,25) lösen (Ultraschallbehandlung)
- 15,25 ml 3,3 % Wasserstoffperoxidlösung zufügen
- 10,8 mg Peroxidase zusetzen
- 18 h bei 37 °C inkubieren
- ausgefallenes Dehydrodivanillin abfiltrieren, mit Wasser waschen und 8 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen
- 1 g Dehydrodivanillin-Rohprodukt mit 0,82 g Malonsäure in 12 ml Pyridin lösen
- 200 µl Piperidin als Katalysator hinzufügen
- bei 70 °C unter Rückfluß 6 h rühren
- nach dem Abkühlen in 300 ml halbkonz. Salzsäure gießen
- ausgefallenes 5-5'-DFS-Rohprodukt abfiltrieren, mit Wasser waschen, 24 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen

5.3.1.6 Synthese von 8-5'-Dehydrodiferulasäuren

Synthese Ferulasäureethylester

- 400 ml Ethanol und 20 ml Acetylchlorid in einen 1000 ml Rundkolben geben und zwei Minuten rühren
- 53 g *trans*-FS hinzufügen, über Nacht rühren
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen
- Rohprodukt mittels ¹H-NMR auf vollständigen Umsatz überprüfen, bei nicht vollständigem Umsatz Arbeitsvorgang mit dem Rohprodukt wiederholen

Dimerisierung und Reinigung

- 2 g Ferulasäureethylester in 2000 ml Acetatpuffer (pH 4,0) bei max. 60 °C lösen
- nach dem Abkühlen der Lösung 0,76 ml 30 % Wasserstoffperoxidlösung und 10 mg Peroxidase hinzufügen
- nach 10 min ausgefallenen 8-5'-Dehydrodiferulasäurediester abfiltrieren
- Produkt in wenig Ethylacetat aufnehmen
- Reinigung mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel, Eluent Ethylacetat:Petrolether 30:70
- Hauptfraktion, die den 8-5'-Dehydrodiferulasäurediester enthält (mittlere von drei Fraktionen), am Rotationsverdampfer zur Trockne bringen

Verseifung und Isolierung der 8-5'-Dehydrodiferulasäuren

- 8-5'-Dehydrodiferulasäureester in 2 ml 1,4-Dioxan aufnehmen
- mit 5 ml mit Stickstoff entgaster 2 M NaOH versetzen und über Nacht rühren (Stickstoffatmosphäre)
- Hydrolyseansatz mit Salzsäure ansäuern und DFS mit Ethylacetat extrahieren
- organische Phase über Natriumsulfat trocknen und am Rotationsverdampfer zur Trockne bringen
- Isolierung der 8-5'-DFS mittels präparativer DC an Kieselgel, Fließmittel Chloroform:Ethylacetat:Essigsäure 10:1:0,1

5.3.1.7 Alkalische Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung estergebundener Substanzen in löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

Hydrolyse

- 40 – 90 mg UBS bzw. 60 – 120 mg LBS in ein Pyrexglas einwiegen
- 50 µg 5-5'-Me-DFS und 200 µg oCS (für UBS) bzw. 15 µg 5-5'-Me-DFS und 30 µg oCS (für LBS) als interne Standardsubstanzen gelöst in 1,4-Dioxan hinzufügen
- 5 ml mit Stickstoff entgaste 2 M NaOH zugeben
- Kopfraum mit Stickstoff begasen und Pyrexgläser verschließen
- schütteln bis vollständige Benetzung der BS gewährleistet ist
- bei Raumtemperatur, lichtgeschützt 18 h hydrolysieren

Extraktion

- Hydrolyseansatz mit 0,95 ml konz. Salzsäure ansäuern, pH-Wert muß kleiner 2 sein
- dreimal mit 4 ml Diethylether extrahieren, zur besseren Phasentrennung bei niedriger Drehzahl zentrifugieren, bei einigen Getreiden, z.B. Wildreis, sollte die erste Extraktion mit 8 ml Diethylether durchgeführt werden, da sich zwischen den Phasen eine breite Schicht von Hydrolyserückständen sammelt
- vereinigte organische Phasen in einem Reaktionsvial unter einem Stickstoffstrom zur Trockne bringen, Lösungsmittelreste über Nacht im Vakuum über Natriumsulfat entfernen

Derivatisierung

- zu dem Trocknungsrückstand 10 µl Pyridin und 40 µl BSTFA hinzufügen
- verschlossene Reaktionsvials 30 min bei 60 °C im Heizblock erhitzen
- Lösungen zur Bestimmung der monomeren PCS aus UBS 1:6 mit Dichlormethan verdünnen, für alle anderen Bestimmungen unverdünnte Lösungen einsetzen
- gaschromatographische Analyse (silylierte Substanzen bei RT nur einige Stunden stabil, Aufbewahrung im Kühlschrank für 24 h möglich)

5.3.2 Arbeitsvorschriften zur Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Verbindungen aus unlöslichen Ballaststoffen

5.3.2.1 Enzymatische Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe

- 4 – 10 g UBS aus Roggen bzw. Wildreis einwiegen und in einem 1000 ml Jodzahlkolben in bidest. Wasser (90 ml bidest. Wasser je 1 g UBS) suspendieren
- 0,4 – 1 g Driselase zugeben (100 mg Driselase je 1 g UBS)
- 48 h bei 37 °C unter Rühren lichtgeschützt inkubieren
- durch 10 minütiges Erhitzen auf 100 °C Enzyme inaktivieren
- Suspension 20 min zentrifugieren und Überstand durch Faltenfilter filtrieren
- Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C auf ein Volumen kleiner 50 ml einengen, im Meßkolben mit Wasser auf 50 ml auffüllen
- bei Überprüfung der PCS-Zusammensetzung des Hydrolysats 1 ml zur PCS-Analyse nach Kapitel 5.3.2.7 abpipettieren
- Zentrifugationsrückstand 16 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen und auswiegen, PCS-Analyse nach Kapitel 5.3.1.7

5.3.2.2 Saure Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe

- 10 – 15 g UBS aus Roggen bzw. Wildreis einwiegen und in einem 1000 ml Jodzahlkolben mit 50 mM TFA versetzen (30 ml TFA je 1 g UBS)
- Suspension 3 h bei 100 °C im Wasserbad unter Rückfluß erhitzen
- nach dem Abkühlen Suspension 20 min zentrifugieren und Überstand durch Faltenfilter filtrieren
- Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C auf ca. 150 ml einengen
- mit 0,25 M NaOH pH-Wert von 5,0 einstellen
- ausgefallenen Niederschlag durch 15 minütiges Zentrifugieren entfernen, Überstand durch Faltenfilter filtrieren
- Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C auf ein Volumen kleiner 100 ml einengen, im Meßkolben mit Wasser auf 100 ml auffüllen
- bei Überprüfung der PCS-Zusammensetzung des Hydrolysats 1 ml zur PCS-Analyse nach Kapitel 5.3.2.7 abpipettieren
- Zentrifugationsrückstand 16 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen und auswiegen, PCS-Analyse nach Kapitel 5.3.1.7.

5.3.2.3 Reinigung der Hydrolysate an Amberlite XAD-2

- Chromatographie-Säule (\varnothing 2 cm) 42 cm hoch mit in Wasser aufgeschlammtem Amberlite XAD-2 Material füllen
- die Hydrolysate nach Kapitel 5.3.2.1 bzw. 5.3.2.2 mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro Sekunde auf die Säule aufbringen
- Säule mit 350 ml Wasser waschen (Tropfgeschwindigkeit ca. 2 Tropfen/sec), Aufgabefraktion und Waschwasser sammeln und vereinigen (\rightarrow H₂O-Fraktion)
- PCS-Oligosaccharid-Verbindungen mit 500 ml Methanol:Wasser 50:50 eluieren (Tropfgeschwindigkeit ca. 1 Tropfen/sec) (\rightarrow MeOH/H₂O-Fraktion)
- Säule mit 350 ml Methanol waschen (Tropfgeschwindigkeit ca. 2 Tropfen/sec), sammeln (\rightarrow MeOH-Fraktion)
- alle drei Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C auf wenige ml einengen, Fraktionen im 10 ml Meßkolben auffüllen und 100 μ l zur PCS-Analyse nach Kapitel 5.3.2.7 einsetzen
- restliche MeOH/H₂O-Fraktion am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C auf 3 – 5 ml einengen und auf 5,5 ml auffüllen

5.3.2.4 Fraktionierung der Hydrolysate mittels Gelpermeationschromatographie

- Säule mit mind. 1 l bidest. Wasser konditionieren, Fluß 2 –3 ml/ min, oberen Stempel nachregulieren, Säule mit Aluminiumfolie umwickeln
- MeOH/H₂O-Fraktion aus Kapitel 5.3.2.3 injizieren
- nach der dem Totvolumen entsprechenden Vorlaufzeit (ca. 2 - 4 Stunden) 12-Minuten-Fraktionen (entsprechen 6 bzw. 8,4 ml) sammeln
- Fraktionen gemäß den Chromatogrammen den Peaks zuordnen und vereinigen
- vereinte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C auf Volumen <10 ml einengen, in gewogenes Gefriertrocknungsgläschen (Braunglas) überführen

und gefriertrocknen, *oder*: direkt gefriertrocknen bis nur noch wenig Eis vorhanden ist, nach dem Auftauen in gewogenes Gefriertrocknungsgläschen überführen und gefriertrocknen, auswiegen (das Gefriertrocknen im Rundkolben bis zur Trockne sollte aufgrund möglicher Substanzverluste beim Belüften der Gefriertrocknung vermieden werden)

- wird die GPC-Säule länger als 24 h nicht benutzt, mit mind. 250 ml 0,02 % Natriumazid-Lösung spülen

5.3.2.5 Phenolcarbonsäure-Oligosaccharid-Screening mittels Dünnschichtchromatographie

Für alle Screening-Methoden (Kapitel 2.3.5.1 – 2.3.5.3) wird 1 mg der GPC-Fraktionen (bei geringeren Mengen die gesamte Fraktion) in 1 ml Wasser oder Methanol:Wasser 50:50 gelöst und membranfiltriert. Diese Lösungen werden für alle Screening-Methoden direkt eingesetzt.

- DC-Platte: Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator (254 nm)
- Fließmittel: Acetonitril:Wasser 85:15
- Detektion: 1) UV-Betrachtung bei 254 nm
2) Detektion mit Zuckerdetektionsreagenz: Lösung 1: 1 g *p*-Anisidin in 24 ml Aceton und 6 ml konz. Phosphorsäure lösen; Lösung 2: 1 g Diphenylamin in 24 ml Aceton lösen; Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 mischen und DC besprühen, DC ca. 10 min bei 120 °C erwärmen
- Vergleichssubstanzen: *trans*-FS, Arabinose

5.3.2.6 Fraktionierung bzw. Reinigung der GPC-Fraktionen mittels semi(präparativer) Hochleistungsflüssigchromatographie

- Trennungen an der präparativen HPLC-Säule:
 - um Substanzverluste möglichst gering zu halten, nicht mehr als 500 µl in die 1 ml Proben-schleife injizieren
 - pro Lauf nicht mehr als 8 mg der GPC-Fraktionen aufgeben
 - Fraktionen in entsprechendem Volumen bidest. Wasser aufnehmen und injizieren
- Trennungen an der semipräparativen HPLC-Säule:
 - nicht mehr als 50 µl in die 100 µl Probenschleife injizieren
 - pro Lauf maximal 2 mg der GPC-Fraktionen aufgeben
 - Fraktionen in entsprechendem Volumen bidest. Wasser aufnehmen und injizieren
- per Hand fraktionieren und die gemäß den Chromatogrammen vereinigten Fraktionen sammeln
- Fraktionen bei vermindertem Druck und 40 °C am Vakuumrotationsverdampfer einengen bis kein Acetonitril mehr vorhanden ist
- Fraktionen in gewogene Gefriertrocknungsgläschen (aus Braunglas) überführen und gefriertrocknen
- Fraktionen auswiegen, Reinheit der Fraktionen auf dem analytischen System (Kapitel 5.1.3.1 bzw. 5.1.3.2) überprüfen

5.3.2.7 Identifizierung (und Quantifizierung) monomerer phenolischer Säuren aus löslichen Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

- 0,6 – 0,8 mg der nach Kapitel 5.3.2.6 gereinigten Fraktionen in 1 ml bidest. Wasser lösen (bei geringen Substanzmengen zerstörungsfreie NMR-Spektroskopie (Kapitel 5.1.5) zuerst durchführen!)

- 100 µl in 1,7 ml-Braunglasgefäße pipettieren (ebenso mit den Amberlite-Fractionen und Hydrolysaten aus den Kapiteln 5.3.2.3 bzw. 5.3.2.1 und 5.3.2.2 verfahren)
- 100 µl einer mit Stickstoff entgasten 2 M Natronlauge und ein Miniaturrührstäbchen hinzufügen
- nach dem Begasen des Kopfraums mit Stickstoff Gläschen schließen und 2 h rühren
- Hydrolyse durch Zugabe von 150 µl 2 M Phosphorsäure stoppen
- Lösungen direkt zur HPLC-Bestimmung einsetzen (Lösungen, die aus Amberlite-Fractionen oder Hydrolysaten hervorgehen, evtl. membranfiltrieren)

Kalibrierung

- Fünfpunktkalibrierung: Konzentrationen der Standardlösungen: Standardlösung 1: *trans*-FS, *trans*-pCS, SA, 4-HPES, SyS, 4-HPPS, 4-HBS, VS in MeOH:H₂O 25:75, je 125, 50, 25, 2,5 und 0,5 µg/ml; Standardlösung 2: *cis/trans*-FS-Gemisch und *cis/trans*-pCS-Gemisch mit definiertem Isomeren-Verhältnis (s. Kapitel 5.3.1.4) so einwiegen, daß Standardlösung (in MeOH:H₂O 25:75) folgende Konzentrationen an *cis*-FS und *cis*-pCA enthält: 100, 50, 20, 2 und 0,5 µg/ml
- Kalibrationsgeraden für *trans*-FS, *cis*-FS, *trans*-pCS und SA bei 325 nm, für *cis*-pCS, 4-HPES, SyS und 4-HPPS bei 280 nm und für 4-HBS und VS bei 260 nm bestimmen

5.3.2.8 Identifizierung (und Quantifizierung) von Monosacchariden aus Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Gaschromatographie

Hydrolyse

- 100 µl der in Kapitel 5.3.2.7 vorbereiteten PCS-Oligosaccharid-Lösungen in ein Pyrexglas pipettieren
- Wasser in einem Stickstoffstrom bei max. 50 °C (Heizblock) entfernen
- 500 µl 2 M Trifluoressigsäure hinzufügen und Pyrexglas verschließen
- 30 min bei 120 °C im Trockenschrank erhitzen, alle 10 min leicht schütteln
- Lösung in einem Stickstoffstrom bei max. 50 °C zur Trockne bringen
- zum Rückstand 100 µl 1 M Ammoniaklösung hinzufügen

Reduktion, Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate

- Durchführung gemäß Vorschriften in Kapitel 5.3.1.3

Behandlung von Standardsubstanzen (Ermittlung von Korrekturfaktoren)

- Durchführung gemäß Vorschriften in Kapitel 5.3.1.3

5.4 Tabellen

5.4.1 Faktoren und Verfahrenskennndaten für die gaschromatographische Kohlenhydratbestimmung

Relative Retentionszeiten und Korrekturfaktoren (Responsefaktoren):

Substanz	RRT _{Erythrit}	RRT _{Inosit}	KF _{Erythrit}	KF _{Inosit}
<i>Rhamnose</i>	1,837	0,799	1,08	1,16
<i>Fucose</i>	1,860	0,809	1,02	1,09
<i>Arabinose</i>	1,873	0,814	0,96	1,02
<i>Xylose</i>	1,916	0,833	0,97	1,04
<i>Mannose</i>	2,325	1,011	1,04	1,12
<i>Glucose</i>	2,345	1,020	1,10	1,18
<i>Galaktose</i>	2,362	1,027	0,96	1,03

RRT_{Erythrit/Inosit} - relative Retentionszeit bezogen auf Erythrit bzw. *myo*-Inosit

KF_{Erythrit/Inosit} - Korrekturfaktor bezogen auf Erythrit bzw. *myo*-Inosit

Verfahrenskennndaten

Substanz	linearer Bereich* [$\mu\text{g/ml}$]	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/ml}$]
<i>Rhamnose</i>	0,5 – 50	$2,5 \times 10^{-2}$
<i>Fucose</i>	0,5 – 50	$1,4 \times 10^{-2}$
<i>Arabinose</i>	0,5 – 50	$2,5 \times 10^{-2}$
<i>Xylose</i>	0,5 – 50	$2,5 \times 10^{-2}$
<i>Mannose</i>	0,5 – 50	$2,5 \times 10^{-2}$
<i>Glucose</i>	0,5 – 50	$2,5 \times 10^{-2}$
<i>Galaktose</i>	0,5 – 50	$2,5 \times 10^{-2}$

* $r > 0,999$

5.4.2 Faktoren für die gaschromatographische Identifizierung und Quantifizierung von monomeren und dimeren Phenolcarbonsäuren sowie von Kreuzprodukten

Relative Retentionszeiten monomere PCS (Standardsubstanzen):

Substanz	GC-MS (Hewlett Packard)	GC-MS (Thermoquest)	GC-FID
	RRT _{oCS}	RRT _{oCS}	RRT _{oCS}
<i>cis-pCS</i>	0,950	0,958	0,948
<i>cis-FS</i>	1,202	1,182	1,176
<i>trans-pCS</i>	1,265	1,211	1,230
<i>trans-FS</i>	1,684	1,558	1,559
<i>SA</i>	2,175	1,881	1,815

RRT_{oCS} – relative Retentionszeit bezogen auf oCS

Relative Retentionszeiten dimere PCS und Kreuzprodukte (Standardsubstanzen):

Substanz	GC-MS (Hewlett Packard)	GC-MS (Thermoquest)	GC-FID
	RRT _{5-5'-Me-DFS}	RRT _{5-5'-Me-DFS}	RRT _{5-5'-Me-DFS}
8-8'-DFSc	0,586	0,583	0,558
8-8'-DFSnc	0,607	0,595	0,571
8-5'-DFSnc	0,698	0,683	0,674
8-O-4'-DFS	0,847	0,851	0,834
8-5'-DFSc	0,858	0,862	0,847
5-5'-DFS	0,947	0,923	0,944
8-5'-DFSdc	0,967	0,959	0,972
4-O-5'-DFS	1,046	1,051	1,032
8-8'-DSSc	0,622	0,624	0,604
8-8'-DSSnc	0,711	0,707	0,692
8-β-THF-CF (1)	0,602	0,580	0,575
8-β-THF-CF (2)	0,616	0,597	0,591
4-O-β-CFE (threo)	0,700	0,669	0,672
4-O-β-CFE (erythro)	0,729	0,686	0,694
MEL	0,870	0,908	0,874
iso-MEL	0,910	0,962	0,920

RRT_{5-5'-Me-DFS} – relative Retentionszeit bezogen auf 5-5'-Me-DFS

Korrekturfaktoren (Responsefaktoren) monomere und dimere PCS:

Substanz	KF _{5-5'-Me-DFS}	Substanz	KF _{oCS}
8-8'-DFSc	0,914	trans-FS	1,155
8-8'-DFSnc	0,958	cis-FS	1,155
8-5'-DFSc	2,481	trans-pCS	0,993
8-5'-DFSnc	0,896	cis-pCS	0,993
8-5'-DFSdc	1,000	SA	1,267
8-O-4'-DFS	1,183		
5-5'-DFS	0,952		

KF_{5-5'-Me-DFS/oCS} – Korrekturfaktor bezogen auf 5-5'-Me-DFS/oCS

5.4.3 Kalibrationsdaten der Sephadex LH-20 Gelpermeationschromatographie-Säule

Totvolumen = äußeres Volumen (V_0): 121 ml

Gesamtvolumen (V_t) = 344 ml

LAURENT und KILLANDER-Konstante: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ mit V_e = Elutionsvolumen zu bestimmende Substanz

Substanz	Molekularmasse	V_e	V_e/V_0	K_{av}
<i>Dextrin 10</i>	ca. 1620	130	1,07	0,04
<i>Dextrin 15</i>	ca. 1400	135	1,12	0,06
<i>Dextrin 20</i>	ca. 900	140	1,16	0,09
<i>Raffinose</i>	504	220	1,82	0,44
<i>Saccharose</i>	342	248	2,05	0,57
<i>Xylose</i>	150	270	2,23	0,67

5.4.4 Faktoren und Verfahrenskenndaten für die flüssigchromatographische Bestimmung monomerer Phenolcarbonsäuren

(Relative) Retentionszeiten:

Substanz	RT^+ [min]	$RRT_{trans-FS}$	Substanz	RT^+ [min]	$RRT_{trans-FS}$
<i>4-HBS</i>	7,44	0,444	<i>trans-pCS</i>	13,54	0,808
<i>4-HPES</i>	7,99	0,477	<i>cis-pCS</i>	14,95	0,893
<i>VS</i>	8,95	0,534	<i>trans-FS</i>	16,75	1,000
<i>SyS</i>	9,62	0,574	<i>SA</i>	17,69	1,056
<i>4-HPPS</i>	11,78	0,703	<i>cis-FS</i>	18,56	1,108

$RRT_{trans-FS}$ – relative Retentionszeit bezogen auf *trans-FS*;

RT^+ - Retentionszeit

Verfahrenskenndaten:

Substanz	linearer Bereich* [$\mu\text{g/ml}$]	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/ml}$]	Wellenlänge [nm]
<i>4-HBS</i>	0,250-125	0,013	260
<i>4-HPES</i>	0,250-500	0,250	280
<i>VS</i>	0,125-125	0,025	260
<i>SyS</i>	0,125-250	0,025	280
<i>4-HPPS</i>	1,250-500	0,250	280
<i>trans-pCS</i>	0,250-250	0,025	325
<i>cis-pCS</i>	0,250-250	0,124	280
<i>trans-FS</i>	0,250-250	0,013	325
<i>cis-FS</i>	1,250-500	0,124	325
<i>SA</i>	0,125-500	0,050	325

* $r > 0,999$

5.4.5 Ballaststoffgehalte der untersuchten Getreide

Gehalte an unlöslichen Ballaststoffen

	nk* UBS [g/100 g Mehl]	Protein [g/100 g nk UBS]	Asche [g/100 g nk UBS]	Korrektur- faktor	UBS [g/100 g Mehl]	SD (n=3) [g/100 g Mehl]
<i>Weizen</i>	9,88	10,1	1,2	0,887	8,76	0,55
<i>Dinkel</i>	9,00	9,5	1,3	0,891	8,02	0,28
<i>Roggen</i>	13,50	9,2	1,1	0,897	12,11	0,88
<i>Gerste</i>	8,71	13,1	2,1	0,847	7,38	0,13
<i>Hafer</i>	9,22	39,5	2,3	0,581	5,36	0,19
<i>Mais</i>	13,35	11,1	1,0	0,879	11,73	0,15
<i>Hirse</i>	5,19	42,2	1,5	0,563	2,93	0,39
<i>Reis</i>	5,49	39,4	2,1	0,585	3,21	0,22
<i>Wildreis</i>	5,03	32,1	1,6	0,663	3,34	0,10

*nk – nicht korrigiert

Gehalte an löslichen Ballaststoffen

	nk* LBS [g/100 g Mehl]	Protein [g/100 g nk LBS]	Asche [g/100 g nk LBS]	Korrektur- faktor	LBS [g/100 g Mehl]	SD (n=3) [g/100 g Mehl]
<i>Weizen</i>	3,32	2,4	31,4	0,662	2,20	0,22
<i>Dinkel</i>	3,09	2,2	33,2	0,646	1,99	0,32
<i>Roggen</i>	5,33	2,1	24,2	0,736	3,92	0,32
<i>Gerste</i>	4,47	1,9	21,8	0,764	3,41	1,10
<i>Hafer</i>	3,95	1,5	24,7	0,738	2,92	0,12
<i>Mais</i>	1,81	8,5	42,6	0,489	0,88	0,16
<i>Hirse</i>	1,55	5,3	44,1	0,506	0,78	0,08
<i>Reis</i>	1,90	7,8	43,2	0,490	0,93	0,04
<i>Wildreis</i>	1,43	6,0	38,4	0,555	0,79	0,04

*nk – nicht korrigiert

5.4.6 Kohlenhydratzusammensetzung der Ballaststoffe

Monomerenzusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe in mg g⁻¹ UBS

[mg g ⁻¹ UBS]	Rha	Fuc	Ara	SD*	Xyl	SD*	Man	SD*	Glc	SD*	Gal	SD*
<i>Weizen</i>	nn	nn	102,5	10,9	207,1	17,0	17,1	7,6	204,9	23,5	13,4	1,3
<i>Dinkel</i>	nn	nn	81,3	4,8	204,5	3,5	25,0	4,0	225,9	12,5	13,7	1,2
<i>Roggen</i>	nn	nn	101,6	22,6	238,8	43,2	21,1	2,8	226,2	0,1	18,0	2,5
<i>Gerste</i>	nn	nn	112,8	9,5	190,9	5,0	29,0	3,4	187,7	1,53	13,5	1,2
<i>Hafer</i>	nn	nn	86,8	4,4	150,5	3,6	23,3	1,3	203,4	8,6	13,8	11,5
<i>Mais</i>	nn	nn	114,4	32,0	203,2	26,5	15,5	5,3	206,1	6,5	31,9	5,4
<i>Hirse</i>	nn	nn	79,9	2,1	72,5	1,2	tr	-	160,1	1,74	17,48	0,86
<i>Reis</i>	nn	nn	68,2	18,2	84,9	15,5	24,7	2,4	216,2	19,0	24,8	4,9
<i>Wildreis</i>	tr	tr	77,4	8,4	77,6	6,2	23,83	1,74	230,8	26,7	28,5	2,0

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren; * - n = 2

Monomerenzusammensetzung der löslichen Ballaststoffe in mg g⁻¹ LBS

[mg g ⁻¹ LBS]	Rha	Fuc	Ara	SD*	Xyl	SD*	Man	SD*	Glc	SD*	Gal	SD*
<i>Weizen</i>	nn	nn	93,8	1,3	199,5	7,4	37,5	3,4	45,1	0,1	51,2	1,3
<i>Dinkel</i>	nn	nn	112,9	10,3	153,2	13,0	42,1	2,4	100,6	2,2	68,2	4,2
<i>Roggen</i>	nn	nn	116,5	33,5	207,6	18,0	32,6	1,1	58,8	41,1	18,1	8,8
<i>Gerste</i>	tr	tr	22,9	5,6	31,3	2,8	23,9	6,5	505,7	21,9	14,9	1,7
<i>Hafer</i>	nn	tr	26,1	5,0	16,6	3,6	29,0	5,2	609,2	125,0	35,0	7,8
<i>Mais</i>	nn	tr	25,9	2,9	18,8	1,1	48,9	3,8	30,3	1,4	19,6	3,8
<i>Hirse</i>	nn	tr	4,7	0,3	5,2	0,6	71,8	8,3	40,0	4,1	24,5	3,5
<i>Reis</i>	nn	tr	9,6	1,4	6,1	0,9	64,8	5,3	35,5	1,1	23,3	0,7
<i>Wildreis</i>	nn	tr	11,7	0,4	8,6	0,3	58,2	5,1	31,9	0,7	25,4	0,5

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren; * - n = 2

Molare Verhältnisse Arabinose/Xylose

UBS	Ara/Xyl	LBS	Ara/Xyl
<i>Weizen</i>	0,49	<i>Weizen</i>	0,47
<i>Dinkel</i>	0,40	<i>Dinkel</i>	0,74
<i>Roggen</i>	0,43	<i>Roggen</i>	0,56
<i>Gerste</i>	0,59	<i>Gerste</i>	0,73
<i>Hafer</i>	0,58	<i>Hafer</i>	1,57
<i>Mais</i>	0,56	<i>Mais</i>	1,38
<i>Hirse</i>	1,10	<i>Hirse</i>	0,90
<i>Reis</i>	0,80	<i>Reis</i>	1,57
<i>Wildreis</i>	1,00	<i>Wildreis</i>	1,36

5.4.7 Gehalte an monomeren Phenolcarbonsäuren

Gehalte an monomeren PCS in unlöslichen Ballaststoffen in $\mu\text{g g}^{-1}$ UBS

[$\mu\text{g g}^{-1}$ UBS]	<i>trans</i> -FS	<i>cis</i> -FS	FS _{gesamt}	SD*	<i>trans</i> -pCS	<i>cis</i> -pCS	pCS _{gesamt}	SD*	<i>trans</i> -SA	SD*
<i>Weizen</i>	5952	423	6376	104	166	29	195	22	79	4
<i>Dinkel</i>	7281	231	7573	276	165	20	185	8	53	8
<i>Roggen</i>	6338	611	6949	506	353	13	366	174	89	22
<i>Gerste</i>	4675	378	5053	148	481	30	511	15	95	3
<i>Hafer</i>	4249	197	4445	349	309	nn	309	17	160	21
<i>Mais</i>	24622	213	24835	1027	2157	tr	2157	70	89	4
<i>Hirse</i>	7619	656	8276	1370	298	84	382	36	tr	-
<i>Reis</i>	7512	444	7956	58	2169	20	2189	53	185	5
<i>Wildreis</i>	4358	167	4526	75	175	16	191	11	445	9

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren; * - n = 3

Gehalte an monomeren PCS in löslichen Ballaststoffen in $\mu\text{g g}^{-1}$ LBS

[$\mu\text{g g}^{-1}$ LBS]	<i>trans</i> -FS	<i>cis</i> -FS	FS _{gesamt}	SD*	<i>trans</i> -pCS	<i>cis</i> -pCS	pCS _{gesamt}	SD*	<i>trans</i> -SA	SD*
<i>Weizen</i>	1427	387	1814	119	17	nn	17	3	17	2
<i>Dinkel</i>	504	231	735	27	25	tr	25	16	22	2
<i>Roggen</i>	1178	326	1504	177	17	tr	17	2	16	4
<i>Gerste</i>	238	81	319	126	11	tr	11	1	4	1
<i>Hafer</i>	106	28	133	17	8	nn	8	3	7	5
<i>Mais</i>	329	80	409	169	21	tr	21	3	8	3
<i>Hirse</i>	146	52	197	79	11	nn	11	4	tr	-
<i>Reis</i>	82	37	119	24	13	nn	13	5	6	2
<i>Wildreis</i>	101	28	129	24	7	nn	7	1	12	1

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren; * - n = 3

5.4.8 Dehydrodiferulasäuregehalte in unlöslichen und löslichen Getreideballaststoffen

Dehydrodiferulasäuregehalte in $\mu\text{g g}^{-1}$ UBS in unlöslichen Getreideballaststoffen

$[\mu\text{g g}^{-1} \text{UBS}]$	8-5'-DFSnc	8-5'-DFSsc	8-5'-DFSdc	Σ 8-5'DFS	SD*(Σ 8-5'DFS)	8-8'-DFSsc	8-8'-DFSnc	Σ 8-8'DFS	SD*(Σ 8-8'DFS)
Weizen	323	377	393	1084	24	277	130	407	22
Dinkel	410	400	384	1194	41	309	135	444	15
Roggen	277	380	1271	1928	30	591	196	787	108
Gerste	390	584	826	1800	164	448	157	605	23
Hafer	607	305	734	1645	36	469	226	695	29
Mais	1473	1315	1818	4606	147	1726	389	2115	69
Hirse	610	592	1373	2575	218	1110	357	1467	36
Reis	396	937	474	1807	15	692	218	910	21
Wildreis	367	390	539	1296	112	539	216	755	55

* - n = 3

$[\mu\text{g g}^{-1} \text{UBS}]$	8-0-4'-DFS	SD*	5-5'-DFS	SD*	4-0-5'-DFS	SD*	Σ DFS	SD*
Weizen	479	10	391	11	12	1	2372	36
Dinkel	530	39	420	9	14	1	2601	59
Roggen	430	53	503	46	tr	-	3647	132
Gerste	691	36	562	20	tr	-	3658	170
Hafer	785	44	475	27	nn	-	3599	69
Mais	2639	64	3198	59	38	4	12596	184
Hirse	890	47	760	48	nn	-	5693	231
Reis	764	48	547	23	14	4	4042	59
Wildreis	396	28	393	25	tr	-	2840	130

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren; * - n = 3

Dehydrodiferulasäuregehalte in $\mu\text{g g}^{-1}$ LBS in löslichen Getreideballaststoffen

$[\mu\text{g g}^{-1} \text{LBS}]$	8-5'-DFSnc	8-5'-DFSsc	8-5'-DFSdc	Σ 8-5'DFS	SD*(Σ 8-5'DFS)	8-8'-DFSsc	8-8'-DFSnc	Σ 8-8'DFS	SD*(Σ 8-8'DFS)
Weizen	22	22	23	67	5	45	23	68	13
Dinkel	23	43	27	92	24	60	49	109	36
Roggen	10	7	9	27	2	22	15	37	7
Gerste	6	11	9	26	8	16	8	24	4
Hafer	4	8	6	17	5	7	6	16	1
Mais	5	8	8	21	3	11	13	24	1
Hirse	3	9	8	20	6	9	11	20	5
Reis	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	-
Wildreis	tr	8	5	-	-	5	11	16	2

* - n = 3

[$\mu\text{g g}^{-1}$ LBS]	8-O-4'-DFS	SD*	5-5'-DFS	SD*	4-O-5'-DFS	SD*	Σ DFS	SD*
Weizen	19	2	30	1	nn	-	184	14
Dinkel	15	2	17	2	nn	-	233	43
Roggen	7	1	13	1	nn	-	83	8
Gerste	7	3	12	3	nn	-	69	10
Hafer	5	1	4	1	nn	-	38	5
Mais	7	1	7	2	nn	-	59	3
Hirse	3	1	4	2	nn	-	46	9
Reis	tr	-	tr	-	nn	-	tr	-
Wildreis	tr	-	tr	-	nn	-	tr	-

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren; * - n = 3

5.4.9 Faktoren zur Abschätzung des Dimerisierungsgrades von Ferulasäure

UBS	„Gehalt-Faktor“*	„molarer Faktor“**	LBS	„Gehalt-Faktor“*	„molarer Faktor“**
Weizen	27,1	27,6	Weizen	9,2	9,4
Dinkel	25,6	26,0	Dinkel	24,1	24,4
Roggen	34,4	35,5	Roggen	5,2	5,3
Gerste	42,0	42,8	Gerste	17,8	18,1
Hafer	44,7	45,5	Hafer	22,2	22,6
Mais	33,7	34,2	Mais	12,6	12,8
Hirse	40,8	41,6	Hirse	18,9	19,4
Reis	33,7	34,1	Reis	-	-
Wildreis	38,6	39,2	Wildreis	-	-

* - $(\Sigma\text{DFS} [\text{mg g}^{-1}]/(\text{cis/trans-FS} [\text{mg g}^{-1}]+\Sigma\text{DFS} [\text{mg g}^{-1}]))\times 100$

** - $2x\Sigma\text{DFS}[\text{mol g}^{-1}]/(2x\Sigma\text{DFS}[\text{mol g}^{-1}]+(\text{cis/trans-FS} [\text{mol g}^{-1}]))\times 100$

5.4.10 Diferulasäuremuster in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen

Diferulasäuremuster unlöslicher Getreideballaststoffe

UBS	8-5'-DFS	8-8'-DFS	5-5'-DFS	8-O-4'-DFS	4-O-5'-DFS
Weizen	46,8	16,8	16,1	19,8	0,5
Dinkel	46,9	16,7	15,8	20,0	0,5
Roggen	54,0	18,4	13,4	14,2	nb
Gerste	50,7	16,1	14,9	18,4	nb
Hafer	47,1	18,8	12,9	21,2	nb
Mais	37,7	16,5	24,9	20,6	0,3
Hirse	46,9	25,0	12,9	15,2	nn
Reis	45,5	22,2	13,3	18,6	0,4
Wildreis	46,9	26,0	13,5	13,6	nb

nn – nicht nachweisbar; nb – nicht bestimmbar

Diferulasäuremuster löslicher Getreideballaststoffe

LBS	8-5'-DFS	8-8'-DFS	5-5'-DFS	8-O-4'-DFS	4-O-5'-DFS
<i>Weizen</i>	37,4	36,4	16,0	10,2	nn
<i>Dinkel</i>	40,4	46,0	7,1	6,5	nn
<i>Roggen</i>	33,1	43,5	15,5	7,9	nn
<i>Gerste</i>	38,8	34,7	16,7	9,8	nn
<i>Hafer</i>	44,7	32,8	11,2	11,4	nn
<i>Mais</i>	36,5	39,8	11,9	11,8	nn
<i>Hirse</i>	44,0	41,9	8,5	5,7	nn
<i>Reis</i>	nb	nb	nb	nb	nn
<i>Wildreis</i>	nb	nb	nb	nb	nn

nn – nicht nachweisbar, nb – nicht bestimmbar

5.4.11 Relative Retentionszeiten und Gehalte von 8-8'-7-O-7'-Dehydrodiferulasäure in unlöslichen und löslichen Getreideballaststoffen**Relative Retentionszeiten**

GC-MS (Hewlett Packard): RRT_{5-5'-Me-DFS} 0,704

GC-MS (Thermoquest): RRT_{5-5'-Me-DFS} 0,691

GC-FID: RRT_{5-5'-Me-DFS} 0,683

8-8'-7-O-7'-DFS-Gehalte in unlöslichen und löslichen Getreideballaststoffen

UBS	8-8'-7-O-7'-DFS*	SD*(n=3)	LBS	8-8'-7-O-7'-DFS*	SD*(n=3)
<i>Weizen</i>	113	9	<i>Weizen</i>	10	1
<i>Dinkel</i>	146	11	<i>Dinkel</i>	tr	-
<i>Roggen</i>	197	11	<i>Roggen</i>	tr	-
<i>Gerste</i>	153	25	<i>Gerste</i>	tr	-
<i>Hafer</i>	200	45	<i>Hafer</i>	tr	-
<i>Mais</i>	927	52	<i>Mais</i>	tr	-
<i>Hirse</i>	324	17	<i>Hirse</i>	tr	-
<i>Reis</i>	146	14	<i>Reis</i>	tr	-
<i>Wildreis</i>	153	11	<i>Wildreis</i>	tr	-

* - [$\mu\text{g g}^{-1}$ UBS/LBS]; tr - Spuren

5.4.12 Dehydrodisinapinsäuregehalte sowie Abschätzung der Dimerisierung von Sinapinsäure in unlöslichen und löslichen Getreideballaststoffen

Dehydrodisinapinsäuregehalte in $\mu\text{g g}^{-1}$ UBS in unlöslichen Getreideballaststoffen

$[\mu\text{g g}^{-1} \text{UBS}]$	8-8'-DSSc	SD	8-8'-DSSnc	SD	Σ8-8'-DSS	SD
<i>Weizen</i>	67	9	+	-	-	-
<i>Dinkel</i>	32	3	+	-	-	-
<i>Roggen</i>	tr	-	nn	-	-	-
<i>Gerste</i>	tr	-	nn	-	-	-
<i>Hafer</i>	nn	-	nn	-	-	-
<i>Mais</i>	tr	-	nn	-	-	-
<i>Hirse</i>	nn	-	nn	-	-	-
<i>Reis</i>	90	22	nn	-	-	-
<i>Wildreis</i>	262	34	430	60	692	93

+ - mittels GC-MS identifiziert, jedoch aufgrund Peaküberlagerungen mittels GC-FID nicht bestimmbar

nn – nicht nachweisbar; tr – Spuren

Dehydrodisinapinsäuregehalte in $\mu\text{g g}^{-1}$ LBS in löslichen Getreideballaststoffen

$[\mu\text{g g}^{-1} \text{LBS}]$	8-8'-DSSc	SD	8-8'-DSSnc	SD	Σ8-8'-DSS	SD
<i>Weizen</i>	16	3	8	1	25	3
<i>Dinkel</i>	31	13	tr	-	-	-
<i>Roggen</i>	5	1	tr	-	-	-
<i>Gerste</i>	tr	-	nn	-	-	-
<i>Hafer</i>	nn	-	nn	-	-	-
<i>Mais</i>	nn	-	nn	-	-	-
<i>Hirse</i>	nn	-	nn	-	-	-
<i>Reis</i>	tr	-	nn	-	-	-
<i>Wildreis</i>	5	1	3	1	8	1

tr – Spuren, nn – nicht nachweisbar

Faktoren („Gehalt-Faktoren“) zur Abschätzung des Dimerisierungsgrades von Sinapinsäure

UBS	8-8'-DSSc*	8-8'-DSSnc**	Σ8-8'-DSS***	LBS	8-8'-DSSc*	8-8'-DSSnc**	Σ8-8'-DSS***
Weizen	45,8	-	-	Weizen	38,1	19,0	57,1
Dinkel	37,6	-	-	Dinkel	58,5	-	-
Roggen	-	-	-	Roggen	23,9	-	-
Reis	32,7	-	-	Reis	-	-	-
Wildreis	23,0	37,8	60,9	Wildreis	25,0	15,0	40,0

* - $(8-8'-DSSc \text{ [mg g}^{-1}\text{]}/(SA \text{ [mg g}^{-1}\text{]}+\Sigma 8-8'-DSS \text{ [mg g}^{-1}\text{]}))\times 100$

** - $(8-8'-DSSnc \text{ [mg g}^{-1}\text{]}/(SA \text{ [mg g}^{-1}\text{]}+\Sigma 8-8'-DSS \text{ [mg g}^{-1}\text{]}))\times 100$

*** - $(\Sigma 8-8'-DSS \text{ [mg g}^{-1}\text{]}/(SA \text{ [mg g}^{-1}\text{]}+\Sigma 8-8'-DSS \text{ [mg g}^{-1}\text{]}))\times 100$

5.4.13 ¹H- und ¹³C-NMR-Daten für aus Wildreis isolierte FS-Oligosaccharide**¹H- und ¹³C-NMR-Daten für aus Wildreis isoliertes FAXXX**

	δ H1 (³ J _{1,2})	δ H2	δ H3	δ H4	δ H5 _{EQ}	δ H5 _{AX}
β-D-Xyl p	4,57 (7,9)	3,24	3,54	3,76	4,04	3,36
α-D-Xyl p	5,18 (3,8)	3,54	na	na	na	na
β-D-Xyl' p	4,49 (7,6)	3,44	3,72	3,81	4,11	3,38
β-D-Xyl'' p	4,42 (7,9)	3,26	3,40	3,58	3,89	3,26
α-L-Araf	5,39 (-)	4,20	3,98	4,54	4,51	4,33
	δ H2	δ H5 (³ J _{5,6})	δ H6	δ H7 (³ J _{7,8})	δ H8	δ OMe
FS	7,27	6,92 (8,5)	7,19	7,71 (15,4)	6,44	3,88
	δ C1	δ C2	δ C3	δ C4	δ C5	
β-D-Xyl p	96,7*	74,7*	74,1*	76,9*	63,6*	
α-D-Xyl p	92,3*	71,5*	71,5*	na	59,4*	
β-D-Xyl' p	101,9*	73,7*	78,3*	74,1*	63,1*	
β-D-Xyl'' p	101,9*	73,7*	76,0*	69,5*	65,4*	
α-L-Araf	107,5*	80,8*	78,2*	82,4*	64,4*	
FS	126,6**	111,7*	147,7**	148,3**	116,1*	
	δ C6	δ C7	δ C8	δ C9	δ OMe	
FS	123,8*	147,0*	113,7*	169,8**	56,3*	

na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten

* - Wert aus HMQC-Experiment entnommen

** - Wert aus HMBC-Experiment entnommen

¹H- und ¹³C-NMR-Daten für aus Wildreis isoliertes FAXX

	δ H1 ($^3J_{1,2}$)	δ H2	δ H3	δ H4	δ H5 _{EQ}	δ H5 _{AX}
β -D-Xyl <i>p</i>	4,57 (8,2)	3,24	3,53	3,76	4,03	3,35
α -D-Xyl <i>p</i>	5,18 (3,8)	3,55	3,78	na	na	na
β -D-Xyl' <i>p</i>	4,46 (7,9)	3,42	3,57	3,70	4,00	3,32
α -L-Ara <i>f</i>	5,35 (-)	4,23	4,06	4,42	4,51	4,33
	δ H2	δ H5 ($^3J_{5,6}$)	δ H6	δ H7 ($^3J_{7,8}$)	δ H8	δ OMe
FS	7,21	6,90 (8,5)	7,14	7,64 (15,8)	6,38	3,89
	δ C1	δ C2	δ C3	δ C4	δ C5	
β -D-Xyl <i>p</i>	97,11	74,52!	74,59!	77,09	63,5*	
α -D-Xyl <i>p</i>	92,3*	71,9*	71,5*	77,2*	59,5*	
β -D-Xyl' <i>p</i>	102,34	73,39	82,40	68,33	65,63	
α -L-Ara <i>f</i>	108,80	81,73	77,44	82,04	64,45	
FS	127,23	111,83	148,1**	149,1**	116,0*	
	δ C6	δ C7	δ C8	δ C9	δ OMe	
FS	123,7*	147,17	114,42	169,78	56,41	

na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten

! - Zuordnung kann vertauscht sein

* - Wert aus HMQC-Experiment entnommen

** - Wert aus HMBC-Experiment entnommen

¹H- und ¹³C-NMR-Daten für ein aus Wildreis isoliertes Ferulasäuredisaccharid (FAX)

	δ H1 ($^3J_{1,2}$)	δ H2	δ H3	δ H4	δ H5 _{EQ}	δ H5 _{AX}
α -L-Ara <i>f</i>	5,43 (1,9)	4,17	na	na	na	na
β -L-Ara <i>f</i>	5,38 (4,7)	4,23	4,38	4,10	4,50	4,31
β -D-Xyl <i>p</i>	4,60 (7,9) ^d 4,56 (7,9) ^d	3,37 ^d 3,29 ^d	na	na	na	na
	δ H2	δ H5 ($^3J_{5,6}$)	δ H6	δ H7 ($^3J_{7,8}$)	δ H8	δ OMe
FS	7,26	6,90 (7,9)	7,17	7,69 ^d (16,0)	6,41 ^d	3,88
	δ C1	δ C2	δ C3	δ C4	δ C5	
α -L-Ara <i>f</i>	100,4*	89,4*	na	na	na	
β -L-Ara <i>f</i>	95,3*	83,7*	73,5*	78,8*	65,4*	
β -D-Xyl <i>p</i>	104,0 ^{d,*} 103,1 ^{d,*}	73,4*	na	na	na	
FS	126,5**	111,7*	148,3**	149,7**	116,4*	
	δ C6	δ C7	δ C8	δ C9	δ OMe	
FS	123,9*	147, 1*	114,0*	169,7**	56,4*	

na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten ^d - Peaks „doppeln“

* - Wert aus HMQC-Experiment entnommen ** - Wert aus HMBC-Experiment entnommen

¹H- und ¹³C-NMR-Daten für aus Wildreis isoliertes FA

	δ H1 ($^3J_{1,2}$)	δ H2	δ H3	δ H4	δ H5 _{EQ}	δ H5 _{AX}
<i>α-L-Araf</i>	5,29 (-)	4,07	na	na	4,45!	4,31!
<i>β-L-Araf</i>	5,32 (4,4)	4,12	na	na	4,46!	4,27!
	δ H2	δ H5 ($^3J_{5,6}$)	δ H6	δ H7 ($^3J_{7,8}$)	δ H8	δ OMe
FS	7,20	6,88 (8,2)	7,13	7,64 ^d (16,0)	6,37 ^d	3,74
	δ C1	δ C2	δ C3	δ C4	δ C5	
<i>α-L-Araf</i>	101,91	81,93	76,69!	81,36	64,13	
<i>β-L-Araf</i>	95,99	76,59!	75,00	79,30	65,74	
FS	127,23	111,86	148,31	149,2**	116,24	
	δ C6	δ C7	δ C8	δ C9	δ OMe	
FS	124,11	147,15	114,50 ^d 114,37 ^d	169,86 ^d 169,80 ^d	56,44	

na - Signale nicht auszuwerten bzw. nicht zu beobachten

! - Zuordnung kann vertauscht sein

^d - Peaks „doppeln“

** - Wert aus HMBC-Experiment entnommen

5.5 Chromatogramme und Spektren

5.5.1 Chromatogramme

GC-Chromatogramme:

Abb. 52: GC-FID-Chromatogramm der Alditolacetate eines Standardmonosaccharidgemisches

Abb. 53: GC-MS-Chromatogramm (HP System im SIM Modus) des alkalischen Hydrolysats von löslichen Weizenballaststoffen (Bereich der dimeren PCS)

Abb. 54: GC-FID-Chromatogramm des alkalischen Hydrolysats von unlöslichen Dinkelballaststoffen (Bereich der dimeren PCS)

Abb. 55: GC-MS-Chromatogramm (Thermoquest System) des alkalischen Hydrolysats von unlöslichen Wildreisballaststoffen (Bereich der dimeren PCS, TIC)

Abb. 56: GC-MS-Chromatogramm (Thermoquest System) des alkalischen Hydrolysats von löslichen Dinkelballaststoffen (oben TIC, unten Selected-Ion-Chromatogramm m/z 704)

HPLC-Chromatogramme:

Abb. 57: HPLC-Chromatogramme eines Standardgemisches monomerer Phenolcarbonsäuren, UV-Detektion bei 260, 280 und 325 nm

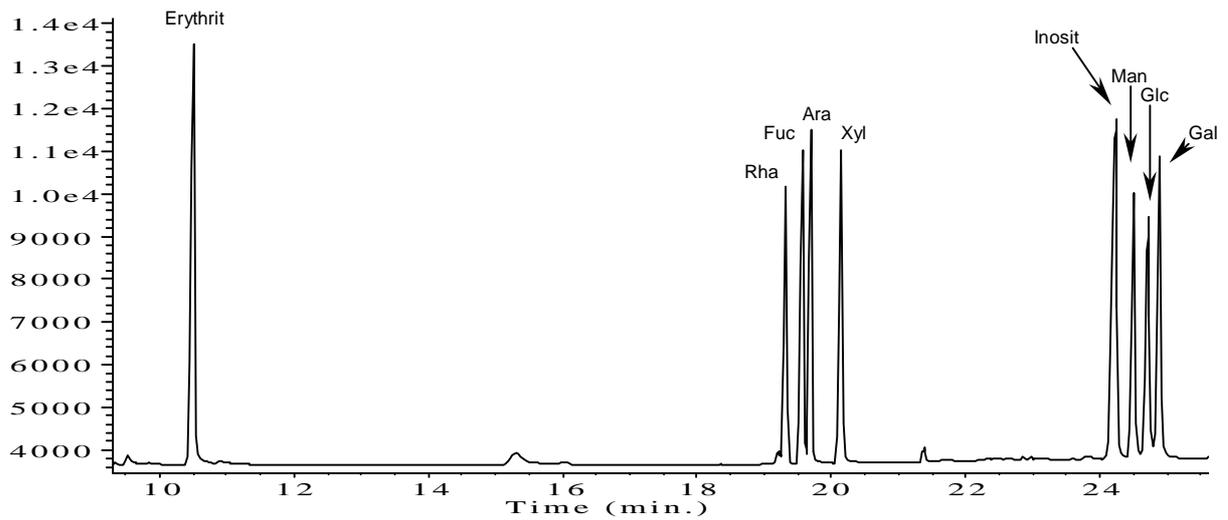


Abbildung 52: GC-FID-Chromatogramm der Alditolacetate eines Standardmonosaccharidgemisches

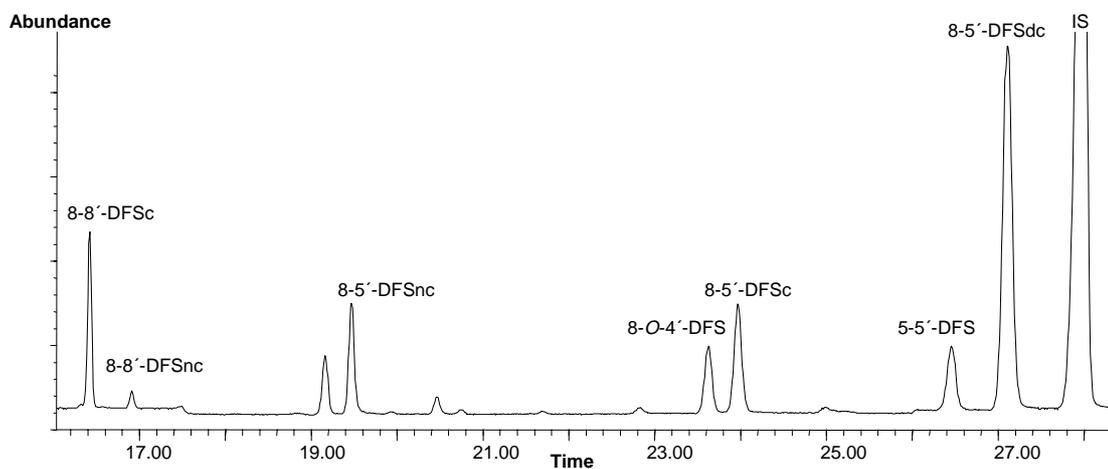


Abbildung 53: GC-MS-Chromatogramm (HP-System im SIM-Modus) des alkalischen Hydrolysats von löslichen Weizenballaststoffen (Bereich der dimeren PCS)

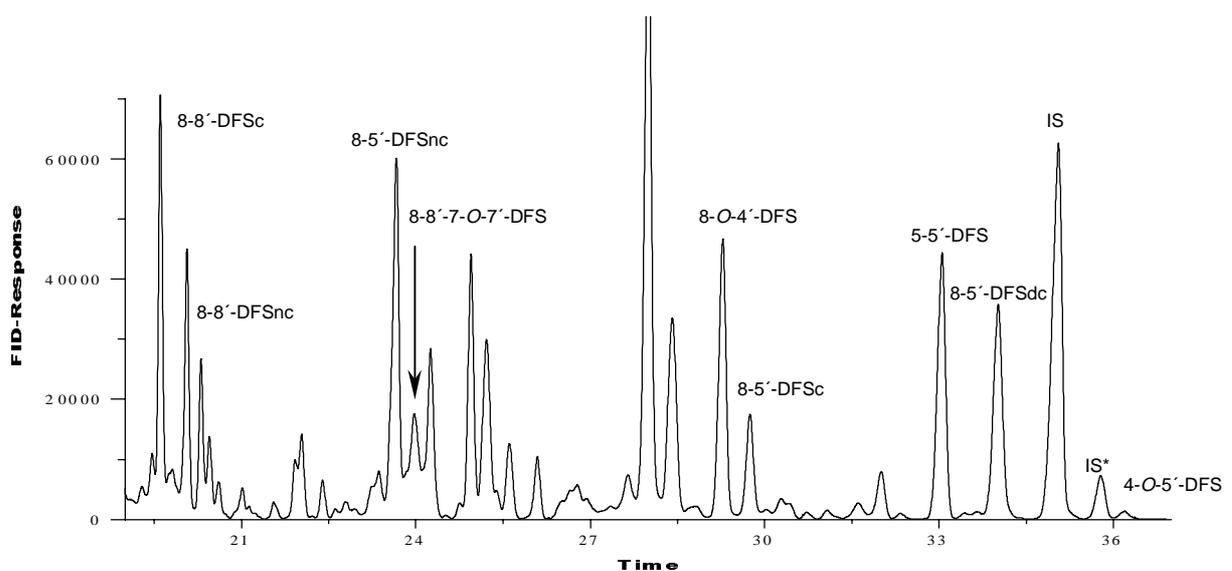


Abbildung 54: GC-FID-Chromatogramm des alkalischen Hydrolysats von unlöslichen Dinkelballaststoffen (Bereich der dimeren PCS)

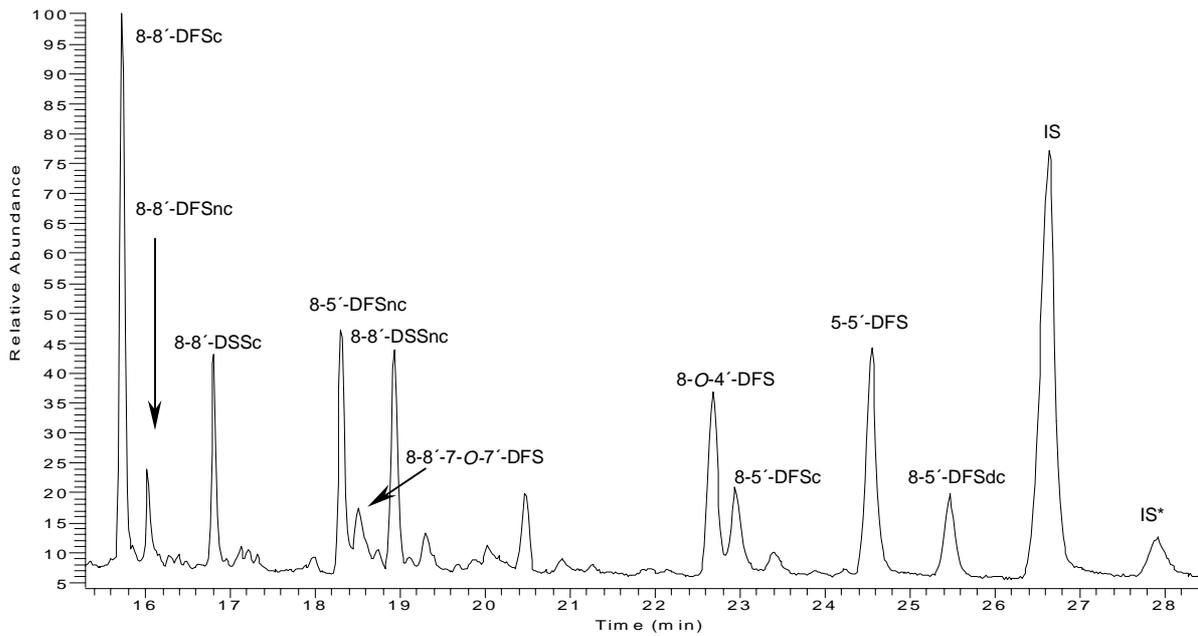


Abbildung 55: GC-MS-Chromatogramm (Thermoquest-System) des alkalischen Hydrolysats von unlöslichen Wildreisballaststoffen (Bereich der dimeren PCS, TIC)

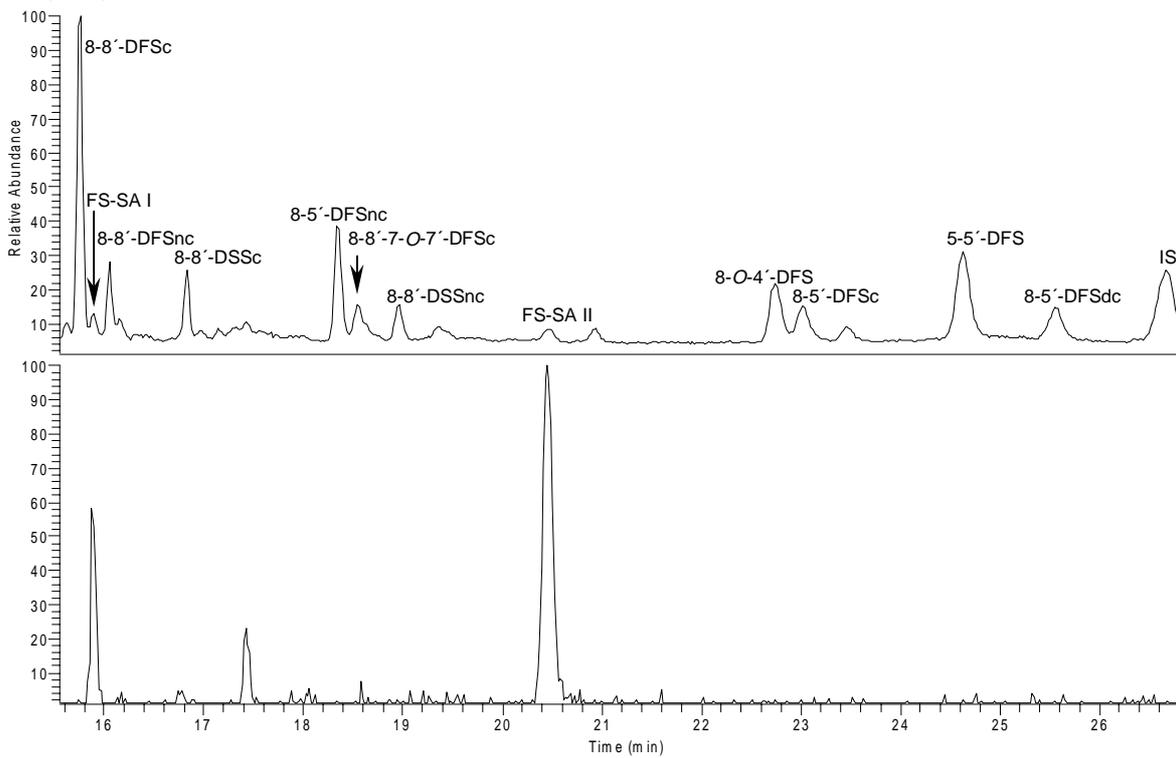


Abbildung 56: GC-MS-Chromatogramm (Thermoquest-System) des alkalischen Hydrolysats von löslichen Dinkelballaststoffen (oben TIC, unten Selected-Ion-Chromatogramm m/z 704)

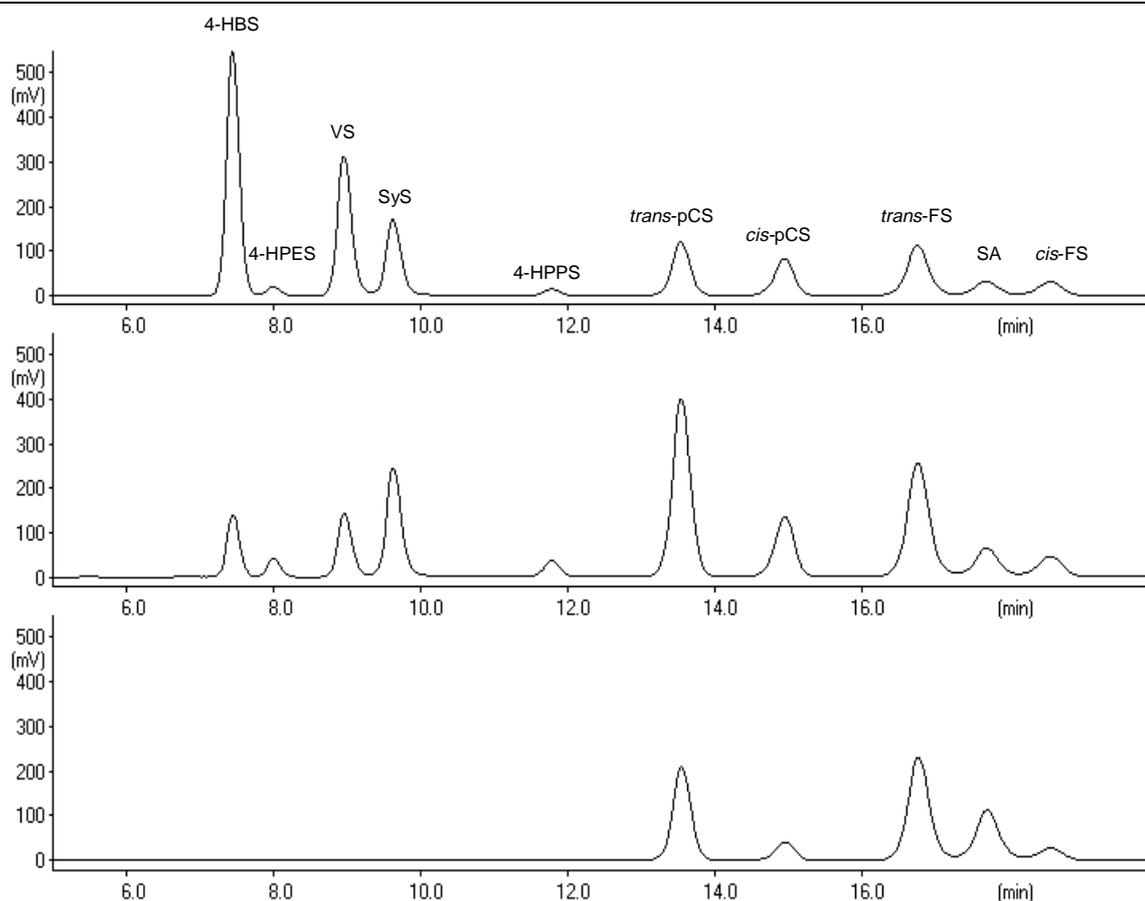


Abbildung 57: HPLC-Chromatogramme eines Standardgemisches monomerer Phenolcarbonsäuren, UV-Detektion bei 260, 280 und 325 nm (von oben nach unten, Ordinate bei 325 nm nicht vergleichbar)

5.5.2 Spektren

UV-Spektren:

Abb. 58: UV-Spektren monomerer phenolischer Säuren

MS-Spektren:

Abb. 59: Ion-Trap-Massenspektren der Dehydrodiferulasäuren

Abb. 60: Massenspektren der Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte (Quadrupolspektren oder Ion-Trap-Spektren)

Abb. 61: Ion-Trap-Massenspektrum von FS-SA I (?)

Abb. 62: Ion-Trap-Massenspektrum von FS-pCS (?)

NMR-Spektren:

Abb. 63: ^1H -NMR-Spektrum von FAXX (Kohlenhydratregion)

Abb. 64: ^{13}C -BB-NMR-Spektrum von FAXX (Kohlenhydratregion)

Abb. 65: HMQC-Spektrum von FAX (Kohlenhydratregion)

Abb. 66: ^1H -NMR-Spektrum von FA (Kohlenhydratregion)

Abb. 67: ^{13}C -BB-NMR-Spektrum von FA (Kohlenhydratregion)

Abb. 68: HMQC-Spektrum von XFAXX (Kohlenhydratregion)

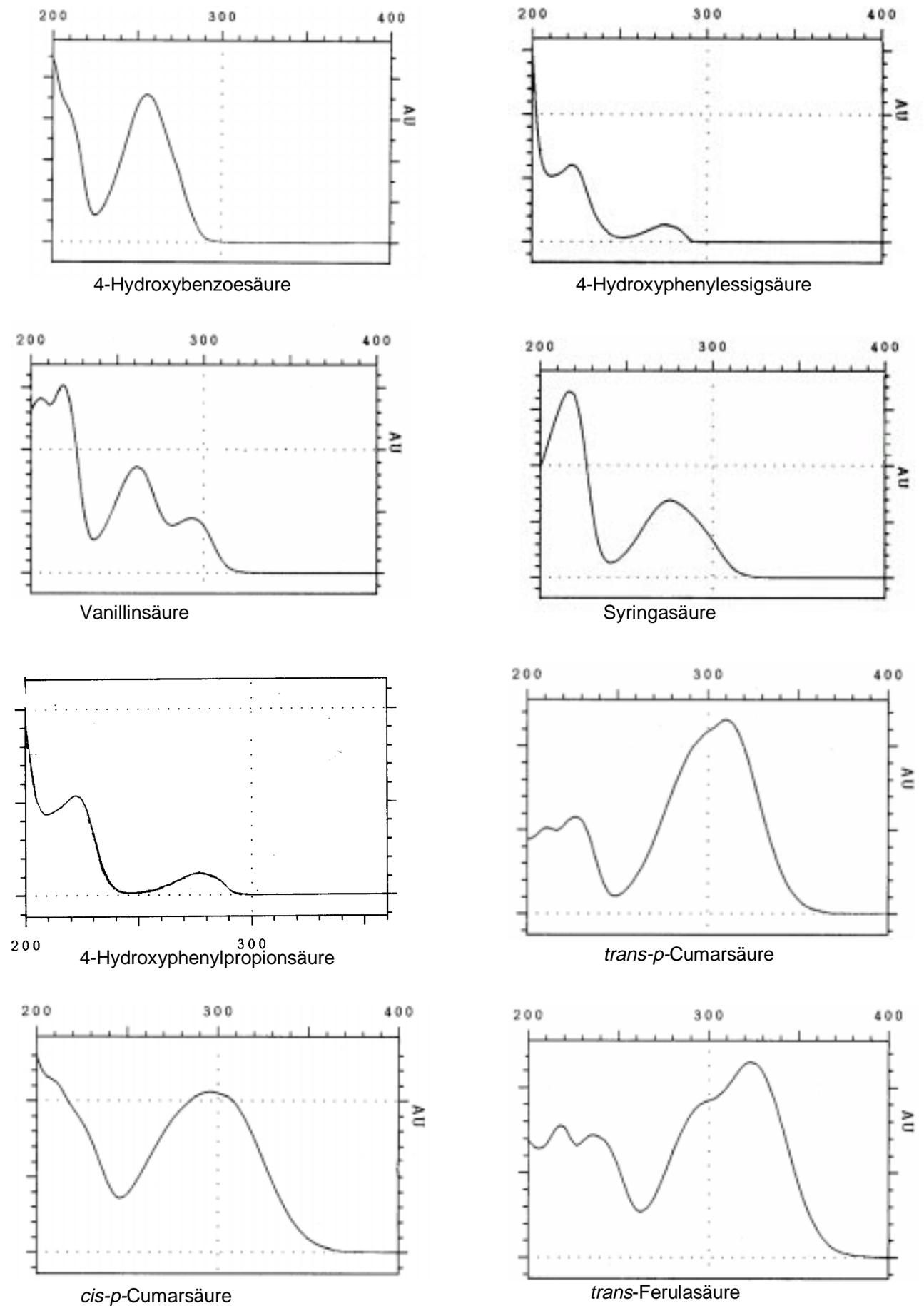


Abbildung 58: UV-Spektren monomerer phenolischer Säuren

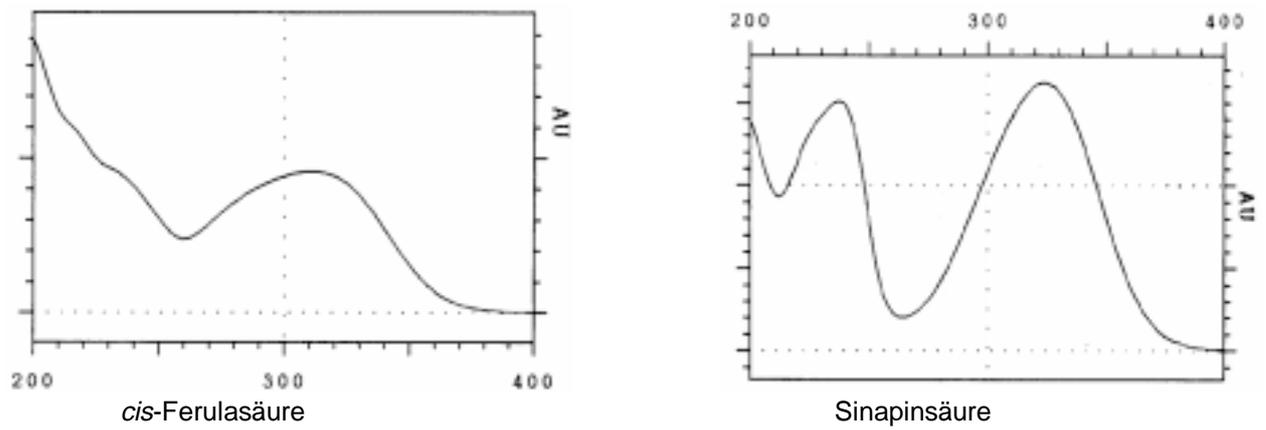


Abbildung 58 (Fortsetzung): UV-Spektren monomerer phenolischer Säuren

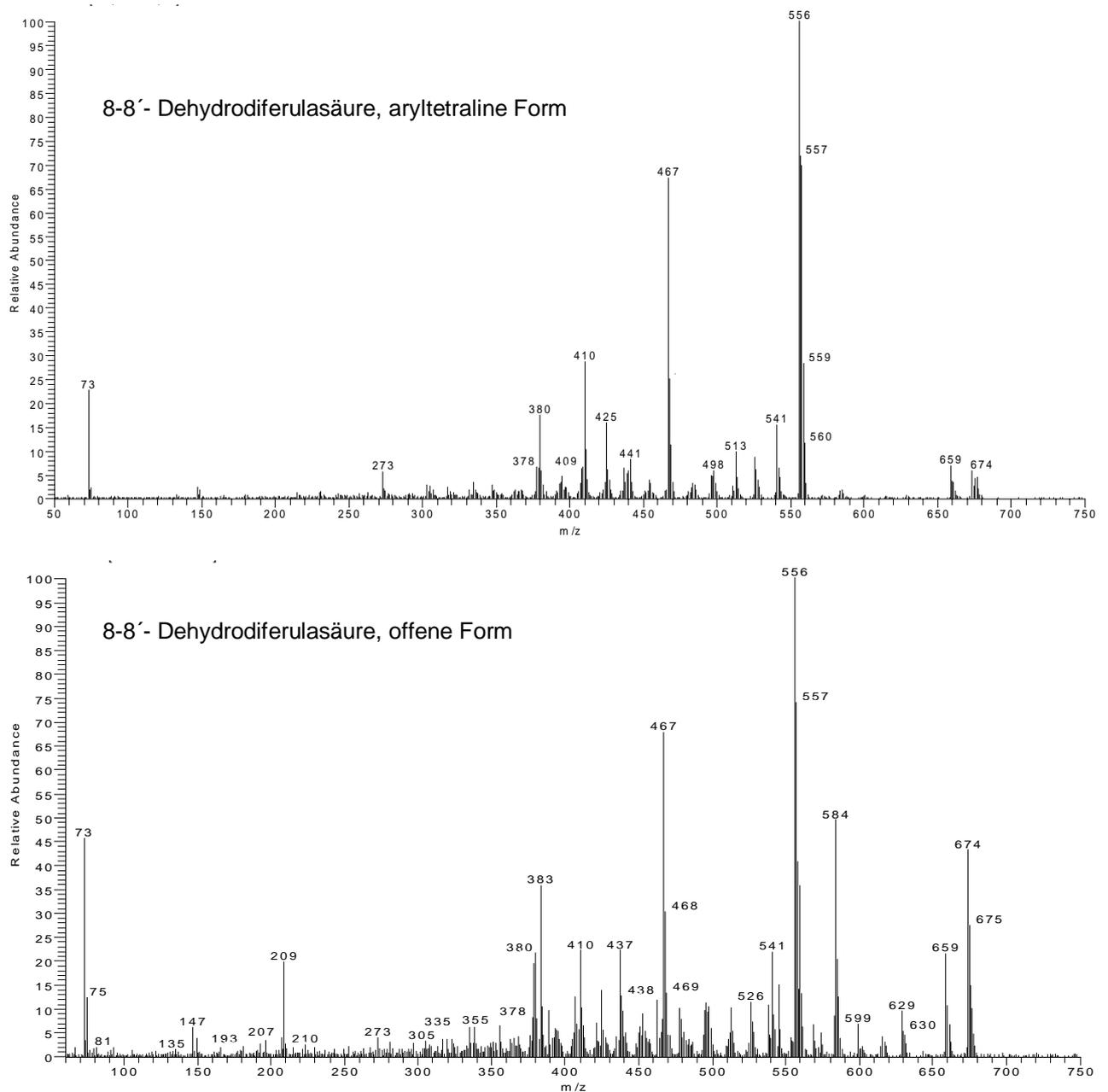


Abbildung 59: Ion-Trap-Massenspektren der Dehydrodiferulasäuren, Anordnung gemäß Elutionsfolge

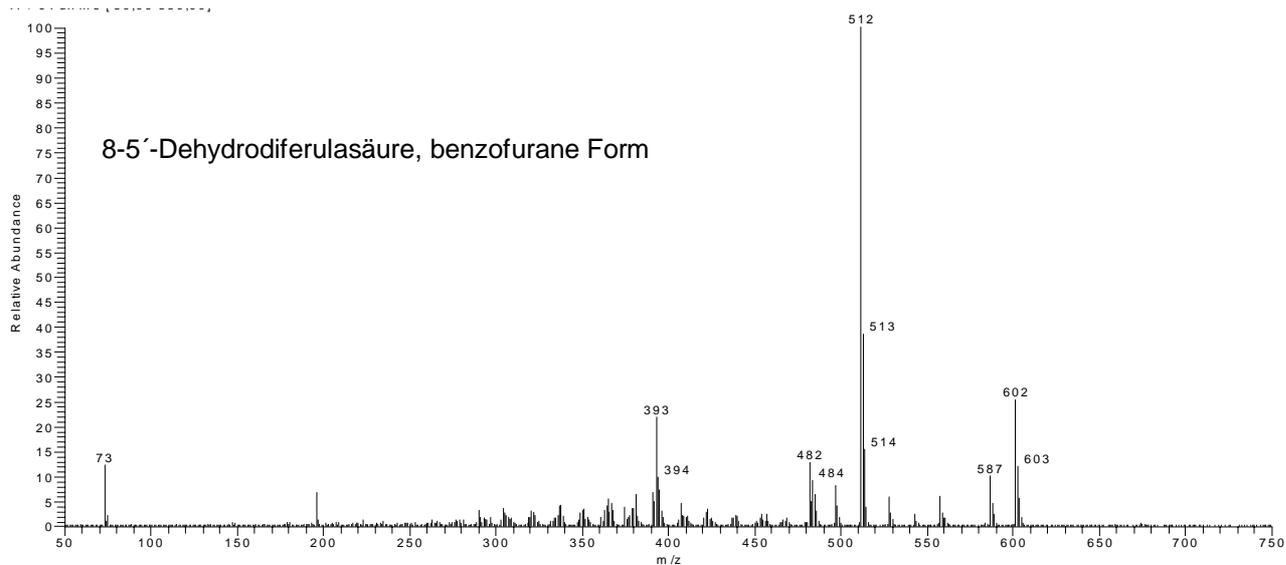
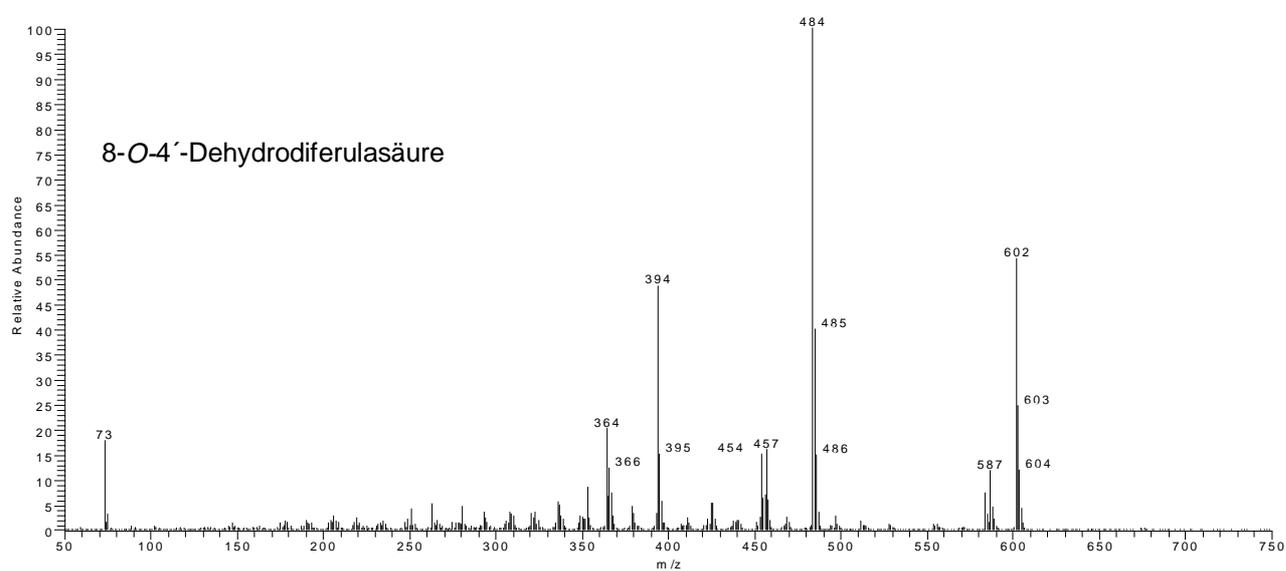
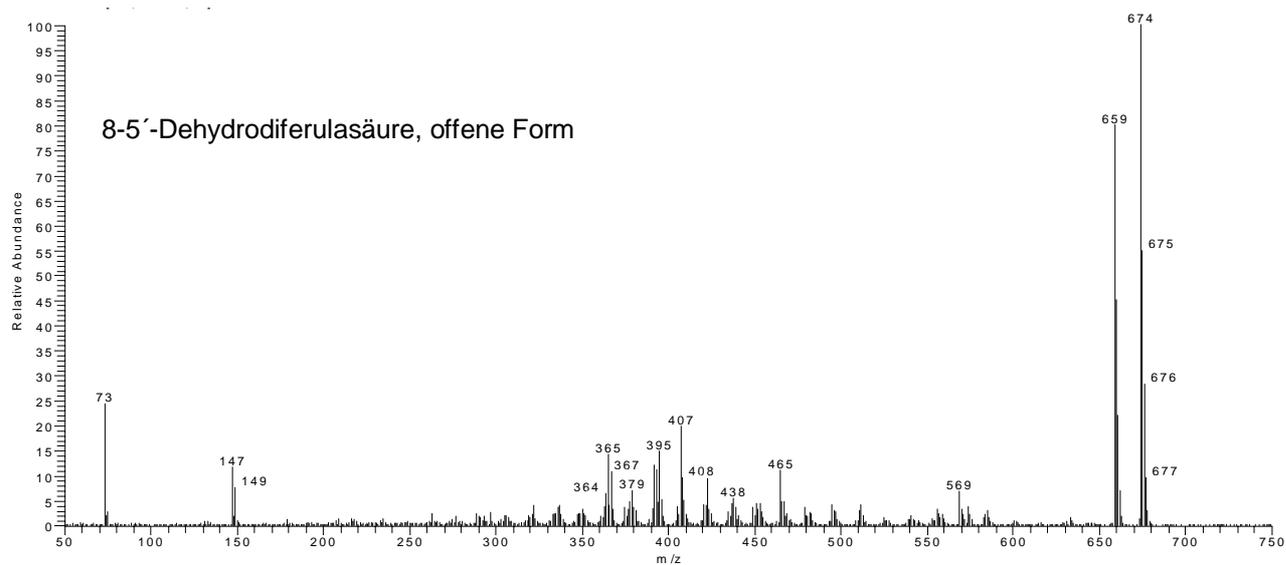


Abbildung 59 (Fortsetzung): Ion-Trap-Massenspektren der Dehydrodiferulasäuren, Anordnung gemäß Elutionsfolge

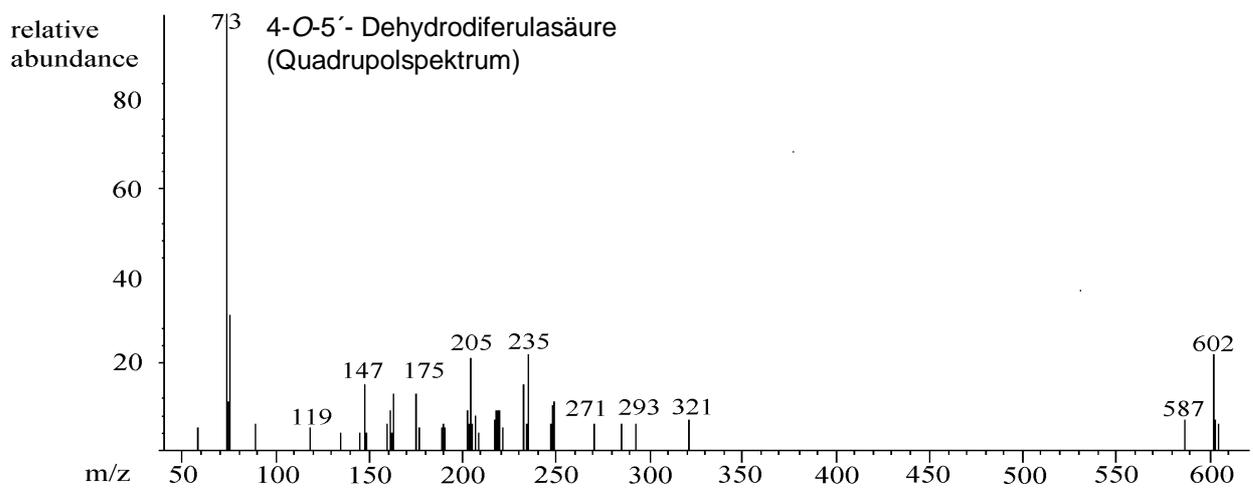
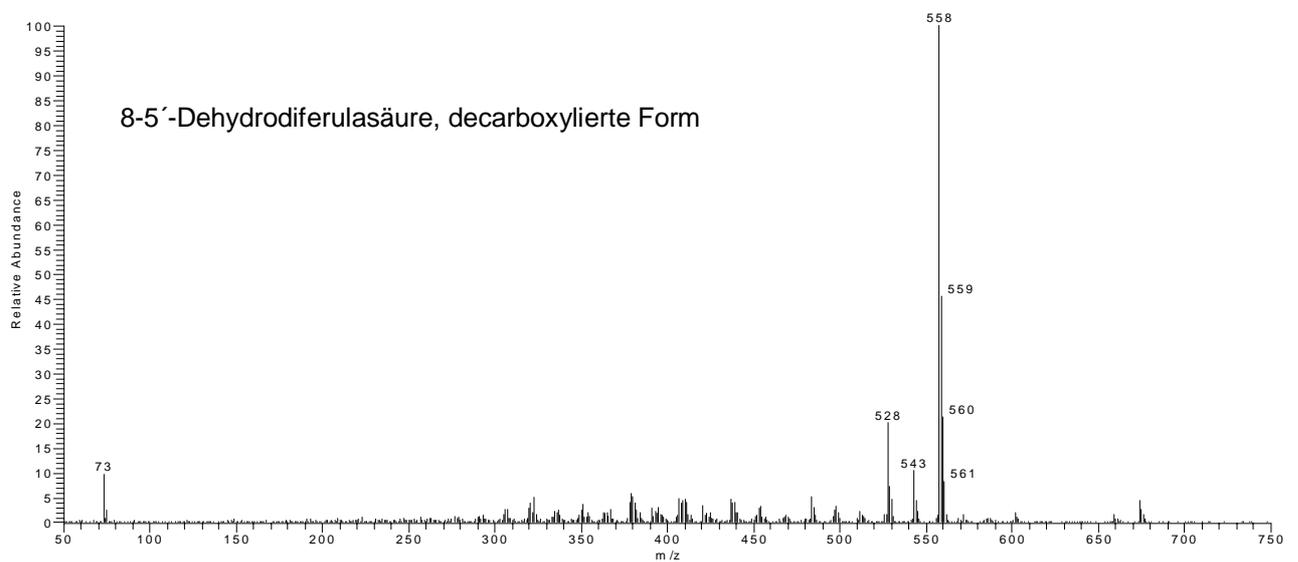
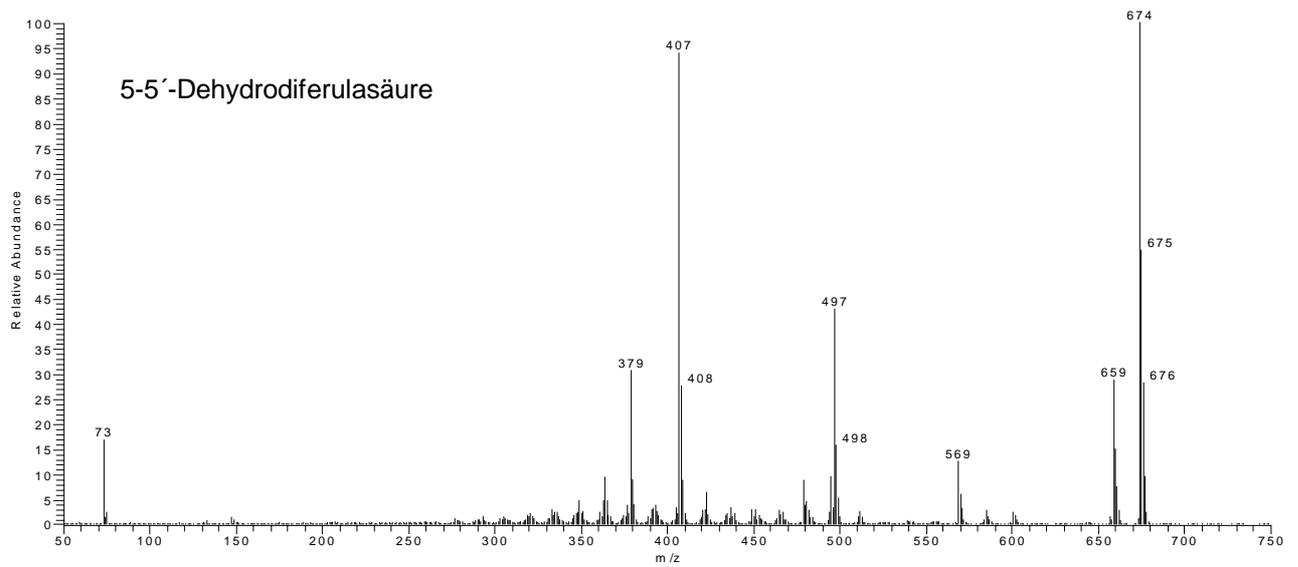


Abbildung 59 (Fortsetzung): Ion-Trap-Massenspektren Dehydrodiferulasäuren (4-O-5'-DFS: Quadrupolspektrum), Anordnung gemäß Elutionsfolge

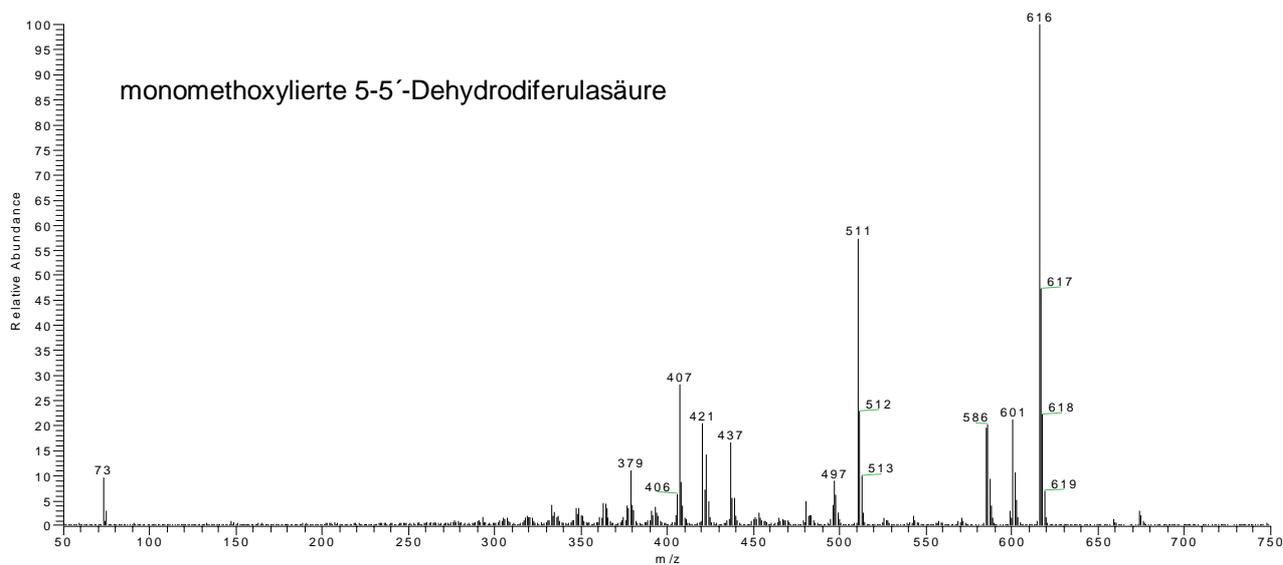


Abbildung 59 (Fortsetzung): Ion-Trap-Massenspektren der Dehydrodiferulasäuren, Anordnung gemäß Elutionsfolge

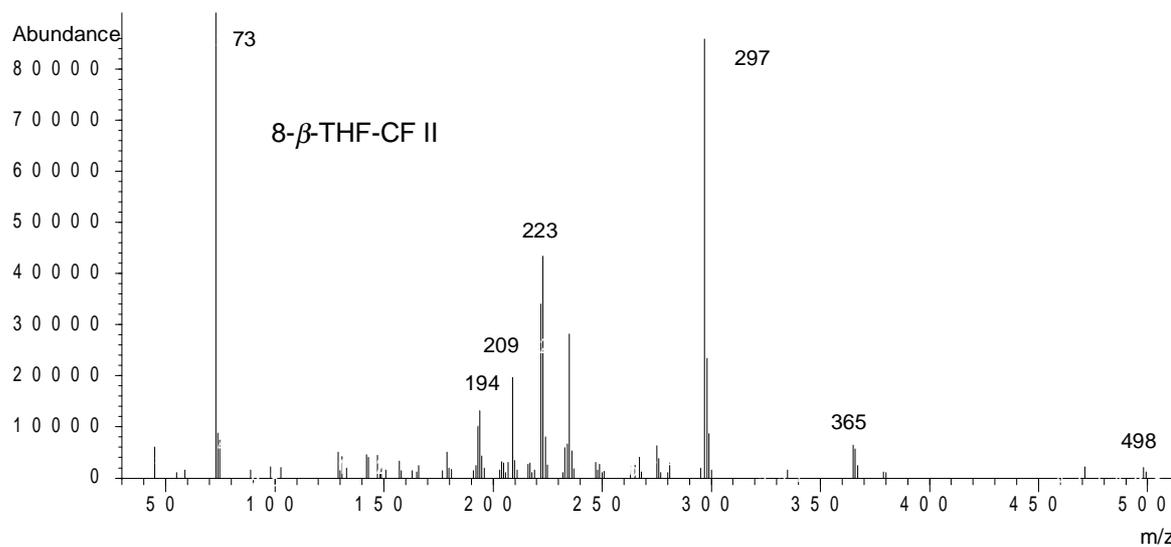
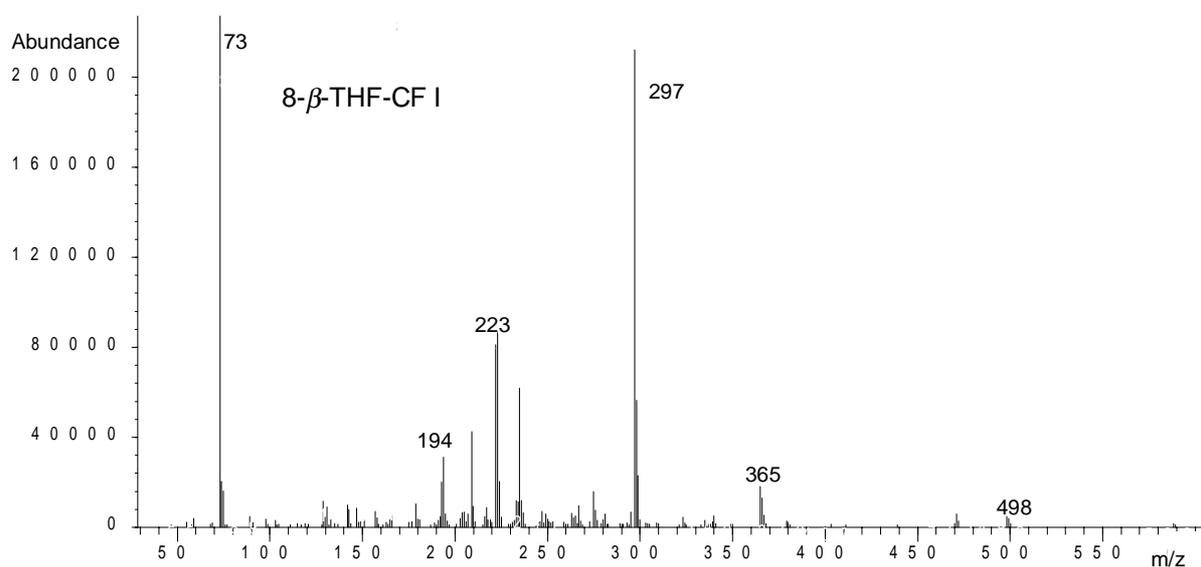


Abbildung 60: Massenspektren der Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte (Quadrupolspektren)

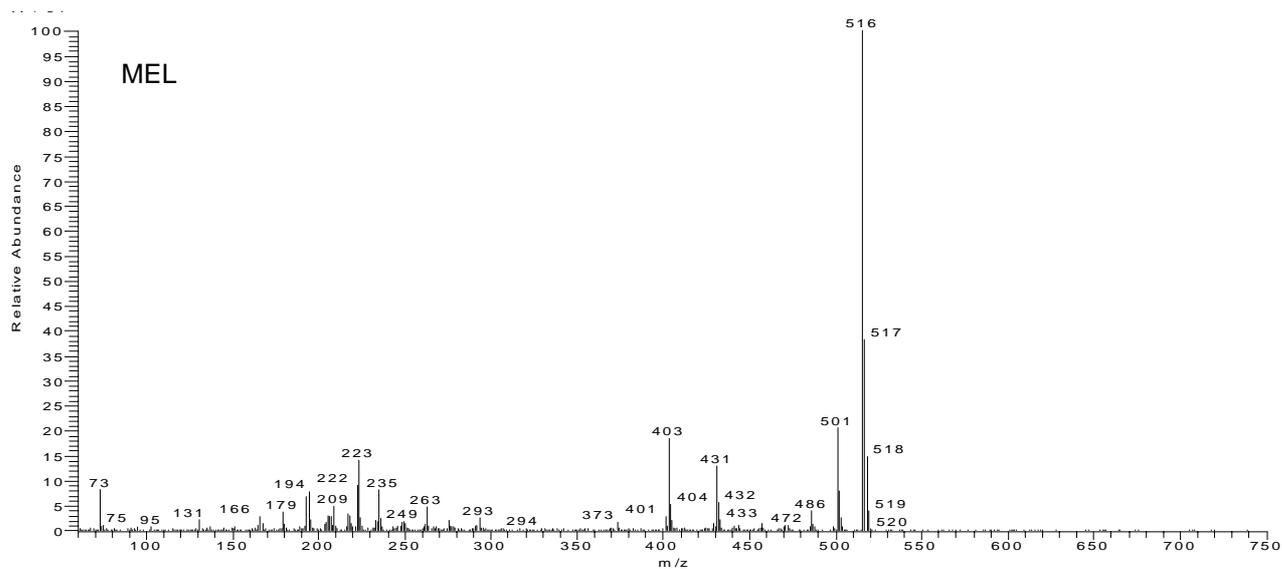
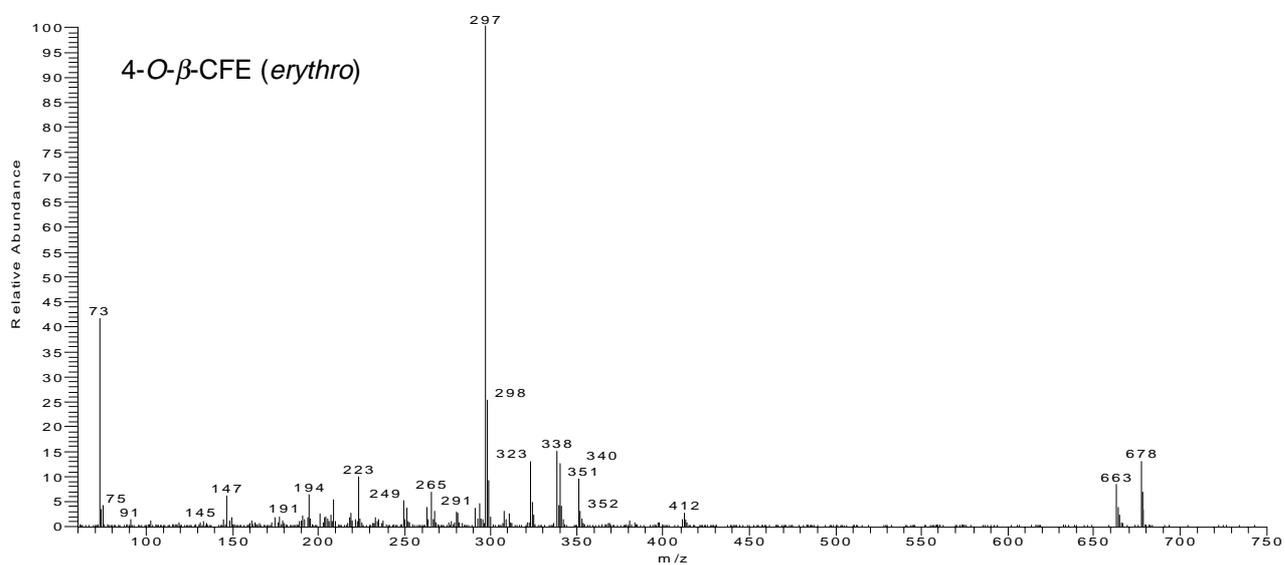
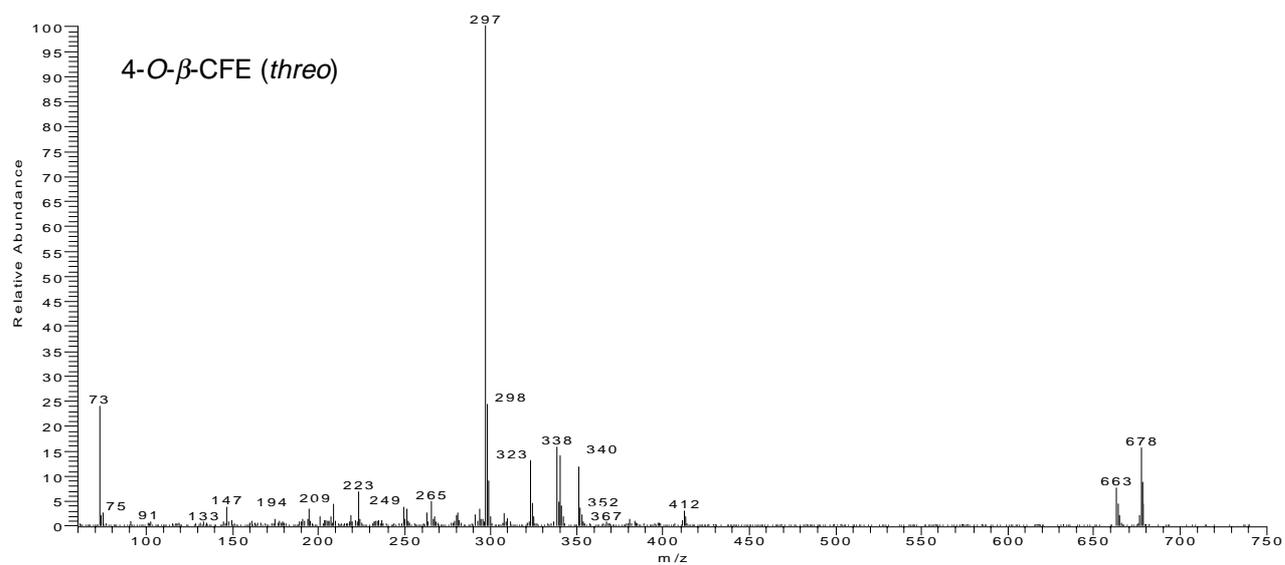


Abbildung 60 (Fortsetzung): Massenspektren der Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte (Ion-Trap-Spektren)

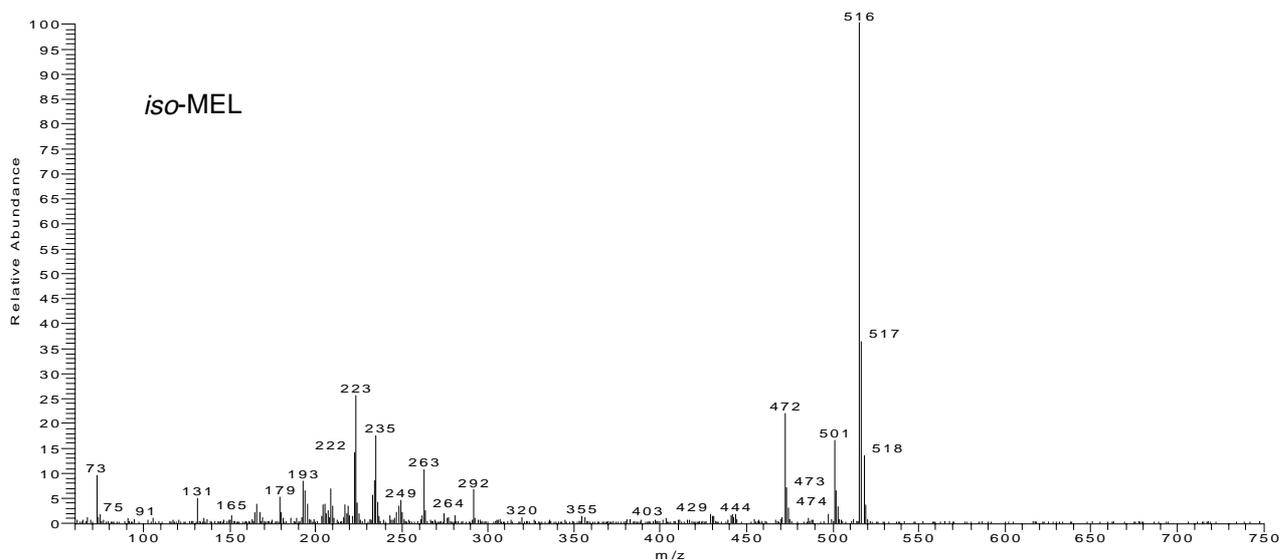


Abbildung 60 (Fortsetzung): Massenspektren der Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte (Ion-Trap-Spektren)

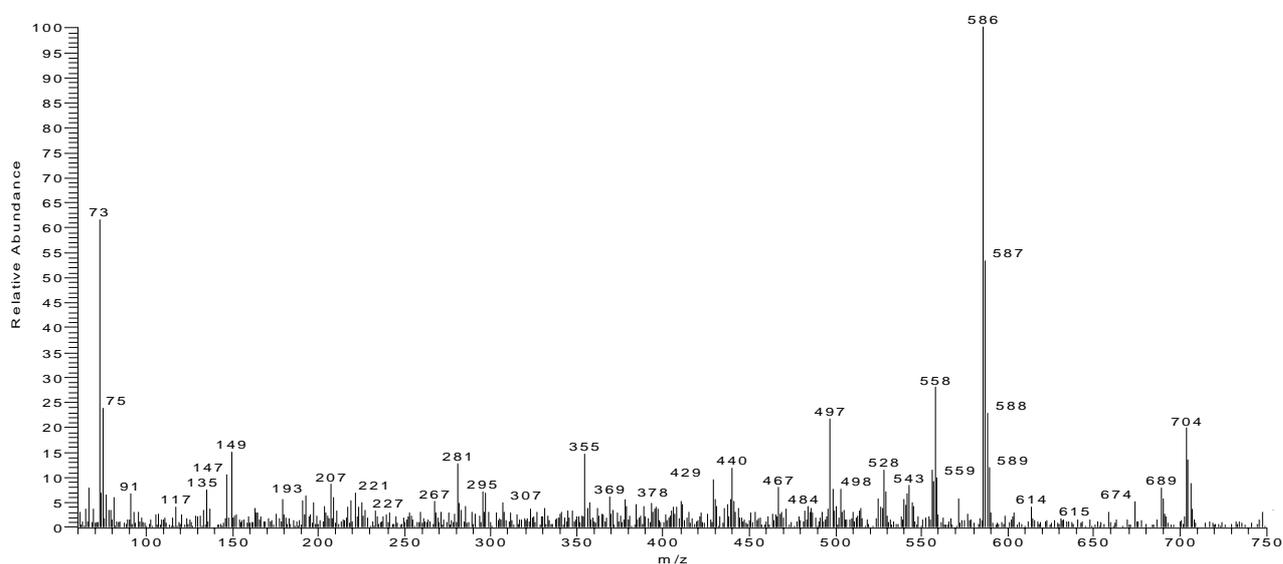


Abbildung 61: Ion-Trap-Massenspektrum von FS-SA I (?)

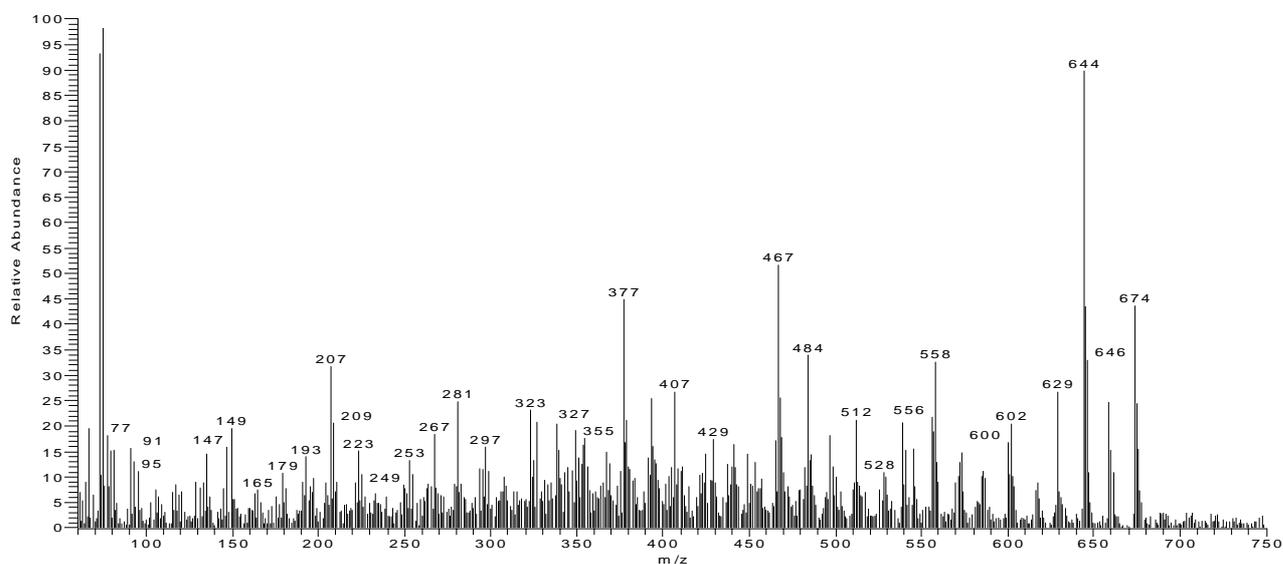


Abbildung 62: Ion-Trap-Massenspektrum von FS-pCS I (?)

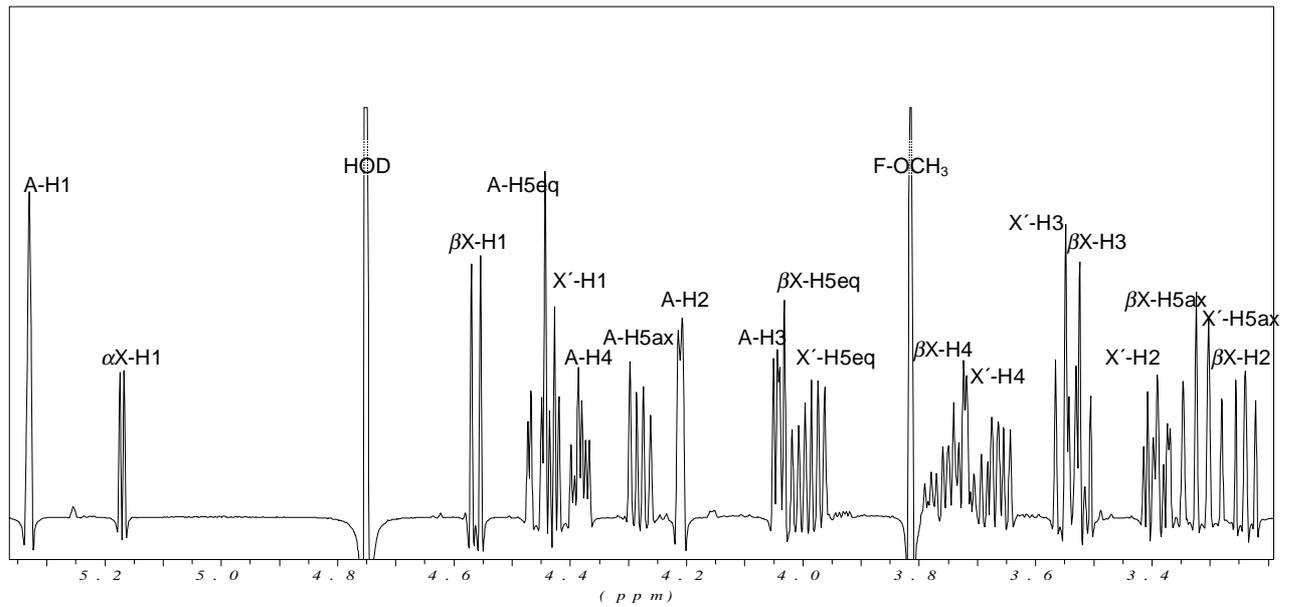


Abbildung 63: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von FAXX (Kohlenhydratregion)

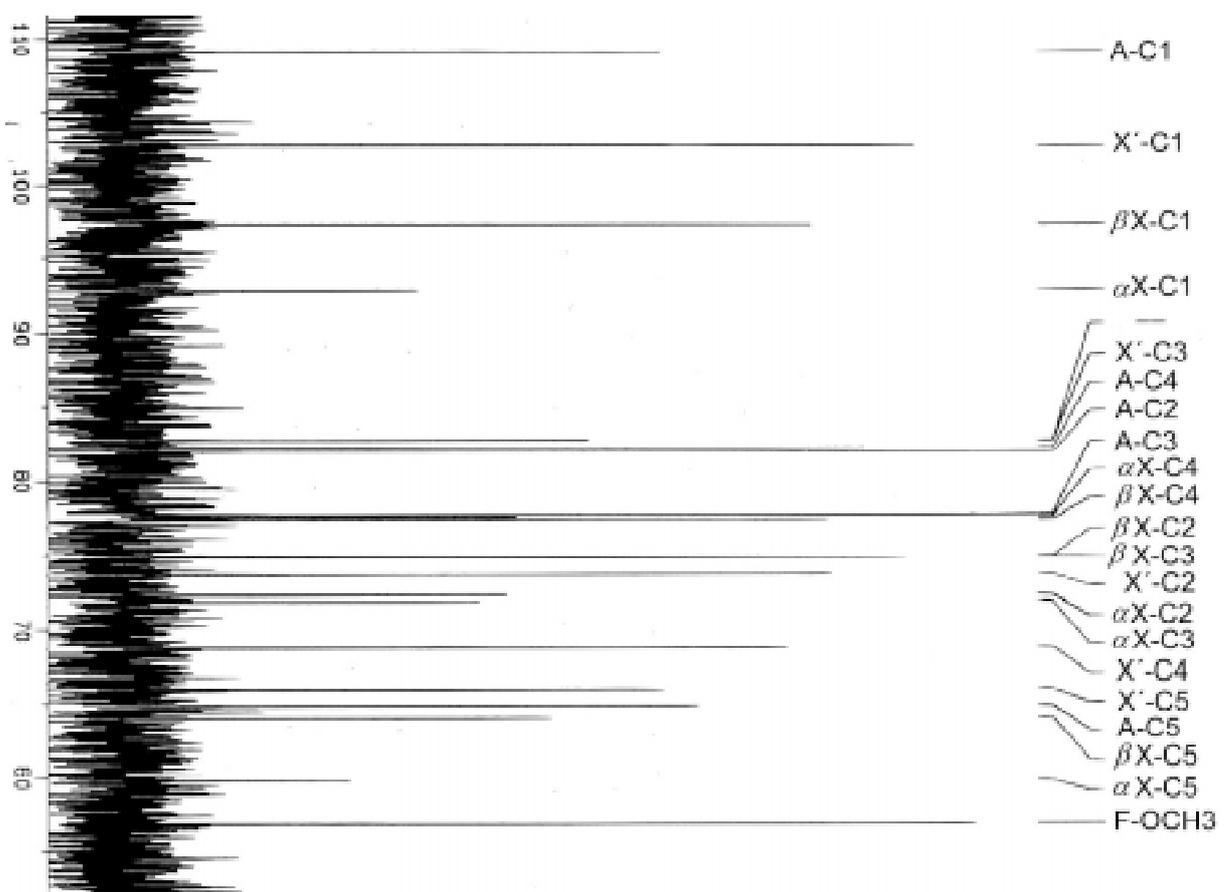


Abbildung 64: $^{13}\text{C-BB-NMR}$ -Spektrum von FAXX (Kohlenhydratregion)

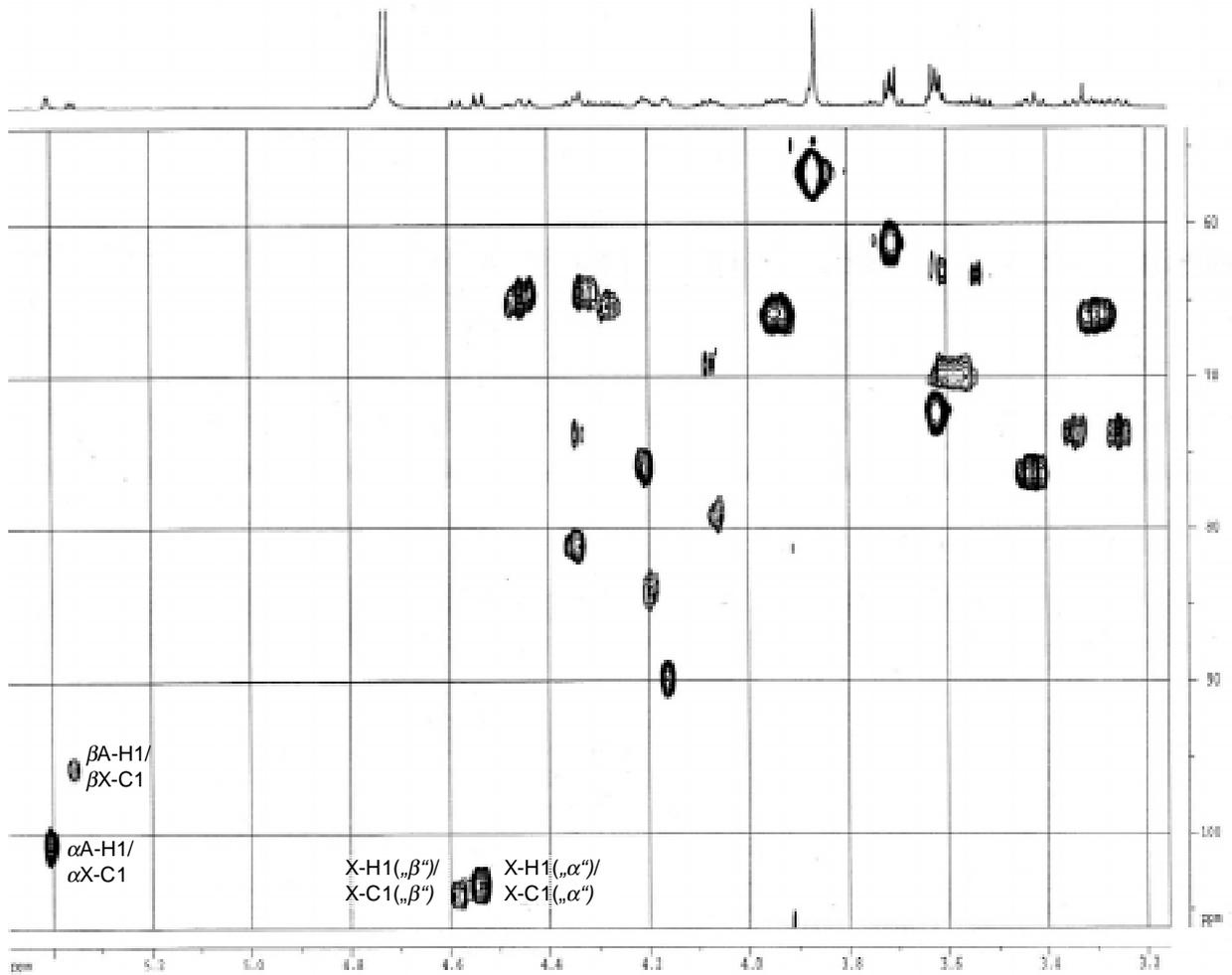


Abbildung 65: HMOC-Spektrum von FAX (Kohlenhydratregion), nur Signale für anomere Kohlenstoffatome sind markiert

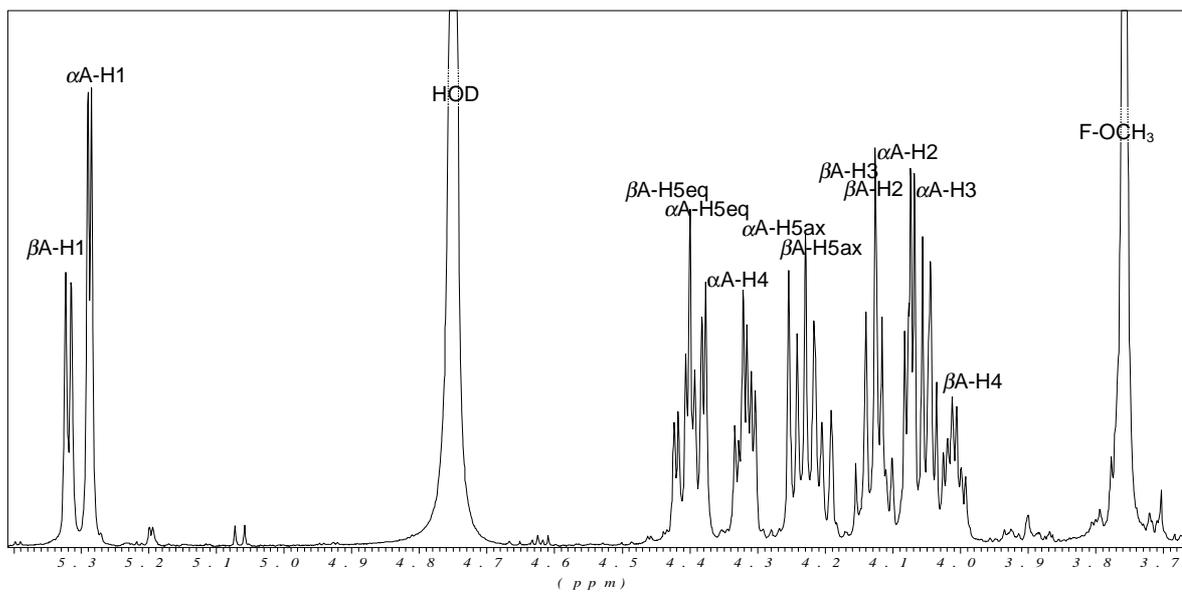


Abbildung 66: ^1H -NMR-Spektrum von FA (Kohlenhydratregion)

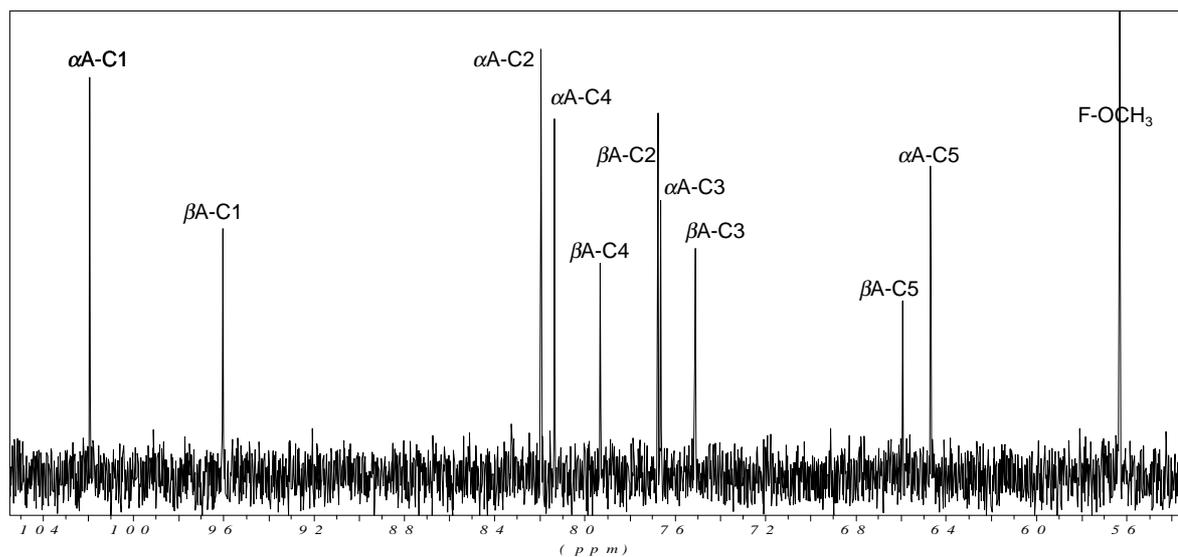


Abbildung 67: ^{13}C -BB-NMR-Spektrum von FA (Kohlenhydratregion)

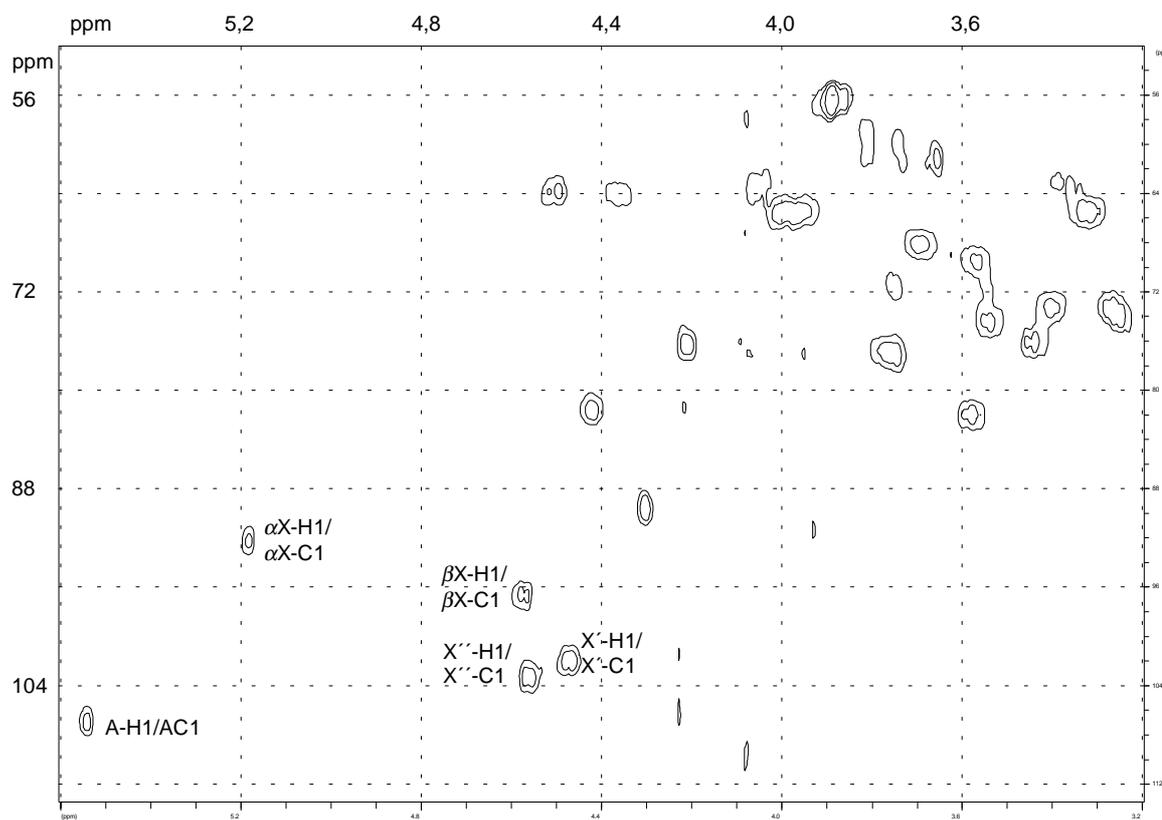


Abbildung 68: HMOC-Spektrum von XFAXX (Kohlenhydratregion), nur Signale für anomere Kohlenstoffatome sind markiert

6. Literatur

- Albersheim P, Nevins DJ, English PD & Karr A, A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr Res* **5**:340-345 (1967).
- Åman P, Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages, in *Forage cell wall structure and digestibility*, (Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD & Ralph J, Eds). ASA-CSSA-SSSA, Madison , 183-199 (1993).
- Andreasen MF, Christensen LP, Meyer AS & Hansen Å, Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. *J Sci Food Agric* **79**:411-413 (1999).
- Andreasen MF, Christensen LP, Meyer AS & Hansen Å, Ferulic acid dehydrodimers in rye (*Secale cereale* L.). *J Cereal Sci* **31**:303-307 (2000).
- Angyal S, Hudson's rules of isorotation as applied to furanosides, and the conformations of methyl aldofuranosides. *Carbohydr Res* **77**:37-50 (1979).
- Asp N-G, Björck I & Nyman M, Physiological effects of cereal dietary fibre. *Carbohydr Polym* **21**:183-187 (1993).
- Asp N-G, Development of dietary fibre methodology, in *Advanced dietary fibre technology*, (Mc Cleary BV & Prosky L, Eds). Blackwell Science, Oxford, 77-119 (2001).
- Azuma J, Kato A, Koshijima T & Okamura K, Arabinosyl xylotriase mixedly esterified with acetic and ferulic acids from sugar cane bagasse. *Agric Biol Chem* **54**:2181-2182 (1990).
- Bach Knudsen KE, Johansen HN & Glitso V, Rye dietary fiber and fermentation in the colon. *Cereal Foods World* **42**:690-694 (1997).
- Bartolomé B, Faulds CB, Kroon PA, Waldron K, Gilbert HJ, Hazlewood G & Williamson G, An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* esterase (XylID) release a 5-5' ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl Environ Microbiol* **63**:208-212 (1997).
- Baumgartner J & Neukom H, Enzymatische Oxidation von Vanillin. *Chimia* **26**:366-368 (1972).
- Bax A & Davis DG, MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J Magn Reson* **65**:355-360 (1985).
- Bax A & Subramanian S, Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy. *J Magn Reson* **67**:565-569 (1986).
- Bax A & Summers MF, ¹H and ¹³C assignments from sensitivity enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J Am Chem Soc* **108**:2093-2094 (1986).
- Besle J-M, Cornu A & Jouany J-P, Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *J Sci Food Agric* **64**:171-190 (1994).
- BgVV (Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin), in *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG*. Beuth Verlag, Berlin (1997).

- Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ & Stone BA, A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr Res* **113**:291-299 (1983).
- Bock K & Pedersen C, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **41**:27-66 (1983).
- Bolwell GP, Synthesis of cell wall components: aspects of control. *Phytochemistry* **27**:1235-1253 (1988).
- Borneman WS, Hartley RD, Himmelsbach DS & Ljungdahl LG, Assay for *trans-p*-coumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. *Anal Biochem* **190**:129-133 (1990).
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254 (1976).
- Burkitt DP, Walker ARP & Painter NS, Effect of dietary fibre on stools and transit times and its role in the causation of disease. *Lancet* **ii**:1408-1411 (1972).
- Carpita NC, The chemical structure of the cell walls of higher plants, in *Dietary fiber: chemistry, physiology, and health effects*, (Kritchevsky D, Bonfield C & Anderson JW, Eds). Plenum Press, New York, 15-30 (1990).
- Chesson A, Stewart CS & Wallace RJ, Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* **44**:597-603 (1982).
- Colquhoun IJ, Ralet M-C, Thibault JF, Faulds CB & Williamson G, Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* **263**:243-256 (1994).
- Davin LB, Wang H-B, Crowell AL, Bedgar DL, Martin DM, Sarkanen S & Lewis NG, Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**:362-366 (1997).
- Deetz DA, Jung H-JG, Helm RF, Hatfield RD & Ralph J, Impact of methyl 5-*O*-(*E*)-feruloyl- α -L-arabinofuranoside on in-vitro degradation of cellulose and xylan. *J Sci Food Agric* **61**:423-427 (1993).
- Dervilly G, Saulnier L, Roger P & Thibault J-F, Isolation of homogenous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *J Agric Food Chem* **48**:270-278 (2000).
- deVries JW, Prosky L, Li B & Cho S, A historical perspective on defining dietary fiber. *Cereal Foods World* **44**:367-369 (1999).
- Englyst HN, Quigley ME & Hudson GJ, Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst* **119**:1497-1509 (1994).
- Faulds CB & Williamson G, Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**:1082-1087 (1995).

- Faulds CB, Kroon PA, Saulnier L, Thibault J-F & Williamson G, Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydr Polym* **27**:187-190 (1995).
- Faulds CB & Williamson G, The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J Sci Food Agric* **79**:393-395 (1999).
- Figueroa-Espinoza MC & Rouau X, Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chem* **75**:259-265 (1998).
- Ford CW, A feruloylated arabinoxylan liberated from cell walls of *Digitaria decumbens* (pangola grass) by treatment with borohydride. *Carbohydr Res* **190**:137-144 (1989).
- Ford CW & Hartley RD, Cyclodimers of *p*-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses. *J Sci Food Agric* **50**:29-43 (1990).
- Fry SC, Phenolic components of the primary cell wall. *Biochem J* **203**:493-504 (1982).
- Fry SC & Miller JC, Toward a working model of the growing plant cell wall. Phenolic cross-linking reactions in the primary cell walls of dicotyledons, in *Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation*, (Lewis NG & Paice MG, Eds). ACS, Washington, DC, 33-46 (1989).
- Garcia-Conesa MT, Kroon PA & Williamson G, Enzymic hydrolysis of diferulates from wheat bran cell walls. *Biochem Soc Trans* **26**:S168 (1998).
- Geissmann T & Neukom H, Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxidative phenolische Kopplung. *Helv Chim Acta* **54**:1108-1112 (1971).
- Geissmann T & Neukom H, On the composition of the water soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation. *Lebensm-Wiss Technol* **6**:59-62 (1973).
- Glitsø LV, Jensen BB & Bach Knudsen KE, *In vitro* fermentation of rye carbohydrates including arabinoxylans of different structure. *J Sci Food Agric* **80**:1211-1218 (2000).
- Grabber JH, Hatfield RD, Ralph J, Zon J & Amrhein N, Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. *Phytochemistry* **40**:1077-1082 (1995).
- Grabber JH, Hatfield RD & Ralph J, Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J Sci Food Agric* **77**:193-200 (1998a).
- Grabber JH, Ralph J & Hatfield RD, Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *J Agric Food Chem* **46**:2609-2614 (1998b).
- Gruppen H, Hoffmann RA, Kormelink FJM, Voragen GJ, Kamerling JP & Vliegthart JFG, Characterisation by ¹H NMR spectroscopy of enzymically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. *Carbohydr Res* **233**:45-64 (1992).
- Gubler F, Ashford AE, Bacic A, Blakeney AB & Stone BA, Release of ferulic acid esters from barley aleurone II. Characterization of the feruloyl compounds released in response to GA₃. *Aust J Plant Physiol* **12**:307-317 (1985).
- Harris PJ & Hartley RD, Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* **259**:508-510 (1976).

- Harrison LJ, Sia G-L, Sim K-Y, Tan HT-W, Connolly JD, Lavaud C & Massiot G, A ferulic acid ester of sucrose and other constituents of *Bhesa paniculata*. *Phytochemistry* **38**:1497-1500 (1995).
- Hartley RD & Jones EC, Effect of ultraviolet light on substituted cinnamic acids and the estimation of their cis and trans isomers by gas –chromatography. *J Chromatogr* **107**:213-218 (1975).
- Hartley RD & Jones EC, Diferulic acid as a component of cell-walls of *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry* **15**:1157-1160 (1976).
- Hartley RD & Ford CW, Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability, in *Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation*, (Lewis NG & Paice MG, Eds). ACS, Washington, DC, 137-149 (1989).
- Hartley RD, Morrison III WH, Himmelsbach DS & Borneman WS, Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry* **29**:3705-3709 (1990).
- Hatfield RD, Ralph J & Grabber JH, Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Sci* **39**:27-37 (1999).
- He L & Terashima N, Formation and structure of lignin in monocotyledons. II. Deposition and distribution of phenolic acids and their association with cell wall polymers in rice plants (*Oryza sativa*). *Mokuzai Gakkaishi* **35**:123-129 (1989).
- Helm RF & Ralph J, Lignin-hydroxycinnamyl model compounds related to forage cell wall structure. 1. Ether-linked structures. *J Agric Food Chem* **40**:2167-2175 (1992).
- Herrmann K, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* **28**:315-347 (1989).
- Herrmann K, Hydroxyzimtsäure-Verbindungen als biologisch aktive Inhaltsstoffe von Lebensmitteln. *Ernähr-Umsch* **38**:148-154 (1991).
- Hespell RB & O'Bryan PJ, Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Appl Biochem* **58**:1082-1088 (1992).
- Himmelsbach DS, Hartley RD, Borneman WS, Poppe L & van Halbeek H, Structure of a feruloylated arabinoxylan tetrasaccharide that contains the β -D-Xylp-(1 \rightarrow 2)- α -L-Araf element by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem* **32**:158-165 (1994).
- Hipsley EH, Dietary “fibre“ and pregnancy toxemia. *Brit Med J* **42**:420-422 (1953).
- Hoffmann RA, Leeflang BR, deBarse MM, Kamerling JP & Vliegthart JFG, Characterisation by ^1H -n.m.r.-spectroscopy of oligosaccharides, derived from arabinoxylans of white endosperm of wheat, that contain the elements $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$ or $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Araf(1}\rightarrow 2)][\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow 3)]\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$. *Carbohydr Res* **221**:63-81 (1991).
- Hoffmann RA, Kamerling JP & Vliegthart JFG, Structural features of a water-soluble arabinoxylan from the endosperm of wheat. *Carbohydr Res* **226**:303-311 (1992a).
- Hoffmann RA, Geijtenbeek T, Kamerling JP & Vliegthart JFG, ^1H -N.m.r. study of enzymically generated wheat-endosperm arabinoxylan oligosaccharides: structures of hepta- to tetradeca-

- saccharides containing two or three branched xylose residues. *Carbohydr Res* **223**:19-44 (1992b).
- Iiyama K, Lam TBT, Meikle PJ, Ng K, Rhodes D & Stone BA, Cell wall biosynthesis and its regulation, in *Forage cell wall structure and digestibility*, (Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD & Ralph J, Eds). ASA-CSSA-SSSA, Madison, 621-683 (1993).
- Iiyama K, Lam TB-T & Stone BA, Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* **104**:315-320 (1994).
- Ishii T, Hiroi T & Thomas JR, Feruloylated xyloglucan and *p*-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry* **29**:1999-2003 (1990).
- Ishii T & Hiroi T, Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell walls. *Carbohydr Res* **196**:175-183 (1990a).
- Ishii T & Hiroi T, Linkage of phenolic acids to cell wall polysaccharides of bamboo shoot. *Carbohydr Res* **206**:297-310 (1990b).
- Ishii T, Acetylation of *O*-2 of arabinofuranose residues in feruloylated arabinoxylan from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry* **30**:2317-2320 (1991a).
- Ishii T, Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan from bamboo shoot cell walls. *Carbohydr Res* **219**:15-22 (1991b).
- Ishii T & Tobita T, Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell walls. *Carbohydr Res* **248**:179-190 (1993).
- Ishii T, Feruloyl oligosaccharides from cell walls of suspension cultured spinach (*Spinacia oleracea*) cells and sugar beet (*Beta vulgaris*) pulp. *Plant Cell Physiol* **35**:701-704 (1994).
- Ishii T, Isolation and characterization of a *p*-coumaroyl arabinoxylan tetrasaccharide from bamboo shoot cell walls. *Mokuzai Gakkaishi* **42**:515-519 (1996).
- Ishii T, Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci* **127**:111-127 (1997).
- Izydorczyk MS and Biliaderis CG, Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr Polym* **28**:33-48 (1995).
- Jacquet G, Pollet B & Lapierre C, New ether-linked ferulic acid–coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J Agric Food Chem* **43**:2746-2751 (1995).
- Jung HG, Fahey GC & Garst JE, Simple phenolic monomers of forages and effects of in-vitro fermentation on cell wall phenolics. *J Anim Sci* **57**:1294-1305 (1983).
- Kamisaka S, Takeda S, Takahashi K & Shibata K, Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles – their relationships to mechanical properties of the wall. *Physiol Plant* **78**:1-7 (1990).
- Karplus M, Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J Chem Phys* **30**:11-15 (1959).
- Karplus M, Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J Amer Chem Soc* **85**:2870-2871 (1963).

- Kato A, Azuma J & Koshijima T, A new feruloylated trisaccharide from bagasse. *Chem Letters* 137-140 (1983).
- Kato A & Nevins DJ, Isolation and identification of *O*-(5-*O*-feruloyl- α -L-arabinofuranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. *Carbohydr Res* **137**:139-150 (1985).
- Kato A, Azuma J & Koshijima T, Isolation and identification of a new feruloylated tetrasaccharide from bagasse lignin-carbohydrate complex containing phenolic acid. *Agric Bio Chem* **51**:1691-1693 (1987).
- Kroon PA, Garcia Conesa MT, Colquhoun IJ & Williamson G, Process for the isolation of preparative quantities of [2-*O*-(*trans*-feruloyl)- α -L-arabinofuranosyl]-(1 \rightarrow 5)-L-arabinofuranose from sugarbeet. *Carbohydr Res* **300**:351-354 (1997a).
- Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Robertson JA & Williamson G, Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J Agric Food Chem* **45**:661-667 (1997b).
- Kroon PA, Garcia-Conesa MT, Fillingham IJ, Hazlewood GP & Williamson G, Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J Sci Food Agric* **79**:428-434 (1999).
- Kroon PA, What role for feruloyl esterases today? *Polyphénols Actualités* **19**:4-5 (2000).
- Lam TBT, Iiyama K & Stone BA, Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *phalaris* internodes. *Phytochemistry* **31**:1179-1183 (1992a) .
- Lam TBT, Iiyama K & Stone BA, Changes in phenolic acids from internode walls of wheat and *phalaris* during maturation. *Phytochemistry* **31**:2655-2658 (1992b).
- Lempereur I, Surget A & Rouau X, Variability in dehydrodiferulic acid composition of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and distribution in milling fractions. *J Cereal Sci* **28**:251-258 (1998).
- Lethonen K & Ketola M, Derivatization of phenolic acids for capillary gas chromatography with hydrogen flame ionization and electron-capture detection. *J Chromatogr* **370**:465-473 (1986).
- Markwalder HU & Neukom H, Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* **15**:836-837 (1976).
- McCallum JA, Taylor IEP & Towers GHN, Spectrophotometric assay and electrophoretic detection of *trans*-feruloyl esterase activity. *Anal Biochem* **196**:360-366 (1991).
- McDougall GJ, Morrison IM, Stewart D & Hillman JR, Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *J Sci Food Agric* **70**:133-150 (1996).
- Meyer K, Köhler A & Kauss H, Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS Lett* **290**:209-212 (1991).
- Micard V, Grabber JH, Ralph J, Renard CMGC & Thibault J-F, Dehydrodiferulic acids from sugarbeet pulp. *Phytochemistry* **44**:1365-1368 (1997).

- Müller-Harvey I, Hartley RD, Harris PJ & Curzon EH, Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr Res* **148**:71-85 (1986).
- Myton KE & Fry SC, Intraprotoplasmic feruloylation of arabinoxylans in *Festuca arundinacea* cell cultures. *Planta* **193**:326-330 (1994).
- Ng A, Greenshields RN & Waldron KW, Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: formation of ferulic acid dehydrodimers. *Carbohydr Res* **303**:459-462 (1997).
- Nishizawa C, Ohta T, Egashira Y & Sanada H, Ferulic acid contents in typical cereals. *J Jpn Soc Food Sci Technol* **45**:499-503 (1998).
- Nordkvist E, Salomonsson A-C & Åman P, Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *J Sci Food Agric* **35**:657-661 (1984).
- Ohashi H, Yamamoto E, Lewis NG & Towers GHN, 5-Hydroxyferulic acid in *Zea mays* and *Hordeum vulgare* cell walls. *Phytochemistry* **26**:1915-1916 (1987).
- Ohta T, Yamasaki S, Egashira Y & Sanada H, Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. *J Agric Food Chem* **42**:653-656 (1994).
- Packert M, Analytik und Bedeutung gebundener aromatischer Carbonsäuren der Nahrungsfaser aus Getreide und anderen Nutzpflanzen. *Dissertation*. Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie (1993).
- Packert M & Steinhart H, Separation and identification of some monomeric and dimeric phenolic acids by a simple gas chromatographic method using capillary column and FID-MSD. *J Chromatogr Sci* **33**:631-639 (1995).
- Parr AJ, Waldron KW, Ng A & Parker ML, The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J Sci Food Agric* **71**:501-507 (1996).
- Parr AJ, Ng A & Waldron KW, Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *J Agric Food Chem* **45**:2468-2471 (1997).
- Plaami SP, Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev Int* **13**:29-76 (1997).
- Prosky L, Asp N-G, Furda I, deVries JW, Schweizer TF & Harland BF, Determination of total dietary fiber in foods and food products and total diets: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* **67**:1044-1053 (1984).
- Prosky L, Asp N-G, Furda I, deVries JW, Schweizer TF & Harland BF, Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* **68**:677-679 (1985).
- Prosky L, Asp N-G, Schweizer TF, deVries JW & Furda I, Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* **71**:1017-1023 (1988).
- Prosky L, Asp N-G, Schweizer TF, deVries JW & Furda I, Determination of soluble and insoluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J AOAC Int* **75**:360-367 (1992).

- Prosky L, Asp N-G, Schweizer TF, deVries JW & Furda I, Determination of soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J AOAC Int* **77**:690-694 (1994).
- Quideau S, *Ph.D. Thesis*, University of Wisconsin-Madison, USA (1994).
- Quideau S & Ralph J, A biomimetic route to lignin model compounds *via* silver (I) oxide oxidation. *Holzforschung* **48**:12-22 (1994).
- Quideau S & Ralph J, Lignin-ferulate cross-links in grasses. Part 4. Incorporation of 5-5-coupled dehydrodiferulate into synthetic lignin. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 2351-2358 (1997).
- Quigley ME & Englyst HN, Determination of the uronic acid constituents of non-starch polysaccharides by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Analyst* **119**:1511-1518 (1994).
- Rafter JJ, Eng VWS, Furrer R, Medline A & Bruce WR, Effects of calcium and pH of the mucosal damage produced by deoxycholic acid in the rat colon. *Gut* **27**:1320 (1986).
- Ralet M-C, Thibault J-F, Faulds CB & Williamson G, Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr Res* **263**:227-241 (1994).
- Ralph J, Helm RF, Quideau S & Hatfield RD, Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 2961-2967 (1992a).
- Ralph J, Helm RF & Quideau S, Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 2. Model compound syntheses. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 2971-2980 (1992b).
- Ralph J, Quideau S, Grabber JH & Hatfield RD, Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 3485-3498 (1994).
- Ralph J, Grabber JH & Hatfield RD, Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr Res* **275**:167-178 (1995).
- Ralph J, Garcia Conesa MT & Williamson G, Simple preparation of 8-5-coupled diferulate. *J Agric Food Chem* **46**:2531-2532 (1998).
- Renger A, Phenolische Carbonsäuren als Cross-links in unlöslicher Getreidenahrungsfaser unter besonderer Berücksichtigung von technologischen Prozessen. *Dissertation*. Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie (1999).
- Renger A & Steinhart H, Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *Eur Food Res Technol* **211**:422-428 (2000).
- Rybka K, Sitarski J & Raczynska-Bojanowska K, Ferulic acid in rye and wheat grain and grain dietary fibre. *Cereal Chem* **70**:55-59 (1993).
- Ryden P & Robertson JA, The effect of fibre source and fermentation on the apparent hydrophobic binding properties of wheat bran preparations for the mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *Carcinogenesis* **16**:209-216 (1995a).

- Ryden P & Robertson JA, The consequences of fruit and vegetable fibre fermentation on their binding capacity for MeIQx and the effects of soluble fibre sources on the binding affinity of wheat bran preparations. *Carcinogenesis* **16**:1711-1716 (1995b).
- Saeman JF, Bubl LJ & Harris EE, Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industr Engin Chem* **17**:35-37 (1954).
- Sánchez M, Peña MJ, Revilla G & Zarra I, Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyls. *Plant Physiol* **111**:941-946 (1996).
- Sarkanen KV & Ludwig CH, *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience, New York (1971).
- Saulnier L, Vigouroux J & Thibault J-F, Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydr Res* **272**:241-253 (1995).
- Saulnier L & Thibault J-F, Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J Sci Food Agric* **79**:396-402 (1999).
- Saulnier L, Crépeau M-J, Lahaye M, Thibault J-F, Garcia-Conesa MT, Kroon PA & Williamson G, Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled diferulates. *Carbohydr Res* **320**:82-92 (1999).
- Scalbert A, Monties B, Lallemand J-Y, Guittet E & Rolando C, Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* **24**:1359-1362 (1985).
- Scalbert A, Monties B, Rolando C & Sierra-Escudero A, Formation of ether linkage between phenolic acids and Gramineae lignin: a possible mechanism involving quinone methides. *Holzforschung* **40**:191-195 (1986).
- Scheppach W, Ernährungsmedizinische Bedeutung von komplexen Kohlenhydraten, in *Kohlenhydrate in der Ernährungsmedizin unter besonderer Berücksichtigung des Zuckers*, (Kluthe R & Kasper H, Eds). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 19-23 (1996).
- Schneeman BO, Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutr Res* **18**:625-632 (1998).
- Schrezenmeir J, Kohlenhydrate und Diabetes und Dyslipoproteinämie, in *Kohlenhydrate in der Ernährungsmedizin unter besonderer Berücksichtigung des Zuckers*, (Kluthe R & Kasper H, Eds). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 36 (1996).
- Selvendran RR & MacDougall AJ, Cell-wall chemistry and architecture in relation to sources of dietary fibre. *Eur J Clin Nutr* **49**:S27-S41 (1995).
- Shibuya N, Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* **23**:2233-2237 (1984).
- Smith MM & Hartley RD, Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr Res* **118**:65-80 (1983).

- Syrjänen K & Brunow G, Oxidative cross-coupling of *p*-hydroxycinnamic alcohols with dimeric arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds. The effect of oxidation potentials. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 3425-3429 (1998).
- Tanner GR & Morrison IM, Phenolic-carbohydrate complexes in the cell walls of *Lolium perenne*. *Phytochemistry* **22**:1433-1439 (1983).
- Theander O, Westerlund E & Åman P, Structure and components of dietary fiber. *Cereal Foods World* **38**:135-141 (1993).
- Theander O, Åman P, Westerlund E, Andersson R & Petterson D, Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (The Uppsala method): collaborative study. *JAOAC Int* **78**:1030-1044 (1995).
- Trowell HC, Crude fibre, dietary fibre, and arteriosclerosis. *Atherosclerosis* **16**:138 (1972a).
- Trowell HC, Ischemic heart disease and dietary fibre. *Am J Clin Nutr* **25**:926-932 (1972b).
- Trowell HC, Definition of dietary fibre. *Lancet* **i**:503 (1974).
- Trowell HC, Southgate DAT, Wolever, TMS, Leeds AR, Gassull MA & Jenkins DJA, Dietary fibre redefined. *Lancet* **a**: 967 (1976).
- Turner LB, Mueller-Harvey I & McAllan AB, Light induced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. *Phytochemistry* **33**:791-796 (1993).
- Vinkx CJA & Delcour JA, Rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans: A critical review. *J Cereal Sci* **24**:1-14 (1996).
- Waksman SA & Cordon TC, A method for studying decomposition of isolated lignin, and the influence of lignin on cellulose decomposition. *Soil Sci* **45**:199-206 (1938).
- Waldron KW, Parr AJ, Ng A & Ralph J, Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem Anal* **7**:305-312 (1996).
- Waldron KW, Ng A, Parker ML & Parr AJ, Ferulic acid dehydrodimers in the cell wall of beta vulgaris and their possible role in texture. *J Sci Food Agric* **74**:221-228 (1997a).
- Waldron KW, Smith AC, Parr AJ, Ng A & Parker ML, New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends Food Sci Technol* **8**:213-221 (1997b).
- Wallace G, Russell WR, Lomax JA, Jarvis MC, Lapierre C & Chesson A, Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydr Res* **272**:41-53 (1995).
- Wende G & Fry SC, *O*-Feruloylated, *O*-acetylated oligosaccharides as sidechains of grass xylans. *Phytochemistry* **44**:1011-1018 (1997a).
- Wende G & Fry SC, 2-*O*- β -D-Xylopyranosyl-(5-*O*-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry* **44**:1019-1030 (1997b).
- Wilson JR, Organization of forage plant tissues, in *Forage cell wall structure and digestibility*, (Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD & Ralph J, Eds). ASA-CSSA-SSSA, Madison, 1-32 (1993).

- Woolard GR, Rathbone EB & Novellie L, Structural studies on a glucuronoarabinoxylan from the husk of sorghum grain. *Carbohydr Res* **51**:239-247 (1976).
- Yamamoto E & Towers GHN, Cell wall bound ferulic acid in barley seedlings during development and its photoisomerization. *J Plant Physiol* **117**:441-449 (1985).
- Yamamoto E, Bokelman GH & Lewis NG, Phenylpropanoid metabolism in cell walls. An overview, in *Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation*, (Lewis NG & Paice MG, Eds). ACS, Washington, DC, 68-88 (1989).
- Zanger M, The determination of aromatic substitution patterns by nuclear magnetic resonance. *Org Magn Reson* **4**:1-25 (1972).
- Zupfer JM, Churchill KE, Rasmusson DC & Fulcher RG, Variation in ferulic acid concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry. *J Agric Food Chem* **46**:1350-1354 (1998).