
**Einfluss von Lignin und Ferulasäurederivaten
auf die Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen
und den fermentativen Abbau
durch die menschliche Darmflora**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
Abteilung für Lebensmittelchemie
vorgelegt von

Carola Funk
aus Hamburg

Hamburg 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis Oktober 2006 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung für Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

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

Tag der Disputation: 21.12.2007

Prüfungskommission:
Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
Prof. Dr. E. Stahl-Biskup
Dr. M. Körs

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanken.

Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die bereitwillige Durchsicht meiner Arbeit als Zweitgutachter.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Mirko Bunzel, dem ich nicht nur das Thema meiner Doktorarbeit zu verdanken habe, sondern der mich und meine Arbeit auch maßgeblich geprägt hat. Ich habe durch ihn eine großartige wissenschaftliche Unterstützung erfahren. Ebenso schätze ich sehr seinen Humor und die Freundschaft, die sich im Laufe unserer gemeinsamen Jahre an der Universität Hamburg entwickelt hat. Sehr dankbar bin ich ihm für die unvergesslichen USA-Forschungsaufenthalte, die er mir ermöglicht hat.

Bei Ella Allerdings, Andreas Heinze, Reiko Yonekura und ganz besonders bei Diane Dobberstein und Diana Gniechwitz bedanke ich mich für eine tolle gemeinsame Laborzeit. Es ist viel Wert, wenn im Labor nicht nur alle fachlichen Fragen diskutiert werden können, sondern die Arbeit ebenso mit so guten Freundschaften - auch über das Labor hinaus - eng verbunden ist.

Ebenso bedanke ich mich bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen der Lebensmittelchemie Hamburg für die schönen Jahre, insbesondere bei Sabine Gremmel, mit der ich einen langen Weg gemeinsam gegangen bin.

Zu großem Dank bin ich Patrick Weber, Janina Thilker und Juliane Peters verpflichtet, die diese Arbeit mit viel Engagement unterstützt haben. Es war eine sehr schöne Zeit mit ihnen.

Special thanks go to Prof. Dr. John H. Grabber, Christy Davidson, Prof. Dr. John and Sally Ralph for supervising and helping me with my research studies at the U.S. Dairy Forage Research Center in Madison and for being so great hosts. I also thank Dr. Ronald Hatfield, Dr. Jane Marita, Dr. Hoon Kim and Dr. Fachuang Lu for the kind support.

Der H. Wilhelm-Schaumann-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung beider Forschungsaufenthalte am U.S. Dairy Forage Research Center in Madison, USA.

Des Weiteren danke ich Dr. Annett Braune, die mir die Durchführung der Fermentationsstudien am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke ermöglicht hat, für die gute Zusammenarbeit.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Familie, auf deren Unterstützung und Hilfe ich mich jederzeit verlassen konnte.

Schließlich sei allen fleißigen Korrektur-Lesern dieser Arbeit gedankt!

Meinen drei Funken

INHALTSVERZEICHNIS

A.	Abkürzungsverzeichnis	III
B.	Gefahrstoffliste	VI
1	EINLEITUNG	1
2	ALLGEMEINER TEIL	2
2.1	Ballaststoffe	2
2.1.1	<i>Definition von Ballaststoffen</i>	2
2.1.2	<i>Ballaststoffe im menschlichen Gastrointestinaltrakt</i>	2
2.1.2.1	<i>Ballaststoffe im Dünndarm</i>	2
2.1.2.2	<i>Ballaststoffe im Dickdarm</i>	3
2.2	Pflanzenzellwände	4
2.2.1	<i>Aufbau von Pflanzenzellwänden</i>	5
2.2.1.1	<i>Kohlenhydratzusammensetzung</i>	5
2.2.1.2	<i>Zellwandgebundene Ferulasäure</i>	7
2.2.1.3	<i>Lignin</i>	12
2.2.2	<i>Zellwand-Modellsysteme</i>	17
2.3	Heterozyklische aromatische Amine	18
2.3.1	<i>Struktur und Vorkommen</i>	18
2.3.2	<i>Mutagenität und Kanzerogenität</i>	20
2.3.3	<i>Adsorption an Ballaststoffe</i>	22
2.4	Gallensäuren	23
2.4.1	<i>Struktur und Vorkommen</i>	23
2.4.2	<i>Physiologische Eigenschaften von Gallensäuren</i>	26
2.4.3	<i>Adsorption an Ballaststoffe</i>	27
2.5	Zielsetzung der Arbeit	28
2.6	Literatur	30
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Isolierung und Strukturcharakterisierung der 8-O-4/8-O-4- und 8-8/8-O-4-gekoppelten Dehydrotriferulasäuren aus Maiskleie	41
3.2	Untersuchung des Einflusses zellwandgebundener Ferulasäure sowie von Di- und Triferulasäuren auf den Abbau von Maiszellwänden durch die humane Darmmikrobiota	56
3.3	Bestimmung des Einflusses der Lignifizierung und des Gehaltes an Ferulasäurederivaten von Maiszellwänden auf die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Aminen	69
3.4	Studien zum Abbau lignifizierter Zellwände durch die menschliche Darmflora und Einfluss auf die Adsorption heterozyklischer aromatischer Amine	86
3.5	Untersuchung eines möglichen Einflusses der Lignifizierung von Maiszellwänden auf die Adsorption von Gallensäuren	99

4	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	112
4.1	Ferulasäure und ihre oligomeren Verbindungen.....	112
4.1.1	<i>Strukturanalyse oligomerer Ferulasäureverbindungen.....</i>	112
4.1.2	<i>Einfluss von Ferulasäure und Diferulasäure-Cross-Links auf die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Aminen an Ballaststoffe.....</i>	116
4.1.3	<i>Einfluss von Ferulasäure und Diferulasäure-Cross-Links auf den fermentativen Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota</i>	119
4.2	Lignin	122
4.2.1	<i>Einfluss von Lignin auf die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Aminen an Ballaststoffe.....</i>	122
4.2.2	<i>Einfluss von Lignin auf die Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe.....</i>	125
4.2.3	<i>Einfluss von Lignin auf den fermentativen Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota</i>	127
4.3	Literatur.....	129
5	ZUSAMMENFASSUNG	136
	SUMMARY.....	139
6	ANHANG.....	142
6.1	Liste der Publikationen.....	142
6.2	Liste der Vorträge	143
6.3	Liste der Poster	143

A. Abkürzungsverzeichnis

A ^A	Arabiose
AαC	2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol / 2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indole
AACC	American Association of Cereal Chemists
ABSL ^T	Acetylbromid-lösliches Lignin
AIP	2-Aminoindan-2-phosphonsäure / 2-Aminoindan-2-phosphonic acid
AP	Atmospheric pressure
aq.	Aqueous
Araf ^A	Arabinofuranose
BHI	Brain heart infusion
brd	Broad doublet
bs	Broad singlet
CAD ^A	Zimtalkohol-Dehydrogenase
CAld-5H ^A	Coniferaldehyd-5-Hydroxylase
CAld-OMT ^A	5-Hydroxyconiferaldehyd-O-Methyltransferase
CCoAOMT ^A	Kaffeoyl-CoA-O-Methyltransferase
CCR ^A	Cinnamoyl-CoA-Reduktase
C3H ^A	<i>p</i> -Cumarsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
4CL ^A	4-Cumarsäure:CoA-Ligase
ClogP	Berechneter Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen 1-Octanol und Wasser / Calculated logarithm of the partition coefficient
COMT ^A	Kaffeesäure-O-Methyltransferase
COSY	Correlated spectroscopy
CW ^{A,T}	Cell walls
d ^T	Doublet
DAD	Dioden-Array-Detektor / Diode array detector
dd ^T	Doublet of doublets
DFA ^A	Dehydrodiferulic acid
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinoxalin
DHP	Dehydrogenierungs-Polymer / Dehydrogenation polymer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ESI	Electrospray ionization
Et ₂ O	Diethyl ether
F5H ^A	Ferulasäure-5-Hydroxylase
FID	Flame ionization detector
FS ^A	Ferulasäure
G	Guaiacyl
GalpA ^A	Galacturonsäure (Pyranose)
GC	Gas chromatograph(y)
GlcP ^A	Glucopyranose
Glu-P-1 ^{A,T}	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol

Glu-P-2 ^{A,T}	2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazol
GPC	Gel permeation chromatography
Harman (H)	1-Methyl-9 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indol
HAA	Heterozyklische aromatische Amine / Heterocyclic aromatic amines
HAR ^A	Heterozyklischer aromatischer Rest
HCT ^A	<i>p</i> -Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase
HD	High density
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HOMOPIPES	Homopiperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie / High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinolin / 2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline
J	Coupling constant
k.A.n. ^A	Keine Adsorption nachweisbar
KBE	Koloniebildende Einheiten
max. ^T	Maximal
MeAcC ^{A,T}	2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indol
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinolin
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinoxalin / 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie / Mass spectrometry
m/z	Mass/charge ratio
n.b. ^T	Nicht bestimmt
n.d. ^T	Not unambiguously detected or not determined, respectively
Norharman (NH)	9 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indol
NMR	Kernresonanzspektroskopie / Nuclear magnetic resonance spectroscopy
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PBS	Phosphate-buffered saline
PHIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin / 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
PS ^A	Polysaccharid
Rhap ^A	Rhamnopyranose
ROESY	Rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
RP	Reversed Phase
s ^T	Singlet
S	Syringyl
SAD ^A	Sinapylalkohol-Dehydrogenase
SPE	Solid phase extraction

TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indol
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indol
UV	Ultraviolett / Ultraviolet
UVD	Ultraviolet detection
X ^A	Xylose
Xylp ^A	Xylopyranose
δ ^T	Chemical shift

^A nur in Abbildungen

^T nur in Tabellen

B. Gefahrstoffliste

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	F, Xn	10-20/21/22-36	16-36/37
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-chinoxalin (MeIQx)	vermutlich kanzerogen für den Menschen (IARC ^a)		
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]-chinolin (IQ)	vermutlich kanzerogen für den Menschen (IARC ^a)		
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)	wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen (IARC ^a)		
2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol (AαC)	vermutlich kanzerogen für den Menschen (IARC ^a)		
Ammoniak	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Calciumchlorid-Dihydrat	Xi	36	26
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Coniferaldehyd	Xi	36/37/38	26-37/39
o-Cumarsäure	Xi	36/37/38	-
Deoxycholsäure	Xn	22-36/37/38	26-36
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Xn	22-37-41-43-52/53	24/25-26-36/37/39-46-61
Diethylether	Xn, F ⁺	12-19-22-66-67	2-9-16-29-67
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Dinatriumtetraborat	-	-	24/25
meso-Erythrit	Xi	36/37/38	26-36
Essigsäure, 100 %	C	10-35	23.2-26-45
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22/34	26-36/37/39-45
Ethanol, 96 %	F	11	7-16
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Glucoseoxidase, 151 000 units/g	Xn	42	22-45
Guaiacol	Xn	22-36/38	26
Homopiperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (HOMOPIPES)	C	21-34	26-36/37/39-45
3-Hydroxybiphenyl, 90 %	Xi	36/37/38	-
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
1-Methylimidazol	C	21/22-34	26-36-45
Murashige & Skoog Basal Medium	O, Xi	8-36/37/38	17-26-36

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Natriumborhydrid	F, T	15-25-34	14.2-26-36/37/39-43.6-45
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
o-Phosphorsäure, 85 %	C	34	26-36/37/39/45
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure), Sesquinatrimmsalz (PIPES)	-	-	22-24/25
Salzsäure, 37 %	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure, 95-98 %	C	35	26-30-45
Toluol	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Wasserstoffperoxid, 30 %	Xn	22-41	26-39

^a IARC: International Agency of Research on Cancer

1 EINLEITUNG

Die Entstehung des Begriffes Ballaststoffe reicht in das 19. Jahrhundert zurück, als Ballaststoffe als unverdaubare und daher überflüssige Lebensmittelbestandteile galten. Erst 100 Jahre später wurden erste Vermutungen veröffentlicht, dass Ballaststoffe einen wesentlichen Beitrag zur Gesunderhaltung des menschlichen Körpers leisten. Mittlerweile wurden Ballaststoffe mit zahlreichen ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften korreliert. Trotz ausgeprägter Forschungsaktivitäten herrschen auf dem Gebiet der Ballaststoffe jedoch nach wie vor viele Unklarheiten. Dies spiegelt sich darin wieder, dass es keine offizielle Definition des Begriffes Ballaststoffe gibt und existierende Definitionen kontinuierlich diskutiert werden. Des Weiteren ist die Struktur vieler Ballaststoffkomponenten, wie z. B. Suberin, Lignin oder die Quervernetzung von Polysacchariden, aufgrund ihrer Komplexität und Variabilität bis heute nicht ins Detail aufgeklärt. Entsprechend schwierig gestaltet sich die Erforschung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Die Untersuchung von Wirkungsmechanismen der Ballaststoffe in epidemiologischen Studien (Kohorten-/Fall-Kontroll-Studien) führt im Allgemeinen nur zu sehr unspezifischen Ergebnissen. Aussagen über Effekte spezieller Ballaststoffkomponenten sind kaum möglich. Trotz dieser Schwierigkeiten konnten einige ernährungsphysiologische Eigenschaften von Ballaststoffen bzw. ihren Komponenten anhand von epidemiologischen Studien, ergänzt durch *in vitro*-Studien, gut belegt werden. Andere Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden wiederum nach wie vor kontrovers diskutiert. Hier besteht neben den die Ballaststoffstrukturen betreffenden Wissenslücken vor allem die Problematik, gemessene Effekte direkt mit einzelnen Ballaststoffkomponenten zu korrelieren. Da Ballaststoffkomponenten im Allgemeinen eng verbunden mit dem sie natürlich umgebenden Ballaststoff-Netzwerk vorliegen, ist die umgebende Matrix stets als zusätzlicher unbekannter Einflussfaktor zu berücksichtigen. Isolierte Ballaststoffkomponenten wiederum zeigen oftmals veränderte Eigenschaften, sodass sie zur Simulierung natürlich vorliegender Bedingungen nur begrenzt geeignet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zum einen ein Beitrag zur Strukturaufklärung von zellwandgebundenen Triferulasäuren als Polysaccharid-Cross-Links geleistet werden. Im Mittelpunkt der Arbeit steht jedoch die gezielte *in vitro*-Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen anhand eines Maiszellwand-Modellsystems. Als Strukturkomponenten sind hierbei Lignin sowie Ferulasäure und ihre oligomeren Verbindungen von Interesse. Beide Strukturmerkmale können in den isolierten Maiszellwänden, der Zielsetzung entsprechend, bei gleich bleibender „Restzellwandmatrix“ manipuliert werden. Der Wirkungsmechanismus, auf den sich diese Arbeit im Wesentlichen bezieht, ist die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Aminen (HAA) und Gallensäuren an Ballaststoffe im menschlichen Gastrointestinaltrakt und ein dadurch begünstigter Transport aus dem Körper. Die Adsorption von HAA wird z. B. in Zusammenhang mit einem verminderten Krebsrisiko diskutiert, wohingegen die Adsorption von Gallensäuren vor allem in Hinblick auf eine Senkung des Cholesterinspiegels wünschenswert scheint. Als weiterer Wirkungsmechanismus, der ebenfalls in Verbindung mit einer Krebsprävention (vor allem den Dickdarm betreffend) diskutiert wird, soll der Effekt der genannten Ballaststoffstrukturen auf die Fermentation von Pflanzenzellwänden durch humane Darmmikroorganismen untersucht werden.

2 ALLGEMEINER TEIL

2.1 Ballaststoffe

Der Verzehr von Ballaststoffen wird im Allgemeinen mit einer Vielzahl ernährungsphysiologisch positiver zu bewertender Effekte korreliert. Hieraus resultierend empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung eine tägliche Ballaststoffaufnahme von mindestens 30 g. In der menschlichen Ernährung erfolgt die Aufnahme von Ballaststoffen vor allem über den Verzehr von Pflanzenzellwänden (Kap. 2.2), insbesondere denen von Getreide.

2.1.1 Definition von Ballaststoffen

Der Begriff Ballaststoffe beschreibt gemäß der American Association of Cereal Chemists (AACC) die essbaren Teile von Pflanzen oder analogen Kohlenhydraten, die gegen die Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und vollständig oder teilweise im Dickdarm fermentiert werden. Zu Ballaststoffen zählen folglich Polysaccharide, Oligosaccharide, Lignin und andere assoziierte Pflanzenkomponenten (1). Die Gruppe der Ballaststoffe ist somit sehr heterogen. Zudem sind die Strukturen einzelner Ballaststoffkomponenten wie z. B. Lignin äußerst komplex und variabel und sind bislang nicht immer erschöpfend aufgeklärt.

Beachtenswert ist, dass die AACC Ballaststoffe zusätzlich über ihre ernährungsphysiologischen Eigenschaften definiert. So fördern Ballaststoffe definitionsgemäß positive physiologische Effekte wie abführende Wirkungen und/oder Senkung des Blutcholesterins und/oder Senkung des Blutzuckers. Auf die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen wird im Einzelnen in Kapitel 2.1.2 eingegangen.

Da der Begriff „Ballaststoffe“ im Widerspruch zu der ernährungsphysiologischen Relevanz von Ballaststoffen zu stehen scheint, findet im heutigen Sprachgebrauch auch oftmals der Begriff „Nahrungsfaser“, abgeleitet von dem englischen dietary bzw. nutritional fiber, Verwendung.

2.1.2 Ballaststoffe im menschlichen Gastrointestinaltrakt

2.1.2.1 Ballaststoffe im Dünndarm

Nach der oralen Aufnahme und Passage durch den Magen gelangen Ballaststoffe in den Dünndarm, wo sie das Duodenum, das Jejunum und schließlich das Ileum passieren. Der Großteil des Dünndarms unterliegt im Vergleich zum Dickdarm lediglich einer dünnen Besiedelung durch Mikroorganismen. Schätzungsweise liegen im Duodenum und Jejunum 10^2 - 10^5 koloniebildende Einheiten (KBE)/mL vor, während die Zahl der Mikroorganismen im Verlaufe des Ileums auf ca. 10^8 KBE/mL ansteigt (2). Der Anstieg der Mikroorganismenbesiedelung geht einher mit einem pH-Wert-Anstieg von durchschnittlich 6,5 im Duodenum (wo aufgrund der eintretenden Magensäure auch ein deutlich niedrigerer pH-Wert vorliegen kann) bis hin zu ca. 7,5 im Ileum (2, 3). Im Duodenum sind die Arten der Mikroorganismen vor allem auf solche Arten beschränkt, die gut an den relativ niedrigen pH-Wert angepasst sind.

Hierzu zählen z. B. Lactobazillen, Streptokokken, Bifidobakterien, Enterobakterien, Staphylokokken und Hefen. Im Ileum nimmt die Vielfalt der Mikroorganismen zu. Neben den bereits genannten Arten sind z. B. auch Clostridien zu finden sowie bedeutsame Mengen von Vertretern der Gattung *Bacteroides*. Die Bifidobakterien stellen die wichtigste Gruppe dar (2). Die in ihrer Zahl und Vielfalt beschränkte Mikrobiota des Dünndarms, ausgenommen des Ileums, reicht nicht aus, um die komplexen Ballaststoffe abzubauen. Ebenso unterliegen die Ballaststoffe aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes keiner Absorption. Dies führt zu einem erhöhten Gewicht des Darminhaltes und einem größeren Stuhlvolumen (Bulking-Effekt) und bewirkt außerdem eine Verzögerung der Absorption von Lipiden und Glucose aus der Nahrung. Dies wiederum wirkt sich z. B. positiv auf den postprandialen Blutglucosespiegel aus (1, 4-6). Da Ballaststoffe durch die Enzyme des Dünndarms nicht abgebaut werden, können sie bei entsprechenden Adsorptionseigenschaften für endogene bzw. exogene Substanzen diese aus dem Dünndarm transportieren. Dieser Mechanismus wird für verschiedenste Substanzen diskutiert. So wird aufgrund von *in vitro*-Studien angenommen, dass Ballaststoffe vor allem hydrophobe kanzerogene Substanzen wie z. B. HAA adsorbieren und ohne Absorption durch den Dünndarm und im Idealfall durch den Dickdarm befördern und aus dem Körper heraus transportieren können (Kap. 2.3.3). Analog wird die Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe diskutiert. Die verringerte Gallensäurekonzentration im Dünndarm hätte eine verstärkte Gallensäureproduktion und dadurch bedingt eine Senkung des Cholesterinspiegels zur Folge (Kap. 2.4.3) (4, 5, 7, 8).

2.1.2.2 Ballaststoffe im Dickdarm

Das Kolon ist mit ca. 10^{10} bis 10^{12} KBE/g der am dichtesten besiedelte Abschnitt des menschlichen Gastrointestinaltraktes. Die Artenvielfalt der im Allgemeinen anaeroben Mikrobiota übertrifft die in den anderen Darmabschnitten bei weitem und umfasst ca. 400 - 500 unterschiedliche Bakterienspezies. Neben den bereits im Dünndarm angesiedelten Arten (Kap. 2.1.2.1) sind z. B. Eubakterien, Peptostreptokokken und Fusobakterien zu finden. Trotz der Artenvielfalt machen nur ca. 30 - 40 Spezies 99 % der Bakterienmasse aus (2).

Für die Fermentation von Ballaststoffen und insbesondere der komplexen Kohlenhydrate im Kolon spielen neben Ruminokokken, Eubakterien und Peptostreptokokken vor allem die Vertreter der Gattung *Bacteroides* eine wesentliche Rolle. Ihre Enzyme wie z. B. Xylanasen, β -Glucanasen und Polygalacturonasen bewirken eine Spaltung der entsprechenden Polysaccharide zu Oligo- und Monosacchariden. Die Monosaccharide werden im Wesentlichen zu Wasserstoff, Kohlendioxid, Methan und den kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat und in geringen Mengen zu Formiat, Valerat und Caproat abgebaut. Während die Gase über die Lunge oder den Anus ausgeschieden werden, unterliegen die kurzkettigen Fettsäuren im Kolon zum großen Teil der Absorption. Die Fermentation von Kohlenhydraten findet bevorzugt bereits im terminalen Ileum sowie im proximalen Kolon statt. Dies führt aufgrund der Säureproduktion zu einer pH-Wert-Absenkung. Zum distalen Kolon hin nimmt die Menge der abbaubaren Kohlenhydrate ab und der pH-Wert steigt wieder auf ca. 7 an (2-4).

Die Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Kolon wird mit einer Reihe positiver Effekte auf die menschliche Gesundheit in Verbindung gebracht. Zum einen vermindert ein durch die Säure-

reproduktion reduzierter pH-Wert das Wachstum und die Toxinproduktion einiger unerwünschter Bakterien (z. B. *Clostridium difficile*), wohingegen erwünschte Spezies wie Bifidobakterien und Lactobazillen in ihrem Wachstum gefördert werden können (9). Ein schwach saures Milieu reduziert außerdem die Löslichkeit sekundärer Gallensäuren, die teilweise als tumorfördernd diskutiert werden. Hinzu kommt, dass das Enzym 7- α -Dehydroxylase, das im Kolon für die Transformation primärer in sekundäre Gallensäuren verantwortlich ist, durch pH-Werte < 6 gehemmt wird (6, 7). Von den gebildeten kurzkettigen Fettsäuren hat Butyrat eine besondere Bedeutung. Es wird für die Verminderung von Tumorzellwachstum und -proliferation sowie die Induktion der Differenzierung und Apoptose von Tumorzellen verantwortlich gemacht (6, 10, 11).

Das Ausmaß der Fermentation von Ballaststoffen im Kolon wird von deren Struktur, Löslichkeit und Lignifizierungsgrad beeinflusst. Eine verbesserte Löslichkeit wird z. B. mit einer begünstigten Fermentation in Zusammenhang gebracht. Zellwandlignifizierung und eine ausgeprägte Quervernetzung von Polysacchariden durch Diferulasäure-Cross-Links werden hingegen im Rahmen einer verminderten mikrobiellen bzw. enzymatischen Fermentierbarkeit diskutiert (12-16).

Nicht fermentierte Ballaststoffe bewirken, auch aufgrund ihres Wasserbindungsvermögens, ein erhöhtes Stuhlgewicht bzw. -volumen (Bulking-Effekt). Die Fermentation von Ballaststoffen regt das Bakterienwachstum an und führt so ebenfalls zu einer, wenn auch weniger stark ausgeprägten, Erhöhung von Stuhlgewicht und -volumen. Ein erhöhtes Stuhlgewicht hat die Anregung der Darmperistaltik und eine Verkürzung der gastrointestinalen Transitzeit zur Folge. Während hierdurch Verstopfung, Hämorrhoiden und divertikuläre Krankheiten vermindert werden können, spielt eine verkürzte Transitzeit insbesondere auch für unerwünschte Substanzen wie Kanzerogene eine Rolle, deren Kontaktzeit mit der Darmmukosa hierdurch reduziert wird (5-7).

Inwiefern die Fermentation von Ballaststoffen deren Adsorptionseigenschaften für z. B. HAA oder Gallensäuren beeinflusst, ist bislang wenig untersucht.

2.2 Pflanzenzellwände

Die Pflanzenzellwand stellt ein komplexes Netzwerk dar, das den Protoplasten umschließt. Sie bestimmt die Form- und Strukturgebung der Pflanze und ist für ihre Funktionalität von wesentlicher Bedeutung. Sie schützt z. B. die Zelle vor mechanischer Beanspruchung, Austrocknung und Strahlung. Sie hat eine Barrierefunktion und schützt die Zelle gegen das Eindringen pathogener Keime. Pflanzenzellwände sind jedoch nicht nur für die Pflanze selbst wichtig, sondern sie stellen auch einen wesentlichen Bestandteil für die menschliche Ernährung dar. Pflanzenzellwände bilden hierbei die Hauptquelle für Ballaststoffe.

2.2.1 Aufbau von Pflanzenzellwänden

Pflanzenzellwände bestehen neben Wasser aus einem Netzwerk von Polysacchariden, Strukturproteinen, Ligninen und anderen aufgelagerten oder integrierten Substanzen wie Cutin und Suberin. Die chemische Zusammensetzung der Pflanzenzellwand variiert zum einen zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen, wobei sich die in dieser Arbeit präsentierten Grundlagen im Allgemeinen auf die Zellwand monokotyler Pflanzen beschränken. Des Weiteren sind Unterschiede zwischen Pflanzenzellwänden verschiedener Pflanzensorten sowie Pflanzenteile und -gewebe zu beobachten. Hinzu kommt, dass die Pflanzenzellwand ein dynamisches System darstellt, deren chemische Zusammensetzung, Struktur und physikalische Eigenschaften sich während des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung stetig ändern. Während der Zellteilung wird zunächst vor allem aus Pektinen die Mittellamelle der neu entstehenden Zellwand gebildet. Zu beiden Seiten der Mittellamelle bildet sich anschließend aus ungeordneten Cellulose-Mikrofibrillen, Hemicellulosen, Phenolcarbonsäuren und Proteinen die primäre Zellwand, die sich nach Beendigung des Weitenwachstums der Zellwand zunehmend verdickt. Die primäre Zellwand reguliert das Zellwachstum und bildet die strukturelle Grundlage für die entstehende Pflanze. Die sekundäre Zellwand kann, je nach Zelltyp, nach Abschluss des Weitenwachstums der Zelle vor allem zu mechanischen Zwecken gebildet werden. Dies erfolgt in Form von bis zu drei mikroskopisch unterscheidbaren Lagen (S1, S2 und S3), die sich in der parallelen Ausrichtung ihrer Cellulose-Mikrofibrillen unterscheiden. Die sekundäre Zellwand beinhaltet des Weiteren Hemicellulosen und Phenolcarbonsäuren und weist im Zellwandsystem den höchsten Lignifizierungsgrad auf (17).

2.2.1.1 Kohlenhydratzusammensetzung

Die Polysaccharide der Pflanzenzellwand liegen im Allgemeinen in Form von Cellulose, Hemicellulosen und Pektinen vor. Eine typische Polysaccharidzusammensetzung der Primärwand von Hafer- oder Gerstenkaryopsen ist z. B.: ca. 30 % Cellulose, 30 % Arabinoxylane, 30 % mixed-linked- β -Glucane, 5 % Pektine und 4 % Xyloglucane (bezogen auf die Trockenmasse) (5). Es ist jedoch nicht außer Acht zu lassen, dass sich die Polysaccharidzusammensetzung verschiedener Getreidearten sowie verschiedener Gewebe erheblich unterscheidet, u. a. in den Gehalten an mixed-linked- β -Glucanen.

Cellulose stellt das dominierende Polysaccharid der Pflanzenzellwand dar. Das lineare Homopolysaccharid besteht aus β -(1,4)-verknüpften D-Glucose-Einheiten (Abb. 2.1). Während die Cellulosemoleküle in der Primärwand ca. 5000 Einheiten umfassen, erreichen sie in der Sekundärwand einen Umfang von bis zu 15 000 Einheiten (18). Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken führt zur Zusammenlagerung der Cellulosestränge zu Mikrofibrillen, die im Durchmesser ca. 30 - 100 Polysaccharidstränge zählen (5). Die Cellulose-Mikrofibrillen sind in andere Zellwandbestandteile (z. B. Hemicellulosen) eingebettet und bilden das strukturelle Gerüst der Pflanzenzellwand. Während in der Sekundärwand überwiegend kristalline Cellulose vorliegt, hat die Cellulose der Primärwand eher amorpher Charakter (5).

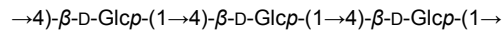
Die Hauptketten der Hemicellulosen bestehen zumeist aus β -(1,4)-verknüpften Xylose-, Glucose- oder Mannose-Einheiten, die über Wasserstoffbrückenbildung mit Cellulose oder auch mit Pektinen wechselwirken können.

Arabinoxylane stellen in ihrer neutralen Form einen wesentlichen Bestandteil von Primärzellwänden in Getreide dar. Die β -(1,4)-verknüpften D-Xylose-Einheiten der Hauptkette sind teilweise in 3- oder in 2- und 3-Stellung mit Arabinofuranose-Einheiten substituiert (Abb. 2.1). Eine Monosubstitution in 2-Stellung spielt eine untergeordnete Rolle. Die Art der Substitution, z. B. der Grad der Arabinose-substitution oder die Verteilung der Substituenten, unterscheidet sich hierbei bei verschiedenen Getreiden sowie in den verschiedenen Geweben und beeinflusst die physikalischen und funktionellen Eigenschaften der Arabinoxylane (19). An die Arabinose-Einheiten der Arabinoxylane können des Weiteren Xylose- und/oder Galactose-Einheiten gebunden sein. Ebenso ist, wenn auch in geringem Maße, die Ausbildung von Seitenketten möglich, die sich aus

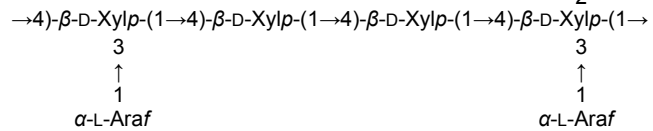
mehreren (1,2)-, (1,3)- oder (1,5)-verknüpften Arabinose-Einheiten zusammensetzen. Die Xylan-Hauptkette der sauren Glucuronoarabinoxylane, die vor allem in den äußeren Schichten von Getreidekörnern vorkommen, ist teilweise mit Arabinose-Einheiten und Glucuronsäure-Einheiten bzw. dem entsprechenden 4-O-Methylether substituiert (18, 19). Ein besonderer Aspekt der Arabinoxylane, auf den in Kapitel 2.2.1.2 näher eingegangen wird, ist die Bindung von Ferulasäure an die O-5-Position der Arabinosesubstituenten.

Neben Arabinoxylanen dominieren vor allem so genannte mixed-linked- β -Glucane die Hemicellulosenfraktion einiger Getreide. Die unverzweigten β -Glucane ähneln in ihrer Struktur der Cellulose, bestehen jedoch nur zu ca. 70 % aus β -(1,4)-verknüpften D-Glucose-Einheiten, während die restlichen 30 % β -(1,3)-verknüpften D-Glucose-Einheiten zukommen, die sich

Cellulose

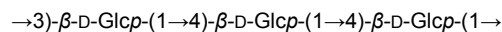


Arabinoxylane (neutral)

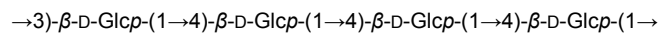


Mixed-linked- β -Glucane

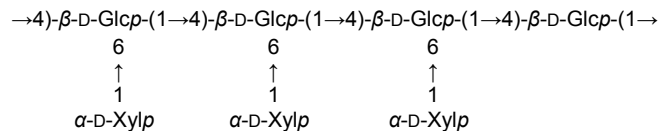
Cellotriosyl-Einheit:



Cellotetraosyl-Einheit:

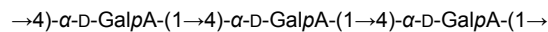


Xyloglucane



Pektine

Homogalacturonan:



Rhamnogalacturan I (Hauptkette):

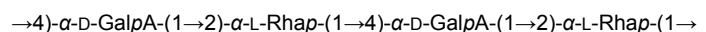


Abbildung 2.1: Strukturmerkmale verschiedener Polysaccharide der Pflanzenzellwand (Glcp = Glucopyranose, Xylp = Xylopyranose, Araf = Arabinofuranose, GalpA = Galacturonsäure (Pyranose), Rhap = Rhamnopyranose).

über das Polysaccharid verteilen (18). Hierdurch entstehen vor allem Cellotriosyl- und Cello-tetraosyl-Einheiten (Abb. 2.1). Cellopentaosyl-Einheiten und höhere Sequenzen spielen eine untergeordnete Rolle. Die Eingliederung der (1,3)-Verknüpfungen in das Polysaccharid führt zu einer unregelmäßigen Form (19), sodass die physikochemischen Eigenschaften der mixed-linked- β -Glucane nicht mit denen der Cellulose zu vergleichen sind.

Xyloglucane liegen in Getreiden nur in geringen Gehalten vor; sie bilden häufig die dominierenden Hemicellulosen in dikotylen Pflanzen. Die Hauptkette aus β -(1,4)-verknüpften D-Glucose-Einheiten ist regelmäßig über (1,6)-Verknüpfungen mit Xylose-Einheiten substituiert (Abb. 2.1). Eine mögliche Bindung von Fucose-, Galactose- oder Arabinose-Einheiten an die Xylose-Einheiten der Xyloglucane spielt in Getreiden keine Rolle.

Pektine, die in der Zellwand monokotyle Pflanzen in verhältnismäßig geringen Gehalten vorliegen, stellen ein komplexes Netzwerk verschiedener, miteinander assoziierter Polysaccharide dar. Die Komplexität der Pektine wird zum einen durch die Vielzahl der involvierten Polysaccharide hervorgerufen, zu denen Homogalacturonane, Xylogalacturonane, Rhamnogalacturonane I bzw. II, Arabinogalactane I bzw. II sowie Arabinane zählen. Hinzu kommt, dass die Gesamtheit der genannten Polysaccharide auf 17 verschiedenen Monosacchariden als Bausteine basieren (20). Eine Hauptkomponente der Pektine stellt das lineare Homogalacturonan dar, das sich aus α -(1,4)-verknüpften Galacturonsäure-Einheiten zusammensetzt (Abb. 2.1). Die Galacturonsäure-Einheiten können in C-6-Position methylverestert und in O-2- bzw. O-3-Position acetyliert sein. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Pektine ist das Rhamnogalacturonan I, das aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten aus (1,2)-gebundener α -L-Rhamnose und (1,4)-gebundener α -D-Galacturonsäure aufgebaut ist (Abb. 2.1). Während die Galacturonsäure-Einheiten teilweise an O-2- und/oder O-3-Stellung acetyliert vorliegen können, ist für die Rhamnose-Einheiten eine Substitution mit neutralen Kohlenhydraten möglich. Die Substitution kann hierbei z. B. durch (1,4)-gebundene β -D-Galactose erfolgen, jedoch ebenso durch Polymere wie Arabinogalactan I oder Arabinan (20). Auf die detaillierte Struktur der weiteren Polysaccharide, die in das Netzwerk der Pektine integriert sind, soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden. Die Anordnung der Polysaccharide innerhalb des Pektin-Netzwerkes wird trotz mehrerer vorgeschlagener Modelle bis heute diskutiert (20).

2.2.1.2 Zellwandgebundene Ferulasäure

Ferulasäure wird in der Pflanze über den Phenylpropanstoffwechsel gebildet. Als Ausgangsprodukt dient hierbei in erster Linie Phenylalanin, ein Produkt des Shikimisäure-Weges. Phenylalanin wird zunächst zu Zimtsäure umgesetzt. Es folgt eine Hydroxylierung zu *p*-Cumar-säure, die schließlich über Kaffeesäure zu Ferulasäure und ggf. weiter zu Sinapinsäure reagieren kann (Abb. 2.2) (21, 22). Bei der Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure spielt das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) eine wesentliche Rolle. Anhand der gezielten Hemmung des Enzyms ist es möglich, die Zimtsäure-Biosynthese und somit die Ferulasäure-Biosynthese zu minimieren - ein Mechanismus, der z. B. bei der Manipulation von Pflanzenzellwänden Anwendung findet (Kap. 2.2.2).

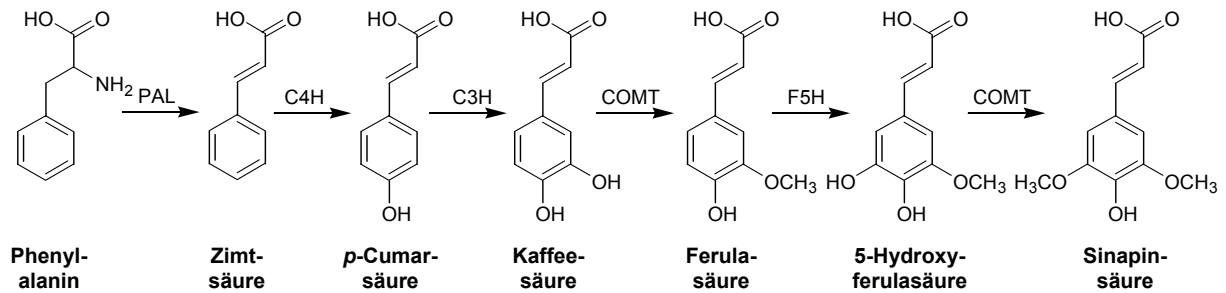


Abbildung 2.2: Vereinfachte Darstellung der Biosynthese von p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure aus Phenylalanin (PAL = Phenylalanin-Ammonium-Lyase, C4H = Zimtsäure-4-Hydroxylase, C3H = p-Cumarsäure-3-Hydroxylase, COMT = Kaffeesäure-O-Methyltransferase, F5H = Ferulasäure-5-Hydroxylase).

In der Pflanze liegt Ferulasäure nicht als freie Säure vor, sondern sie ist über Esterbindungen kovalent mit Polysacchariden verbunden. Ferulasäure ist überwiegend in den Pflanzenzellwänden monokotyler Pflanzen zu finden, z. B. in Pflanzen der Familien *Poaceae* (z. B. Mais, Roggen, Weizen, Reis) und *Bromeliaceae* (z. B. Ananas). Hierbei scheint die Bindung der Ferulasäure spezifisch an die O-5-Position der Arabinoseseitenketten von Arabinoxylanen zu erfolgen. Zudem konnte eine Veresterung mit Ferulasäure nur für Arabinose-Einheiten gezeigt werden, die in O-3-Position (nicht in O-2-Position) an die Xylan-Hauptkette gebunden sind (Abb. 2.3) (23-28). Es wird angenommen, dass die Bindung der Ferulasäure an Arabinoxylane intrazellulär im Golgi-Apparat erfolgt (29-31). In dikotylen Pflanzen ist zellwandgebundene Ferulasäure im Allgemeinen nicht vertreten. Eine Ausnahme bilden die kürzlich zusammengefassten (32) Familien *Chenopodiaceae* (z. B. Spinat, Zuckerrübe) und *Amaranthaceae* (z. B. Amaranth), in denen die Ferulasäure an Pektine gebunden zu finden ist (25, 33-35).

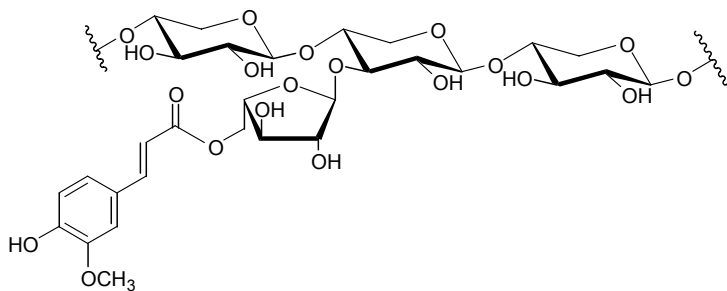


Abbildung 2.3: Struktur einer an ein Arabinoxylan gebundenen Ferulasäure.

Ferulasäure liegt nicht nur als Monomer an Polysaccharide gebunden vor, sondern kann zudem Ferulasäuredimere, -trimer und -tetramere, ggf. sogar höhere Oligomere formen. Durch die Ausbildung dieser so genannten Cross-Links kommt Ferulasäure eine besondere Rolle bei der Quervernetzung von Zellwandstrukturen zu.

Die Bildung von Ferulasäuredimeren ist über zwei Mechanismen möglich. Die mittels Ultraviolett (UV)-Licht katalysierte, photochemische [2+2]-Cycloaddition führt zur Bildung von Cyclobutan-Dimeren, spielt jedoch für Ferulasäure häufig eine untergeordnete Rolle. In Getreidekaryopsen wurden lediglich geringe Mengen an Homo- und Heterocyclodimeren der p-Cu-

marinsäure und der Ferulasäure nachgewiesen (36, 37). Der bevorzugte Bildungsmechanismus basiert auf einer oxidativen, radikalischen Kopplungsreaktion zu Dehydrodiferulasäuren, kurz Diferulasäuren genannt. In Anwesenheit zellwandgebundener Peroxidase sowie von Wasserstoffperoxid bilden die zellwandgebundenen Ferulasäureester elektronen-delokalisierte Phenoxyradikale, die in 4-O-, C5- oder C8-Position mit einem weiteren Radikal koppeln können (Abb. 2.4). Hieraus resultieren theoretisch als Kopplungsmöglichkeiten zweier Ferulasäureradikale die 8-5-, 8-O-4-, 5-5-, 8-8- sowie 4-O-5-Bindung (38-40).

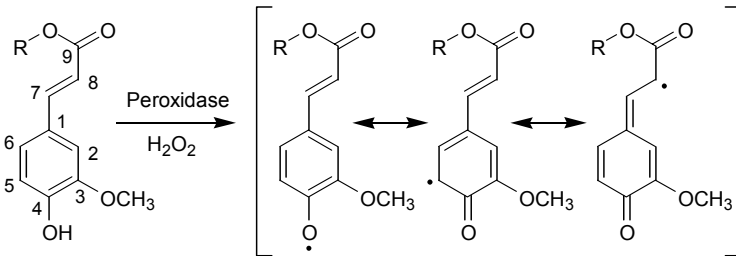


Abbildung 2.4: Oxidation eines Ferulasäureesters zu elektronen-delokalisierten Phenoxyradikalen ($R =$ z. B. Arabinoxylan).

Tatsächlich konnten im Laufe der letzten 35 Jahre die theoretisch möglichen Kopplungsmuster durch Isolierung und Identifizierung der entsprechenden Diferulasäuren z. B. aus Getreide bestätigt werden. Hierbei basiert die Isolierung von Diferulasäuren aus Pflanzenmaterial im Allgemeinen auf einer alkalischen Hydrolyse, bei der u. a. die mit den Polysacchariden veresterte Ferulasäure bzw. Diferulasäuren abgespalten werden. Die erstmalige Isolierung einer Diferulasäure, der 5-5-gekoppelten Diferulasäure (**1**, Abb. 2.5) gelang in den 70er Jahren Markwalder & Neukom aus Weizenendosperm (41). Einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung weiterer Diferulasäurestrukturen leistete die Gruppe um Ralph vor allem in den 90er Jahren (42). Mit Hilfe verschiedener synthetisierter Diferulasäuren konnten sie 8-O-4-, 8-5- und 8-8-gekoppelte Diferulasäuren (**2-7**, Abb. 2.5) in Knäuelgras, Rutenhirse und in Maiszellsuspensionen nachweisen. Später konnte ebenso die 4-O-5-gekoppelte Diferulasäure in Getreide identifiziert werden (**9**, Abb. 2.5) (43). Bei den 8-5-gekoppelten Diferulasäuren werden die zyklische Form, die offene Form und die decarboxylierte Form unterschieden. Jedoch wird angenommen, dass lediglich die zyklische Form in der Pflanze vorliegt. Die anderen beiden 8-5-gekoppelten Diferulasäuren sind Produkte, die erst bei der Isolierung der Diferulasäuren aus Pflanzenmaterial mittels alkalischer Hydrolyse aus der zyklischen Form gebildet werden (44). Bei den 8-8-gekoppelten Diferulasäuren sind ebenso drei Formen zu beobachten: die zyklische Form, die offene Form und, erst vor kurzem nachgewiesen, eine Tetrahydrofuran (THF)-Form (**8**, Abb. 2.5) (45). Allerdings ist bislang unklar, welche der Formen in Pflanzen vertreten sind.

Die Gehalte an Diferulasäuren in verschiedenen Pflanzen variieren naturgemäß. In den unlöslichen Ballaststoffen von Getreide wurden z. B. Diferulasäuregehalte zwischen 2,4 mg/g (Weizen) und 12,6 mg/g (Mais) nachgewiesen (46). Hierbei dominierten Diferulasäuren mit 8-5-Kopplung, gefolgt von 8-O-4- und 5-5-gekoppelten Diferulasäuren sowie der Summe der 8-8-gekoppelten Diferulasäuren. Die 4-O-5-gekoppelte Diferulasäure wurde teilweise in Spuren nachgewiesen. Die löslichen Ballaststoffe der untersuchten Getreide wiesen hingegen lediglich Diferulasäuregehalte $< 250 \mu\text{g/g}$ auf (46).

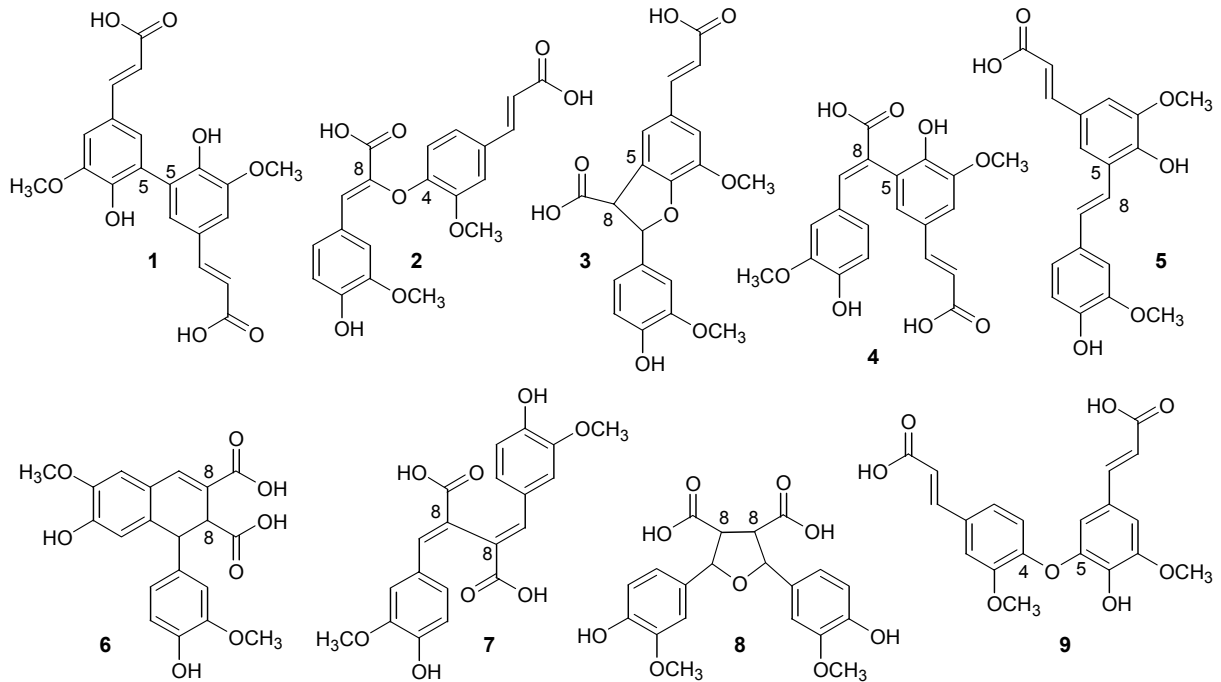


Abbildung 2.5: Strukturen aus Pflanzen isolierter Dehydrodiferulasäuren mit 5-5-Kopplung (1), 8-O-4-Kopplung (2), 8-5-Kopplung (zyklische Form) (3), 8-5-Kopplung (offene Form) (4), 8-5-Kopplung (decarboxylierte Form) (5), 8-8-Kopplung (zyklische Form) (6), 8-8-Kopplung (offene Form) (7), 8-8-Kopplung (Tetrahydrofuran(THF)-Form) (8) und 4-O-5-Kopplung (9).

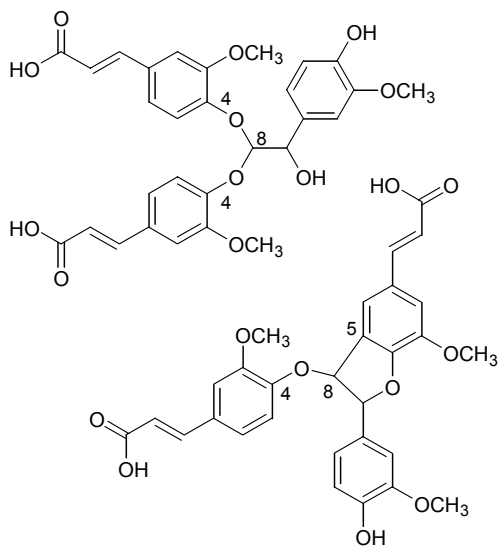


Abbildung 2.6: Strukturen zweier durch Oxidation freier Ferulasäuren erhaltener trimerer Verbindungen.

Die Bildung von Dehydrotriferulasäuren galt lange Zeit als umstritten, da ein Aufeinandertreffen und Koppeln dreier an Polysaccharidstränge gebundener Ferulasäure-Einheiten aus sterischer Sicht als unwahrscheinlich erschien. Erst vor wenigen Jahren gelang es mittels radioaktiver Markierung polysaccharidgebundene Triferulasäuren und höhere Oligomere in Mais-Suspensionskulturen nachzuweisen. Eine weiterführende Identifizierung der jeweiligen Substanzen blieb jedoch aus (47). Ward et al. gelang es kurz darauf, durch Peroxidase katalysierte Oxidation freier, sterisch nicht behinderter Ferulasäure neben 8-8- und 8-5-gekoppelten Diferulasäuren die in Abbildung 2.6 gezeigten trimeren Verbindungen zu erhalten (48). Diese Verbindungen sind jedoch für zellwandgebundene Ferulasäure nicht relevant, da freie Ferulasäure unter den Bedingungen der radikalischen Kopplung zur Decarboxylierung neigt und daher decarboxylierte Produkte in die dargestellten Trimere eingebaut wurden.

Die erstmalige Isolierung und Identifizierung einer Triferulasäure aus Pflanzenmaterial gelang schließlich kürzlich aus Maiskleie (49, 50). Die drei Ferulasäure-Einheiten sind über eine 5-5- und eine 8-O-4-Kopplung miteinander verbunden (10, Abb. 2.7). Es folgten die Isolierung und Identifizierung von 8-8(THF-Form), 5-5-gekoppelten, 8-5, 8-O-4-gekoppelten und 8-5-(offene Form), 5-5-gekoppelten Dehydrotriferulasäuren sowie von einer 5-5,8-O-4(H₂O)-gekoppelten Form (11-14, Abb. 2.7) (51, 52).

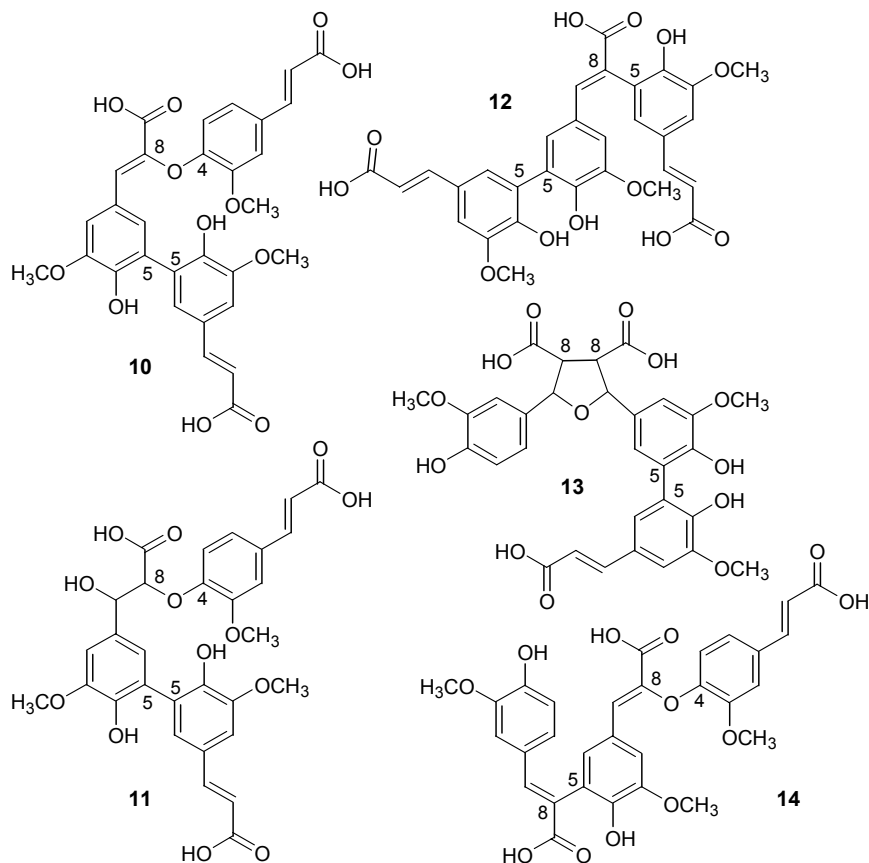


Abbildung 2.7: Strukturen aus Maiskleie isolierter Dehydrotriferulasäuren mit 5-5,8-O-4-Kopplung (10), 5-5,8-O-4(H₂O)-Kopplung (11), 8-5(offene Form), 5-5-Kopplung (12), 8-8(Tetrahydrofuran(THF)-Form), 5-5-Kopplung (13) und 8-5(offene Form), 8-O-4-Kopplung (14).

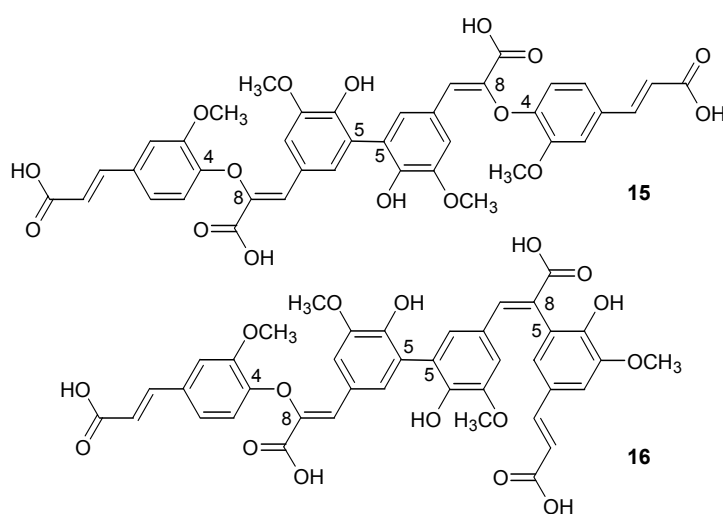


Abbildung 2.8: Strukturen aus Maiskleie isolierter Dehydrotetraferulasäuren mit 4-O-8,5-5,8-O-4-Kopplung (15) und 4-O-8,5-5,8-5(offene Form)-Kopplung (16).

Noch unwahrscheinlicher als das Vorkommen von Triferulasäuren galt aufgrund möglicher sterischer Behinderungen die Bildung höherer Ferulasäure-Oligomere in der Pflanze. Dennoch wurden kürzlich erstmals zwei Dehydrotetraferulasäuren aus Maiskleie isoliert: die 4-O-8,5-5,8-O-4-gekoppelte und die 4-O-8,5-5,8-5(offene Form)-gekoppelte Tetraferulasäure (Abb. 2.8) (52). Auffällig ist, dass in beiden Strukturen die in Maiskleie dominierende 5-5,8-O-4-gekoppelte Triferulasäure enthalten ist.

Durch ihre Eigenschaft der Cross-Link-Bildung können Ferulasäure bzw. ihre oligomeren Verbindungen maßgeblich die Struktur der pflanzlichen Zellwand beeinflussen. Wie bereits erwähnt, führt die Dimerisierung von polysaccharidgebundener Ferulasäure zu einer Quervernetzung der Polysaccharide, insbesondere der Arabinoxylane, über Diferulasäure-Cross-Links. Der Vernetzungsgrad wiederum beeinflusst die Eigenschaften der Zellwand. Ein erhöhter Vernetzungsgrad wird z. B. mit einer verminderten Löslichkeit sowie mit einer verminderten Abbaubarkeit durch Xylanasen in Verbindung gebracht (14, 15, 53, 54). In welcher Weise Triferulasäuren und Tetraferulasäuren als Cross-Links fungieren, konnte bislang nicht geklärt werden. Die Bindung von Diferulasäuren an Arabinoxylane wurde bereits bewiesen (55, 56). Entsprechende Beweise für die Trimere und Tetramere der Ferulasäure durch Isolierung und Identifizierung diagnostischer Tri-/Tetraferulasäureoligosaccharide stehen jedoch noch aus. Des Weiteren ist vor allem die Frage von Interesse, ob Tri- bzw. Tetraferulasäuren nicht nur zwei, sondern auch drei oder vier Polysaccharidstränge vernetzen können. Ferulasäure kann jedoch nicht nur die Vernetzung von Polysacchariden bewirken, sondern ebenso die Vernetzung von Polysacchariden mit anderen Polymeren in der Pflanzenzellwand. Sowohl Ferulasäure als auch Diferulasäuren können z. B. mit Monolignolen und ggf. oligomeren Lignin-Einheiten koppeln und auf diese Weise Polysaccharide mit Lignin verbinden (44, 57-60). Des Weiteren wird eine Kopplung von Ferulasäure mit Proteinen diskutiert (31, 61-64). So konnten kürzlich Ferulasäure-Tyrosin-Cross-Links in Weizen- und Roggenmehl nachgewiesen werden (64).

2.2.1.3 Lignin

Lignin ist ein komplexes phenolisches Polymer der Pflanzenzellwand, das deren Eigenschaften maßgeblich beeinflusst. Lignin schützt nicht nur die Pflanzenzellwand vor mechanischen Verletzungen, sondern verhärtet und stärkt auch Pflanzenzellwände, insbesondere im Bereich des Pflanzenstammes bzw. -stengels. Des Weiteren ermöglicht Lignin durch die Ausbildung wasserdichter Zellwandschichten den Wassertransport innerhalb der Pflanze und schützt die Pflanze vor dem Eindringen pathogener Keime (65).

Die Struktur des Lignins ist aufgrund seiner Komplexität bis heute nicht umfassend aufgeklärt, zumal Ligninstrukturen je nach Pflanzenart, Zellwandtyp und Wachstumsphase variieren. Die Bildung des Lignins basiert wie die Bildung von Dehydrodiferulasäuren (Kap. 2.2.1.2) auf oxidativen, radikalischen Kopplungsreaktionen. Als Vorstufen, so genannte Monolignole, dienen vor allem 4-Hydroxyphenylpropanoide und hier insbesondere *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol (Abb. 2.9). Die Monolignole stellen Alkohol-Analoga der in Kapitel 2.2.1.2 dargestellten Phenolcarbonsäuren *p*-Cumar-säure, Ferulasäure und Sinapinsäure dar und sind ebenso Produkte des Phenylpropanstoffwechsels. Während sich *p*-Cumarylalkohol aus der aktivierten *p*-Cumarsäure ableitet, ver-

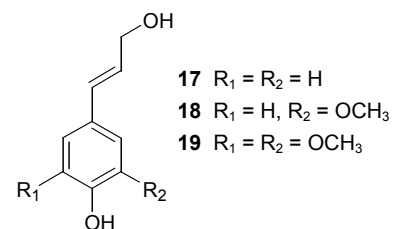


Abbildung 2.9: Strukturen der Monolignole *p*-Cumarylalkohol (17), Coniferylalkohol (18) und Sinapylalkohol (19).

läuft der dominierende Syntheseweg für die anderen beiden Monolignole über die aktivierten Formen der Kaffee- und Ferulasäure sowie Coniferaldehyd. Aus letzterem wird direkt Coniferylalkohol gebildet oder über 5-Hydroxyconiferaldehyd und Sinapaldehyd Sinapylalkohol. Eine Transformation von Coniferyl- zu Sinapylalkohol ist ebenso möglich. Abbildung 2.10 zeigt lediglich eine vereinfachte Darstellung des Biosyntheseweges, während in Wirklichkeit neben diesem Hauptweg alternative „Seitenwege“ möglich sind (65, 66).

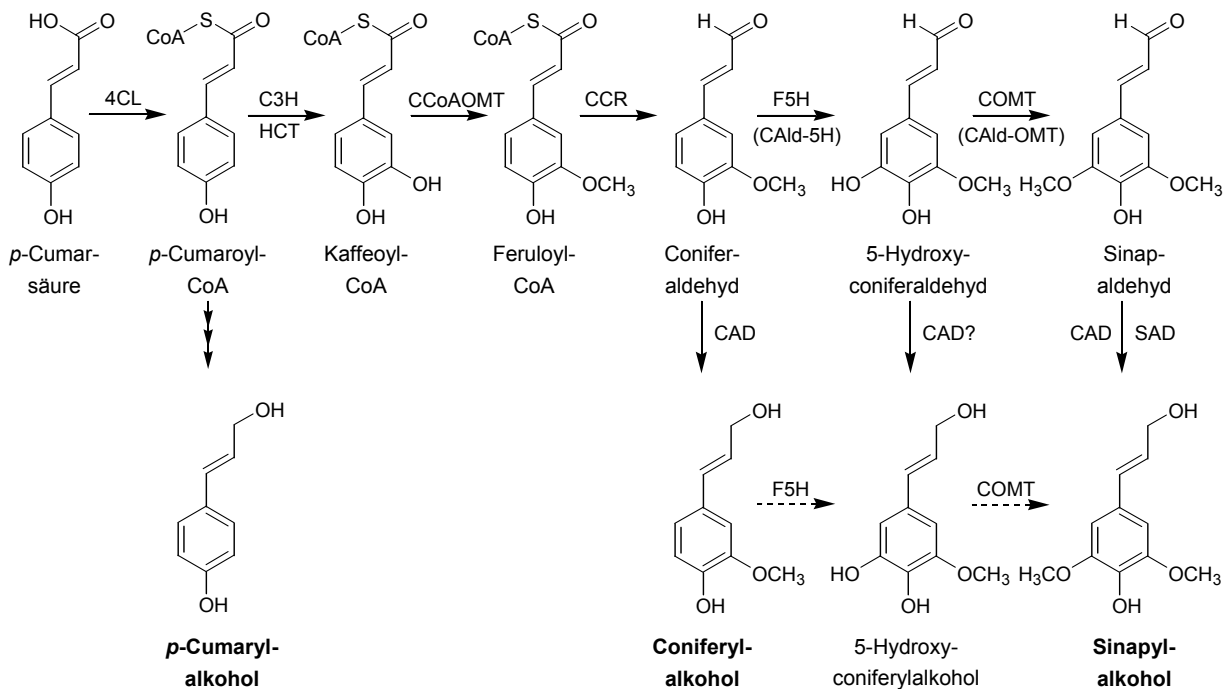


Abbildung 2.10: Vereinfachte Darstellung der Monolignolsynthese aus p-Cumarsäure (4CL: 4-Cumarsäure:CoA-Ligase, C3H = p-Cumarsäure-3-Hydroxylase, HCT = p-Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase, CCoAOMT = Kaffeoyl-CoA-O-Methyltransferase, CCR = Cinnamoyl-CoA-Reduktase, F5H = Ferulasäure-5-Hydroxylase, CAld-5H = Coniferaldehyd-5-Hydroxylase, COMT = Kaffeesäure-O-Methyltransferase, CAld-OMT = 5-Hydroxyconiferaldehyd-O-Methyltransferase, CAD = Zimtalkohol-Dehydrogenase, SAD = Sinapylalkohol-Dehydrogenase).

Die synthetisierten Monolignole werden zur Ligninbildung aus dem Protoplast in die Zellwand transportiert. Es wird vermutet, dass der Transport in Form der Glucoside stattfindet, die anschließend wieder gespalten werden. In der Zellwand werden die Monolignole oxidativ zu Phenoxyradikalen dehydrogeniert (in Analogie zu Abb. 2.4). Dies erfolgt in Anwesenheit von zellwandgebundener Peroxidase und Wasserstoffperoxid. Durch welche Mechanismen das benötigte Wasserstoffperoxid in der Zellwand gebildet wird, ist bislang umstritten. Ebenso ist bislang unklar, inwiefern andere Enzyme als Peroxidasen, z. B. Laccasen, Polyphenoloxidasen oder Coniferylalkoholoxidase, an der Dehydrogenierung von Monolignolen *in planta* alleine oder in Kombination beteiligt sind (65-67).

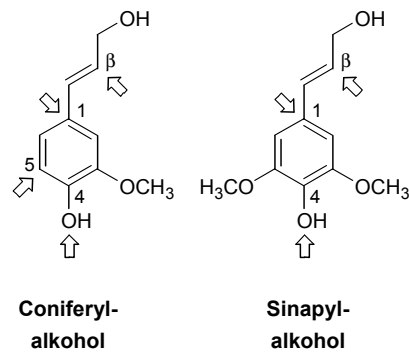


Abbildung 2.11: Kopplungsmöglichkeiten für Coniferyl- und Sinapylalkohol bei der Ligninbildung. Voraussetzung ist die Oxidation der Monolignole zu elektronendelokalisierten Phenoxyradikalen.

Die resonanzstabilisierten Phenoxyradikale können theoretisch in C1-, C5-, 4-O- und C β -Position mit weiteren Monolignolen, Oligomeren oder Ligninpolymeren koppeln (Abb. 2.11). Für Sinapylalkohol entfällt aufgrund der Methoxygruppe an C5 die Kopplungsmöglichkeit an dieser Position. Es wird davon ausgegangen, dass das Wachstum des Lignins von so genannten „nucleation sites“ in der Mittellamelle und den Ecken der Primärwand ausgeht, von wo aus sich dann Lignin durch Kopplung von Monolignolen an das wachsende Polymer bis in die sekundäre Zellwand erstreckt. Polysaccharidgebundene Ferulasäure bzw. ihre dimeren Verbindungen könnten neben bestimmten Proteinen oder Pektin als Ausgangspunkte für die Ligninbildung fungieren. Jedoch ist die genaue

Identität und Funktion der „nucleation sites“ bislang noch unklar. Die Ligninbildung verläuft vermutlich zufällig, d.h. nur die Reaktionsbedingungen in der Zellwand (z. B. Monolignolverfügbarkeit, pH-Wert etc.) steuern die Zusammensetzung des Lignins und die Ausbildung spezieller Bindungstypen. Für die Annahme, dass spezielle Proteine, so genannte „dirigent proteins“, die Ausbildung der Ligninstrukturen beeinflussen, gibt es bislang keine überzeugenden Beweise (65, 66, 68-70).

Bedingt durch die verschiedenen Kopplungspositionen der Phenoxyradikale sind, ähnlich wie bei Ferulasäure, eine Vielzahl von Kopplungskombinationen möglich, wobei sowohl Ether- als auch C-C-Bindungen gebildet werden (Abb. 2.12). Die β -O-4-Kopplung stellt im Allgemeinen in Ligninen, insbesondere in den späteren Entwicklungsstadien, mit über 50 % die dominierende Kopplungsart dar (20, Abb. 2.12). Sie ist typisch für die Kopplung von Monomeren an das wachsende Oligo- oder Polymer, ebenso wie die β -5-Kopplung bzw. die daraus resultierende β -5(α -O-4)-Kopplung, die jedoch in geringeren Anteilen vertreten ist (24, Abb. 2.12). 5-O-4- und 5-5-Kopplungen treten hingegen nur bei der Kopplung zweier Oligomere bzw. von Oligomer und Polymer auf und sind folglich nur in geringeren Mengen zu finden (22, 23, Abb. 2.12). Dennoch sind sie aufgrund ihrer Funktion als Verzweigungspunkte innerhalb des Ligninpolymers von Bedeutung. Die Mehrheit der 5-5-gekoppelten Lignin-Einheiten liegt durch zusätzliche Bindung eines Monolignols in β -Position und anschließender Ausbildung einer achtgliedrigen Ringstruktur in der Dibenzodioxocin-Form vor (25, Abb. 2.12). Die β - β -Kopplung scheint nur zwischen Monolignolen möglich zu sein, nicht jedoch durch Kopplung von Monolignolen an Oligomere bzw. das Polymer (21, Abb. 2.12). Sie spielt daher vor allem zu Beginn des Lignifizierungsprozesses eine Rolle. Es wird diskutiert, dass die Ausbildung von β -1-Kopplungen mit der Beendigung des Lignifizierungsprozesses durch Abbruch des Kettenwachstums in Verbindung steht. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die „konventionellen“ β -C1-Struktureinheiten (27, Abb. 2.12) unter Säureeinfluss aus Spirodienon-Struktureinheiten (26, Abb. 2.12) gebildet werden (18, 66).

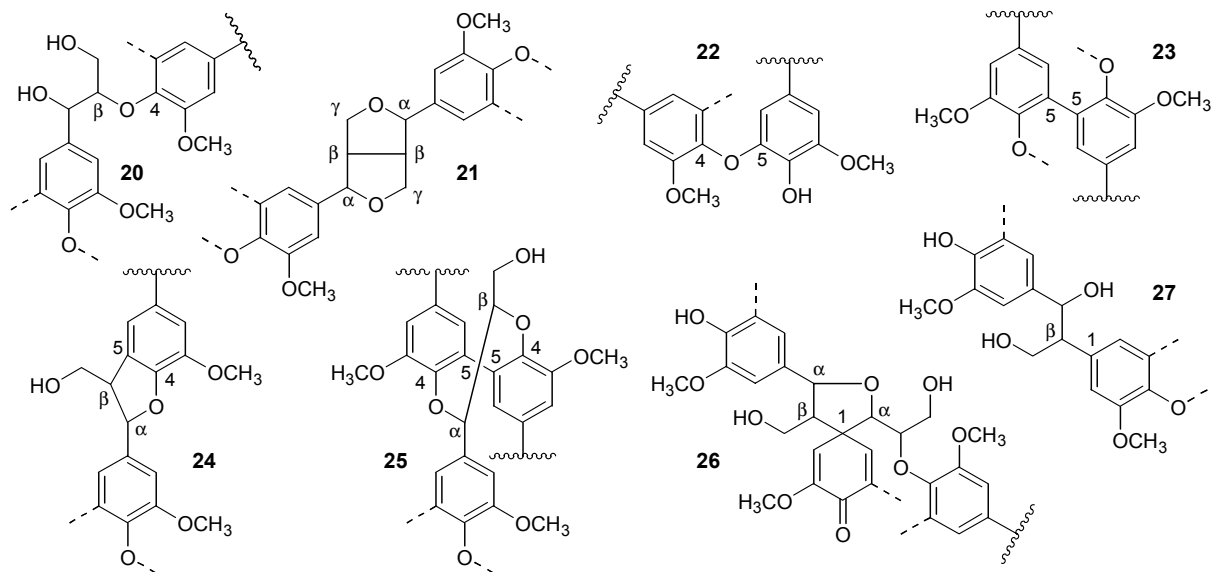


Abbildung 2.12: Strukturbeispiele für Kopplungsarten im Ligninpolymer: β -O-4-Kopplung (β -Arylether) (20), β - β (γ -O- α)-Kopplung (Resinol) (21), 5-O-4-Kopplung (Biphenylether) (22), 5-5-Kopplung (Biphenyl) (23), β -5(α -O-4)-Kopplung (Phenylcumarin) (24), 5-5/ β -O-4(α -O-4)-Kopplung (Dibenzodioxocin) (25), β -1(α -O- α)-Kopplung (Spirodienon) (26), β -1-Kopplung (β -C1) (27).

Neben den Kopplungsarten stellen ebenso die ins Ligninpolymer integrierten Monolignole eine Variable dar. Die Ligninzusammensetzung variiert z. B. je nach botanischer Herkunft der Pflanze, Gewebetyp der Zelle sowie der jeweiligen Zellwandschicht. Ebenso wird die Ligninzusammensetzung von den Entwicklungsstadien der Zellwand bzw. Pflanze beeinflusst. Lignine monokotyler Gräser bestehen vor allem aus Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten, die sich von den Monolignolen Coniferyl- und Sinapylalkohol ableiten.

Tabelle 2.1: Gehalte an Acetylbromid-löslichem Lignin (ABSL) verschiedener unlöslicher Gemüse-, Obst- und Getreideballaststoffe sowie die entsprechenden Verhältnisse von Guaiacyl (G)- und Syringyl (S)-Einheiten. ABSL-Gehalte beziehen sich auf die unlöslichen Ballaststoffe, die Werte in Klammern auf alkali-extrahierte unlösliche Ballaststoffe (71, 72).

Ballaststoffquelle	ABSL [%]	Verhältnis G/S	Verhältnis S/G
Karotte	3,2	38,8	0,03
Spinat	3,3	29,6	0,03
Kiwi	8,3	18,5	0,06
Grünkohl	2,5	4,9	0,2
Spargel	5,6	3,3	0,3
Roggen	8,5 (5,8)	3,0	0,3
Kohlrabi	3,8	2,4	0,4
Radieschen	3,4	1,5	0,7
Weizen	8,9 (6,1)	1,5	0,7
Apfel	1,7	1,2	0,8
Birne	23,5	0,6	1,6
Maiskleie	14,1 (5,7)	0,6	1,6
Rhabarber	9,0	0,17	6,2

p-Hydroxyphenyl-Einheiten, die durch den Einbau von *p*-Cumarylalkohol in das Ligninpolymer gebildet werden, spielen eine untergeordnete Rolle. Tabelle 2.1 zeigt die Verhältnisse von Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten in Ligninen bzw. ligninähnlichen Strukturen verschiedener Getreideballaststoffe im Vergleich mit den in Obst- und Gemüseballaststoffen vorliegenden Verhältnissen. Während die Guaiacyl/Syringyl-Verhältnisse in Getreideballaststoffen verhältnismäßig ausgeglichen sind und lediglich zwischen 0,6 und 3 schwanken, sind in Gemüse und Obst neben ausgeglichenen Verhältnissen ebenfalls Lignine bzw. ligninähnliche Strukturen zu finden, in denen Guaiacyl-Einheiten deutlich dominieren (z. B. in Karotten- und Kiwiballaststoffen). Die Charakterisierung von Rhabarber-Lignin zeigte eine Struktur, die in bisher nicht gekanntem Ausmaß von Syringyl-Einheiten dominiert wird (71, 72).

Neben den bereits beschriebenen Monolignolen *p*-Hydroxyphenyl, Coniferyl- und Sinapylalkohol können auch andere Monomere in das Ligninpolymer integriert werden. Hierzu zählen Nebenprodukte aus der Monolignol-Biosynthese, wie 5-Hydroxyconiferylalkohol, Hydroxyzimtaldehyde und an Polysaccharide gebundene Hydroxyzimtsäuren (28-30, Abb. 2.13). Die Erforschung dieser Nebenprodukte erfolgte in den letzten Jahren vor allem anhand transgener, mutierter Pflanzen, in denen gezielt Enzymdefizite z. B. der Zimtalkoholdehydrogenase oder der Kaffesäure-O-methyltransferase hervorgerufen wurden, um so den Monolignol-Biosyntheseweg und das hieraus resultierende Ligninpolymer zu beeinflussen (65, 73, 74). Jedoch wurden auch andere Ligninmonomere nachgewiesen, wie z. B. Hydroxybenzaldehyde, Dihydrozimmtalkohole und die sich daraus ableitenden Arylpropan-1,3-diole (31-33, Abb. 2.13). Des Weiteren wurden verschiedene Konjugate von 4-Hydroxyphenylpropanoiden als Bausteine des Ligninpolymers identifiziert, die in einigen Pflanzen in beachtlichen Mengen zu finden sind. Hierzu zählen z. B. acetylierte Hydroxyzimmtalkohole sowie mit Benzoesäure und *p*-Cumarsäure substituierte Hydroxyzimmtalkohole (34-36, Abb. 2.13) (66).

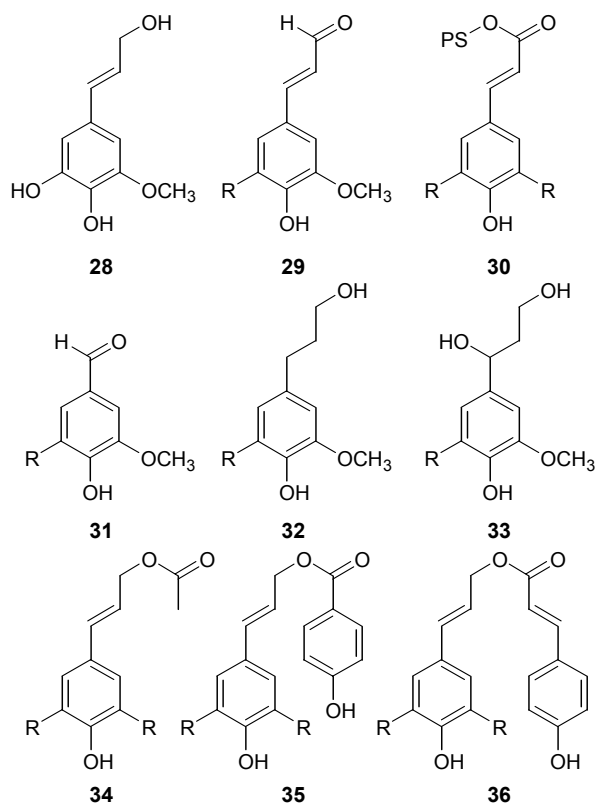


Abbildung 2.13: Strukturen phenolischer Verbindungen, die in das Ligninpolymer integriert werden können: 5-Hydroxyconiferylalkohol (28), Hydroxyzimtaldehyde (29), Hydroxyzimtsäure-ester (30), Hydroxybenzaldehyde (31), Dihydrozimmtalkohole (32), Arylpropan-1,3-diole (33), Hydroxycinnamylacetate (34), Hydroxycinnamyl-*p*-hydroxybenzoate (35), Hydroxycinnamyl-*p*-cumarate (36) ($R = H$ bzw. OCH_3 , $PS =$ Polysaccharid).

2.2.2 Zellwand-Modellsysteme

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurde, weist die pflanzliche Zellwand eine komplexe Struktur auf, die in Abhängigkeit einer Vielzahl von Faktoren variiert und oftmals nicht erschöpfend zu charakterisieren ist. Dies gestaltet z. B. die Analytik von Struktur-Wirkungs-Beziehungen anhand von natürlichen, aus Pflanzen isolierten Zellwänden als nahezu unmöglich. Eine Alternative bilden Zellwand-Modellsysteme, die auf gezüchteten Pflanzenzellen mit reproduzierbaren und teilweise lenkbaren Strukturen basieren. Die Züchtung der Zellen erfolgt im Allgemeinen in Form von Zellsuspensionskulturen. Nach entsprechender Wachstumsphase, z. B. über einen Zeitraum von 2 Wochen, können die Zellen durch Filtration isoliert und gereinigt werden. Die Gewinnung von Zellwand-Bruchstücken kann mit einer so genannten Parr Bomb erzielt werden, in der die Zellen zunächst einem Überdruck ausgesetzt und dann durch plötzlichen Druckausgleich aufgebrochen werden. Die Reinigung der Zellwände von nicht zellwandgebundenen Zellinhaltsstoffen erfolgt durch Waschen und Filtration. Die Trocknung führt schließlich zu Zellwänden mit reproduzierbarem Wassergehalt und reproduzierbarer Zusammensetzung. Im Allgemeinen werden primäre, d.h. nicht differenzierte Zellen eingesetzt, sodass die Struktur der Zellwände verhältnismäßig einfach und daher gut zu charakterisieren ist.

Während der Wachstumsphase bzw. nach Gewinnung und vor der Trocknung der Zellwände können einzelne Strukturparameter gezielt manipuliert werden, während die restliche Zellwandmatrix im Wesentlichen unverändert bleibt. So ist z. B. die Manipulation der Gehalte an Ferulasäurederivaten möglich. Zum einen kann die Synthese von Ferulasäure in den heranwachsenden Zellen durch Zugabe von 2-Aminoindan-2-phosphonsäure (AIP) gehemmt werden. AIP ist ein spezifischer Inhibitor des Enzyms PAL. Dieses benötigt die Zelle, um aus Phenylalanin Zimtsäure zu bilden, die wiederum als Vorstufe der Ferulasäure dient (Kap. 2.2.1.2). Über die Menge der AIP-Zugabe kann somit das Ausmaß der Ferulasäuresynthese reguliert werden. Zum anderen ist es möglich, die Ausbildung von Cross-Links in Form von Diferulasäuren oder höheren Ferulasäureoligomeren zu beeinflussen. Die Bildung der Cross-Links beruht auf der Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid (Kap. 2.2.1.2). Beide Substanzen liegen natürlich in der Zelle vor, sodass die Cross-Link-Bildung teilweise bereits während des Zellwachstums stattfindet. Wasserstoffperoxid stellt häufig den limitierenden Faktor für eine weitergehende Dimerisierung dar. Durch direkte Zugabe von Wasserstoffperoxid zu den isolierten Zellwänden kann die Cross-Link-Bildung jedoch erheblich gesteigert werden. Wasserstoffperoxid kann auch indirekt zur Verfügung gestellt werden, in dem es durch Zugabe von Glucose und Glucoseoxidase in der Zellwandsuspension generiert wird.

Ein weiterer Parameter, der in den Zellwand-Modellsystemen manipuliert werden kann, ist die Lignifizierung. Während die primären Zellwände lediglich Spuren von Lignin aufweisen, kann synthetisches Lignin in Form von Dehydrogenierungs-Polymer (DHP)-Zellwandkomplexen gezielt in die Zellwände integriert werden. Es wurde bereits in den 70er Jahren versucht, Lignin *in vitro* zu simulieren, indem Monolignole oxidativ zu DHP gekoppelt wurden (75, 76). Nachfolgende Studien zeigten, dass die Strukturen der gebildeten DHP von der Geschwindigkeit der Polymerisation abhängen. Während durch schnelles Zusammenbringen des Oxidationssystems, z. B. Peroxidase/Wasserstoffperoxid oder Laccase/Sauerstoff, mit

den Monolignolen so genannte „Bulk“-Polymere (Zulauf-DHP) gebildet wurden, führte die langsame kontinuierliche Zugabe der Monolignole zum Oxidationssystem zu den so genannten „End-wise“-Polymeren (Zutropf-DHP). Die beiden Polymere unterschieden sich erheblich in den gebildeten Kopplungsarten (Kap. 2.2.1.3). Hierbei ähnelten die Strukturen der Zutropf-DHP denen von natürlichen Ligninen stärker als die Strukturen der Zulauf-DHP (65). Des Weiteren zeigte sich, dass die Strukturen der DHP ebenso durch die Anwesenheit anderer Zellwandstrukturen wie Polysaccharide, polysaccharidgebundene Ferulasäurederivate, Proteine oder das wachsende Ligninpolymer selbst beeinflusst werden (65, 77). Dies führte zu dem Ansatz, dass DHP natürliche Lignine am besten simulieren können, wenn sie in ihre „natürliche“ Umgebung, in Pflanzenzellwände, eingebaut werden. Hierfür machte man sich, analog zu der oben beschriebenen Ferulasäure-Cross-Link-Bildung, zellwandgebundene Peroxidasen zunutze. Durch die langsame, kontinuierliche Zugabe von Monolignolen und Wasserstoffperoxid bzw. Glucose/Glucoseoxidase z. B. zu Maiszellwandsuspensionen wurde so eine Bildung von DHP innerhalb der Zellwände erzielt. Diese DHP-Zellwandkomplexe sind fest in der Zellwand „verankert“ und gleichen in ihrer Struktur den Ligninen natürlicher Gräser (77). Durch die Variation der Menge und der Art der für die DHP-Zellwandkomplexe verwendeten Monolignole sind verschiedenste Variationen des „Lignins“ möglich.

2.3 Heterozyklische aromatische Amine

2.3.1 Struktur und Vorkommen

Seit ihrer Entdeckung Ende der 70er Jahre stehen HAA aufgrund ihrer Mutagenität und ggf. Kanzerogenität im Mittelpunkt zahlreicher Studien. Mittlerweile wurden über 20 verschiedene HAA identifiziert, die vor allem in thermisch behandelten, proteinreichen, tierischen Lebensmitteln, jedoch ebenso in erhitzten pflanzlichen Lebensmitteln präsent sind. Eine Auswahl der häufigsten HAA mit ihren Abkürzungen ist in Tabelle 2.2 gezeigt.

HAA lassen sich aufgrund ihrer Struktur in zwei Gruppen unterteilen, die der Amino-Carboline und der Amino-Imidazo-Azaarene.

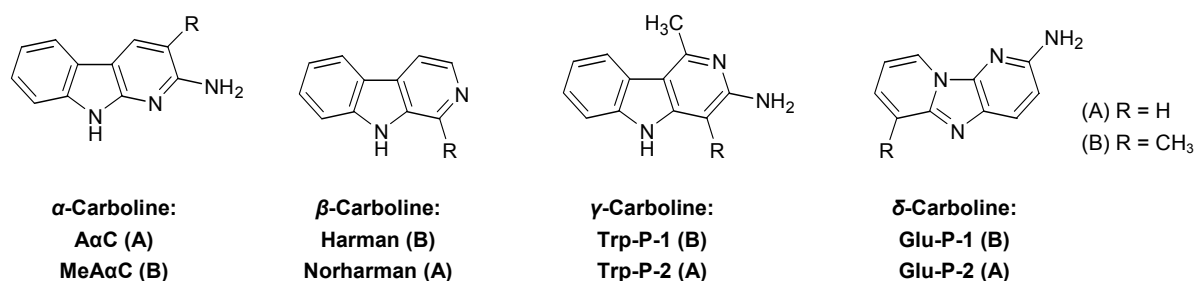


Abbildung 2.14: Strukturen heterozyklischer aromatischer Amine aus der Gruppe der Amino-Carboline.

Amino-Carboline sind Pyrido-Indole und -Imidazole, die in die Untergruppen α-, β-, γ- und δ-Carboline unterteilt werden (Abb. 2.14). Sie unterscheiden sich aufgrund der Anzahl und

Position exozyklischer Amino- und Methoxygruppen. Die vermutlich radikalische Bildung der Amino-Carboline erfolgt durch Pyrolyse von Aminosäuren, vor allem Tryptophan und Glutaminsäure, und tierischen oder pflanzlichen Proteinen bei Temperaturen $> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Gruppe der Amino-Imidazo-Azaarene setzt sich aus Imidazochinolin, -chinoxalin und -pyridin zusammen (Abb. 2.15). Die für die Amino-Imidazo-Azaarene charakteristische methylierte 2-Amino-Imidazo-Gruppe hat ihren Ursprung in Kreatin, weshalb die Bildung dieser HAA nur in tierischen Produkten beobachtet wird. Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass Kreatin zu Kreatinin umgesetzt wird, das mit Aldehyden aus dem Streckerabbau sowie Pyridin und Pyrazin aus der Maillardreaktion zum entsprechenden Amino-Imidazo-Azaaren reagiert (78).

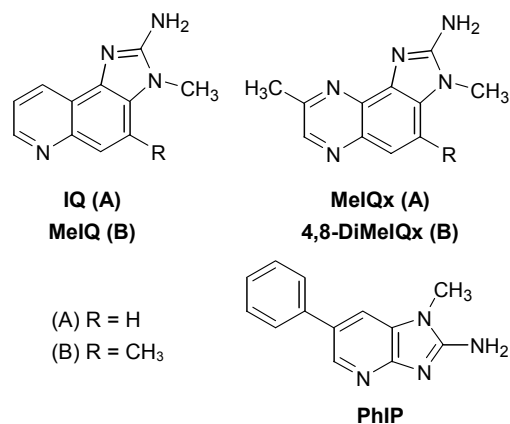


Abbildung 2.15: Strukturen heterozyklischer aromatischer Amine aus der Gruppe der Amino-Imidazo-Azaarene.

Tabelle 2.2: Abkürzungen und chemische Namen ausgewählter heterozyklischer aromatischer Amine (HAA).

HAA-Abkürzung	Chemischer Name
AaC	2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol
MeAaC	2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol
Harman (H)	1-Methyl-9H-pyrido[4,3-b]indol
Norharman (NH)	9H-Pyrido[4,3-b]indol
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Glu-P-1	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-Aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin

Vorrangig werden HAA in gekochten, gebratenen, gegrillten, gebrühten, geräucherten oder anderweitig erhitzten Fleisch- und Fischprodukten detektiert. Das Ausmaß der HAA-Bildung hängt hierbei von verschiedenen Faktoren wie Zusammensetzung des jeweiligen Lebensmittels, Art der Zubereitung, Zubereitungstemperatur und -dauer und Feuchtigkeitsgehalt ab

(79, 80). Aufgrund der erhöhten Temperatureinwirkung sind HAA vor allem in den äußeren Schichten der erhitzten Produkte zu finden. Die mittlere tägliche Aufnahme wird für Erwachsene auf ca. 7 ng/kg Körpergewicht geschätzt (81). Wie in Tabelle 2.3 dargestellt, sind neben Harman und Norharman in erster Linie PhIP und AαC in Gehalten von bis zu 480 bzw. 650 ng/g Lebensmittel enthalten. MeIQx wird meist in geringeren Gehalten detektiert, ist jedoch am häufigsten in Lebensmitteln nachzuweisen. IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, Trp-P-1 und Trp-P-2 spielen im Vergleich eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 2.3: Gehalte ausgewählter heterozyklischer aromatischer Amine (HAA) in erhitzten Lebensmitteln in ng/g (max. = maximal, n.b. = nicht bestimmt, Abkürzungen der HAA siehe Tab. 2.2) (78).

HAA	Rotes Fleisch	Geflügel	Fisch	Fleisch-Extrakt, Pfannenrückstand
IQ	0 - 2	0 - 1	0 - 1	0 - 15
MeIQ	0 - 2	0 - 1	0 - 0,3	0 - 6
MeIQx	0 - 10 (max. 27)	0 - 3 (max. 9)	0 - 2	0 - 80
4,8-DiMeIQx	0-5	0 - 3	0 - 1	0 - 9
PhIP	0 - 35 (max. 290)	0 - 10 (max. 480)	0 - 10 (max. 23)	0 - 10
AαC	0 - 20 (max. 650)	0 - 1 (max. 180)	0 - 10 (max. 110)	0 - 3
Trp-P-1	0 - 1	0 - 2	0 - 1	0 - 5 (max. 13)
Trp-P-2	0 - 1	0 - 1	n.b.	0 (max. 14)
Norharman	0 - 30	n.b.	0 - 200	0 - 100 (max. 200)
Harman	0 - 20	n.b.	0 - 130	0 - 120 (max. 200)

2.3.2 Mutagenität und Kanzerogenität

Die Entdeckung der HAA basierte auf ihrer Mutagenität gegenüber *Salmonella typhimurium*. Mit Ausnahme von Harman und Norharman erwiesen sich zudem alle in Abbildung 2.14 und 2.15 dargestellten HAA in Tierversuchen als kanzerogen (82, 83). Für die Mutagenität/Kanzerogenität der HAA spielt ihre Metabolisierung im Körper eine wesentliche Rolle. Nach oraler Aufnahme gelangen die HAA nach Passage durch den Magen in den Dünndarm, wo sie absorbiert und über die Pfortader zur Leber transportiert werden. Hier erfolgt in der Phase-I-Reaktion eine Hydroxylierung durch Cytochrom-P450-Isoenzyme, vor allem CYP1A2. In der Phase-II-Reaktion erfolgt in der Leber oder nach Zirkulation mit dem Blut auch in anderen Organen eine Veresterung durch Acetyltransferasen oder Sulfotransferasen. Die Spaltung der Metabolite führt zu hoch reaktiven Nitreniumionen, die DNA-Addukte bilden können (Abb. 2.16) (84). Die Bildung der Nitreniumionen kann auch auf anderen Wegen erfolgen. UDP-Glucuronosyltransferasen z. B. bewirken als Phase-II-Enzyme eine Glu-

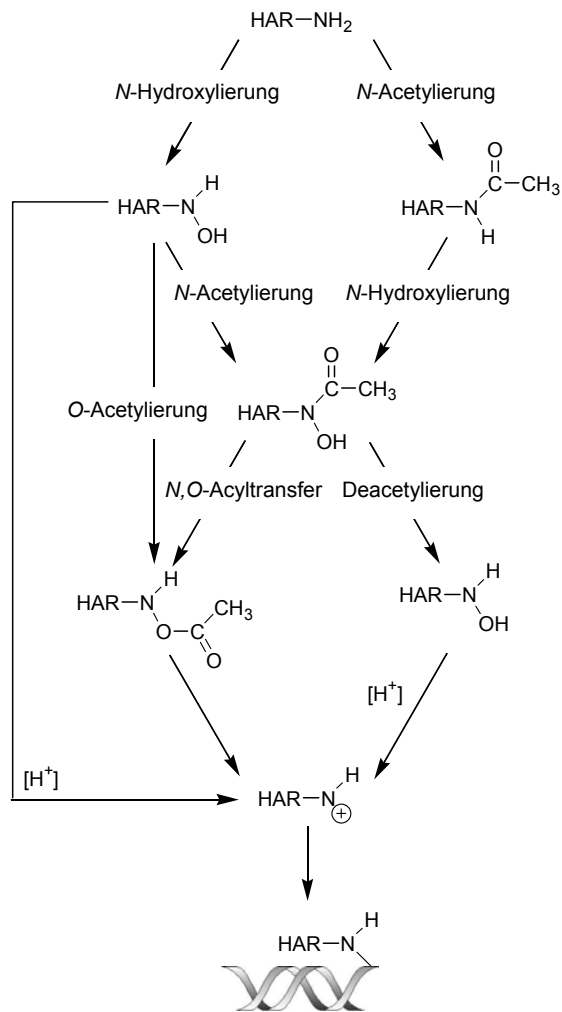


Abbildung 2.16: Mögliche Reaktionswege der metabolischen Aktivierung heterozyklischer aromatischer Amine zum reaktiven Nitreniumion mit anschließender DNA-Addukt-Bildung (HAR = heterozyklischer aromatischer Rest).

curonidierung der in der Leber gebildeten N-Hydroxylamine zu N-Glucuroniden, die nach biliärer Ausscheidung in den Darm gelangen. Die Glucuronide stellen eigentlich „Entgiftungsprodukte“ des Körpers dar, können jedoch nach Spaltung durch Glucuronidasen der Darmflora und anschließender Acetylierung oder Sulfatierung wie bereits beschrieben zum Nitreniumion reagieren (85). Bei der Bildung von DNA-Addukten, die aufgrund der Änderung der DNA-Sequenz zur Induktion von Tumoren führen können, spielt vor allem die Kopplung des Nitreniumions an die C8- und N2-Position des Desoxyguanosins eine Rolle (86, 87). Vermutlich ist die Bildung von DNA-Addukten jedoch nur einer von mehreren Faktoren, der für die Kanzerogenität der HAA verantwortlich ist. Charakteristisch für die kanzerogene Wirkung der HAA ist die Unterschiedlichkeit und Vielseitigkeit der Zielorgane (Tab. 2.4) (82, 84, 87).

Die Übertragbarkeit der in Tierversuchen nachgewiesenen Kanzerogenität der HAA auf den Menschen erweist sich als schwierig. Ein gravierender Aspekt ist, dass die HAA-Dosen, die für die Induktion bei z. B. Nagetieren eingesetzt wurden, oftmals um mehr als das 1000fache die für den Menschen abgeschätzte Belastung an HAA überschreiten (81). Hinzu kommt, dass so-

wohl Metabolismus als auch Ausscheidungskinetik erhebliche Speziesunterschiede aufweisen. So wurde für isolierte humane Lebermikrosomen ein höheres Bioaktivierungspotential für PhIP nachgewiesen als für Lebermikrosomen von Ratten und Mäusen (88). Für PhIP wurde zudem im humanen Kolon eine deutlich höhere DNA-Adduktbildung beobachtet als im Ratten- oder Mäusekolon. Des Weiteren wurden in der Ratte nur ca. 10 % der oralen Dosis renal eliminiert, während beim Menschen bis zu 60 % der Dosis im Urin wieder gefunden wurden. Zudem erschweren interindividuelle Unterschiede in der Ausscheidungsrate, dem Metabolitenprofil sowie der DNA- und Proteinadduktbildung eine verallgemeinernde Aussage (81).

In einer Vielzahl von epidemiologischen Studien wurde versucht, die Bedeutung der HAA für die Krebsbildung beim Menschen zu konkretisieren. Hierbei wurde meist der Zusammenhang zwischen Konsum von intensiv erhitztem Fleisch und der Bildung von z. B. Brustkrebs oder Kolonkrebs untersucht. Für die meisten Studien konnte eine positive Korrelation gezeigt werden, jedoch wurden ebenso negative Korrelationen erzielt (89).

Tabelle 2.4: Zielorgane für kanzerogene Wirkung ausgewählter heterozyklischer aromatischer Amine (HAA) in Ratten und Mäusen (Abkürzungen der HAA siehe Tab. 2.2) (82).

HAA	Spezies	HAA-Konzentration im Futter	Zielorgan
IQ	Ratte	0,03 %	Leber Dünndarm Dickdarm Zymbaldrüse Klitorisdrüse Haut
	Maus	0,03 %	Leber Vormagen Lunge
MeIQx	Ratte	0,04 %	Leber Zymbaldrüse Klitorisdrüse Haut
	Maus	0,06 %	Leber Lunge hämatopoetisches System
PhIP	Ratte	0,04 %	Dickdarm Milchdrüse Prostata
	Maus	0,04 %	Lymphgewebe
AαC	Maus	0,08 %	Leber Blutgefäße

2.3.3 Adsorption an Ballaststoffe

Wie bereits in Kapitel 2.1.2.1 erwähnt, wird die Adsorption von Kanzerogenen an Ballaststoffe als direkter Mechanismus zur Krebsrisikoreduzierung diskutiert. Ballaststoffe unterliegen im Dünndarm keinem und im Kolon oftmals nur einem eingeschränkten fermentativen Abbau. Die Adsorption von Kanzerogenen an Ballaststoffe würde somit deren effektive, zur Verfügung stehende Konzentration im Darm reduzieren und einen Transport der Kanzerogene aus dem Körper ermöglichen. Für die HAA kommt als entscheidender Punkt hinzu, dass eine frühe Adsorption an Ballaststoffe die Absorption im Dünndarm und anschließende metabolische Aktivierung in der Leber verhindern könnte.

Die Adsorption von HAA an Ballaststoffe wurde bislang vor allem anhand von *in vitro*-Studien untersucht (90-94). Diese basierten auf der Inkubation von Modellballaststoffen mit dem jeweiligen HAA unter Bedingungen, die den menschlichen Verdauungstrakt simulierten. Die nicht adsorbierten HAA wurden im Allgemeinen nach Zentrifugation mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Ames Test (*Salmonella Typhimurium*) im Überstand quantifiziert. Anhand dieser Studien konnte gezeigt werden, dass HAA an ver-

schiedenste Ballaststoffe adsorbieren können. Hierbei spielte die Zusammensetzung der Ballaststoffe eine wesentliche Rolle. Die Gruppe von Harris und Ferguson zeigten z. B., dass die Adsorption an verschiedene Pflanzenzellwände zwischen 6 und 97 % schwankte, wobei suberin- und ligninhaltige Ballaststoffe HAA bevorzugt adsorbierten (91). Sowohl Suberin als auch Lignin haben einen hydrophoben Charakter und entsprechend wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass die Adsorption von HAA vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert. Barnes et al. hingegen zweifelten die hervorgehobene Stellung dieser Polymere an. Sie schlugen anstatt hydrophober Wechselwirkungen zwischen HAA und Ballaststoffen vielmehr einen Kationen-Austausch-Mechanismus vor, in den Carboxylgruppen (z. B. von Pektinen) und ggf. Hydroxylgruppen der Ballaststoffe involviert sind (93).

Neben der Struktur der Ballaststoffe beeinflussen eine Vielzahl anderer Faktoren die *in vitro*-Adsorption der HAA an Ballaststoffe. Entscheidend ist vor allem die Hydrophobizität der HAA, die im Allgemeinen als berechneter Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen 1-Octanol und Wasser (ClogP) umschrieben wird. Der ClogP nimmt mit wachsender Hydrophobizität zu, ebenso wie die Adsorption der HAA (90, 91). Des Weiteren ist die Adsorption von HAA an Ballaststoffe vom pH-Wert abhängig. In bisherigen Studien wurde das Adsorptionsmaximum ausgewählter HAA dem leicht sauren Milieu (pH 4 - 6) zugeordnet (93, 94). Weitere Faktoren, die die Adsorption von HAA beeinflussen sind z. B. die Partikelgröße der Ballaststoffproben, Polymerisationsgrad der Polysaccharide und die Anwesenheit anderer Komponenten, wie z. B. lösliche Polysaccharide oder Gallensäuren (92, 94-96).

2.4 Gallensäuren

2.4.1 Struktur und Vorkommen

Gallensäuren sind Steroide, die im menschlichen Körper aus Cholesterin synthetisiert werden. Das Steroidgerüst ist aufgrund der *cis*-Stellung des A- und B-Ringes gekrümmt. Die Stereochemie sowie die Struktur und Länge der aliphatischen Seitenkette variieren in verschiedenen Spezies. Im menschlichen Körper dominieren Gallensäuren mit einem C24-Körper. Des Weiteren unterscheiden sich Gallensäuren aufgrund der Anzahl, Position und Stereochemie der Hydroxylgruppen am Steroidgerüst (Abb. 2.17) (97).

In der Leber eines erwachsenen Menschen werden im Durchschnitt ca. 500 mg Cholesterin pro Tag in Gallensäuren umgewandelt. Dies erfolgt über eine Reihe von Reaktionsschritten und erfordert eine Vielzahl von Enzymen. Der klassische (neutrale) Weg der Gallensäuresynthese aus Cholesterin erfolgt in der Leber unter Mitwirkung von 17 Enzymen (97, 98). Den initiierenden und gleichzeitig limitierenden Schritt der Synthese bildet die 7α -Hydroxlierung von Cholesterin durch die Cholesterin- 7α -Hydroxylase, ein Cytochrom-P450-Enzym (CYP7A1). Es folgt eine Modifizierung der Ringstruktur sowie eine Oxidation und Verkürzung der aliphatischen Seitenkette zu den so genannten primären Gallensäuren Cholsäure (mit drei Hydroxylgruppen) und Chenodesoxycholsäure (mit zwei Hydroxylgruppen, Abb. 2.17) in Form ihrer CoA-Thioester. Der alternative (saure) Syntheseweg spielt mit ca. 10 % der Gallensäureproduktion eine untergeordnete Rolle. Er verläuft über die Oxidation

von Cholesterin durch CYP27A1 und CYP7B1 und findet vor allem in peripherem Gewebe statt. Die Oxidationsprodukte werden zur Leber transportiert, wo ihre Umwandlung in Chenodesoxycholsäure erfolgt (98-102).

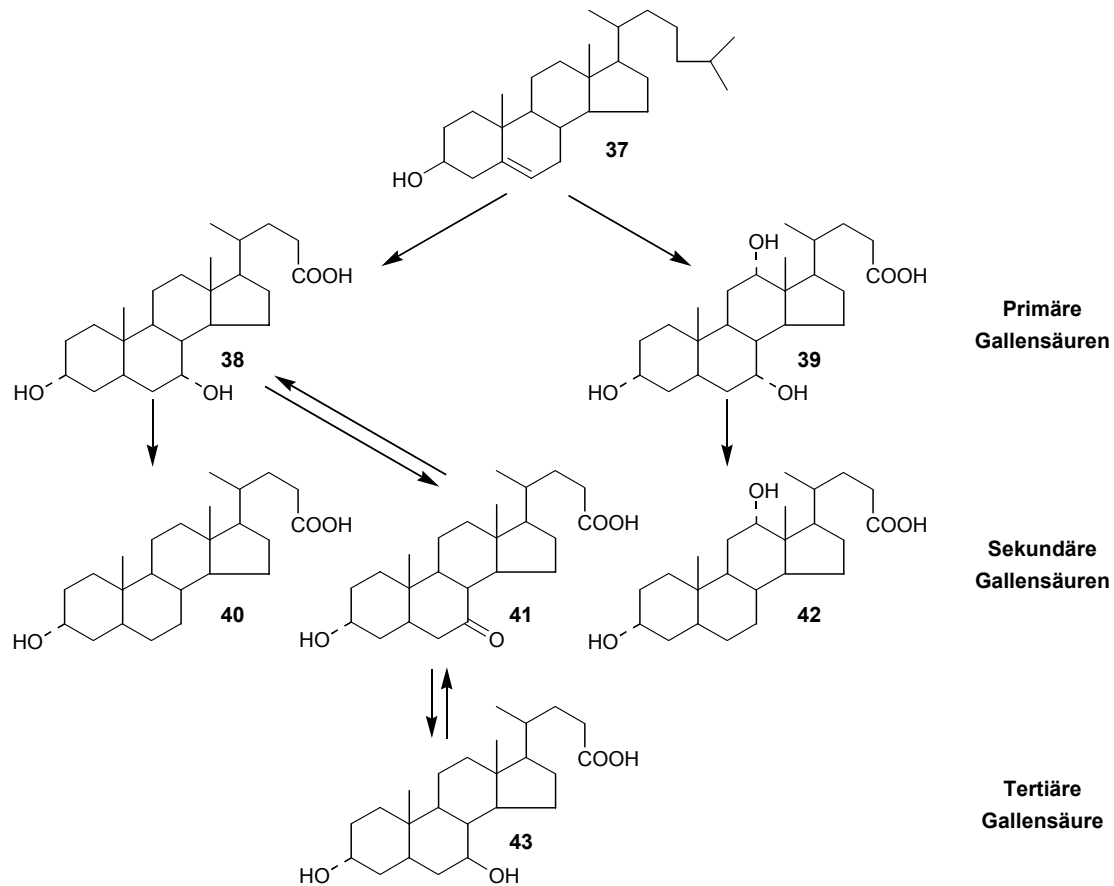


Abbildung 2.17: Vereinfachte Darstellung der Bildung von Gallensäuren. Aus Cholesterin (37) erfolgt die Synthese der primären Gallensäuren Chenodesoxycholsäure (38) und Cholsäure (39), die in die sekundären Gallensäuren Lithocholsäure (40) und Desoxycholsäure (42) umgewandelt werden. Die Bildung der tertiären Gallensäure Ursodesoxycholsäure (43) verläuft über 7-Ketolithocholsäure (41).

98 % der in der Leber vorliegenden Gallensäuren verlassen diese nicht als freie Säure bzw. in ihrer aktivierten Form, sondern als Konjugate. Die Konjugation erfolgt mit Glycin oder Taurin durch Gallensäure CoA: Aminosäure-N-Acyltransferase (Abb. 2.18). Das Verhältnis der beiden Konjugate hängt von der Verfügbarkeit der Aminosäuren ab, wobei im Menschen jedoch im Allgemeinen die Glycin-Konjugate mit etwa 70 % dominieren. Die Konjugation bewirkt eine deutliche Absenkung der pK_A -Werte der Gallensäuren und gewährleistet so deren Löslichkeit in Form ihrer Gallensalze im Gastrointestinaltrakt (98, 100, 103, 104).

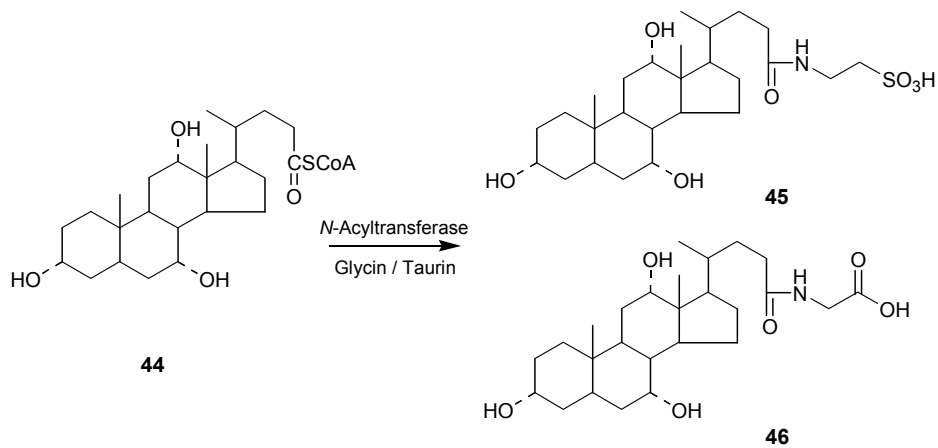


Abbildung 2.18: Konjugation von Gallensäuren am Beispiel der Cholsäure (44) zu Tauro- (45) und Glycogallensäuren (46).

Die Gallensalze durchlaufen im menschlichen Körper den enterohepatischen Kreislauf (Abb. 2.19). Die konjugierten, primären Gallensäuren werden aus der Leber aktiv durch die canalikuläre Membran in die Gallenkapillaren transportiert und dort angereichert. Als Bestandteil der Galle gelangen die Gallensalze schließlich ins Duodenum (101, 105, 106). Während der Passage durch den Dünndarm wird ein Teil der Gallensalze passiv absorbiert und zur Leber transportiert (105, 107, 108). Der Großteil der Gallensäuren, ca. 95 %, wird jedoch im distalen Ileum aktiv durch mehrere natriumabhängige Transportsysteme absorbiert und mit dem Pfortaderblut zurück zur Leber transportiert (100, 101, 105, 107). Der enterohepatische Kreislauf wird auf diese Weise von den Gallensalzen bzw. -säuren ca. 6 - 10 mal pro Tag durchlaufen. Dies entspricht einer Menge von ca. 12 - 36 g Gallensalzen, die täglich die Leber bzw. den Dünndarm passieren (109). Weniger als 5 % der Gallensalze gelangen in das Kolon, aus dem sie ebenfalls passiv absorbiert werden können. Nur ein Bruchteil der Gallensalze (0,2 - 0,6 g/Tag) werden mit den Fäzes ausgeschieden (105, 110, 111).

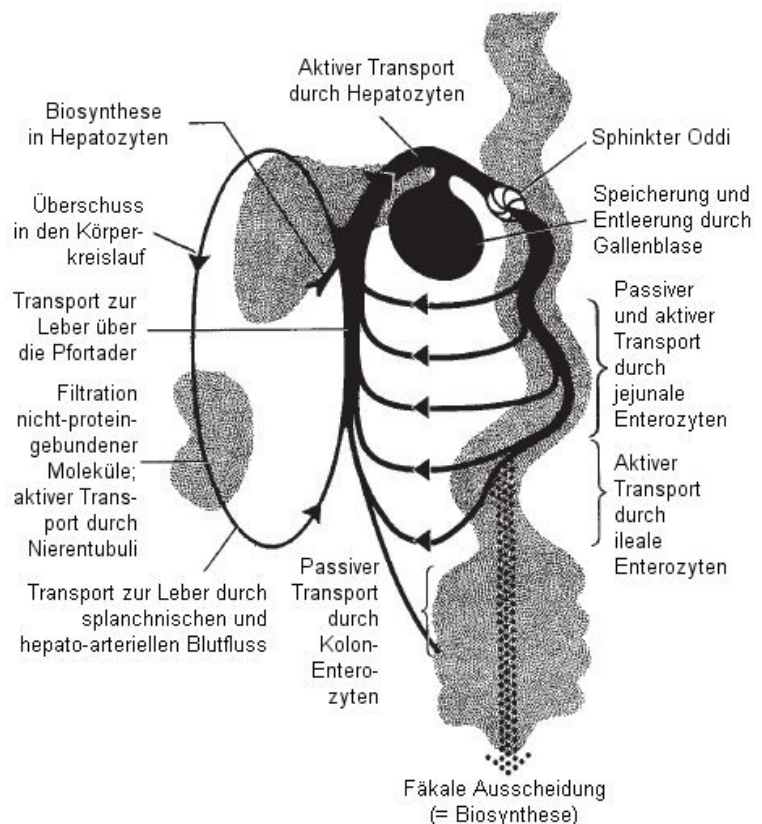


Abbildung 2.19: Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren im menschlichen Körper (103).

Im Ileum und Kolon können die Gallensalze durch die dort angesiedelte Mikrobiota in eine Vielzahl von Metaboliten transformiert werden. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei die De-konjugation und anschließende Dehydroxylierung an der C7-Position, z. B. durch Vertreter der Lactobazillen, Clostridien, Bifidobakterien, Eubakterien und der Gattung *Bacteroides* (112). Die hieraus resultierenden Gallensäuren werden als sekundäre Gallensäuren bezeichnet. Während aus Cholsäure Desoxycholsäure gebildet wird, entsteht aus Chenodesoxycholsäure Lithocholsäure (Abb. 2.17).

Desoxycholsäure wird analog zu den primären Gallensalzen nahezu vollständig absorbiert und durchläuft den enterohepatischen Kreislauf, wohingegen Lithocholsäure hauptsächlich mit den Fäzes ausgeschieden und nur zu 0,2 - 0,5 % absorbiert wird (113). Des Weiteren kann Chenodesoxycholsäure nach Oxidation im Darm zu 7-Ketolithocholsäure absorbiert und in der Leber zur tertiären Gallensäure Ursodesoxycholsäure reduziert werden (Abb. 2.17) (105, 112).

Unter den primären, sekundären und tertiären Gallensäuren dominieren in der Galle die Salze der Cholsäure und der Chenodesoxycholsäure, die durchschnittlich 37 % bzw. 39 % der gesamten Gallensäuren ausmachen. Die Salze der Desoxycholsäure umfassen durchschnittlich 16 %, wohingegen die der Ursodesoxycholsäure und Lithocholsäure mit nur durchschnittlich 2,1 % bzw. 0,7 % zu finden sind (104).

2.4.2 Physiologische Eigenschaften von Gallensäuren

Gallensäuren liegen im Gastrointestinaltrakt vor allem in Form von so genannten mixed-Micellen vor, die sie aufgrund ihres amphiphilen Charakters ausbilden können. In diese Micellen werden Substanzen wie Lecithin und Cholesterin in der Galle oder Fettsäuren und Monoglyceride im Dünndarm integriert. Mit ihnen wird der Transport wasserunlöslicher Substanzen ermöglicht. In der Galle dienen die Micellen z. B. zur Exkretion von Cholesterin und anderen lipophilen Molekülen. Im Dünndarm transportieren die Micellen oberhalb der kritischen Micellbildungskonzentration Triglyceride und fettlösliche Vitamine und ermöglichen so deren Absorption (97, 103).

Durch die Emulsion von Fetttropfen in den Micellen werden deren Angriffsflächen für Lipasen vergrößert und somit die Fettverdauung gefördert. Des Weiteren aktivieren Gallensäuren spezielle Lipasen (bile salt-activated lipases), die für die Verdauung verschiedener Fetttypen eine bedeutende Rolle spielen (97).

Schließlich sind Gallensäuren für die Regulierung ihrer eigenen Synthese als auch die von Cholesterin von Bedeutung. Bei sinkender intrazellulärer Gallensäurekonzentration wird die Synthese der Gallensäuren gesteigert. Dies basiert auf einer hemmenden Wirkung der Gallensäuren auf die Cholesterin-7 α -Hydroxylase, ein Enzym, welches für die Gallensäuresynthese über den neutralen Biosyntheseweg essentiell ist (Kap. 2.4.1). Durch Hemmung der Cholesterin-7 α -Hydroxylase wird die Gallensäurekonzentration im Gleichgewicht gehalten (103, 109). Eine gesteigerte Gallensäuresynthese wiederum bedarf einer erhöhten Menge an Cholesterin als Edukt, sodass dessen Konzentration gesenkt wird (97). Als weiterer Aspekt der Cholesterinregulierung inhibieren die dominierenden hydrophoben Gallensäuren die β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA-Reduktase, die ein limitierendes Enzym der Cholesterin-

synthese darstellt. Die weniger vertretenen hydrophilen Gallensäuren (z. B. Ursodesoxycholsäure) hingegen erwiesen sich als aktivitätssteigernd für das Enzym (109). Die Involvierung der Gallensäuren in die Cholesterinregulierung scheint jedoch im Detail sehr viel komplexer zu sein. So wird z. B. diskutiert, dass Gallensäuren als Hormone agieren, die an Nuclear-Rezeptoren binden und die Expression von Proteinen modulieren, die wiederum für den Cholesterinhaushalt bestimmend sind (97).

Gallensäuren werden nicht nur positive Eigenschaften zugesprochen. Sekundäre Gallensäuren erwiesen sich in Tierstudien als tumorfördernd (114, 115) und werden auch mit menschlichen Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht (116-118). Die Mechanismen, mit denen Gallensäuren z. B. intrazelluläre Signalwege und die Genexpression beeinflussen und so Proliferation und Apoptose induzieren, sind bislang nur ansatzweise geklärt (119-123). Auf der anderen Seite scheinen sekundäre Gallensäure ebenso die Apoptose von Krebszellen bewirken zu können (124-126).

2.4.3 Adsorption an Ballaststoffe

Ähnlich wie für HAA (Kap. 2.3.3) wird auch für Gallensäuren die Adsorption an Ballaststoffe, vor allem lösliche, viskose Ballaststoffe, als positiver Mechanismus für die menschliche Gesundheit diskutiert. Der hierdurch bewirkte Transport von Gallensäuren aus dem Körper hätte zum einen eine gesteigerte Gallensäuresynthese zur Folge, um die entstehenden Gallensäure-Defizite im enterohepatischen Kreislauf auszugleichen. Da die Synthese aus Cholesterin erfolgt, wäre eine Senkung des Cholesterinspiegels die Folge (Kap. 2.4.2). Die Adsorption sekundärer Gallensäuren wird aufgrund derer tumorfördernden Eigenschaften vor allem in Zusammenhang mit einer Reduzierung des Krebsrisikos gesehen.

Die Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe wurde analog zu den Studien mit HAA u. a. anhand zahlreicher *in vitro*-Studien untersucht. Hierbei wurden als Ballaststoffquellen verschiedene Getreide- (127-132) und Gemüsearten (133-137) verwendet und entsprechend variierende Adsorptionsraten von 0 - 200 μmol Gallensäure/g Probe erzielt. Aussagen über den Einfluss einzelner Ballaststoffkomponenten auf die Adsorption von Gallensäuren sind hierbei widersprüchlich. Während für Cellulose z. B. einheitlich eine geringe Adsorption beobachtet wurde (127, 137, 138), sind die oftmals als besonders effektiv hervorgehobenen Adsorptionseigenschaften von Lignin umstritten. Viele Studien führen hohe Adsorptionsraten auf das in Ballaststoffen enthaltene Lignin zurück (137, 139-142), jedoch gibt es auch Studien, die diese These anzweifeln (130, 143, 144).

Des Weiteren spielt für die Adsorption von Gallensäuren ihre Konjugation eine Rolle. Bisherige Studien zeigten, dass Glycinkonjugate besser adsorbiert werden als die entsprechenden Taurinkonjugate (133, 139, 145). Vergleichende Aussagen über die Adsorption von unkonjugierten und konjugierten Gallensäuren sind hingegen widersprüchlich (133, 136, 139, 145). Schließlich wird in den meisten Studien die Adsorption der Gallensäuren mit der Anzahl der Hydroxylgruppen der jeweiligen Gallensäuren korreliert (132, 133, 136, 137, 139, 142). Hieraus wird im Allgemeinen eine Abhängigkeit der Adsorption von der Hydrophobizität der Gallensäuren abgeleitet. Dies wiederum würde hydrophobe Wechselwirkungen als Grundlage

für die Adsorption nahe legen. Jedoch gibt es ebenso Studien, die einem Zusammenhang zwischen Hydrophobizität der Gallensäuren und Adsorption widersprechen (130, 145).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Für Ballaststoffe wird eine Vielzahl ernährungsphysiologisch positiver Eigenschaften diskutiert. Diese zu verallgemeinern ist jedoch aufgrund der komplexen und variierenden Struktur von Ballaststoffen nicht möglich. Um vor allem physikochemische und ernährungsphysiologische Eigenschaften von Ballaststoffen besser deuten und beurteilen zu können, ist daher das Ziel vieler Studien, einzelne Ballaststoffkomponenten mit bestimmten Eigenschaften zu korrelieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Wirkungsweisen zweier strukturell bedeutender Ballaststoffkomponenten näher untersucht werden: Ferulasäure und ihre oligomeren Verbindungen sowie Lignin.

Voraussetzung für die Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist eine möglichst genaue Kenntnis der zu untersuchenden Komponenten. Gerade im Bereich der oligomeren Ferulasäureverbindungen ist noch vieles unbekannt. Das Vorkommen von höher oligomeren Ferulasäureverbindungen war lange Zeit umstritten. Die erstmalige Isolierung einer Dehydrotriferulasäure, der 5-5/8-O-4-gekoppelten Triferulasäure, verdeutlichte den Bedarf struktureller Aufklärung von Ferulasäureoligomeren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher auf das Vorkommen weiterer bislang unbekannter Triferulasäuren in Ballaststoffen geprüft werden. Eine Isolierung der Substanzen sollte aus Maiskleie mittels Sephadex LH-20 Chromatographie und semipräparativer HPLC erreicht werden. Eine Identifizierung sollte mittels Massenspektrometrie (MS) und 1D- und 2D-Kernresonanzspektroskopie (NMR) erfolgen.

Die Korrelation einzelner Ballaststoffkomponenten mit bestimmten ernährungsphysiologischen Eigenschaften erweist sich im Allgemeinen als schwierig, da bei der Verwendung komplexer Zellwände als Ballaststoffquellen neben den untersuchten Ballaststoffkomponenten eine Vielzahl anderer Komponenten die Ergebnisse beeinflussen können. Eine Isolierung von Ballaststoffkomponenten wiederum ist zum einen nicht immer möglich, zum anderen ist zu vermuten, dass die Wirkweise isolierter Substanzen sich von der in einer Matrix eingebundener Substanzen unterscheidet. Diese Problematik soll in dieser Arbeit gelöst werden, indem ausgewählte Eigenschaften von zellwandgebundenen Ferulasäuren bzw. Diferulasäure-Cross-Links und Lignin mit Hilfe von manipulierten Maiszellwänden analysiert werden. Das Besondere dieses Zellwand-Modellsystems ist, dass gezielt einzelne Parameter der Zellwände verändert werden können, während die restliche Zellwandmatrix gleich bleibt. So sollten z. B. Zellwände mit reduziertem Ferulasäure- sowie erhöhtem Diferulasäuregehalt hergestellt werden. Um den Einfluss von Lignin auf bestimmte Ballaststoffeigenschaften zu untersuchen, sollten Zellwände mit variierenden Ligningehalten und Ligninzusammensetzungen angefertigt werden. Hierbei sollte die Wahl der Parameter möglichst gut die in natürlichen Zellwänden vorkommenden Lignine imitieren. Die Synthese der Zellwände sollte am

U.S. Dairy Forage Research Center durchgeführt werden, das auf dem Gebiet dieser Modellzellwände bereits langjährige Erfahrungen aufweist.

Die synthetisierten Maiszellwände sollten u. a. für Adsorptionsstudien genutzt werden. Hierbei sollte analysiert werden, welchen Einfluss die zu variierenden Ferulasäure- bzw. Ligninparameter auf die *in vitro*-Adsorption ausgewählter, mutagener HAA ausüben. Eine Adsorption von HAA wird im Allgemeinen als wünschenswert angesehen, da die HAA so aus dem Körper heraustransportiert werden könnten, ohne einer Adsorption bzw. einer metabolischen Aktivierung in der Leber zu unterliegen. Der Einfluss von Ferulasäurederivaten auf die Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen wurde bislang nicht untersucht, während für Lignin im Allgemeinen ein besonders ausgeprägter Einfluss auf die Adsorption von HAA diskutiert wird. Jedoch wurde in bisherigen Studien nur mit komplexen Modellballaststoffen gearbeitet, wohingegen der Einsatz manipulierter Maiszellwände erstmals die spezifische Erfassung des Einflusses der Lignifizierung auf die Adsorption von HAA ermöglichen sollte. Für die Adsorptionsstudien sollte in Anlehnung an die Arbeiten von Ferguson/Harris et al. (90, 91) eine Methode zur Inkubation von Zellwandsuspensionen mit HAA (unter den Dünndarm simulierenden Bedingungen) sowie eine HPLC-Methode zur Quantifizierung nicht adsorbierter HAA entwickelt und etabliert werden.

Werden HAA an lignifizierte Zellwände im Dünndarm adsorbiert, besteht die Möglichkeit, dass die adsorbierten HAA während der Passage durch den menschlichen Dickdarm wieder freigesetzt werden. Ballaststoffe unterliegen im Dickdarm einem fermentativen Abbau, der die Struktur der Ballaststoffe bzw. der Fermentationsrückstände ggf. maßgeblich verändert und somit auch die Adsorptionseigenschaften positiv wie auch negativ beeinflussen kann. Um dieser Frage nachzugehen, sollten Maiszellwände am Deutschen Institut für Ernährung in Potsdam mit humaner Darmmikrobiota in Form von Fäzessuspensionen inkubiert werden, um so den Abbau im menschlichen Kolon nachzustellen. Die resultierenden Zellwandrückstände sollten, im Vergleich mit den nicht fermentierten Zellwänden, bezüglich ihrer Adsorptionseigenschaften für ausgewählte HAA untersucht werden.

Die Fermentation gezielt lignifizierter Zellwände mit humanen Darmmikroorganismen sollte des Weiteren Zusammenhänge zwischen Ligninkonzentration und -zusammensetzung und dem Ausmaß des Zellwandabbaus aufzeigen. Hierfür sollten die Zellwände vor und nach einer Fermentation bezüglich der Kohlenhydratzusammensetzung und des Ligningehaltes charakterisiert werden. Analog sollte untersucht werden, inwiefern zellwandgebundene Ferulasäure bzw. Diferulasäure-Cross-Links den Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota hemmen.

Schließlich sollte in Anlehnung an die Adsorptionsstudien mit HAA untersucht werden, welchen Einfluss die Ligninkonzentration und -zusammensetzung auf die Adsorption von ausgewählten Gallensäuren hat. Die Rolle des Lignins für die Gallensäureadsorption wurde bislang in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert. Eine effektive Adsorption primärer Gallensäuren könnte vor allem eine Senkung des Cholesterinspiegels bewirken, während die

Adsorption sekundärer Gallensäuren mit der Reduzierung des Dickdarmkrebsrisikos in Zusammenhang gebracht wird.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich für die Ballaststoffkomponente Ferulasäure bzw. ihre oligomeren Verbindungen in folgende Fragestellungen zusammenfassen:

- Welche Triferulasäuren sind in Ballaststoffen vertreten und in welcher Weise wirken sie bei der Quervernetzung von Polysacchariden mit?
- Beeinflusst die Ferulasäurekonzentration bzw. der Grad der Diferulasäurebildung in Pflanzenzellwänden die Adsorption von HAA?
- Bewirken zellwandgebundene Ferulasäure bzw. Diferulasäure-Cross-Links eine Hemmung des fermentativen Zellwandabbaus durch die humane Darmmikrobiota?

Bezüglich des Lignins sind zusammenfassend folgende Fragestellungen für diese Arbeit relevant:

- Welchen Einfluss haben Ligninkonzentration und -zusammensetzung auf die Adsorption von HAA an Ballaststoffe?
- Welche Auswirkung haben die genannten Parameter auf den fermentativen Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota?
- Wie verändert die Fermentation die Adsorptionseigenschaften lignifizierter Zellwände für HAA?
- Beeinflussen Ligninkonzentration und -zusammensetzung die Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe?

2.6 Literatur

- (1) AACC-Report. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* **2001**, *46*, 112-126.
- (2) Blaut, M. Ökologie des Darmes. In *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes*; W. F. Caspary; M. Kist and J. Stein, Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2006; pp 45-55.
- (3) Evans, D. F.; Pye, G.; Bramley, R.; Clark, A. G.; Dyson, T. J. and Hardcastle, J. D. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **1988**, *29*, 1035-1041.
- (4) Schneeman, B. O. Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutr. Res.* **1998**, *18*, 625-632.
- (5) McDougall, G. J.; Morrison, I. M.; Stewart, D. and Hillman, J. R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *70*, 133-150.
- (6) Plaami, S. P. Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev. Int.* **1997**, *13*, 29-76.
- (7) Ferguson, L. R. and Harris, P. J. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* **1996**, *350*, 173-184.

- (8) Harris, P. J. and Ferguson, L. R. Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Mutation Res.* **1999**, *443*, 95-110.
- (9) May, T.; Mackie, R. I.; Fahey, G. C.; Cremin, J. C. and Garleb, K. H. Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on growth and toxin production by *Clostridium difficile*. *Scand. J. Gastroenterol.* **1994**, *19*, 916-922.
- (10) Scheppach, W.; Bartram, H. P. and Richter, F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **1995**, *31a*, 1077-1080.
- (11) Cummings, J. H.; Sheila, A. and Bingham, S. A. Dietary fibre, fermentation and large bowel cancer. *Cancer Surveys* **1987**, *6*, 601-621.
- (12) Asp, N. G.; Björck, I. and Nyman, M. Physiological effects of cereal dietary fibre. *Carbohydr. Polym.* **1993**, *21*, 183-187.
- (13) Bourquin, L. D.; Titgemeyer, E. C. and Fahey, G. C. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr. Res.* **1996**, *16*, 1119-1131.
- (14) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. and Ralph, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 193-200.
- (15) Beaugrand, J.; Crônier, D.; Debeire, P. and Chabbert, B. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *J. Cereal Sci.* **2004**, *40*, 223-230.
- (16) Jung, H. G. and Allen, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* **1995**, *73*, 2774-2790.
- (17) Heredia, A.; Jimenez, A. and Guillen, R. Composition of plant-cell walls. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *200*, 24-31.
- (18) Bunzel, M. and Steinhart, H. Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten. *Chem. Unserer Zeit* **2003**, *37*, 188-196.
- (19) Theander, O.; Westerlund, E. and Aman, P. Structure and components of dietary fiber. *Cereal Foods World* **1993**, *38*, 135-138.
- (20) Vincken, J.-P.; Schols, H. A.; Oomen, R. J. F. J.; McCann, M. C.; Ulvskov, P.; Vorage, A. G. J. and Visser, R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall structure. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1781-1789.
- (21) Bunzel, M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. Dissertation, Hamburg, 2001.
- (22) Humphreys, J. M. and Chapple, C. Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, *5*, 224-229.
- (23) Bunzel, M.; Allerdings, E.; Sinnwell, V.; Ralph, J. and Steinhart, H. Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 482-488.

-
- (24) Smith, B. G. and Harris, P. J. Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 513-519.
- (25) Ishii, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* **1997**, *127*, 111-127.
- (26) Saulnier, L.; Vigouroux, J. and Thibault, J. F. Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydr. Res.* **1995**, *272*, 241-253.
- (27) Wende, G. and Fry, S. C. 2-O- β -D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1019-1030.
- (28) Allerdings, E.; Ralph, J.; Steinhart, H. and Bunzel, M. Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1276-1286.
- (29) Myton, K. E. and Fry, S. C. Intraprotoplasmic feruloylation of arabinoxylans in *Festuca arundinacea* cell-cultures. *Planta* **1994**, *193*, 326-330.
- (30) Fry, S. C.; Willis, S. C. and Paterson, A. E. J. Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta* **2000**, *211*, 679-692.
- (31) Obel, N.; Porchia, A. C. and Scheller, H. V. Intracellular feruloylation of arabinoxylan in wheat: evidence for feruloyl-glucose as precursor. *Planta* **2003**, *216*, 620-629.
- (32) The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linnean Soc.* **2003**, *141*, 399-436.
- (33) Colquhoun, I. J.; Ralet, M. C.; Thibault, J. F.; Faulds, C. B. and Williamson, G. Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR-spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 243-256.
- (34) Ralet, M. C.; Thibault, J. F.; Faulds, C. B. and Williamson, G. Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell-walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 227-241.
- (35) Bunzel, M.; Ralph, J. and Steinhart, H. Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 551-559.
- (36) Morrison, W. H.; Hartley, R. D. and Himmelsbach, D. S. Synthesis of substituted truxillic acids from *p*-coumaric and ferulic acid: simulation of dimerisation in plant cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 766-771.
- (37) Packert, M. Analytik und Bedeutung gebundener aromatischer Carbonsäuren der Nahrungsfaser aus Getreide und anderen Nutzpflanzen. Dissertation, Universität Hamburg, 1993.

- (38) Geissmann, T. and Neukom, H. Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxidative phenolische Kupplung. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 1108-1112.
- (39) Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Grabber, J. H.; Jung, H. G.; Quideau, S. and Helm, R. F. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In *Lignin and Lignan Biosynthesis*; N. G. Lewis and S. Sarkanen, Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1998; pp 209-236.
- (40) Encina, A. and Fry, S. C. Oxidative coupling of a feruloyl-arabinoxylan trisaccharide (FAXX) in the walls of living maize cells requires endogenous hydrogen peroxide and is controlled by a low-M_r apoplastic inhibitor. *Planta* **2005**, *223*, 77-89.
- (41) Markwalder, H. U. and Neukom, H. Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 836-837.
- (42) Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H. and Hatfield, R. D. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 3485-3498.
- (43) Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. and Steinhart, H. Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3166-3169.
- (44) Ralph, J.; Bunzel, M.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Grabber, J. H. and Steinhart, H. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 79-96.
- (45) Schatz, P. F.; Ralph, J.; Lu, F.; Guzei, I. A. and Bunzel, M. Synthesis and identification of 2,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-tetrahydrofuran-3,4-dicarboxylic acid, an unanticipated ferulate 8-8-coupling product acylating cereal plant cell walls. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2801-2806.
- (46) Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D. and Steinhart, H. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 653-660.
- (47) Fry, S. C. Menage a trois: oxidative coupling of feruloyl polysaccharides *in vivo* proceeds beyond dimers. *Polyphénols Actualités* **2000**, *19*, 8-12.
- (48) Ward, G.; Hadar, Y.; Bilkis, I.; Konstantinovskiy, L. and Dosoretz, C. G. Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18734-18741.
- (49) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C. and Steinhart, H. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 128-133.
- (50) Rouau, X.; Cheynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudec, E.; Louis-Montero, J. and Criton, M. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 899-903.

- (51) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C. and Steinhart, H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5845-5850.
- (52) Bunzel, M.; Ralph, J.; Brüning, P. and Steinhart, H. Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6409-6418.
- (53) Beaugrand, J.; Cronier, D.; Thiebeau, P.; Schreiber, L.; Debeire, P. and Chabbert, B. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7108-7117.
- (54) Bunzel, M.; Steinhart, H. and Ralph, J. Strukturbildende phenolische Verbindungen in Getreideballaststoffen am Beispiel löslicher und unlöslicher Roggenballaststoffe. *Getreide, Mehl und Brot* **2002**, *56*, 281-286.
- (55) Saulnier, L.; Crepeau, M. J.; Lahaye, M.; Thibault, J. F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A. and Williamson, G. Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 82-92.
- (56) Allerdings, E.; Ralph, J.; Schatz, P. F.; Gniechwitz, D.; Steinhart, H. and Bunzel, M. Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 113-124.
- (57) Ralph, J.; Helm, R. F.; Quideau, S. and Hatfield, R. D. Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 2961-2969.
- (58) Jacquet, G.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Mhamdi, F. and Rolando, C. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2746-2751.
- (59) Ralph, J.; Grabber, J. H. and Hatfield, R. D. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* **1995**, *275*, 167-178.
- (60) Quideau, S. and 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* **1997**, 2351-2358.
- (61) Oudgenoeg, G.; Hilhorst, R.; Piersma, S. R.; Boeriu, C. G.; Gruppen, H.; Hessing, M.; Voragen, A. G. J. and Laane, C. Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2503-2510.
- (62) Oudgenoeg, G.; Dirksen, E.; Ingemann, S.; Hilhorst, R.; Gruppen, H.; Boeriu, C. G.; Piersma, S. R.; vanBerkel, W. J. H.; Laane, C. and Voragen, A. G. J. Horseradish peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid on a template of a tyrosine-containing tripeptide. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21332-21340.

- (63) Boeriu, C. G.; Oudgenoeg, G.; Spekking, W. T. J.; Berendsen, L. B. J. M.; Vancon, L.; Boumans, H.; Gruppen, H.; van Berkel, W. J. H.; Laane, C. and Voragen, A. G. J. Horseradish peroxidase-catalyzed cross-linking of feruloylated arabinoxylans with β -caseins. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6633-6639.
- (64) Piber, M. and Koehler, P. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5276-5284.
- (65) Boerjan, W.; Ralph, J. and Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 519-546.
- (66) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H. and Boerjan, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 29-60.
- (67) Wallace, G. and Fry, S. C. Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 769-773.
- (68) Davin, L. B.; Wang, H.-B.; Crowell, A. L.; Bedgar, D. L.; Martin, D. M.; Sarkanen, S. and Lewis, N. G. Stereoselective biomolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **1997**, *275*, 362-366.
- (69) Davin, L. B. and Lewis, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 453-461.
- (70) Grabber, J. H.; Ralph, J. and Hatfield, R. D. Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: Implications for lignification in grasses. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6008-6016.
- (71) Bunzel, M.; Ralph, J.; Lu, F.; Hatfield, R. D. and Steinhart, H. Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6496-6502.
- (72) Bunzel, M.; Seiler, A. and Steinhart, H. Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9553-9559.
- (73) Ralph, J.; Lapierre, C.; Marita, J. M.; Kim, H.; Lu, F.; Hatfield, R. D.; Ralph, S.; Chapple, C.; Franke, R.; Hemm, M. R.; Van Doorselaere, J.; Sederoff, R. R.; O'Malley, D. M.; Scott, J. T.; Mac Kay, J. J.; Yahiaoui, N.; Boudet, A.-M.; Pean, M.; Pilate, G.; Jouanin, L. and Boerjan, W. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 993-1003.
- (74) Marita, J. M.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Guo, D.; Chen, F. and Dixon, R. A. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 53-65.

- (75) Kirk, T. K.; Connors, W. J.; Bleam, W. D.; Hackett, W. F. and Zeikus, J. G. Preparation and microbial decomposition of synthetic (^{14}C) lignins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72*, 2513-2519.
- (76) Gagnaire, D. and Robert, D. A polymer model of lignin (D. H. P.) carbon-13 selectively labelled at the benzylic positions: synthesis and NMR study. *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 1477-1495.
- (77) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Kuster, T. and Pell, A. N. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1453-1459.
- (78) Jägerstad, M.; Skog, K. I.; Arvidsson, P. and Solyakov, A. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1998**, *207*, 419-427.
- (79) Knize, M. G.; Dolbeare, F. A.; Carroll, K. L.; Moore, D. H. and Felton, J. S. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 595-603.
- (80) Felton, J. S.; Fultz, E.; Dolbeare, F. A. and Knize, M. G. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties by microwave pretreatment. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 897-903.
- (81) Pfau, W. Krebs und Ernährung: welche Bedeutung haben Aufbewahrung und Zubereitung der Nahrung? *Aktuel. Ernaehr. Med.* **2001**, *26*, 144-147.
- (82) Sugimura, T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 387-395.
- (83) Sugimura, T. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **1997**, *376*, 211-219.
- (84) Turesky, R. J. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 101-117.
- (85) Berlau, J.; Gleib, M. and Pool-Zobel, B. L. Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 737-743.
- (86) Turesky, R. J. Metabolism and biodisposition of heterocyclic amines. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, *347*, 39-53.
- (87) Schut, H. A. J. and Snyderwine, E. G. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 353-368.
- (88) Lin, D. X.; Lang, N. P. and Kadlubar, F. F. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by hepatic microsomes and cytosols from humans, rats, and mice. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, *23*, 518-524.
- (89) Weisburger, J. H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutat. Res.* **2002**, *506-507*, 9-20.

- (90) Ferguson, L. R.; Robertson, A. M.; Watson, M. E.; Kestell, P. and Harris, P. J. The adsorption of a range of dietary carcinogens by α -cellulose, a model insoluble dietary fiber. *Mutation Res.* **1993**, *319*, 257-266.
- (91) Harris, P. J.; Triggs, C. M.; Robertson, A. M.; Watson, M. E. and Ferguson, L. R. The adsorption of heterocyclic aromatic amines by model dietary fibres with contrasting compositions. *Chem. Biol. Interact.* **1996**, *100*, 13-25.
- (92) Egoshi, K.; Nakaoka, H.; Oka, T. and Abo, K. Adsorption of heterocyclic aromatic amines by low molecular weight cellulose. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **1997**, *38*, 435-440.
- (93) Barnes, W. S.; Maiello, J. and Weisburger, J. H. *In vitro* binding of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline to dietary fibers. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, *70*, 757-760.
- (94) Ryden, P. and Robertson, J. A. The effects of pH and bile salts on the binding of MeIQx to wheat bran fibre. *Mutation Res.* **1996**, *351*, 45-52.
- (95) Ferguson, L. R.; Robertson, A. M.; Watson, M. E.; Triggs, C. M. and Harris, P. J. The effects of a soluble-fibre polysaccharide on the adsorption of carcinogens to insoluble dietary fibres. *Chem.-Biol. Interactions* **1995**, *95*, 245-255.
- (96) Ryden, P. and Robertson, J. A. The effect of fibre source and fermentation on the apparent binding properties of wheat bran preparations for the mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 209-216.
- (97) Mukhopadhyay, S. and Maitra, U. Chemistry and biology of bile acids. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 1666-1683.
- (98) Russell, D. W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 137-174.
- (99) Chiang, J. Y. L. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J. Hepatol.* **2004**, *40*, 539-551.
- (100) St-Pierre, M. V.; Kullak-Ublick, G. A.; Hagenbuch, B. and Meier, P. J. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J. Exp. Biol.* **2001**, *204*, 1673-1686.
- (101) Kullak-Ublick, G. A.; Stieger, B. and Meier, P. J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **2004**, *126*, 322-342.
- (102) Schwarz, M. Pathways and defects of bile acid synthesis: insights from *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Drug Discov. Today* **2004**, *1*, 205-212.
- (103) Hofmann, A. F. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol. Sci.* **1999**, *14*, 24-29.
- (104) Rossi, S. S.; Converse, J. L. and Hofmann, A. F. High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids. *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 589-595.

- (105) Gerok, W. and Matern, S. Pathogenetische Bedeutung der Gallensäuren. *Klin. Wochenschr.* **1981**, *59*, 575-589.
- (106) Roberts, M. S.; Magnusson, B. M.; Burczynski, F. J. and M., W. Enterohepatic circulation, physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 751-790.
- (107) Torchia, E. C.; Cheema, S. K. and Agellon, L. B. Coordinate regulation of bile acid biosynthetic and recovery pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225*, 128-133.
- (108) Meier, P. J. and Stieger, B. Bile salt transporters. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, *64*, 635-661.
- (109) Carulli, N.; Bertolotti, M.; Carubbi, F.; Concari, M.; Martella, P.; Carulli, L. and Loria, P. Review article: effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2000**, *14*, 14-18.
- (110) Mekhjian, H. S.; Phillips, S. F. and Hofmann, A. F. Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig. Dis. Sci.* **1979**, *24*, 545-550.
- (111) Redinger, R. N. The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts. *Am. J. Surg.* **2003**, *185*, 168-172.
- (112) Prabha, V. and Ohri, M. Review: bacterial transformations of bile acids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 191-196.
- (113) Chiang, J. Y. L. Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2003**, *284*, 349-356.
- (114) Reddy, B. S.; Watanabe, K.; Weisburger, J. H. and Wynder, E. L. Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 3238-3242.
- (115) Cohen, B. I. and Raicht, R. F. Effects of bile acids on colon carcinogenesis in rats treated with carcinogens. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 3759-3760.
- (116) Reddy, B. S.; Mastromarino, A.; Gustafson, C.; Lipkin, M. and Wynder, E. L. Fecal bile acids and neutral sterols in patients with familial polyposis. *Cancer* **1976**, *38*, 1694-1698.
- (117) Bayerdorffer, E.; Mannes, G. A.; Richter, W. O.; Ochsenkuhn, T.; Wiebecke, B.; Kopeke, W. and Paumgartner, G. Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterology* **1993**, *104*, 145-151.
- (118) Imray, C. H.; Radley, S.; Davis, A.; Barker, G.; Hendrickse, C. W.; Donovan, I. A.; Lawson, A. M.; Baker, P. R. and Neoptolemos, J. P. Faecal unconjugated bile acids in patients with colorectal cancer or polyps. *Gut* **1992**, *33*, 1239-1245.
- (119) Mahmoud, N. N.; Dannenberg, A. J.; Bilinski, R. T.; Mestre, J. R.; Chadburn, A.; Churchill, M.; Martucci, C. and Bertagnolli, M. M. Administration of an unconjugated bile acid increases duodenal tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 299-303.

- (120) Glinghammar, B.; Inoue, H. and Rafter, J. J. Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF- κ B and AP-1. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 839-845.
- (121) Mühlbauer, M.; Allard, B.; Bosserhoff, A. K.; Kiessling, S.; Herfarth, H.; Rogler, G.; Schölmerich, J.; Jobin, C. and Hellerbrand, C. Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF- κ B signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2004**, *286*, 1000-1008.
- (122) Yoon, J.-H.; Higuchi, H.; Werneburg, N. W.; Kaufmann, S. H. and Gores, G. J. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 985-993.
- (123) Pai, R.; Tarnawski, A. S. and Tran, T. Deoxycholic acid activates β -catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 2156-2163.
- (124) Schlottmann, K.; Wachs, F.-P.; Krieg, R. C.; Kullmann, F.; Schölmerich, J. and Rogler, G. Characterization of bile salt-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4270-4276.
- (125) Zhang, R. Z.; Gong, J.; Wang, H. and Wang, L. Bile salts inhibit growth and induce apoptosis of human esophageal cancer cell line. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11*, 5109-5113.
- (126) Yui, S.; Saeki, T.; Kanamoto, R. and Iwami, K. Characteristics of apoptosis in HCT116 colon cancer cells induced by deoxycholic acid. *J. Biochem.* **2005**, *138*, 151-157.
- (127) Kritchevsky, D. *In vitro* binding of bile acids and other lipids by dietary fiber. *Agr. Food Ind. Hi Tec.* **1996**, *7*, 27-29.
- (128) Kahlon, T. S. and Woodruff, C. L. *In vitro* binding of bile acids by rice bran, oat bran, barley and β -glucan enriched barley. *Cereal Chem.* **2003**, *80*, 260-263.
- (129) Kahlon, T. S.; Berrios, J. d. J.; Smith, G. E. and Pan, J. L. *In vitro* bile acid binding capacity of wheat bran extruded at five specific mechanical energy levels. *Cereal Chem.* **2006**, *83*, 157-160.
- (130) Górecka, D.; Korczak, J.; Konieczny, P.; Hes, M. and Flaczyk, E. Adsorption of bile acids by cereal products. *Cereal Foods World* **2005**, *50*, 176-178.
- (131) Sayar, S.; Jannink, J.-L. and White, P. J. *In vitro* bile acid binding activity within flour fractions from oat lines with typical and high β -glucan amounts. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5142-5148.
- (132) Drzikova, B.; Dongowski, G.; Gebhardt, E. and Habel, A. The composition of dietary fibre-rich extrudates from oat affects bile acid binding and fermentation *in vitro*. *Food Chem.* **2005**, *90*, 181-192.

- (133) Kern, F., Jr.; Birkner, H. J. and Ostrower, V. S. Binding of bile acids by dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* **1978**, *31*, 175-179.
- (134) Pickardt, C.; Dongowski, G. and Kunzek, H. The influence of mechanical and enzymatic disintegration of carrots on the structure and properties of cell wall materials. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 229-239.
- (135) Hoagland, P. D. and Pfeffer, P. E. Cobinding of bile acids to carrot fiber. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 316-319.
- (136) Chen, M. L.; Chang, S. C. and Guoo, J. Y. Fiber contents of some chinese vegetables and their *in vitro* binding capacity of bile acids. *Nutr. Rep. Int.* **1982**, *26*, 1053-1059.
- (137) Górecka, D.; Korczak, J.; Balcerowski, E. and Decyk, K. Sorption of bile acids and cholesterol by dietary fiber of carrots, cabbage and apples. *Electr. J. Pol. Agric. Univ. Food Sci. Technol.* **2002**, *5*, published online at www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/food/art-02.html.
- (138) Kahlon, T. S.; Smith, G. E. and Shao, Q. *In vitro* binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*). *Food Chem.* **2005**, *90*, 241-246.
- (139) Eastwood, M. A. and Hamilton, D. Studies on the adsorption of bile salts to non-absorbed components of diet. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *152*, 165-173.
- (140) Story, J. A. and Kritchevsky, D. Comparison of the binding of various bile acids and bile salts *in vitro* by several types of fiber. *J. Nutr.* **1976**, *106*, 1292-1294.
- (141) Gallaher, D. and Schneeman, B. O. Intestinal interaction of bile acids, phospholipids, dietary fibers, and cholestyramine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **1986**, *250*, 420-426.
- (142) Huang, C.-M. and Dural, N. H. Adsorption of bile acids on cereal type food fibers. *J. Food Proc. Eng* **1995**, *18*, 243-266.
- (143) Elhardallou, S. B. The bile acids binding of the fibre-rich fractions of three starchy legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1992**, *42*, 207-218.
- (144) Nixon, A.; Mason, A. N. and Bilton, R. F. The binding of bile acids by *in vitro* enzymically digested vegetable fibre. *Biochem. Soc. Trans.* **1986**, *14*, 369-370.
- (145) Camire, M. E. and Dougherty, M. P. Raisin dietary fiber composition and *in vitro* bile acid binding. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 834-837.

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Arbeit befassen sich mit der Strukturcharakterisierung von Ferulasäureoligomeren und den Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Ferulaten und Ligninen als Ballaststoffkomponenten der pflanzlichen Zellwand. Sie werden in diesem Kapitel in Form von fünf Veröffentlichungen präsentiert.

3.1 Isolierung und Strukturcharakterisierung der 8-O-4/8-O-4- und 8-8/8-O-4-gekoppelten Dehydrotriferulasäuren aus Maiskleie

Die in diesem Kapitel dargestellte Veröffentlichung behandelt die Fragestellung, welche Dehydrotriferulasäurestrukturen in Ballaststoffen nachzuweisen sind und in welcher Weise diese bei der Quervernetzung von Polysacchariden mitwirken.

Phytochemistry, 66 (3), 363-371, 2005

Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran

CAROLA FUNK,^a JOHN RALPH,^{b,c} HANS STEINHART,^a MIRKO BUNZEL^{a*}

^a Institute of Biochemistry and Food Chemistry, Department of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany.

^b US Dairy Forage Research Center, USDA-ARS, 1925 Linden Drive West, Madison, Wisconsin 53706-1108, USA.

^c Department of Forestry, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706, USA.

* Author to whom correspondence should be addressed:

e-mail: Mirko.Bunzel@uni-hamburg.de

Tel.: +49-(0)40-42838-4379; Fax: +49-(0)40-42838-4342

Abstract

Two new dehydrotriferulic acids were isolated from saponified maize bran insoluble fiber using Sephadex LH-20 chromatography followed by semi-preparative RP-HPLC. Based on UV-spectroscopy, mass spectroscopy and one- and two-dimensional NMR experiments, the structures were identified as 8-O-4,8-O-4-dehydrotriferulic acid and 8-8(cyclic),8-O-4-dehydrotriferulic acid. Which of the possible phenols in the initially formed 8-8-dehydrotriferulate was etherified by 4-O-8-coupling with ferulate has been unambiguously elucidated. The ferulate dehydrotrimers which give rise to these dehydrotriferulic acids fol-

lowing saponification are presumed, like the dehydrodiferulates, to cross-link polysaccharides. Neither dehydrotriferulic acid described here involves a 5-5-dehydrodiferulic acid unit; only the 5-5-dehydrodimer may be formed intramolecularly. However, whether dehydrotriferulates are capable of cross-linking more than two polysaccharide chains remains open. Although the levels of the isolated ferulate dehydrotrimers are lower than those of the ferulate dehydrodimers, the isolation now of three different dehydrotriferulates indicates that trimers contribute to a strong network cross-linking plant cell wall polysaccharides.

Keywords

Zea mays L.; Gramineae; Maize bran; Cell wall cross-linking; Triferulic acid; Triferulate; Ferulic acid; Ferulate; Arabinoxylans; Dietary fibre

Introduction

Hydroxycinnamic acids have a significant role in cross-linking plant cell wall polymers, especially polysaccharides and lignin (Lam et al., 1992; Ralph et al., 1998b, 2004). Although sinapates (Bunzel et al., 2003b) and *p*-coumarates (Hartley et al., 1990a) also form dimers, ferulic acid is probably the most important hydroxycinnamic acid for cross-linking polysaccharides in the plant cell wall (Ishii, 1997; Ralph et al., 1998b, 2004). In grasses ferulic acid acylates the primary C5-OH of α -L-arabinosyl moieties of arabinoxylans (Kato and Nevins, 1985; Ishii, 1997). In some dicots ferulic acid is linked to pectins (Ishii, 1997). Although ferulate dimerisation is possible by photochemical (Hartley et al., 1990b) and radical coupling (Ralph et al., 1994) mechanisms, radically coupled dehydrodiferulic acids (from dehydrodiferulates) usually predominate over photochemically coupled diferulate cyclobutane derivatives in alkaline hydrolysates of grasses. A whole range of dehydrodiferulates was synthesised (Ralph et al., 1994, 1998a) and identified in a variety of samples (Bunzel et al., 2001; Micard et al., 1997; Parker et al., 2003; Parr et al., 1997; Ralph et al., 1994; Waldron et al., 1997a). The dehydrodiferulates are characterised by the new bond formed between the two ferulates (by coupling at their 4-O-, 5- or 8-carbons) as 5-5-, 8-8-, 8-5-, 8-O-4-, and 4-O-5-coupled dehydrodimers.

Cross-linking of cell wall-polymers via diferulate bridges is of substantial interest in plant physiology, agricultural chemistry, food chemistry and food technology. Termination of the expansion of the cell growth in grasses (Kamisaka et al., 1990; Tan et al., 1992) and wall stiffening (Zarra et al., 1999), thermal stability of cell adhesion and maintenance of crispness of plant-based foods (e.g. water chestnuts) after cooking (Parker et al., 2003; Parr et al., 1996; Waldron et al., 1997b), gelling properties of sugar beet pectins and other food compounds (Neukom and Markwalder, 1978; Ng et al., 1997; Oosterveld et al., 1997), insolubility of cereal dietary fibres (Bunzel et al., 2001), and limited cell wall degradability by ruminants (Grabber et al., 1998; Hatfield et al., 1999) are related to the formation of diferulate cross-links.

Higher ferulic acid oligomers and polymers can be demonstrated *in vitro* (Ward et al., 2001) and have also been discussed for *in vivo* processes. Fry's group, investigating maize sus-

pension cultures for these products (Fry et al., 2000), speculated that radical polymerisation of ferulates does not stop at the dimeric stage *in vivo*, but forms higher oligomers. Recently the first ferulic acid dehydrotrimer was isolated and structurally characterised (Bunzel et al., 2003a; Rouau et al., 2003). This dehydrotriferulic acid involves ferulates coupled by a 5-5- and an 8-O-4-linkage. From molecular modelling studies it is likely that the 5-5-diferulate is the only one that can form intramolecularly (Hatfield and Ralph, 1999). Owing to the involvement of a 5-5-linkage in the identified trimer, its isolation need not implicate the cross-linking of three polysaccharide chains. More indications for cross-linking three polysaccharide chains by ferulic acid dehydrotrimers would be attained by isolating trimers that contain only 8-8-, 8-5-, 8-O-4-, or 4-O-5-, but no 5-5-linkages.

In this paper we describe the isolation and structural characterisation of an 8-O-4/8-O-4-coupled dehydrotrimer, and an 8-8/8-O-4-coupled dehydrotrimer, and discuss their significance for cell wall cross-linking.

Results and discussion

Structural identification of compound 47 (8-O-4/8-O-4-dehydrotriferulic acid)

The recently developed method for the isolation of dehydrodiferulic acids and the 5-5/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acid from saponified maize bran insoluble fiber on semipreparative scale provided several fractions that contained multiple and/or unidentified phenolic compounds (Bunzel et al., 2004). Using Sephadex LH-20 chromatography, monomeric compounds (eluted with 0.5 mM TFA/MeOH 95/5, first eluent) were fully separated from dimeric/trimeric phenolic compounds. However, it was not possible to separate dimeric compounds from trimeric compounds.

Compound 47 (Fig. 3.1) eluted with the third eluent (0.5 mM TFA/MeOH 40/60) in fraction 1 (Fig. 3.2). Analytical RP-HPLC and ^1H NMR-spectra showed that this fraction (7.7 mg) did not contain a pure compound. Further fractionation was achieved using semipreparative RP-HPLC. The purity of compound 47 was estimated to be > 97 % (3.3 mg).

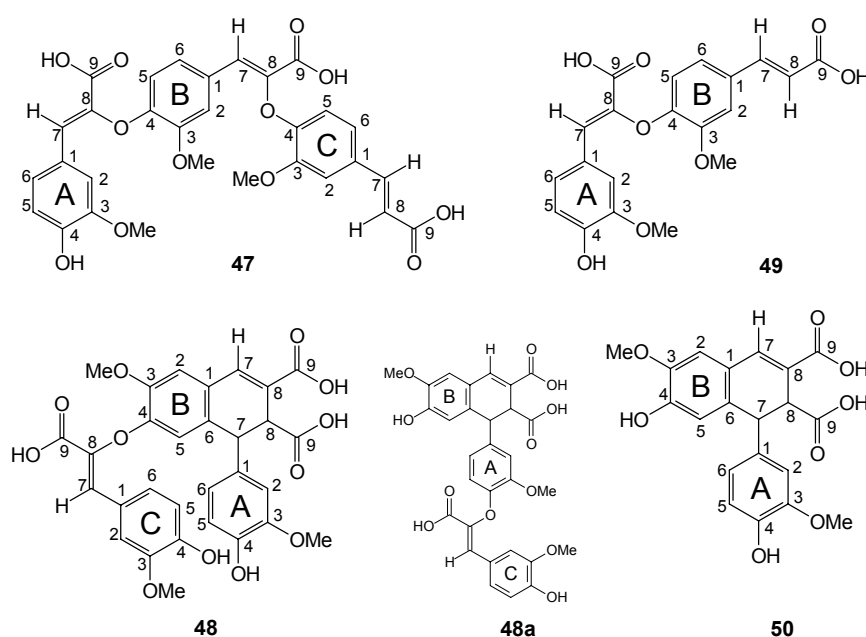


Figure 3.1: Structures and numbering system of the new ferulic acid dehydrotrimers 47 and 48 along with the dehydrodimers 49, 50 and the structure of a hypothetical dehydrotrimer regioisomer 48a.

The UV-spectrum of compound **47** shows characteristics of ferulic acid structures (maxima at 294 nm and 319 nm) (Fig. 3.3, top). The molecular weight of this compound was determined by HPLC-ESI-MS. Negative-ion MS gave a high mass of m/z 577 $[M-H]^-$ (base peak) suggesting a molecular weight of 578. Positive-ion MS showed a base peak of m/z 617, deriving from the potassium adduct ion $[M+K]^+$. A sodium adduct ion was m/z 601 $[M+Na]^+$ (6 % of base peak), also suggesting a molecular weight of 578 indicating a triferulic acid structure.

Results from high-resolution mass spectrometry confirm the formula as $C_{30}H_{26}O_{12}$.

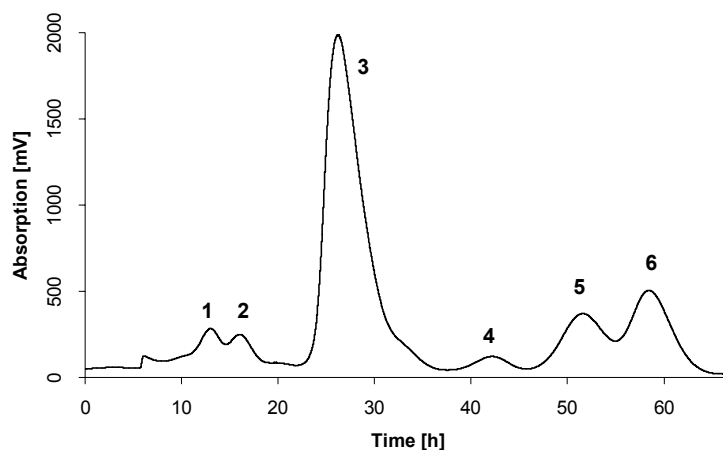


Figure 3.2: Sephadex LH-20 chromatography to isolate compound 47. Compound 47 eluted in fraction 1 using the third eluent (0.5 mM TFA/MeOH 40/60). Fraction 3 contains 5-5-dehydrodiferulic acid, fraction 5 5-5/8-O-4-dehydrotriferulic acid, fraction 6 the decarboxylated form of 8-5-dehydrodiferulic acid and fractions 2 and 4 contain unknown compounds.

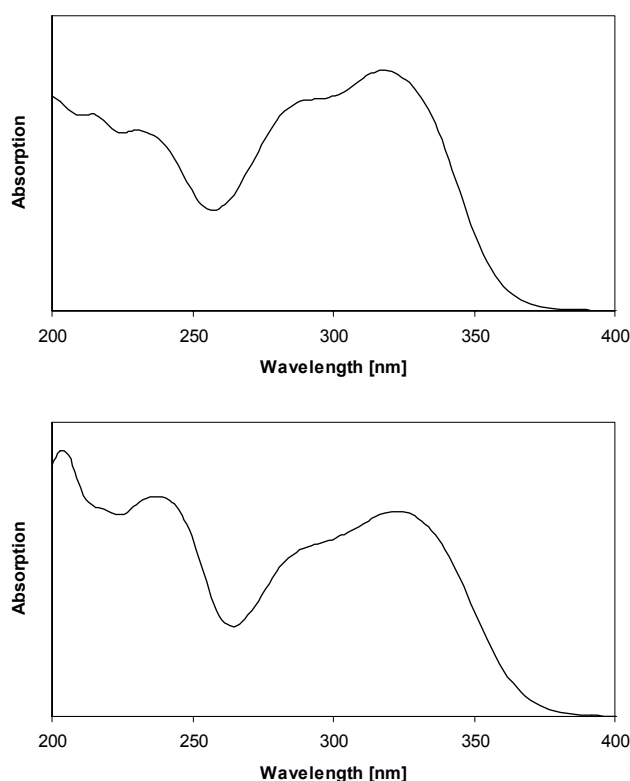


Figure 3.3: UV-spectra of compounds 47 (8-O-4/8-O-4-dehydrotriferulic acid) (top) and 48 (8-8(cyclic)/8-O-4-dehydrotriferulic acid) (bottom).

Using the usual array of 1D and 2D NMR experiments, compound **47** was unambiguously identified as the 8-O-4/8-O-4-coupled ferulic acid dehydrotrimer. 1H and ^{13}C NMR (in acetone- d_6 , Tab. 3.1) showed the signals of 22 protons and 30 carbons. The spectral data revealed three methoxyl groups, three carboxylic groups and three aromatic rings, supporting the MS data suggesting a dehydrotriferulic acid. Consideration of the coupling constants of the aromatic proton signals and the H,H-COSY-spectra indicates protons at the 2-, 5- and 6-carbons of each aromatic ring. This indicates that the ferulic acid units are linked via two 8-O-4-linkages. This contention is proven by presence of only two 16 Hz proton doublets (at 6.44 ppm and 7.59 ppm), indicating just one *trans*-cinnamic acid side chain, but two singlet protons (at 7.38 ppm and 7.42 ppm) characteristic of

Table 3.1: NMR-data for compound 47, 8-O-4/8-O-4-dehydrotriferulic acid, δ in ppm, J in Hz.

Trimer unit	H			C	
	in acetone- d_6	Ref. in acetone- d_6	in DMSO- d_6	in acetone- d_6	Ref. in acetone- d_6
A1				125.1	125.3 ^a
A2	7.45 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.52 (1H, <i>d</i> , 2.0) ^a	7.28 (1H, <i>d</i> , 1.7)	113.8	113.8 ^a
A3				148.3	148.3 ^a
A4				149.4	149.5 ^a
A5	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.82 (1H, <i>d</i> , 8.2) ^a	6.71 (1H, <i>d</i> , 8.2)	115.9	116.0 ^a
A6	7.19 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)	7.23 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.0) ^a	7.07 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.7)	125.9	126.1 ^a
A7	7.38 (1H, <i>s</i>)	7.42 (1H, <i>s</i>) ^a	7.29 (1H, <i>s</i>)	128.2	128.5 ^a
A8				138.3	138.3 ^a
A9				164.7	164.5 ^a
A3-OMe	3.65 (3H, <i>s</i>)	3.73 (3H, <i>s</i>) ^a	3.53 (3H, <i>s</i>)	55.8	55.9 ^a
A4-OH			9.53 (1H, <i>s</i>)		
B1				127.9	130.1 ^b
B2	7.63 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.44 (1H, <i>d</i> , 2.0) ^b	7.50 (1H, <i>d</i> , 1.6)	114.6	112.4 ^b
B3				149.7	150.2 ^b
B4				148.3	148.9 ^b
B5	6.78 (1H, <i>d</i> , 8.5)	6.83 (1H, <i>d</i> , 8.3) ^b	6.64 (1H, <i>d</i> , 8.2)	114.4	114.4 ^b
B6	7.23 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.9)	7.13 (1H, <i>dd</i> , 8.3, 2.0) ^b	7.14 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.6)	125.0	122.9 ^b
B7	7.42 (1H, <i>s</i>)	7.59 (1H, <i>s</i>) ^b	7.33 (1H, <i>s</i>)	127.4	145.3 ^b
B8				139.6	117.5 ^b
B9				164.5	167.9 ^b
B3-OMe	3.82 (3H, <i>s</i>)	4.00 (3H, <i>s</i>) ^b	3.72 (3H, <i>s</i>)	56.0	56.5 ^b
C1				130.2	130.1 ^b
C2	7.44 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.44 (1H, <i>d</i> , 2.0) ^b	7.43 (1H, <i>d</i> , 1.7)	112.4	112.4 ^b
C3				150.1	150.2 ^b
C4				148.7	148.9 ^b
C5	6.82 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.83 (1H, <i>d</i> , 8.3) ^b	6.67 (1H, <i>d</i> , 8.2)	114.2	114.4 ^b
C6	7.12 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)	7.13 (1H, <i>dd</i> , 8.3, 2.0) ^b	7.10 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.7)	122.8	122.9 ^b
C7	7.59 (1H, <i>d</i> , 16.0)	7.59 (1H, <i>s</i>) ^b	7.50 (1H, <i>d</i> , 16.0)	145.1	145.3 ^b
C8	6.44 (1H, <i>d</i> , 16.0)	6.43 (1H, <i>d</i> , 15.9) ^b	6.45 (1H, <i>d</i> , 16.0)	117.7	117.5 ^b
C9				168.2	167.9 ^b
C3-OMe	3.99 (3H, <i>s</i>)	4.00 (3H, <i>s</i>) ^b	3.89 (3H, <i>s</i>)	56.5	56.5 ^b

^{a/b} From a previous study (Ralph et al., 1994), and in NMR database (Ralph et al., 2004b), compound number 2040, 8-O-4-dehydrotriferulic acid (Fig. 3.1, 49). ^a) ring A, ^b) ring B. Abbreviations used: *s* – singlet, *d* – doublet, *dd* – doublet of doublets. Note that the modelling of the aromatic ring in trimer unit B by this compound will not be particularly good since it is additionally 8-linked. The C-ring of the trimer is well modelled by ring B of the dimer.

the unsaturated 7-protons in 8-O-4-coupled products. Based upon the 2D experiments, each of the three propenyl side chains was associated with its corresponding aromatic ring. Whereas the ferulic acid unit with both protons at the 7- and 8-carbons was clearly assigned as an terminal unit (C), the remaining ferulic acid units with only one proton in the sidechain (at carbon-7) could not definitively be assigned as terminal or interior units. The only difference between these two units is the free phenolic hydroxyl group of the terminal ferulic acid unit (A). In order to observe a proton signal for the phenolic hydroxyl group and detect couplings to the aromatic protons, the standard 1D and 2D (for signal assignment) experiments were rerun in DMSO- d_6 , a solvent which minimises proton exchange and therefore sharpens OH-resonances (including those from phenols). The proton spectra showed a singlet at 9.53 ppm, caused by the proton of the phenolic hydroxyl group. The ROESY-spectra showed a coupling between this proton and the proton H5 of one ferulic acid unit, which therefore was assigned as belonging to unit A. The unambiguously assigned proton NMR data for compound **47** in DMSO- d_6 is summarized in Table 3.1. The ^{13}C NMR data are not listed because the small sample amount impeded definitive assignments for all signals within the time constraints for acquiring spectra; full ^{13}C NMR data are provided for the compound in acetone- d_6 . Table 3.1 also shows the comparison of the individual trimer units A, B and C with units A and B of the dimer 8-O-4-dehydrodiferulic acid (**49**, Fig. 3.1). The trimer units A and C are well modelled by this compound, whereas it is not possible to model trimer unit B satisfactorily with this 8-O-4-dehydrodiferulic acid due to the additional 8-coupling in comparison to unit B of the dimer.

Structural identification of compound 48 (8-8(cyclic)/8-O-4-dehydrotriferulic acid)

Compound **48** eluted as a fraction (50.2 mg) together with 8-5-coupled dehydrodiferulic acid (non-cyclic form) and some unidentified compounds with the second eluent (0.5 mM TFA/MeOH 50/50). Further semipreparative RP-HPLC separated compound **48** from the major compound in this fraction, 8-5(non-cyclic)-dehydrodiferulic acid, and some other minor compounds to yield 3.0 mg of fairly clean compound **48** (> 90 %).

The UV-spectrum shows a maximum at 323 nm characteristic of a ferulic acid derivative (Fig. 3.3, bottom). HPLC-ESI-MS was used to determine the molecular weight of this compound. Again, the negative-ion MS gave a high mass of m/z 577 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (base peak) suggesting a weight of 578. Using positive-ion MS the potassium adduct ion m/z 617 $[\text{M} + \text{K}]^+$ formed the base peak. Together with the sodium adduct ion m/z 601 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (6 % of base peak) it also suggested a molecular weight of 578 indicating a triferulic acid structure. High-resolution mass spectrometry confirmed the formula as $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$.

Signals of 21 protons and 30 carbon signals were observed in the 1D NMR spectra in acetone- d_6 . Carbon signals at 173.2 ppm, 168.2 ppm and 164.4 ppm (Tab. 3.2) indicated three carboxylic groups. Due to their chemical shifts (3.61, 3.69, 3.97 ppm), three proton signals (in relation with their carbon shifts) each comprising 3 protons were logically assigned to be methoxyl-groups. Two doublets of doublets at 6.36 and 7.18 ppm with the coupling constants $J = 8.2/2.1$ Hz and $J = 8.2/1.9$ Hz indicated two aromatic systems with protons in *ortho* and *meta* positions (protons at the 2-, 5- and 6-carbons in ferulic acid units) showing that these

Table 3.2: NMR-data for compound 48, 8-8(cyclic)/8-O-4-dehydrotriferulic acid, δ in ppm, J in Hz.

Trimer unit	H			C		
	in acetone- d_6	Ref. in acetone- d_6	in DMSO- d_6	in acetone- d_6	Ref. in acetone- d_6	In DMSO- d_6
A1				135.5	136.1 ^c	134.1*
A2	6.59 (1H, <i>d</i> , 2.1)	6.79 (1H, <i>d</i> , 2.0) ^c	6.46 (1H, <i>bs</i>)	111.9	112.0 ^c	111.3
A3				148.0	148.1 ^c	147.1
A4				146.0	146.1 ^c	144.9
A5	6.57 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.64 (1H, <i>d</i> , 8.2) ^c	6.48 (1H, <i>d</i> , 8.2)	115.4	115.5 ^c	115.0
A6	6.36 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.1)	6.42 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.0) ^c	6.15 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.3)	120.4	120.7 ^c	118.9
A7	4.57 (1H, <i>d</i> , 1.9)	4.61 (1H, <i>br d</i> , 1.8) ^c	4.40 (1H, <i>s</i>)	45.7	46.0 ^c	43.9
A8	3.97 (1H, <i>d</i> , 1.9)	3.88 (1H, <i>d</i> , 1.8)	n.d.	47.5	48.1 ^c	n.d.
A9				173.2	173.6 ^c	172.9
A3-OMe	3.61 (3H, <i>s</i>)	3.74 (3H, <i>s</i>) ^c	3.51 (3H, <i>s</i>)	55.9!!!	56.2 ^c	55.2
A4-OH			8.71 (1H, <i>s</i>)			
B1				127.2	124.6 ^d	125.8
B2	7.23 (1H, <i>s</i>)	7.04 (1H, <i>s</i>) ^d	7.24 (1H, <i>bs</i>)	114.2	113.1 ^d	113.1
B3				149.1!!!	147.5 ^d	147.3
B4				148.4!	149.3 ^d	n.d.
B5	6.72 (1H, <i>s</i>)	6.71 (1H, <i>s</i>) ^d	6.53 (1H, <i>s</i>)	115.4	116.9 ^d	113.6
B6				131.4	132.4 ^d	130.0
B7	7.66 (1H, <i>s</i>)	7.60 (1H, <i>s</i>) ^d	n.d.	137.4	137.6 ^d	n.d.
B8				125.2	124.3 ^d	n.d.
B9				168.2	169.3 ^d	n.d.
B3-OMe	3.97 (3H, <i>s</i>)	3.86 (3H, <i>s</i>) ^d	3.87 (3H, <i>s</i>)	56.6	56.4 ^d	55.9
C1				125.3	125.3 ^a	123.4
C2	7.46 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.52 (1H, <i>d</i> , 2.0) ^a	7.29 (1H, <i>d</i> , 1.4)	113.8	113.8 ^a	113.2
C3				148.2!	148.3 ^a	147.4
C4				149.3!!!	149.5 ^a	148.5
C5	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.82 (1H, <i>d</i> , 8.2) ^a	6.72 (1H, <i>d</i> , 8.3)	115.9	116.0 ^a	115.5
C6	7.18 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)	7.23 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.0) ^a	7.08 (1H, <i>dd</i> , 8.3, 1.4)	126.0	126.1 ^a	124.6
C7	7.36 (1H, <i>s</i>)	7.42 (1H, <i>s</i>) ^a	7.26 (1H, <i>s</i>)	128.3	128.5 ^a	127.0
C8				138.4	138.3 ^a	137.1
C9				164.4	164.5 ^a	164.0
C3-OMe	3.69 (3H, <i>s</i>)	3.73 (3H, <i>s</i>) ^a	3.57 (3H, <i>s</i>)	56.0!!!	55.9 ^a	55.0
C4-OH			9.55 (1H, <i>s</i>)			

^a From a previous study (Ralph et al., 1994), and in NMR database (Ralph et al., 2004b), compound number 2040, 8-O-4-dehydrodiferulic acid (Fig. 3.1, **49**). ^a ring A.

^{c/d} From a previous study (Ralph et al., 1994), and in NMR database (Ralph et al., 2004b), compound number 2036, 8-8(cyclic)-dehydrodiferulic acid (Fig. 3.1, **50**). ^c ring A, ^d ring B.

!!!!! - assignments may be interchanged; * - from 2D-HMBC experiment

Abbreviations used: *s* – singlet, *d* – doublet, *dd* – doublet of doublets, *bs* – broad singlet, *br d* – broad doublet, n.d. – not unambiguously detected.

Note that the modelling of the aromatic ring in trimer unit B by this compound will show some deviations since it is additionally 4-O-linked.

units are not coupled at their 5-positions. Due to the absence of proton signals showing coupling constants of around 16 Hz it was clear that compound **48** did not include any intact *trans*-cinnamic acid side-chains. However, the singlets at 7.36 ppm and 7.66 ppm, in conjunction with their corresponding carbon shifts, are prime indicators that at least two units are 8-linked. Long-range correlations showed that one 8-coupled side chain is coupled to an aromatic ring with protons at carbons 2, 5 and 6 (C-unit, **48**, Fig. 3.1). The second 8-linked side-chain is coupled to an aromatic system with two protons *para* to each other showing singlets (H2 and H5, ring B, **48**, Fig. 3.1), indicating an additional linkage of this unit via its 6-position. Therefore it was logical that units A and B form an 8-8(cyclic)-coupled unit, comparable to that in 8-8(cyclic)-dehydrodiferulic acid (**50**, Fig. 3.1). This assumption is supported by two proton doublets at 4.57 ppm (carbon shift 45.7 ppm) and 3.97 ppm (carbon shift 47.5 ppm) showing the saturated side-chain of unit A. Accordingly, in the HMBC experiment proton A7 (4.57 ppm) shows correlations to the aromatic systems of unit A and B as well to the side chain (carbon-8) of unit B. Full analysis of the 1D and 2D spectra provided the assignment given in Table 3.2 and proved the 8-8(cyclic)/8-O-4-triferulic acid structure. From the NMR-data in acetone- d_6 it is not possible to decide unambiguously if the trimer has the structure **48** or **48a** (Fig. 3.1). Although a comparison of the NMR-data with those data of 8-8(cyclic)-dehydrodiferulic acid and 8-O-4-dehydrodiferulic acids as models (see Tab. 3.2) slightly favours structure **48**, structure **48a** can not be excluded from these data. Thus the regiochemistry of the coupling reaction of ferulate with the pre-formed 8-8(cyclic)-dehydrodimer remained ambiguous. Again, NMR-experiments in DMSO- d_6 sharpened the phenolic hydroxyl resonances and allowed observation of their correlated nuclei in 2D experiments. Phenolic hydroxyls had chemical shifts at 8.71 ppm and 9.55 ppm. Long-range correlations showed that the phenolic proton at 8.71 ppm coupled to carbons of the aromatic ring A, whereas the phenolic proton at 9.55 ppm coupled to carbons being part of the aromatic system C. This indicates free phenolic hydroxyl-groups on units A and C whereas the phenolic group of unit B is etherified. Using this information structure **48a** was excluded and structure **48** was unambiguously established.

Ferulate dehydrotrimers as polysaccharide cross-links in plant cell walls

The isolation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8(cyclic)/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids simplistically suggests that radical-coupled ferulate dehydrotrimers may be capable of cross-linking three polysaccharide chains in the plant cell wall. The former isolation of a 5-5/8-O-4-coupled dehydrotrimer (Bunzel et al., 2003a; Rouau et al., 2003) supported the results of Fry's group (Fry et al., 2000), suggesting higher ferulic acid oligomers, and was the first structurally characterised ferulic acid trimer. However, due to the involvement of a 5-5-coupled diferulic acid moiety in this trimer, we reported that the detection of this compound need not implicate the cross-linking of three polysaccharide chains (Bunzel et al., 2003a). Hatfield and Ralph (1999) used molecular modelling to evaluate the feasibility of intramolecular diferulate formation. These studies showed that it is rather unlikely that diferulates couple arabinoxylans in grass cell walls intramolecularly, with one exception: the 5-5-coupled diferulate is the only diferulate that can be formed without bond strain if the ferulates are positioned strategically on arabi-

nose units attached to xylose units with two intervening xylose units on the same xylan backbone. The results from the molecular modelling study were consistent with the observations that low molecular weight ferulate esters do not favour 5-5-coupling, but the 5-5-diferulate is found in considerable amounts in plant cell walls, e.g. in plant cell walls of the maize grain, where it is the second most abundant after the 8-5-coupled diferulate (Bunzel et al., 2001). Therefore, the detection of the 8-O-4/8-O-4- and 8-O-4/8-8-coupled trimers is the first real hint that ferulates may couple three polysaccharide chains. However, coupling of three polysaccharide chains via a ferulic acid dehydrotrimer appears problematic as polysaccharide chains cross-linked through diferulates are rather rigid entities and it seems challenging to arrange another ferulate in sufficient proximity to produce radical-coupled triferulates. Although the possibility of cross-linking three polysaccharide chains by the identified compounds should not be excluded another possibility should be considered. The mentioned modelling studies did not include the possibility of “back-crossing”, as detailed recently (Ralph et al., 2004). Back-crossing means that two ferulates on two different polysaccharide chains may couple, followed by coupling of another ferulate on these chains with either of the two ferulate moieties already involved in the diferulate. The possibility remains, therefore, that even these newly isolated trimers may still only cross-link two polysaccharide chains. Determining whether two or three polysaccharide chains are involved in dehydrotriferulate cross-linking remains a formidable challenge.

The amounts of the isolated 8-O-4/8-O-4-triferulic acid (3.3 mg out of 30 g maize fibre) and 8-8(cyclic)/8-O-4-triferulic acid (3.0 mg from 40 g maize fibre) are rather low in comparison to the amount of isolated 5-5/8-O-4-triferulic acid (10 mg from 20 g maize fibre) and of diferulic acids (12.6 mg total dehydrodiferulic acids per g insoluble whole grain maize fibre (Bunzel et al., 2001)). However, it is difficult to draw unambiguous quantitative conclusions from preparative results. To assess the significance of dehydrotriferulic acids for cross-linking plant cell wall polymers it will be necessary to develop a method for the quantitative determination of these compounds and to screen these compounds in different plant cell walls.

Conclusion

The first ferulic acid dehydrotrimers devoid of 5-5-coupled moieties were identified from maize bran fiber. Such trimers are derived from initial ferulate dehydrodimers that can not be formed intramolecularly. Unfortunately, the logical conclusion that cross-linking of three polysaccharide chains is involved may still not be warranted; the possibility that preformed dehydrodiferulates can “back-cross” to another ferulate monomer on one of the two chains can not be discounted. Such possibilities now need to be considered more seriously, although unequivocal proof that dehydrotriferulates cross-link three polysaccharide chains will be a formidable challenge. With three dehydrotriferulic acids now identified, it is becoming clear that higher oligomers of ferulate, like the dehydrodimers from which they logically derive, play a role in extensively cross-linking cell wall polysaccharides.

Experimental

General experimental procedures

Heat-stable α -amylase Termamyl 120 L (EC 3.2.1.1, from *Bacillus licheniformis*, 120 KNU/g), the protease Alcalase 2.4 L (EC 3.4.21.62, from *Bacillus licheniformis*, 2.4 AU/g) and the amyloglucosidase AMG 300 L (EC 3.2.1.3, from *Aspergillus niger*, 300 AGU/g) were kindly donated by Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark. Sephadex LH-20 was from Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany). Equipment for Sephadex LH-20 chromatography (L-6000 pump, L-7400 UV-detector) was from Merck/Hitachi (Darmstadt, Germany). HPLC-columns were purchased from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Semipreparative and analytical RP-HPLC were carried out using the following instrumentation: L-6200 intelligent pump, T-6300 column thermostat, L-7400 preparative UV-detector (Merck/Hitachi, Darmstadt, Germany), analytical photodiode array detector (Model 994, Waters, Eschborn, Germany). HPLC-MS instrumentation was from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany): HP Series 1100: autosampler G1313, pump G 1312A, mass spectrometer G 1946A. High-resolution ESI-mass spectrometry was performed on a Thermo-Finnigan (Austin, USA) instrument (MAT 95 XL). NMR experiments were performed on Bruker instruments (Rheinstetten, Germany): DMX 600i (cryogenic probe), DRX-500 and DRX-360.

Material

Maize bran (*Zea mays* L.) was kindly provided by Hammermühle Maismühle GmbH, Kirrweiler, Germany.

Preparation of insoluble maize fibre

Maize bran was pre-treated by extraction with acetone for 4 h using Soxhlet equipment. Pre-treated maize bran (20 g) was used to prepare insoluble maize fibre by an enzymatic procedure as described by Bunzel's group (Bunzel et al., 2001). Deviating from the referenced procedure 1.5 mL Termamyl, 600 μ L protease and 700 μ L amyloglucosidase were used and the heating time during the α -amylase treatment was prolonged to 30 min owing to doubled amount of starting material. The isolation procedure was performed several times.

Alkaline hydrolysis and extraction

The described dehydrotriferulic acids were isolated in two similar isolation processes, process **a** and process **b**, that differ in their details. The following procedure was performed (**a**) six times, (**b**) eight times: Insoluble maize fiber (5 g) was saponified (2 M NaOH, 100 mL, degassed with N₂) in screw-cap tubes (200 mL) under nitrogen and protected from light for 18 h. Following acidification of the mixture (pH <2, ~19 mL 37 % HCl) liberated phenolic acids were extracted into Et₂O (40 mL, three times). The combined Et₂O extracts of all (**a**) six preparations, (**b**) eight preparations were reduced to (**a**) 50 mL, (**b**) 60 mL (rotary evaporation) and extracted with NaHCO₃ solution (5 %), ((**a**) 25 mL, three times; (**b**) 30 mL, four

times). The aq. layers were combined and acidified (pH <2) with HCl (37 %) and phenolic acids were re-extracted into Et₂O ((**a**) 30 mL, three times; (**b**) 35 mL, four times). The combined ether extracts were dried over NaSO₄ and evaporated to dryness. The residue was further dried under a stream of N₂ and finally redissolved in (**a**) 14.5 mL, (**b**) 22.5 mL MeOH/H₂O 50/50 (v/v).

Sephadex LH-20 chromatography

Phenolic acids were separated using Sephadex LH-20 chromatography. Application of Sephadex LH-20 chromatography to the separation of monomeric from dimeric/trimeric acids was recently detailed (Bunzel et al., 2004).

Briefly, the column (83 x 2 cm) was conditioned with 0.5 mM aq. TFA/MeOH 95/5 (v/v). Owing to the temporarily precipitation of extracted material at the beginning of the separation, an interspace of about 0.5 cm between floating punch and gel bed was filled with solvent (Bunzel et al., 2004). Following the sample application using a six-way valve, the sample was flushed onto the column eluting with 0.5 mM TFA/MeOH 80/20 (v/v) for 20 min, flow rate: 1.0 mL/min. Subsequent elution was carried out as follows (four step elution): 1) elution with 0.5 mM TFA/MeOH 95/5 (v/v) for (**a**) 90 h, (**b**) 145 h, flow rate: 1.5 mL/min; 2) elution with 0.5 mM TFA/MeOH 50/50 (v/v) for (**a**) 71 h, (**b**) 67 h, flow rate: 1.0 mL/min; 3) elution with 0.5 mM TFA/MeOH 40/60 (v/v) for (**a**) 67 h, (**b**) 80 h, flow rate: 1.0 mL min⁻¹; 4) rinsing step with 100 % MeOH. A preparative UV-detector was used for the detection at 325 nm. Fractions were collected every 18 min. In the isolation process **a** the fraction containing compound **47** (2-(4-{2-carboxy-2-[4-(2-carboxy-vinyl)-2-methoxy-phenoxy]-vinyl}-2-methoxy-phenoxy)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-acrylic acid) eluted in the third elution step (0.5 mM TFA/MeOH 40/60 (v/v)) between 670 and 850 min (equal to fraction F12 (Bunzel et al., 2004) and Fig. 3.2). Using isolation process **b**, compound **48** (7-[1-carboxy-2-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-vinyloxy]-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-6-methoxy-1,2-dihydro-naphthalene-2,3-dicarboxylic acid) eluted in the second elution step (0.5 mM TFA/MeOH 50/50 (v/v)) together with 8-5-diferulic acid (non-cyclic form) between 1944 and 2448 min (equal to fraction F9 (Bunzel et al., 2004)).

Semi-preparative RP-HPLC

Further separation of the GPC-fractions was achieved by means of semi-preparative RP-HPLC using a Nucleosil 100 C 18 HD column (250 x 10 mm i.d., 5 µm). The detection wavelength was 325 nm, the injection volume 70 µL (100 µL sample loop). The flow rate was maintained at 2.7 mL/min. A binary elution system consisting of MeOH/1 mM aq. TFA 90/10 (v/v) (A) and MeOH/1 mM aq. TFA 10/90 (v/v) (B) was used to purify compound **47**: initially A 12 %, B 88 %, linear over 5 min to A 38 %, B 62 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 50 %, B 50 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 88 %, B 12 %, held isocratically for 5 min, following an equilibration step (column temperature 45 °C). Compound **48** was separated from 8-5-diferulic acid (non-cyclic) and unidentified compounds using the following system: initially A 25 %, B 75 %, linear over 22 min to A 60 %, B 40 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 88 %, B 12 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 50 %, B 50 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 38 %, B 62 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 12 %, B 88 %.

following a rinsing and equilibration step (column temperature 35 °C). Fractions were collected according to the chromatograms.

Analytical RP-HPLC

The purity of compounds **47** and **48** was checked by analytical RP-HPLC on a Nucleosil 100 C 18 HD column (250 x 4 mm i.d., 5 µm). The detection wavelengths were 325 nm and 280 nm, using an analytical photodiode array detector. The injection volume was 20 µL and the flow rate was maintained at 1 mL min⁻¹. Elution system: eluent A: MeOH; eluent B: 1 mM aq. TFA. Initially A 10 %, B 90 %, linear over 10 min to A 40 %, B 60 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 50 %, B 50 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 80 %, B 20 %, held isocratically for 5 min, following an equilibration step (column temperature 45 °C).

HPLC-MS

Molecular mass determination was achieved by HPLC-MS using atmospheric pressure-electrospray ionisation (AP-ESI) in the positive and negative mode (fragmentor voltage: 60 V (negative mode), 40 V (positive mode); scan range: *m/z* 100 - 750). Fast elution of the isolated trimer was realized by the following HPLC conditions: eluent A: acetonitrile; eluent B: 1 mM ammonium formate in doubly-distilled H₂O (pH 3.0). Initially A 40 %, B 60 %, held isocratically for 2 min, linear over 5 min to A 60 %, B 40 %, following an equilibration step (column temperature 40 °C). The injection volume was 20 µL and the flow rate was maintained at 1 mL/min.

AP-ESI MS, peaks > 5 % of base peak. Positive-ion mode, mass (% of base peak), compound **47**: 617 [M+K]⁺ (100), 601 [M+Na]⁺ (6), 561 (21), 543 (48). Compound **48**: 617 [M+K]⁺ (100), 601 [M+Na]⁺ (6), 596 (45), 579 (6), 561 (10), 533 (20), 425 (11). Negative-ion mode, compound **47**: 577 [M-H]⁻ (100). Compound **48**: 577 [M-H]⁻ (100).

High-resolution ESI-MS was performed by direct inlet using a syringe pump. Compound **47**: found [M+Na]⁺ 601.13280, C₃₀H₂₆O₁₂Na requires 601.13219; compound **48**: found [M+Na]⁺ 601.13267, C₃₀H₂₆O₁₂Na requires 601.13219.

Structural identification by NMR

Structural identification was performed using the usual array of one- and two-dimensional NMR experiments (¹H, ¹³C, H,H-COSY, HSQC/HMQC, HMBC). A complete one-dimensional ¹³C-spectra of compound **47** in DMSO-*d*₆ was not acquired due to sensitivity limitations. Compound **47** in DMSO-*d*₆ was also analysed using a ROESY experiment using correlations from the phenolic-OH to distinguish A and B moieties. Chemical shifts (δ) were referenced to the central solvent signals (acetone-*d*₆: δ_H 2.04 ppm; δ_C 29.8 ppm; DMSO-*d*₆: δ_H 2.49 ppm; δ_C 39.5 ppm). *J*-values are given in Hz. NMR-assignments follow the numbering shown in Figure 3.1.

Acknowledgements

We are grateful to Marco Febiri and Dr. Volker Sinnwell for experimental support and to the CSREES-USDA-NRI competitive grants program (Grant Number 2003-01246) for partial funding.

References

- Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Steinhart, H., 2001. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* 81, 653-660.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., 2003a. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* 217, 128-133.
- Bunzel, M., Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Ralph, S.A., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Steinhart, H., 2003b. Sinapate dehydrodimers and sinapate-ferulate heterodimers in cereal dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1427-1434.
- Bunzel, M., Funk, C., Steinhart, H., 2004. Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *J. Sep. Sci.* 27, 1080-1086.
- Fry, S.C., Willis, S.C., Paterson, A.E.J., 2000. Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta* 211, 679-692.
- Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J., 1998. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* 77, 193-200.
- Hartley, R.D., Morrison, W.H., Balza, F., Towers, G.H.N., 1990a. Substituted truxillic and truxinic acids in cell walls of *Cynodon dactylon*. *Phytochemistry* 29, 3699-3703.
- Hartley, R.D., Morrison, W.H., Himmelsbach, D.S., Borneman, W.S., 1990b. Cross-linking of cell-wall phenolic arabinoxylans in gramineous plants. *Phytochemistry* 29, 3705-3709.
- Hatfield, R.D., Ralph, J., 1999. Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. *J. Sci. Food Agric.* 79, 425-427.
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1999. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Sci.* 39, 27-37.
- Ishii, T., 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127, 111-127.
- Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K., Shibata, K., 1990. Diferulic and ferulic acid in the cell-wall of *Avena* coleoptiles - their relationships to mechanical properties of the cell-wall. *Physiol. Plant.* 78, 1-7.

- Kato, Y., Nevins, D.J., 1985. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- α -L-arabinofuranosyl)-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose as a component of *Zea* shoot cell-walls. Carbohydr. Res. 137, 139-150.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K., Stone, B.A., 1992. Cinnamic acid bridges between cell-wall polymers in wheat and *Phalaris* internodes. Phytochemistry 31, 1179-1183.
- Micard, V., Grabber, J.H., Ralph, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., 1997. Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. Phytochemistry 44, 1365-1368.
- Neukom, H., Markwalder, H.U., 1978. Oxidative gelation of wheat flour pentosans: a new way of cross-linking polymers. Cereal Foods World 23, 374-376.
- Ng, A., Greenshields, R.N., Waldron, K.W., 1997. Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: Formation of ferulic acid dehydrodimers. Carbohydr. Res. 303, 459-462.
- Oosterveld, A., Grabber, J.H., Beldman, G., Ralph, J., Voragen, A.G.J., 1997. Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. Carbohydr. Res. 300, 179-181.
- Parker, C.C., Parker, M.L., Smith, A.C., Waldron, K.W., 2003. Thermal stability of texture in Chinese water chestnut may be dependent on 8,8'-diferulic acid (aryltetralyn form). J. Agric. Food Chem. 51, 2034-2039.
- Parr, A.J., Waldron, K.W., Ng, A., Parker, M.L., 1996. The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). J. Sci. Food Agric. 71, 501-507.
- Parr, A.J., Ng, A., Waldron, K.W., 1997. Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. J. Agric. Food Chem. 45, 2468-2471.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 3485-3498.
- Ralph, J., Conesa, M.T.G., Williamson, G., 1998a. Simple preparation of 8-5-coupled diferulate. J. Agric. Food Chem. 46, 2531-2532.
- Ralph, J., Hatfield, R.D., Grabber, J.H., Jung, H.G., Quideau, S., Helm, R.F., 1998b. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: Lewis, N.G., Sarkanen, S. (Eds.), Lignin and Lignan Biosynthesis. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 209-236.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabber, J.H., Steinhart, H., 2004a. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. Phytochem. Rev. 3, 79-96.
- Ralph, S.A., Landucci, L.L., Ralph, J., 2004b. NMR Database of Lignin and Cell Wall Model Compounds. Online available at <http://www.dfrc.ars.usda.gov/software.html>
- Rouau, X., Cheynier, V., Surget, A., Gloux, D., Barron, C., Meudec, E., Louis-Montero, J., Criton, M., 2003. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. Phytochemistry 63, 899-903.

- Tan, K.S., Hoson, T., Masuda, Y., Kamisaka, S., 1992. Involvement of cell wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth-rate and cell-wall extensibility of *Oryza* coleoptiles. *Plant Cell Physiol.* 33, 103-108.
- Waldron, K.W., Ng, A., Parker, M.L., Parr, A.J., 1997a. Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. *J. Sci. Food Agric.* 74, 221-228.
- Waldron, K.W., Smith, A.C., Parr, A.J., Ng, A., Parker, M.L., 1997b. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 213-221.
- Ward, G., Hadar, Y., Bilkis, I., Konstantinovskiy, L., Dosoretz, C.G., 2001. Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 276, 18734-18741.
- Zarra, I., Sanchez, M., Queijeiro, E., Pena, M.J., Revilla, G., 1999. The cell wall stiffening mechanism in *Pinus pinaster* Aiton: regulation by apoplastic levels of ascorbate and hydrogen peroxide. *J. Sci. Food Agric.* 79, 416-420.

3.2 Untersuchung des Einflusses zellwandgebundener Ferulasäure sowie von Di- und Triferulasäuren auf den Abbau von Maiszellwänden durch die humane Darmmikrobiota

Die hier präsentierte Veröffentlichung befasst sich mit der Frage, inwiefern zellwandgebundene Ferulasäure bzw. Diferulasäure/Triferulasäure-Cross-Links eine Hemmung des fermentativen Zellwandabbaus durch die humane Darmmikrobiota bewirken. Die praktischen Arbeiten in den Kooperationslaboratorien in Madison und Potsdam wurden selber im Rahmen von Forschungsaufenthalten durchgeführt.

Reproduced with permission from J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 2418-2423.
Copyright 2007 American Chemical Society

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (6), 2418-2423, 2007

Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota

CAROLA FUNK,[†] ANNETT BRAUNE,[‡] JOHN H. GRABBER,[§] HANS STEINHART,[†] MIRKO BUNZEL^{†*}

Running Head: Degradation of Maize Cell Walls by Intestinal Microbiota

Institute of Biochemistry and Food Chemistry, Department of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany; German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Department of Gastrointestinal Microbiology, Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal, Germany; U.S. Dairy Forage Research Center, USDA-Agricultural Research Service, 1925 Linden Drive West, Madison, WI 53706

* To whom correspondence should be addressed.

Tel.: +49-40-42838-4379

Fax: +49-40-42838-4342

E-mail: Mirko.Bunzel@uni-hamburg.de

[†] University of Hamburg

[‡] German Institute of Human Nutrition

[§] U.S. Dairy Forage Research Center

Abstract

The degradation of plant fiber by human gut microbiota could be restricted by xylan substitution and cross-linking by ferulate and diferulates, for example by hindering the association of enzymes like xylanases with their substrates. To test the influence of feruloylation on cell wall degradability by human intestinal microbiota, nonlignified primary cell walls from maize cell

suspensions, containing varying degrees of ferulate substitution and diferulate cross-linking, were incubated in nylon bags *in vitro* with human fecal microbiota. Degradation rates were determined gravimetrically and the cell walls were analyzed for carbohydrates, ferulate monomers, dehydrodiferulates, dehydrotriferulates, and other minor phenolic constituents. Shifting cell wall concentrations of total ferulates from 1.5 to 15.8 mg/g and diferulates from 0.8 to 2.6 mg/g did not alter the release of carbohydrates or the overall degradation of cell walls. After 24 h of fermentation, the degradation of xylans and pectins exceeded 90 % while cellulose remained undegraded. The results indicate that low to moderate levels of ferulates and diferulates do not interfere with hydrolysis of nonlignified cell walls by human gut microbiota.

Keywords

Ferulic acid; diferulic acids; triferulic acids; cross-links; arabinoxylans; maize cell walls; fermentation; human fecal microbiota; degradability

Introduction

According to a widely accepted definition, dietary fiber is the edible part of plants or analogous carbohydrates that are resistant to digestion and absorption in the human small intestine with complete or partial fermentation in the large intestine (1). Consequently, polysaccharides, oligosaccharides, lignin, and associated plant substances are included as dietary fiber constituents. Major constituents of cereal dietary fibers are arabinoxylans, mixed-linked β -glucans and cellulose. The physiological effects of arabinoxylans are dependent on their physicochemical properties that are related to their degree of polymerization, the arabinose/xylose ratio, the distribution of side-chains, and the degree of cross-linking, especially via hydroxycinnamates. Ferulate is the predominant hydroxycinnamate in cell walls of cereal grains, acylating arabinose side-chains at the O-5-position (2). Radical coupling of ferulates yields ferulate dehydrodimers (3) with lesser amounts of ferulate dehydrotrimers (4-8) and ferulate dehydrotetramers (8) which mediate intra-/intermolecular coupling of arabinoxylans (9, 10). Arabinoxylans may also be coupled to lignin (11, 12) and proteins (13) via a radical mechanism involving ferulates, further bolstering cell wall cross-linking. Although lignification is a major determinant of fiber degradability (14), ferulates and diferulate cross-links are also thought to inhibit polysaccharide degradation. While early studies suggested a direct toxicity of phenolic acids on ruminal microbes, more recent studies proposed that ferulate substitution and especially diferulate cross-linking impede binding of endoxylanases, thus limiting xylan degradation (15-17). For example, studies with nonlignified cell walls from maize cell suspensions revealed that diferulate cross-links restrict the rate and, to a lesser degree, the extent of cell wall and xylan degradation by fungal enzymes (18). Other work with whole and fractionated wheat bran indicates that xylan degradation by endoxylanase was related to the extent of arabinose substitution and diferulate cross-linking (19, 20). These restrictions may be partially overcome by esterases able to cleave diferulate esters. However, feruloyl esterases, including the esterase produced by the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophi-*

lus, are much more efficient in releasing ferulate and its dimers from soluble substrates than from untreated insoluble cell walls (21-24). The aim of this study was to establish whether ferulate substitution and diferulate cross-linking influence the degradation of nonlignified cell walls and cell wall arabinoxylans by human intestinal microbiota. In this study, we used a cell wall model system in which ferulate substitution and diferulate cross-linking were specifically manipulated without altering other cell wall properties.

Material and methods

General

Nylon-bags (4.5 x 9.0 cm) used in the fermentation experiments were made from polyamide monofilament fabrics (NITEX, polyamide 6.6, mesh opening 10 μm) (Sefar, Freibach, Switzerland). Prior to use, nylon bags were heated for 30 min at 100 °C and stored at 55 - 60 °C in order to minimize bacterial contamination. Brain heart infusion (BHI) broth was from Roth (Karlsruhe, Germany). Sephadex LH-20 was from Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany). Chemicals used in chromatographic procedures were HPLC grade.

Synthesis of primary maize cell walls

Cell walls with different concentrations of ferulates and diferulates were prepared according to Grabber et al. (25, 26). Cell suspensions (350 mL) of maize (*Zea mays* L. cv. Black Mexican) were grown in 1-L flasks. On the 3rd and 9th day after culture initiation, 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP) was added at 0 or 5.4 mg/L to produce cells with normal or reduced levels of cell wall feruloylation. After 14 days of culture, cells were collected at the early stationary growth phase on a nylon mesh (20 μm pore size) and washed with cold 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) buffer (10 mM, pH 7.0). Cells were suspended in PIPES buffer and ruptured by two passages (15 min) through a Parr Nitrogen Bomb maintained at 1500 psi. After cell rupture, cell wall fragments were collected on a nylon mesh (20 μm pore size) and washed sequentially with PIPES buffer, aqueous CaCl_2 (50 mM), and water to remove cytoplasmic contaminants. Cell walls from normal and AIP treated cultures were re-suspended in water and then an aqueous solution of H_2O_2 (0 or 0.3 mmol per gram dry weight of cell walls) was added with stirring over a 60 min period to promote diferulate formation via wall-bound peroxidase. After stirring for an additional 30 min, cell walls were collected on glass microfiber filters (3.1 μm retention), washed thoroughly with water and acetone, and then oven dried at 55 °C.

Characterization of cell walls

Analysis of neutral carbohydrate components was performed as described previously (27, 28). Briefly, cell walls were pre-treated with 12 M H_2SO_4 at 35 °C for 2 h. Following dilution, hydrolysis was performed with 2 M H_2SO_4 for 1 h at 100 °C. Cellulose crystallinity is a main barrier to its chemical degradation. Therefore, pre-hydrolysis using 12 M H_2SO_4 is needed to

alter the fine structure of cellulose. Contrary, acid hydrolysis of hemicelluloses using 2 M H_2SO_4 is possible without pre-treatment using 12 M H_2SO_4 . Uronic acids in acid hydrolyzates were determined colorimetrically according to Blumenkrantz and Asboe-Hansen (29). Following reduction of neutral monosaccharides with NaBH_4 , the resulting alditols were acetylated with acetic anhydride by using 1-methylimidazole as a catalyst. Erythritol was used as internal standard compound. Alditolacetates were determined by GC-FID (GC Focus Series, Thermo Electron Corporation, Milan, Italy) using a 0.32 mm \times 30 m DB-5 capillary column (0.25 μm film thickness) (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). GC conditions were as follows: initial column temperature, 150 $^\circ\text{C}$, held for 3 min, ramped at 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 220 $^\circ\text{C}$, held for 2 min, ramped at 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 300 $^\circ\text{C}$, and held for 10 min; injector temperature 250 $^\circ\text{C}$; split ratio 1:6; flame ionization detection (detector temperature 290 $^\circ\text{C}$). He (1.6 mL/min) was used as carrier gas.

Phenolic monomers and di-/triferulates were analyzed by HPLC with photodiode array detection (DAD) following saponification and a pre-separation using small-scale Sephadex LH-20 chromatography as will be described in detail elsewhere. In brief, cell walls were saponified for 18 h in the dark using 2 M NaOH (degassed with N_2). Monomethylated 5-5-dehydrodiferulic acid and *o*-coumaric acid were added as internal standards just prior to saponification. The alkaline hydrolyzates were acidified (pH < 2) and phenolic compounds were extracted into diethyl ether (three times). Combined ether extracts were evaporated under a stream of N_2 , redissolved in methanol (MeOH)/ H_2O (50/50, v/v), and applied to a SPE-column filled with 1 g Sephadex LH-20 swollen in H_2O . Phenolic monomers were eluted with 3 mM aqueous HCl and recovered by extraction into ethyl acetate. Di-/triferulates were then eluted from the column with ethanol. After evaporation, phenolic monomers (redissolved in MeOH/ H_2O (20/80, v/v)) and di-/triferulates (in MeOH/ H_2O (70/30, v/v)) were analyzed by HPLC-DAD (L-6200 Intelligent Pump, Merck Hitachi, Tokyo, Japan; HPLC 540 Diode Array Detector, BioTek Kontron Instruments, Milan, Italy; Spectra Series Autosampler AS100, Thermo Separation Products, Dreieich, Germany; 2155 HPLC Column Oven, LKB, Bromma, Sweden) on a 250 \times 4.6 mm i.d., 5 μm Luna Phenyl-Hexyl 100 \AA column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The injection volume was 20 μL , the column temperature was 45 $^\circ\text{C}$, and the flow rate was maintained at 1 mL/min. Separation of phenolic monomers was performed using a ternary elution system consisting of 1 mM aqueous trifluoroacetic acid (A), acetonitrile (B), and MeOH (C). Elution was carried out as follows: initially A 87 %, B 13 %, C 0 %, held isocratically for 10 min, linear over 10 min to A 77 %, B 20 %, C 3 %, linear over 5 min to A 70 %, B 25 %, C 5 %, linear over 5 min to A 25 %, B 50 %, C 25 %, followed by an equilibration step. Elution of di-/triferulates was performed as follows: initially A 85 %, B 15 %, C 0 %, linear over 15 min to A 82 %, B 18 %, C 0 %, linear over 5 min to A 80 %, B 20 %, C 0 %, linear over 5 min to A 72 %, B 25 %, C 3 %, linear over 5 min to A 70 %, B 25 %, C 5 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 65 %, B 30 %, C 5 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 55 %, B 40 %, C 5 %, linear over 10 min to A 10 %, B 50 %, C 40 %, followed by an equilibration step. Detection wavelength was 280 nm.

Cell wall fermentation

To provide a broad spectrum of microbiota, aliquots (~10 g) of freshly voided human feces were combined from five female and three male donors (ranging from 26 to 61 years of age, mean age of 39 years) who had not undergone antibiotic therapy within six months prior to the study. The pooled fecal sample (81.2 g) was mixed with 320 mL BHI broth (pH 7.4) in a stomacher bag and homogenized (Stomacher Model 3500, Seward Ltd., London, UK). The resulting suspension was filtered through a sieve with a 1-mm mesh opening to remove large particles and 10 mL of the resulting suspension was added to 500-mL bottles containing 190 mL of BHI broth. To each bottle, a nylon bag containing 500 mg of cell walls was added and the bottles were sealed with natural rubber stoppers and screw caps. Except for feces homogenization, the preparation of the fecal suspension and fermentation bottles was done under anoxic conditions using a glove box (MACS Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, England) containing a gas atmosphere of N₂/CO₂/H₂ (80/10/10, v/v/v). Fermentation bottles were incubated in duplicate on a rotary shaker (200 rpm) at 37 °C for 4, 8, and 24 h. Following fermentation, the bags were removed from the bottles and thoroughly washed with water, followed by acetone. Fermentation residues were carefully dried under N₂ and further dried for two days at 55 °C before weighing for gravimetric determination of degradation rates. To estimate cell wall losses during incubation procedure and further sample handling, additional cell walls were incubated in a similar manner but without feces addition, washed and dried as described above. The fermentation residues were chemically characterized as described above for unfermented cell walls.

Statistical analysis

Data were statistically analyzed by two-factorial analysis of variances at the 0.05 level of significance using SPSS software for Windows, Version 11.5.2.1.

Results and discussion

Cell wall characteristics

Maize cell suspension cultures were grown normally or with AIP, a specific inhibitor of phenylalanine ammonia lyase (30), to produce cell walls with normal or reduced levels of xylan feruloylation. Cell walls isolated from the suspension cultures were in turn incubated in water or water with H₂O₂ to yield normal or elevated levels of di-/triferulate cross-links formed via wall-bound peroxidase. Dry cell walls produced without AIP addition (AIP⁻, H₂O₂⁻) contained 15.8 mg/g of total ferulates, 86 % of which were ferulate monomers. Treatment with H₂O₂ of these cell walls (AIP⁻, H₂O₂⁺) increased peroxidase-mediated diferulate formation from 2.1 mg/g to 2.6 mg/g (total ferulate concentration 14.8 mg/g) without changing the diferulate pattern. Adding AIP to cell suspensions (AIP⁺, H₂O₂⁻) reduced total ferulate concentrations by 82 %. Addition of H₂O₂ to these cell walls (AIP⁺, H₂O₂⁺) had marginal impact on diferulate cross-linking, suggesting that H₂O₂ production during cell growth was sufficient for maximal formation of diferulates. In all treatments, ferulate dimers were dominated by

8-5-coupled diferulic acids (49 %) with the cyclic, the open and the decarboxylated forms (3) being detected in alkaline hydrolyzates. The cyclic 8-5-coupled diferulate is probably the natural form in cell walls while the other structures were presumably formed during the saponification procedure. The 5-5-coupled and 8-8-coupled diferulic acids contributed 21 % and 19 % of diferulates, respectively. The 8-8-coupled dimers included the open, the cyclic, and the newly discovered tetrahydrofuran forms (31). The 8-O-4-coupled structure was the least abundant, accounting for 11 % of the diferulates. Three triferulates were detected (5-5,8-O-4-coupled triferulic acid, 8-8(cyclic),8-O-4-coupled triferulic acid, and 8-O-4,8-O-4-coupled triferulic acid) in alkaline hydrolyzates, but the low abundance of each trimer (< 0.05 mg/g) made quantification difficult. Since each triferulic acid molecule is potentially attached to three xylan chains, they can play a major role in cell wall cross-linking. Cell walls also contained about 0.3 mg/g of *p*-coumaric acid while other phenolic monomers, such as vanillin, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, caffeic acid, and vanillic acid, were detected in lower amounts (< 0.15 mg/g). The concentrations of ferulate and diferulates we observed were comparable to that found in insoluble dietary fiber isolated from wheat and spelt grains but lower than that reported for maize bran (26, 32).

The polysaccharide composition of the prepared maize cell walls was determined and shown to be typical for primary cereal walls (25). AIP and H₂O₂ treatments did not affect the polysaccharide composition. Dry cell walls contained 204 - 232 mg/g of glucose, 151 - 165 mg/g of arabinose, 135 - 142 mg/g of xylose, 115 - 120 mg/g of uronic acids, 80 - 86 mg/g of galactose, 8 - 11 mg/g of mannose, and ≤ 5 mg/g of rhamnose. Our acid hydrolysis procedures indicated about two-thirds of the glucose was derived from cellulose with the balance being derived from hemicelluloses such as β-glucans. Arabinose and xylose originated predominantly from arabinoxylans. The high arabinose/xylose ratio may be due to additional arabinose contribution from pectins, particularly arabinan side chains. However, small amounts of xyloglucans were also supposed to be present (33). Galactose, mannose, and rhamnose presumably originated from hemicelluloses and pectins. The detected uronic acids also indicated the presence of pectins but may partially also stem from glucuronoarabinoxylans.

Cell wall fermentation

Fermentation studies were performed under conditions mimicking the human colon. Cell walls were fermented using nylon bags with a pore size of 10 μm to permit ingress of fecal microorganisms while minimizing the loss of unfermented cell walls. Diffusion of unfermented cell wall components through the nylon pores is regarded as highly unlikely since the cell walls were obtained by filtration over a nylon mesh with a pore size of 20 μm. Indeed, in tests of the incubation (8 and 24 h) and washing procedures without fecal microbiota, only ~6 % of the cell walls were lost. These losses were considered in calculations of cell wall degradation. The overall degradation of all investigated cell walls averaged 5 % (4 - 6 %) after 4 h, 24 % (23 - 30 %) after 8 h, and 65 % (64 - 69 %) after 24 h of fermentation (Fig. 3.4).

The degradation of cell walls after 4, 8 and 24 h of fermentation was not affected (*P* > 0.05) by AIP or H₂O₂ treatments (Fig. 3.4) indicating that variations in xylan feruloylation and

diferulate cross-linking, as generated within this study, did not influence whole cell wall fermentation by human fecal microbiota. To investigate the influence of AIP and/or H_2O_2 treatments on the degradation of individual cell wall polysaccharides, especially arabinoxylans, the monomer carbohydrate composition of the residual cell walls was analyzed following acidic hydrolysis. These studies revealed that cell wall polysaccharides, with the exception of cellulose, were degraded extensively during fermentation (Fig. 3.5a). Arabinoxylan degradation was neither affected by ferulate concentrations nor by ferulate cross-linking. Arabinoxylans were only slightly degraded after 4 h as indicated by minor reductions in xylose concentrations (Fig. 3.5a).

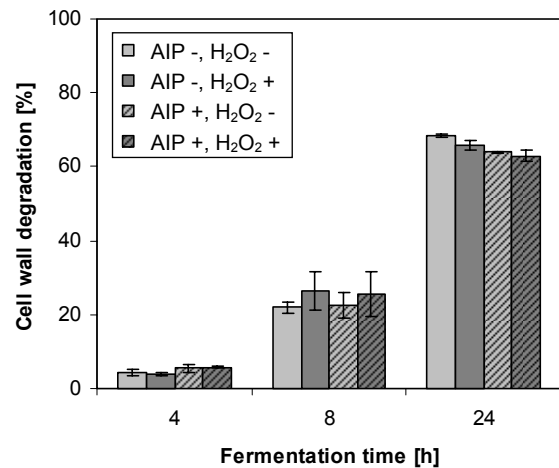


Figure 3.4: Time-dependent degradation of maize cell walls during fermentation with human fecal microbiota. Cell walls differed in treatment with (+) or without (-) 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP) and H_2O_2 . Bars represent standard deviations of repeat determinations.

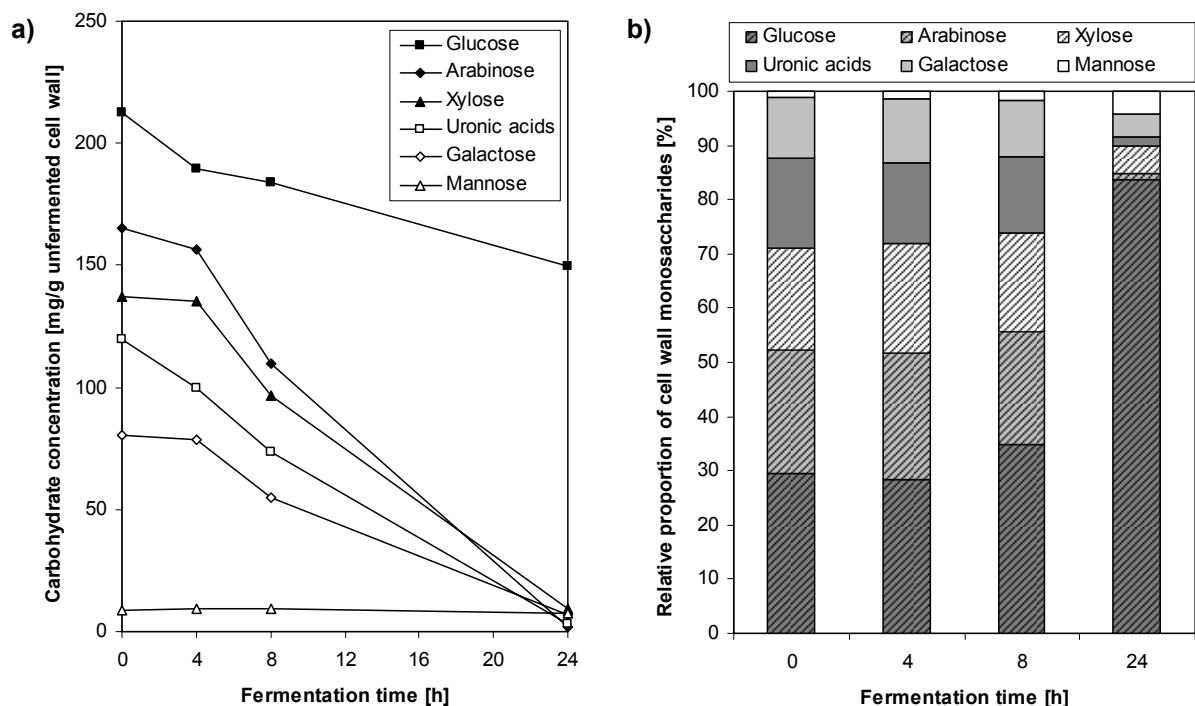


Figure 3.5: Degradation of carbohydrate constituents in primary maize cell walls during fermentation with human fecal microbiota. Since degradation patterns did not vary between cell wall types, carbohydrate degradation is exemplified by cell walls with non-manipulated feruloylation (AIP -, H_2O_2 -). a) Carbohydrate monomer concentrations of residual maize cell walls fermented with human fecal microbiota for varying time periods. Carbohydrate concentrations are referred to the original cell wall before fermentation. b) Proportions of monosaccharides in cell wall residues (% of total carbohydrate).

From Figure 3.6 it might be assumed that reduced ferulate concentrations lead to an enhanced degradation of arabinoxylans after 4 h of fermentation. However, differences in xylose removal from residual cell walls were not significant ($P > 0.05$). Similar findings were observed for the release of arabinose after 4 h, suggesting that the total concentration of ferulates may influence arabinoxylan degradation within the first hours of fermentation. However, this needs to be investigated in further studies using shorter time periods. Removal of arabinose and xylose from residual cell wall components after 8 and 24 h was not significantly affected by AIP and/or H_2O_2 treatments. After 24 h of fermentation, the extensive loss of arabinose (95 - 99 %) and xylose (89 - 94 %) further indicated that modest levels of ferulate substitution and diferulate cross-linking did not impede xylan degradation (Fig. 3.6).

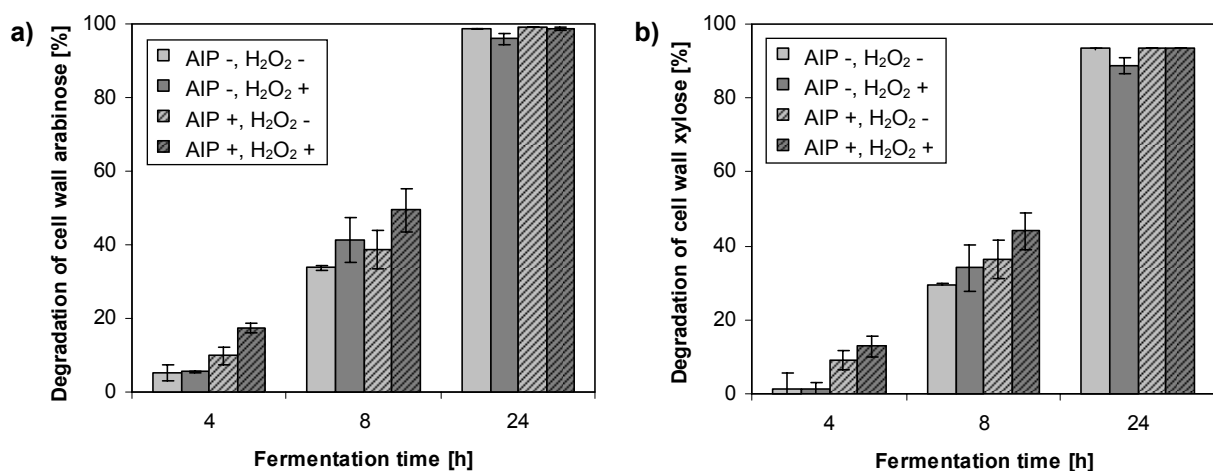


Figure 3.6: Time-dependent degradation of a) arabinose and b) xylose from maize cell wall polysaccharides during fermentation with human fecal microbiota. Cell walls differed in treatment with (+) or without (-) 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP) and H_2O_2 . Bars represent standard deviations of repeat determinations.

Galactose and uronic acid concentrations were also efficiently reduced during fermentation. Cell walls contained $< 1\%$ of these polysaccharide constituents after 24 h of fermentation (Fig. 3.5a), indicating that pectins were almost completely degraded. By contrast, glucose-containing polysaccharides were slowly degraded with only about 27 % of glucans lost after 24 h of fermentation. As a consequence, the residual cell wall material was highly enriched in glucose containing polysaccharides (Fig. 3.5b). Performing carbohydrate analysis with and without pre-hydrolysis in 12 M H_2SO_4 revealed that all glucose lost during fermentation was derived from hemicelluloses such as β -glucans while cellulose remained essentially undegraded. Mannose, a minor carbohydrate in unfermented cell walls, was not influenced by fermentation.

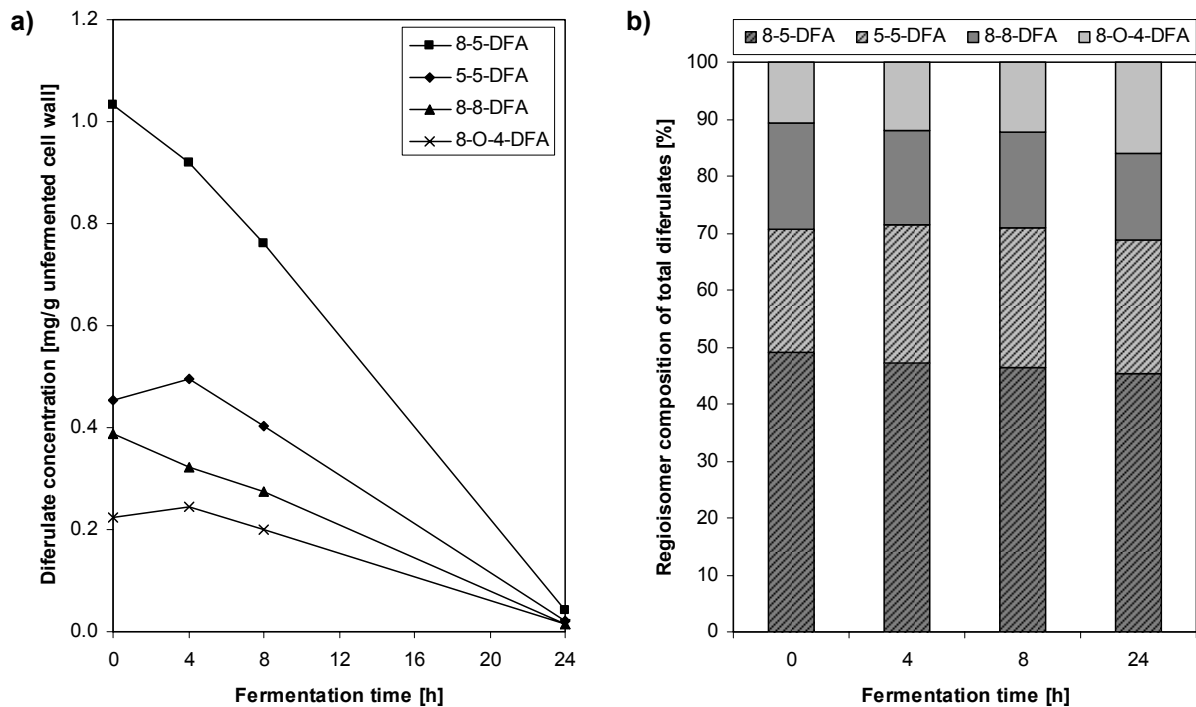


Figure 3.7: Release of diferulates from maize cell walls during fermentation with human fecal microbiota exemplified by cell walls with non-manipulated feruloylation (AIP⁻, H₂O₂⁻). a) Diferulate (DFA) concentrations of cell walls fermented for varying time periods. b) Regioisomer composition of total diferulates of cell wall residues during fermentation.

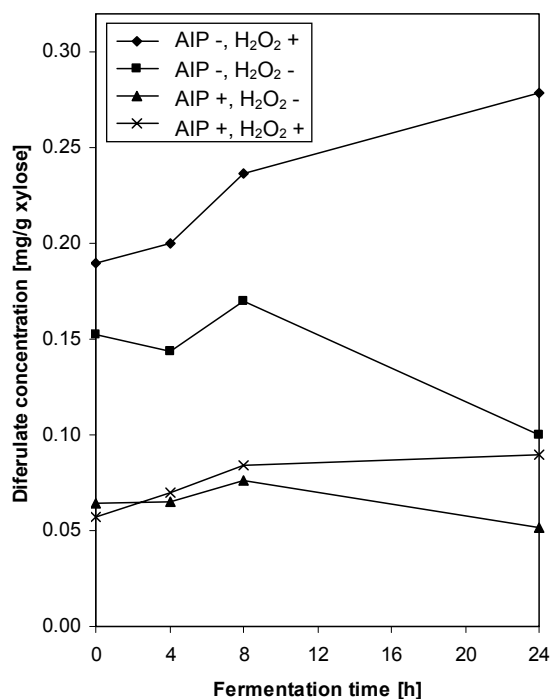


Figure 3.8: Ratio of residual total diferulates and xylose from cell walls during fermentation with human fecal microbiota. Cell walls differed in treatment with (+) or without (-) 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP) and H₂O₂.

The analysis of monomeric and oligomeric ferulates in cell wall residues revealed that monomeric ferulate was slowly released during the first hours of fermentation (< 10 %). After 8 and 24 h of fermentation, ferulate concentrations were reduced by about 25 % and 85 - 95 %, respectively. Diferulate levels only changed slightly after 4 h of fermentation as illustrated in Figure 3.7a. Diferulate release was more distinct after 8 (15 - 30 %) and 24 h (93 - 96 %) of fermentation. The ratio of diferulate regioisomers in the cell wall remained fairly constant during the fermentation (Fig. 3.7b). Although ineffective for inhibiting arabinoxylan degradation by human fecal microbiota, diferulates accumulated on undegraded xylans during fermentation of H₂O₂-treated (AIP⁻, H₂O₂⁺) cell walls (Fig. 3.8). Triferulates were removed effectively from all cell wall preparations. However due to low abundance, reliable estimates of trimer concentrations could not be determined.

In the light of previous studies which indicate inhibitory effects of ferulates, and particularly diferulates on degradation (15, 17-19), the results of our studies were somewhat surprising. However, enzyme isolates or isolated hemicelluloses were often used in previous studies and these may not fully reflect the degradation of cell walls by fecal microbiota. Although endoxylanases play a predominant role in degrading xylans in cell walls, feruloyl esterases produced by human gut microbiota may help to overcome the restrictions caused by ferulate cross-linking (21, 34, 35). Recently, a bacterial feruloyl esterase was purified and characterized from a human gut-relevant species, *Lactobacillus acidophilus* (24). Whereas the feruloyl esterase from *L. acidophilus* was not able to release ferulates from highly polymerized xylans, Kroon et al. (23) described a feruloyl esterase from the gut-irrelevant fungus *Penicillium funiculosum* that was able to release ferulic acid from wheat bran and sugar beet pulp. Although the activity was enhanced by a xylanase, the presence of this enzyme was not mandatory. However, the release of diferulates was not observed from complex matrices to date. From our study we cannot conclude whether ferulates, di- and triferulates are liberated as free acids or ester-linked to arabinoxylan fragments. Preliminary work also suggests that cell wall cross-links might partly be broken by cleavage of ether linkages in diferulates by human gut microbiota (Braune et al., unpublished results). Although the fairly constant diferulate pattern during fermentation suggests that this mechanism is probably minor in our studies such a mechanism should additionally be considered and investigated in more detail. Apart from this less investigated mechanism and a potential effect of feruloyl esterases it should be considered that the degree of cross-linking in the investigated cell walls was simply not effectual to inhibit xylanases from degrading arabinoxylans. In some types of fiber, poor xylan degradation is associated with extremely high ferulate and diferulate concentrations. Maize bran insoluble dietary fiber for example contains 25 mg/g ferulates and 13 mg/g diferulates (32, 36). Unfortunately, our attempts to elicit higher degrees of ferulate substitution in maize cell suspensions and more extensive diferulate cross-linking proved unsuccessful.

Conclusions

Cell walls prepared from maize cell suspensions enabled us to investigate the specific role of ferulate monomers and di-/triferulate cross-linking as constraints to cell wall fermentation by human fecal microbiota. Fermentation studies showed that low to moderate levels of ferulate substitution or diferulate cross-linking do not impede the degradation of nonlignified cell walls. A slight enrichment of diferulates on xylans was observed in fermentation residues from cell walls with the highest degree of cross-linking but the efficient overall degradation of xylans was not affected. We suppose that human fecal microbiota exhibit sufficient xylanase and/or feruloyl esterase and cross-link cleaving activities to overcome any inhibitory effects of ferulates and diferulates found in many types of insoluble cereal dietary fibers.

Abbreviations

AIP - 2-aminoindan-2-phosphonic acid; BHI - brain heart infusion; PIPES - 1,4-piperazinediethane-sulfonic acid

Acknowledgements

We are grateful to the H. Wilhelm Schaumann Stiftung for funding Carola Funk's visit to the U.S. Dairy Forage Research Center in Madison, USA.

Literature cited

- (1) AACC-Report. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* **2001**, *46*, 112-126.
- (2) Ishii, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* **1997**, *127*, 111-127.
- (3) Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 3485-3498.
- (4) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 128-133.
- (5) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5845-5850.
- (6) Funk, C.; Ralph, J.; Steinhart, H.; Bunzel, M. Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 363-371.
- (7) Rouau, X.; Cheynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudec, E.; Louis-Montero, J.; Criton, M. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 899-903.
- (8) Bunzel, M.; Ralph, J.; Brüning, P.; Steinhart, H. Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6409-6418.
- (9) Saulnier, L.; Crepeau, M. J.; Lahaye, M.; Thibault, J. F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Williamson, G. Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 82-92.
- (10) Allerdings, E.; Ralph, J.; Schatz, P. F.; Gniechwitz, D.; Steinhart, H.; Bunzel, M. Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 113-124.

- (11) Ralph, J.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* **1995**, *275*, 167-178.
- (12) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6106-6113.
- (13) Piber, M.; Koehler, P. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5276-5284.
- (14) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S. *p*-Hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2530-2532.
- (15) Hatfield, R. D. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In *Forage cell wall structure and digestibility*; H. G. Jung; D. R. Buxton; R. D. Hatfield and J. Ralph, Eds.; ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, 1993; pp 285-313.
- (16) Jung, H. G.; Deetz, D. A. Cell wall lignification and degradability. In *Forage cell wall structure and digestibility*; H. G. Jung; D. R. Buxton; R. D. Hatfield and J. Ralph, Eds.; ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, 1993; pp 315-346.
- (17) Jung, H. G.; Allen, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* **1995**, *73*, 2774-2790.
- (18) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 193-200.
- (19) Beaugrand, J.; Crônier, D.; Debeire, P.; Chabbert, B. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *J. Cereal Sci.* **2004**, *40*, 223-230.
- (20) Beaugrand, J.; Cronier, D.; Thiebeau, P.; Schreiber, L.; Debeire, P.; Chabbert, B. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7108-7117.
- (21) Andreasen, M. F.; Kroon, P. A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M. T. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *31*, 304-314.
- (22) Kroon, P. A. What role for feruloyl esterases today? *Polyphénols Actualités* **2000**, *19*, 4-5.
- (23) Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N. M.; Archer, D. B.; Belshaw, N. J. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6740-6752.

-
- (24) Wang, X.; Geng, X.; Egashira, Y.; Sanada, H. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2367-2372.
- (25) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J.; Zon, J.; Amrhein, N. Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1077-1082.
- (26) Funk, C.; Weber, P.; Thilker, J.; Grabber, J. H.; Steinhart, H.; Bunzel, M. Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1860-1867.
- (27) Englyst, H. N.; Quigley, M. E.; Geoffrey, J. H. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst* **1994**, *119*, 1497-1509.
- (28) Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R. J.; Stone, B. A. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* **1983**, *113*, 291-299.
- (29) Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 484-489.
- (30) Zon, J.; Amrhein, N. Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-Aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds. *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, *6*, 625-628.
- (31) Schatz, P. F.; Ralph, J.; Lu, F.; Guzei, I. A.; Bunzel, M. Synthesis and identification of 2,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-tetrahydrofuran-3,4-dicarboxylic acid, an unanticipated ferulate 8-8-coupling product acylating cereal plant cell walls. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2801-2806.
- (32) Bunzel, M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. PhD thesis, Hamburg, 2001.
- (33) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2609-2614.
- (34) Kroon, P. A.; Faulds, C. B.; Ryden, P.; Robertson, J. A.; Williamson, G. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 661-667.
- (35) Andreasen, M. F.; Kroon, P. A.; Williamson, G.; Garcia-Conesa, M.-T. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5679-5684.
- (36) Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Steinhart, H. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 653-660.

3.3 Bestimmung des Einflusses der Lignifizierung und des Gehaltes an Ferulasäurederivaten von Maiszellwänden auf die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Aminen

Für die in diesem Kapitel dargestellte Veröffentlichung waren zwei Fragen von Bedeutung. Zum einen sollte geklärt werden, welchen Einfluss sowohl Ligninkonzentration als auch -zusammensetzung auf die Adsorption von HAA haben. Zum anderen war die Frage, inwiefern die Ferulasäurekonzentration bzw. der Grad der Polysaccharidvernetzung durch Diferulasäure/Triferulasäure-Cross-Links die Adsorption von HAA beeinflussen. Die praktischen Arbeiten im Kooperationslabor in Madison wurden selber durchgeführt.

Reproduced with permission from J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 1860-1867.
Copyright 2007 American Chemical Society

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (5), 1860-1867, 2006

Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines

CAROLA FUNK,[†] PATRICK WEBER,[†] JANINA THILKER,[†] JOHN H. GRABBER,[‡] HANS STEINHART,[†] MIRKO BUNZEL^{†*}

Running Head: Adsorption of Heterocyclic Aromatic Amines By Maize Cell Walls

Institute of Biochemistry and Food Chemistry, Department of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany; U.S. Dairy Forage Research Center, USDA-Agricultural Research Service, Madison, WI 53706, USA

* To whom correspondence should be addressed.

Tel.: +49-40-42838-4379

Fax: +49-40-42838-4342

E-mail: Mirko.Bunzel@uni-hamburg.de

[†] University of Hamburg

[‡] U.S. Dairy Forage Research Center

Abstract

Both epidemiological and experimental data indicate that a diet rich in fiber may reduce cancer risk. One possible mechanism is by adsorbing carcinogens and transporting them out of the body without metabolic activation. We investigated the role of fiber lignification and feru-

loylation on the adsorption of four of the most relevant heterocyclic aromatic amines in food: 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC). Adsorption experiments, under conditions mimicking the small intestine, were carried out using nonlignified and artificially lignified primary maize walls with defined lignin and ferulate/diferulate concentrations and defined lignin compositions. Lignin concentration and composition both influenced the adsorption of heterocyclic aromatic amines, especially the more hydrophobic types. Heterocyclic aromatic amine adsorption increased with lignin concentration. 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole were better adsorbed by guaiacyl-rich lignins, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline by syringyl-rich lignins, whereas the adsorption of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline was not clearly influenced by lignin composition. Nonlignified cell walls adsorbed lesser amounts of heterocyclic aromatic amines. Variations in cell wall feruloylation had no effect on heterocyclic aromatic amine adsorption.

Keywords

Heterocyclic aromatic amines, carcinogens, adsorption studies, *Zea mays*, dehydrogenation polymer-cell wall complexes, lignin, monolignols, ferulates, diferulates

Introduction

Dietary fiber is generally thought to protect against colorectal and possibly other forms of cancer. Although some studies indicate no association between dietary fiber intake and colorectal cancer (1-3), large studies like the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) and the USA-based Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial showed a cancer-preventive role of dietary fiber (4, 5). Several direct and indirect mechanisms are proposed by which dietary fibers may decrease cancer risk. The indirect mechanisms are mainly based on effects induced by dietary fiber degradation products, especially short-chain fatty acids like butyrate, formed by colonic bacteria. Direct mechanisms like increase of faecal bulk and shortening of transit time by undegradable dietary fibers may reduce exposure of colonic mucosal cells to carcinogens. The ability of some dietary fibers to adsorb and transport carcinogens out of the body is also proposed as a direct mechanism for preventing cancer (6). A widely discussed group of carcinogens are

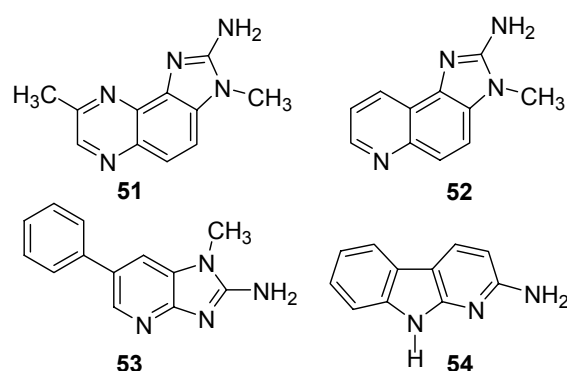


Figure 3.9: Structures of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx, amine 1) 51, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ, amine 2) 52, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP, amine 3) 53, and 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC, amine 4) 54.

heterocyclic aromatic amines (Fig. 3.9), which are mostly found in heated protein rich-foods like meat or fish. Non-metabolized heterocyclic aromatic amines are considered of not being carcinogenic, but their activated metabolites show mutagenic and possibly carcinogenic properties. One of the main mechanisms of metabolic activation occurs when heterocyclic aromatic amines absorbed by the small intestine are transported to the liver where oxidation of the exocyclic amine group by cytochrome P450s leads to N-hydroxy-amines.

These metabolites are then acetylated or sulfonated by Phase II enzymes. The unstable esters readily undergo heterolytic cleavage to produce reactive nitrenium ions, which are able to form promutagenic DNA adducts (7). Another important metabolic pathway is based on glucuronidation of N-hydroxy-metabolites and cleavage by intestinal flora, which is then followed by the already described acetylation or sulfonation and cleavage to reactive nitrenium ions (8). Adsorption of heterocyclic aromatic amines by fiber may prevent their absorption by the small intestine and bioactivation in the liver.

Using *in vitro* conditions simulating the small intestine, it has been shown that dietary fibers, particularly those containing lignin or suberin, readily adsorb heterocyclic aromatic amines (9, 10). Lignin increases fiber hydrophobicity and this may enhance adsorption of hydrophobic carcinogens (10). However, the interpretation of these experiments is not easy, because the model dietary fibers differed in lignin composition and concentration but also other dietary fiber characteristics. As a result, it is not clear whether lignin or some other component was responsible for enhanced adsorption of heterocyclic aromatic amines by some types of fiber.

The two primary precursors (i.e. monolignols) of lignin are coniferyl alcohol and sinapyl alcohol but other 4-hydroxyphenylpropanoids and conjugates may also be incorporated into the macromolecule. In the presence of peroxidase and H_2O_2 , monolignols form electron-delocalized radicals, which couple at various sites with other monolignol radicals or predominantly the growing lignin molecule, to form a complex polymer with a variety of interunit linkages (11). Ferulate monomers (61), ester-linked to polysaccharides in cereal dietary fiber, also undergo radical coupling to form various dimmers (62) and trimers (Fig. 3.10) (12-15). Ferulates also oxidatively couple with the growing lignin polymer (16, 17). Oxidative coupling of ferulate with itself and with lignin leads to extensive cross-linking of the fiber matrix, thus effecting the physico-chemical properties of dietary fibers (18, 19).

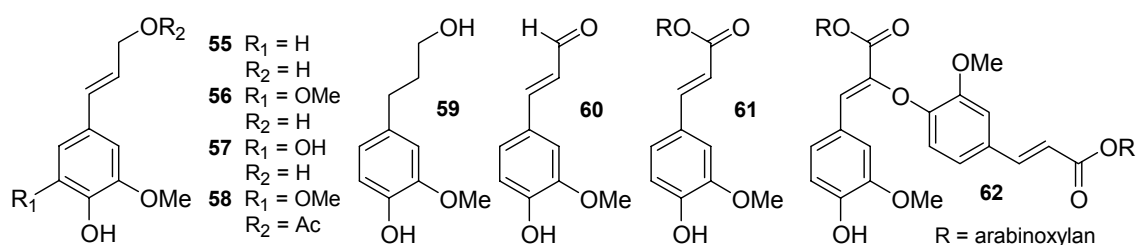


Figure 3.10: Structures of monolignols and ferulates: coniferyl alcohol 55, sinapyl alcohol 56, 5-hydroxyconiferyl alcohol 57, γ -acetylated sinapyl alcohol 58, dihydroconiferyl alcohol 59, coniferyl aldehyde 60, trans-ferulic acid ester 61, 8-O-4-dehydrodiferulic acid ester 62, one of several possible diferulate regio-isomers.

The aim of our study was to clearly delineate how various types and concentrations of lignin affect the adsorption of several heterocyclic aromatic amines (Fig. 3.9) by fiber. In these studies, we artificially lignified maize cell walls to form dehydrogenation polymer-cell wall complexes (DHP-cell walls) with defined lignin and polysaccharide properties. In other studies, feruloylated nonlignified maize walls were used to investigate the adsorption of heterocyclic aromatic amines by ferulates and diferulates.

Material and methods

General

Coniferyl alcohol, sinapyl alcohol, 5-hydroxyconiferyl alcohol, dihydroconiferyl alcohol and γ -acetylated sinapyl alcohol were kindly provided by Hoon Kim and Fachuang Lu (U.S. Dairy Forage Research Center, Wisconsin). Coniferyl aldehyde was obtained from Aldrich and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (amine **1**), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (amine **2**), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (amine **3**) and 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (amine **4**) (Fig. 3.9) were from Toronto Research Chemicals, North York, Canada. Triethylamine phosphate buffer (10 mM, pH 6.5) was freshly prepared before each HPLC analysis.

Synthesis of AIP-cell walls

Nonlignified cell walls (Tab. 3.3) were prepared according to Grabber et al. (20). In brief, 350 mL suspension cultures of maize (*Zea mays* L. cv. Black Mexican) were grown in 1 L flasks (media consisting of 4.5 g/L Murashige and Skoog Basal Medium, 30.0 g/L sucrose and 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, pH 5.6 - 6.8). During cell growth 0, 0.4, or 10.6 mg of 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP)/ L suspension culture was added to vary the degree of cell wall feruloylation (20). After 14 days of culture, cells were collected on a nylon mesh (20 μ m pore size) and washed with cold 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES) buffer (10 mM, pH 7.0). Cells suspended in PIPES buffer were ruptured by two

Table 3.3: Ferulate concentrations of investigated cell walls treated with 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP-CWs) ^a.

cell walls	AIP-addition [mg/L suspension culture]	H ₂ O ₂ addition	ferulates [mg/g CW]		
			monomers	dimers	total
AIP-CW 1	-	-	12.84	1.79	14.63
AIP-CW 2	0.4	-	5.24	1.26	6.50
AIP-CW 3	10.6	-	2.14	0.45	2.59
AIP-CW 4	-	+	9.97	4.03	14.00
AIP-CW 5	0.4	+	3.83	2.01	5.84
AIP-CW 6	10.6	+	1.43	0.70	2.14

^a Carbohydrate and Klason lignin concentrations in mg/g are referred to the original cell wall before fermentation.

passages through a Parr Nitrogen Bomb maintained at 1500 psi. After each passage, cell fragments were collected on a nylon mesh and washed with PIPES buffer. After washing with CaCl_2 solution (50 mM) and water cell walls were resuspended in water and a dilute aqueous solution of H_2O_2 (0.3 mmol H_2O_2 per gram dry weight of cell walls) was added over a 1 h period to one-half of the cell walls of each AIP treatment. Cell walls were then washed thoroughly with water and acetone and dried at 55 °C.

Synthesis of DHP-cell walls

Formation of DHP-cell walls (Tab. 3.4) was carried out according to Grabber et al. (21). Maize cultures were grown without AIP and cell walls were isolated as described above. Cell walls were resuspended in homopiperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (HOMOPIPES) buffer (25 mM, pH 5.5) and dilute aqueous H_2O_2 (0.2 mmol H_2O_2 per gram dry weight of cell walls) was added over a 1.5 h period. After 30 minutes of additional stirring, separate solu-

Table 3.4: Precursors and Klason lignin concentrations of investigated dehydrogenation polymer-cell walls (DHP-CWs).

cell walls	precursors for DHP-cell wall complexes	Klason lignin [%]
DHP-CW 1	coniferyl alcohol	7.56
		13.86
		19.02
DHP-CW 2	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol 2:1	7.51
		13.92
		16.21
DHP-CW 3	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol 1:2	7.07
		11.88
		12.42
DHP-CW 4	sinapyl alcohol	4.80
		9.48
		11.34
DHP-CW 5	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol + 5-Hydroxyconiferylalcohol 1:1:1	6.95
		11.02
		16.23
DHP-CW 6	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol + dihydroconiferyl alcohol 1:1:1	7.12
		13.06
		18.82
DHP-CW 7	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol + coniferyl aldehyde 1:1:1	7.44
		13.70
		20.44
DHP-CW 8	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol + γ -acetylated sinapyl alcohol 1:1:1	6.76
		11.52
		13.17
control	none	0.4 (20)

tions of monolignols (0.3 to 1.0 mmol monolignol per gram dry weight of cell walls, on ice) dissolved in water/acetone (80/20, v/v) and dilute aqueous H₂O₂ (0.5 - 1.5 mmol H₂O₂ per gram dry weight of cell walls) were added dropwise over a period of 5, 10, or 15 h to form DHP-cell walls with about 5, 10, and 14 % lignin. The following monolignols were used as lignin precursors in different ratios: coniferyl alcohol (**55**), sinapyl alcohol (**56**), 5-hydroxy coniferyl alcohol (**57**), γ -acetylated sinapyl alcohol (**58**), dihydroconiferyl alcohol (**59**), and coniferyl aldehyde (**60**) (Fig. 3.10). Following monolignol additions, cell walls were stirred for an additional 24 h and then cell walls were collected on a nylon mesh, washed extensively with water and acetone, and dried at 55 °C.

Characterization of cell walls

The lignin content of DHP-cell walls was determined by a modified Klason lignin method (22). Ferulic acid and diferulic acids were determined by GC-FID following alkaline hydrolysis of cell walls, ether extraction and silylation as described by Ralph et al. (12).

Incubation of cell walls with heterocyclic aromatic amines

Minor impurities were removed by mixing DHP-cell walls (60 mg) with water (10 mL) for 30 min at 37 °C on a rotating shaker. After centrifugation of cell wall suspensions, supernatants were discarded and the washing procedure was repeated three times with water (at 37 °C) and three times with acetone (at room temperature). After washing, cell walls were dried under a stream of nitrogen and stored at 55 °C.

Incubations of heterocyclic aromatic amines with cell walls were done in triplicate, using a modification of the method described by Robertson et al. (23). Cell walls (15 mg) were weighed into conical glass centrifuge tubes and swelled overnight in 1128 μ L of phosphate-buffered saline (10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, containing 130 mM sodium chloride). After adding 72 μ L of an amine **1**, **2**, **3** or **4**-solution (2.5 μ g/mL in methanol/water, (50/50, v/v)), samples were incubated on a rotating mixer (35 rpm) at 37 °C for 1 h. Following centrifugation (3200 rpm), 200 μ L of each supernatant was taken for HPLC analysis.

HPLC analysis of non-adsorbed heterocyclic aromatic amines

Adsorption of each heterocyclic aromatic amine to cell walls was determined indirectly by quantifying the amount of non-adsorbed heterocyclic aromatic amines in the supernatant after incubation. Quantification was performed by HPLC-UV (D-6000A interface, AS-4000A intelligent autosampler, L-6200 intelligent pump, L-4250 UV/VIS detector) (Merck, Darmstadt, Germany) with a column oven with control unit (Knauer, Berlin, Germany) using a 250 x 4.6 mm i.d., 5 μ m Luna Phenyl-Hexyl 100A column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The injection volume was 40 μ L. The column temperature was 45 °C and the flow rate was maintained at 1.2 mL/min. Detection wavelengths were 275 nm (amine **1**), 260 nm (amine **2**), 315 nm (amine **3**) and 338 nm (amine **4**). Elution was carried out using 10 mM triethylamine phosphate buffer, pH 6.5 (A) and acetonitrile (B). For AIP-cell walls, the follow-

ing elution systems were used: amine **1**: A 80 %, B 20 %, held isocratically for 15 min. Amine **2**: A 86 %, B 14 %, held isocratically for 15 min. Amine **3**: initially A 67 %, B 33 %, linear over 6 min to A 85 %, B 15 %, held isocratically for 1 min, following an equilibration step. Amine **4**: initially A 57 %, B 43 %, linear over 3 min to A 45 %, B 55 %, held isocratically for 2 min, following an equilibration step. Elution systems used for analysis of DHP-cell walls were the same for amine **1** and amine **3**. Amine **2** was analyzed using A 84 %, B 16 %, held isocratically for 15 min. The elution system for amine **4** was for DHP-cell walls 1 - 4 (Tab. 3.4) the same as described above. DHP-cell walls 5 - 8 were analyzed with the following elution system: A 58 %, B 42 %, held isocratically for 15 min.

Heterocyclic aromatic amine concentrations of HPLC samples were calculated from peak areas using external calibration curves of five standard solutions, generally concentrated between 35 and 175 ng/mL. External calibration was carried out by incubating and centrifuging heterocyclic aromatic amine solutions in a manner analogous to that used for the investigated cell walls, and subsequent HPLC analysis. Thus, heterocyclic aromatic amine losses due to possible unspecific adsorption to glassware or other losses during procedure were considered. However, recovery rates were > 97 %. Quantitation limits (calculated from a signal to noise ratio of ten) were 10 ng/mL for amine **2**, 15 ng/mL for amines **1** and **4** and 35 ng/mL for amine **3**.

Results and discussion

Cell wall characteristics

In our studies, cell walls with varying degrees of lignin content, lignin composition, cell wall feruloylation, and ferulate dehydrodimerization, were produced for heterocyclic aromatic amine adsorption studies. Cell walls from maize cell suspensions contain only trace amounts of lignin (0.4 % Klason lignin) and their polysaccharide composition is typical of primary walls in cereals (20).

Artificially lignified cell walls (DHP-cell wall complexes) were formed by slowly adding monolignols and H₂O₂ to cell walls isolated from maize suspensions (Tab. 3.4). The artificial lignins formed by polymerization of monolignols by *in situ* wall-bound peroxidases were shown in previous work to be structurally similar to natural grass lignins (21). DHP-cell walls with about 5 % lignin were prepared to mimic quantities reported for insoluble dietary fibers of rye bran (4.5 %) and maize bran (5.7 %) (24). To further evaluate the effects of lignin concentration on heterocyclic aromatic amine adsorption, additional DHP-cell walls with 10 % and 14 % lignin were also prepared. Recently, comparable lignin concentrations were detected in kiwi (8.3 %) and rhubarb (9.0 %) insoluble fiber (25). Actual levels of Klason lignin in DHP-cell walls varied somewhat depending on the monolignol mixture used to lignify cell walls (Tab. 3.4). As in previous work, very high proportions of sinapyl alcohol occasionally reduce the yields of generated polymeric complexes (26). This reflects the results from studies on peroxidases showing that most peroxidases are less efficient in oxidizing sinapyl alcohol than in oxidizing coniferyl alcohol (11). However, as also shown in previous work, DHP-complexes of mixed monolignols were readily generated (21). For example, determination of non-bound

monolignols in the reaction media by UV-scans showed that DHP-cell wall complexes containing guaiacyl and guaiacyl/syringyl (1:2) units from cell walls with about 10 % lignin incorporated both about 94 % of added monolignols. These results confirm that lignins of the desired monolignol ratios were formed.

DHP-cell walls were formed with coniferyl alcohol and sinapyl alcohol in ratios of 1:2 and 2:1 to form lignins representing the range of syringyl:guaiacyl composition observed in cereal fiber (e.g. ratios of 0.4 in insoluble rye bran dietary fiber and 1.6 in insoluble maize bran dietary fiber (24)). In cereal grain lignins, guaiacyl and syringyl units predominate, whereas *p*-hydroxyphenyl units are only detected in trace amounts (24). To further probe the effect of lignin composition on heterocyclic aromatic amine adsorption, additional DHP-cell wall complexes were formed with only coniferyl alcohol or sinapyl alcohol and with other 4-hydroxyphenylpropanoids that have been detected in natural lignins and particularly in mutant and transgenic plants. Extremely low syringyl/guaiacyl-ratios are characteristic for carrots (0.03) and kiwis (0.06) whereas rhubarb has a very high syringyl/guaiacyl ratio (6.2) (25). Dihydroconiferyl alcohol and γ -acetylated sinapyl alcohol are both found incorporated into natural plant lignins (e.g. γ -acetylated sinapyl alcohol in kenaf and dihydroconiferyl alcohol in most softwood lignins). Incorporation of coniferyl aldehyde into lignin is particularly observed in plants with a deficit in cinnamyl alcohol dehydrogenase activity, but also in "normal" plants, for example in pear insoluble fiber (25). 5-Hydroxyconiferyl alcohol is mainly present in plants with downregulated caffeic acid *O*-methyl transferase (11).

Nonlignified cell walls from maize cell suspensions contained 14.6 mg/g of total ferulates, about 10 % of which were diferulates (Tab. 3.3). Treatment of isolated walls with H₂O₂ to stimulate dehydrodimerization by wall-bound peroxidases increased the proportion of diferulates to about 30 %. The concentrations of ferulate monomers (10 mg/g) and diferulates (4 mg/g) in H₂O₂ treated cell walls were comparable to that reported for insoluble dietary fiber of rye (7 mg/g ferulates and 4 mg/g diferulates) and rice (8 mg/g ferulate and 4 mg/g diferulates) brans, but were lower than the concentrations reported for maize bran (25 mg/g ferulates and 13 mg/g diferulates) (18, 27). The degree of cell wall feruloylation was manipulated by growing cell suspensions with AIP, a specific inhibitor of phenylalanine ammonia lyase (28). Growing cell suspensions with 0.4 mg/L and 10.6 mg/L of AIP reduced total ferulate concentrations by 57 and 84 %, respectively, without markedly altering the proportion of diferulates in cell walls treated with and without H₂O₂ (Tab. 3.3).

Adsorption of heterocyclic aromatic amines by cell walls

Adsorption studies were performed with the four heterocyclic aromatic amines shown in Figure 3.9. These heterocyclic aromatic amines, especially amines **3** and **4** (Fig. 3.9), are the most abundant types found in cooked food, detected in amounts of up to 500 ng/g. Amine **1** is the most frequently observed heterocyclic aromatic amine (29). The investigated amines represent different compositional groups (amine **1** as aminoimidazo-quinoxaline, amine **2** as aminoimidazo-quinoline, amine **3** as aminoimidazo-pyridine, and amine **4** as α -carboline) and they also cover the range of hydrophobicity, with amine **1** being one of the least hydrophobic and amine **4** being one of the most hydrophobic heterocyclic aromatic amines.

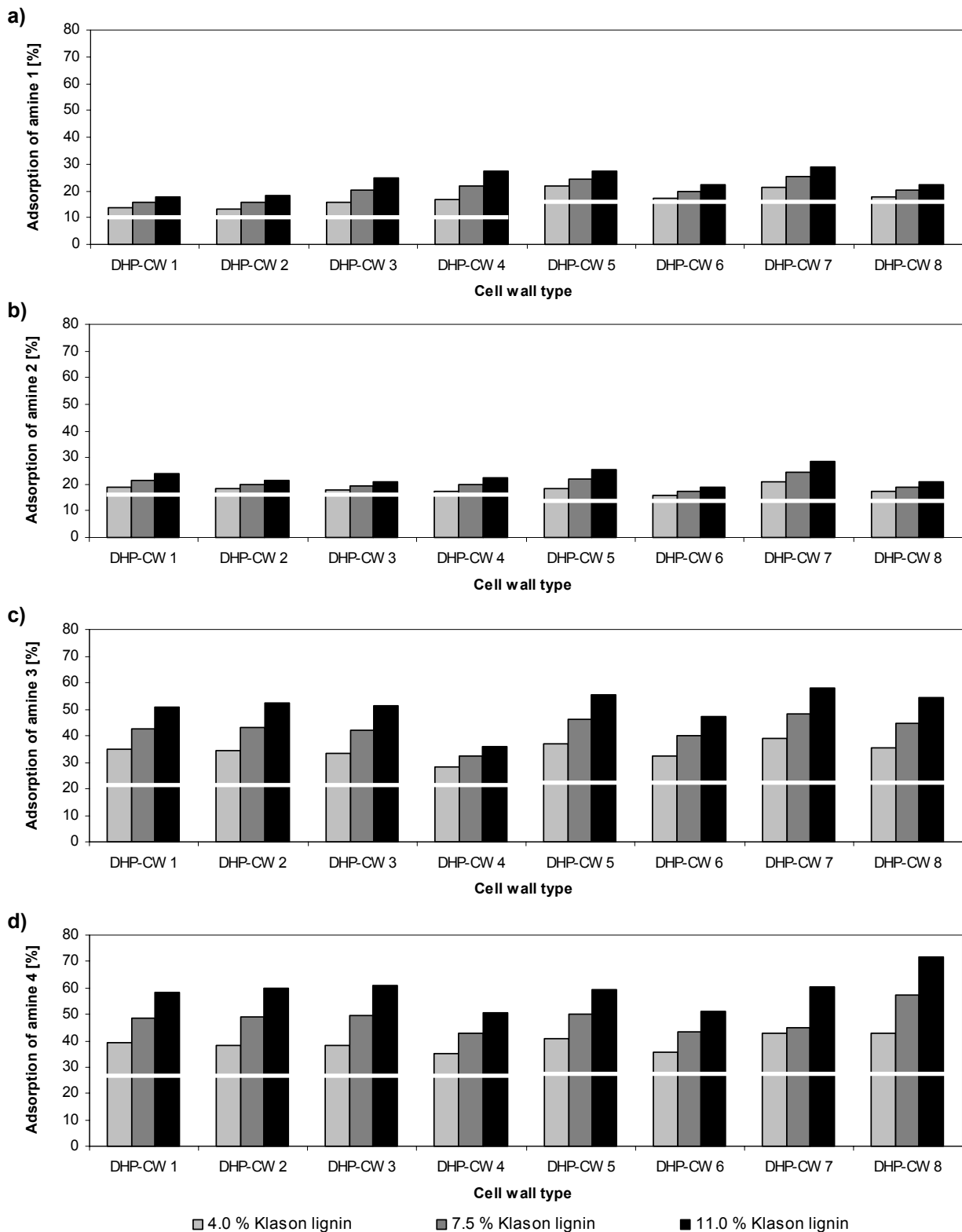


Figure 3.11: Adsorption of a) 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx, amine 1), b) 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ, amine 2), c) 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP, amine 3), and d) 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC, amine 4) (Fig. 3.9) by dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls (Tab. 3.4), interpolated to Klason lignin concentrations of 4.0, 7.5 and 11.0%. The white lines mark the adsorption by nonlignified control cell walls.

Although estimation of heterocyclic aromatic amine intake is difficult and depends on personal eating habits, previous adsorption studies have often used heterocyclic aromatic amine concentrations (e.g. in the range of 0.1 - 1 µg heterocyclic aromatic amine/mg cell wall) that are probably in great excess of concentrations found in human diets. Calculations of heterocyclic aromatic amine concentrations for our studies were based on data summarized by Jägerstad et al. (29). A model meal of 200 g meat and 200 g maize may contain up to 7 µg heterocyclic aromatic amine and 4.0 g dietary fiber (29, 30), leading to a heterocyclic aromatic amine/dietary fiber ratio of 1.75 ng/mg. In our studies, 15 mg cell walls were incubated

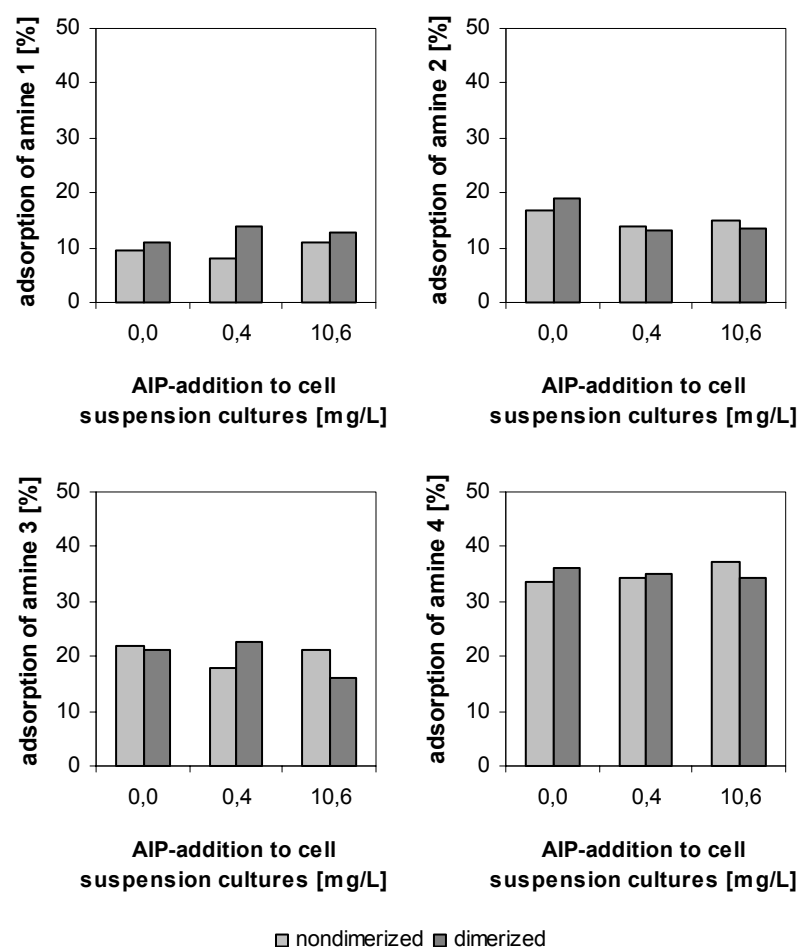


Figure 3.12: Adsorption of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx, amine 1), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ, amine 2), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP, amine 3), and 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC, amine 4) (Fig. 3.9) by cell walls with normal and reduced (di)ferulate concentrations (Tab. 3.3). Reduction of ferulate levels was achieved by treatment of the growing cells with 0.4 and 10.6 mg 2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP)/L suspension culture. Ferulate monomers of AIP-cell walls were partly dimerized by H₂O₂ addition.

with 180 ng heterocyclic aromatic amine, resulting in a heterocyclic aromatic amine/cell wall ratio of 12 ng/mg. This ratio is still high, but lower ratios could not be used, limited by the quantitation limits of the investigated amines in our HPLC methodology. Swelling of cell walls during incubation prevented us from using smaller volumes for the assay.

Under conditions simulating the small intestine (pH 6.5, 37 °C, 1 h, continuous agitation), all four heterocyclic aromatic amines were adsorbed by all cell walls investigated as shown in Figures 3.11 and 3.12. The extent of adsorbed heterocyclic aromatic amines varied between 8 % and 72 % and was influenced by the amines' hydrophobicity, lignin concentration, lignin composition and ferulate concentration of cell walls as follows.

Hydrophobicity of heterocyclic aromatic amines and cell wall adsorption

Across all types of cell walls, adsorption was greatest with amine **4** (up to 72 %), intermediate with amine **3** (up to 58 %), and lowest with amines **1** and **2** (up to 29 %) (Fig. 3.11). Previous studies (9, 10) suggest hydrophobicity of heterocyclic aromatic amines influences their adsorption to fiber. The hydrophobicity of a substance can be estimated from the calculated log of the partition coefficient (ClogP). ClogP is based on the partitioning of a substance between 1-octanol and water and ClogP values increase with increasing hydrophobicity. ClogPs of the four investigated heterocyclic aromatic amines were calculated using a database of Advanced Chemistry Development (ACD/Labs). Based on these calculations, amine **4** is the most hydrophobic heterocyclic aromatic amine (ClogP = 3.05), followed by amine **3** (ClogP = 1.26) and amine **2** (ClogP = 0.85) while amine **1** is the least hydrophobic heterocyclic aromatic amine (ClogP = 0.52). The relation between heterocyclic aromatic amine hydrophobicity and adsorption indicates that adsorption is mainly based on hydrophobic interactions with cell wall components.

Lignin concentration and heterocyclic aromatic amine adsorption

The Klason lignin concentrations of the investigated DHP-cell walls varied between 4.8 % and 20.4 %. To permit direct comparisons between different DHP-cell walls, adsorption data were interpolated to lignin levels of 4.0 %, 7.5 % and 11.0 % by linear regression. The measured adsorption values were plotted against lignin concentrations for each DHP-cell wall type as illustrated for amine **4** adsorption in Figure 3.13. Although a quadratic relationship between lignin concentration and adsorption could not be fully excluded for some treatments, linearity was demonstrated for most of the treatments. Therefore, linear regression was used uniformly for all treatments. Correlation coefficients were generally between 0.915 and 1.000. However, in six cases correlation coefficients were worse (0.724 - 0.899), especially for the poorly adsorbed amines **1** and **2**.

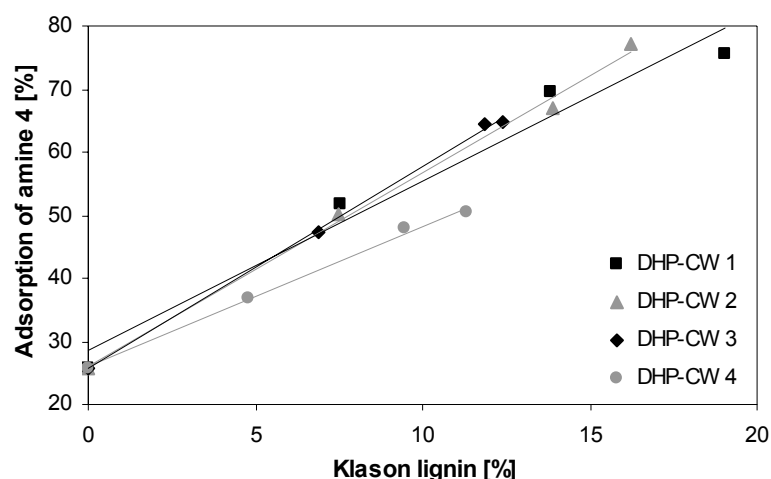


Figure 3.13.: Adsorption of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AaC, amine **4**) (Fig. 3.9) by dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls **1 - 4** (Tab. 3.4). Correlation coefficients of linear regression are: 0.984 (DHP-CW **1**), 0.998 (DHP-CW **2**), 0.999 (DHP-CW **3**) and 0.998 (DHP-CW **4**).

The interpolated data in Figure 3.11 demonstrate that the adsorption of all four heterocyclic aromatic amines, especially amines **3** and **4**, increased as lignin concentrations of DHP-cell walls increased. For example, the adsorption of amine **4** to guaiacyl-DHP-cell walls (DHP-

CW 1) (Fig. 3.11d) increased from 39 % to 58 % as Klason lignin increased from 4 to 11 %. The lignin concentration seems to be less important for the adsorption of the less hydrophobic compounds amines **1** and **2**. With these compounds, increasing the Klason lignin concentration of guaiacyl-DHP-cell walls from 4 % to 11 % only increased heterocyclic aromatic amine adsorption from 19 % to 24 % for amine **2** and from 13 % to 18 % for amine **1**. However, it has to be considered, that cereal dietary fibers are best represented by DHP-cell walls with 4 % Klason lignin, whereas high lignin contents like 11 % are not common for cereals, although some fruit and vegetable insoluble dietary fibers contain higher lignin amounts than cereal fibers (25).

Cell walls that were not artificially lignified were used as control cell walls. These nonlignified cell walls, containing only trace amounts of lignin (20), also adsorbed heterocyclic aromatic amines, but in smaller amounts. The adsorption to nonlignified cell walls is demonstrated by white lines in Figure 3.11. Adsorption to nonlignified cell walls was lowest for amine **1** (on average 13 %) and amine **2** (15 %), intermediate for amine **3** (22 %) and highest for amine **4** (26 %). Comparing the adsorption of “nonlignified” cell walls with the adsorption of artificially lignified DHP-cell walls, the significance of the lignin concentration of the cell walls for the adsorption of heterocyclic aromatic amines especially becomes clear for amines **3** and **4**. For example, guaiacyl-DHP-cell walls with 4 % Klason lignin (DHP-CW 1) (Fig. 3.11c, d) adsorbed 52 % more amine **4** (increase from 26 to 39 % adsorption) and 60 % more amine **3** (increase from 22 to 35 % adsorption) than the “nonlignified” control cell walls. However, especially for the adsorption of amine **2** the cell wall matrix seems to be more effective. Compared to nonlignified control cell walls, guaiacyl-DHP-cell walls with 4 % Klason lignin (DHP-CW 1) (Fig. 3.11b) increased the adsorption of amine **2** only by 16 % (from 16 to 19 % adsorption). Although the effect of lignin on the adsorption of amines **3** and **4** is very distinct, the matrix should also be considered as potent adsorber for these heterocyclic aromatic amines. Thus, in future studies the adsorption properties of different matrix components, especially matrix polysaccharides, have to be investigated more detailed.

Lignin composition and heterocyclic aromatic amine adsorption

The impact of guaiacyl/syringyl-ratios on the adsorption of heterocyclic aromatic amines was investigated, using DHP-cell walls formed with varying ratios of coniferyl alcohol (**55**) and sinapyl alcohol (**56**). Additional DHP-cell wall complexes were formed by adding 5-hydroxyconiferyl alcohol (**57**), γ -acetylated sinapyl alcohol (**58**), dihydroconiferyl alcohol (**59**) or coniferyl aldehyde (**60**) with coniferyl alcohol (**55**) and sinapyl alcohol (**56**) to investigate how lignins formed with more unusual monolignols may influence heterocyclic aromatic amine adsorption (Fig. 3.10).

Lignin composition influenced the adsorption of all four heterocyclic aromatic amines (Fig. 3.11). Among the DHP-cell walls with guaiacyl/syringyl lignins, the more hydrophobic amines **3** and **4** were better adsorbed to lignins containing guaiacyl units; variation from 100 % guaiacyl units (DHP-CW 1) to 1:2 guaiacyl to syringyl (DHP-CW 3) did not affect adsorption but shifting lignin composition to 100 % syringyl units (DHP-CW 4) decreased adsorption by 11 % for amine **3** and 13 % for amine **4** (Fig. 3.11c, d). Adsorption of amine **2** showed no

clear preference for guaiacyl or syringyl units (Fig. 3.11b), whereas amine **1** had greater affinity to syringyl-rich DHP-cell wall complexes (Fig. 3.11a). These shifts might be explained by the differing hydrophobicity of coniferyl alcohol (ClogP = 0.92) compared to sinapyl alcohol (ClogP = 0.57). For example, amine **1**, the least hydrophobic heterocyclic aromatic amine, prefers adsorption to DHP-cell walls mainly derived from the less hydrophobic sinapyl alcohol. However, it has to be considered that lignin is a complex macromolecule and the adsorption properties probably do not only depend on the hydrophobicities of the monolignols themselves, but also on the lignin structures resulting from the coupling positions of the lignin units.

This assumption is supported by the results of the experiments run with the DHP-cell walls deriving from “special” monolignols. Hydrophobicity of the monolignols increases from 5-hydroxyconiferyl alcohol (ClogP = 0.59), over dihydroconiferyl alcohol (ClogP = 0.85) and coniferyl aldehyde (ClogP = 1.35) to γ -acetylated sinapyl alcohol (ClogP = 1.50). Even though dihydroconiferyl alcohol has an intermediate hydrophobicity, DHP-cell walls that incorporated dihydroconiferyl alcohol (DHP-CW 6) (Fig. 3.11) had the least adsorption of heterocyclic aromatic amines. The adsorption effect of DHP-cell walls containing γ -acetylated sinapyl alcohol (DHP-CW 8) (Fig. 3.11) increased with growing hydrophobicity of the investigated heterocyclic aromatic amines and was best for the adsorption of amine **4**. Cell walls containing 11 % Klason lignin, deriving from coniferyl alcohol, sinapyl alcohol and γ -acetylated sinapyl alcohol (1:1:1), adsorbed 72 % of amine **4**, 11 % percentage points more than the corresponding DHP-cell walls with a 1:2 ratio of guaiacyl to syringyl units (DHP-CW 3) (Fig. 3.11d).

Ferulates and heterocyclic aromatic amine adsorption

Ferulates may interact with heterocyclic aromatic amines, for example by forming π - π -interactions between the aromatic systems. Furthermore, diferulates are able to cross-link polysaccharides, thus possibly forming more hydrophobic regions by extensive cross-linking. As already shown for the much more expanded lignin complex, hydrophobicity enhances the adsorption of some heterocyclic aromatic amines. The influence of ferulates on the adsorption of heterocyclic aromatic amines was investigated with maize cell walls isolated from cell suspensions, containing normal and reduced ferulate levels as well as varying degrees of ferulate dimerization (Tab. 3.3).

The adsorption properties of these cell walls are presented in Figure 3.12. As already shown for the adsorption to DHP-cell walls, the adsorption of the four investigated heterocyclic aromatic amines increased with their growing hydrophobicity. However, there was no clear effect of cell wall feruloylation or ferulate dimerization on the adsorption of heterocyclic aromatic amines.

In conclusion, synthesis of DHP-cell walls with varying, defined lignin concentrations and compositions and synthesis of cell walls with normal and reduced ferulate concentrations enabled us to investigate the influence of lignification and feruloylation on the *in vitro* adsorption of the four most abundant heterocyclic aromatic amines in human nutrition (Fig. 3.9).

The results demonstrated that all heterocyclic aromatic amines were adsorbed to all cell walls and adsorption of heterocyclic aromatic amines was related to their hydrophobicity. While different degrees of feruloylation of cell walls had no effect, both lignin concentration and variations in the syringyl and guaiacyl makeup of lignin units influenced the adsorption of heterocyclic aromatic amines. Adsorption of heterocyclic aromatic amines increased with greater lignin deposition into cell walls. The more hydrophobic amines **3** and **4** were better adsorbed by guaiacyl-rich DHP-cell wall complexes whereas amine **1**, the least hydrophobic heterocyclic aromatic amine, showed an increased affinity to syringyl-rich DHP-cell walls complexes. Incorporation of other 4-hydroxyphenylpropanoids into the DHP-cell wall complexes indicated that unusual monolignols, found in some types of plant lignins, also influence adsorption of heterocyclic aromatic amines; all amines had greater affinity to DHP-cell walls containing 5-hydroxyconiferyl alcohol and coniferyl aldehyde than to DHP-cell walls containing dihydroconiferyl alcohol. The affinity of the more hydrophobic heterocyclic aromatic amines was greatly enhanced when DHP-cell walls were formed with γ -acetylated sinapyl alcohol.

Lignified fiber is very effective for adsorbing the more hydrophobic heterocyclic aromatic amines **3** and **4**. This effect is even large for relatively low lignin concentrations that are typically found in cereal grain dietary fibers. However, lignified fiber is rather poor for adsorbing the less hydrophobic heterocyclic aromatic amines **1** and **2**. The adsorption of the less hydrophobic heterocyclic aromatic amines is mainly affected by the nonlignified cell wall matrix and not by the lignin amounts usually found in cereal grain fibers. Since considerable amounts of the more hydrophobic heterocyclic aromatic amines were also adsorbed to nonlignified fiber, adsorption to the cell wall matrix should not be underestimated and needs to be further investigated.

Abbreviations

AIP - 2-aminoindan-2-phosphonic acid; DHP - dehydrogenation polymer; PIPES - 1,4-piperazinediethanesulfonic acid

Safety

The International Agency of Research on Cancer classified the investigated heterocyclic aromatic amines as to their carcinogenic risk to humans as follows:

2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline is probably carcinogenic to humans. The exposure circumstance entails exposures that are probably carcinogenic to humans.

2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole are possibly carcinogenic to humans. The exposure circumstance entails exposures that are possibly carcinogenic to humans.

Acknowledgements

We are grateful to Hoon Kim and Fachuang Lu for synthesizing the monolignols for the DHP-cell wall complexes, to Christy Davidson, Ronald Hatfield and Jane Marita for experimental support, to John Ralph for general help and discussions and to the H. Wilhelm Schaumann Stiftung for funding Carola Funk's visit to the US Dairy Forage Research Center in Madison, USA.

Literature cited

- (1) Pietinen, P.; Malila, N.; Virtanen, M.; Hartman, T. J.; Tangrea, J. A.; Albanes, D.; Virtamo, J. Diet and risk of colorectal cancer in a cohort of Finnish men. *Cancer Causes Control* **1999**, *10*, 387-396.
- (2) Terry, P.; Giovannucci, E.; Michels, K. B.; Bergkvist, L.; Hansen, H.; Holmberg, L.; Wolk, A. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 525-533.
- (3) Harris, P. J.; Ferguson, L. R. Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Mutation Res.* **1999**, *443*, 95-110.
- (4) Bingham, S. A.; Day, N. E.; Luben, R.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Norat, T.; Clavel-Chapelon, F.; Kesse, E.; Nieters, A.; Boeing, H.; Tjonneland, A.; Overvad, K.; Martinez, C.; Dorronsoro, M.; Gonzalez, C. A.; Key, T. J.; Trichopoulou, A.; Naska, A.; Vineis, P.; Tumino, R.; Krogh, V.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Peeters, P. H. M.; Berglund, G.; Hallmans, G.; Lund, E.; Skeie, G.; Kaaks, R.; Riboli, E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* **2003**, *361*, 1496-1501.
- (5) Peters, U.; Sinha, R.; Chatterjee, N.; Subar, A. F.; Ziegler, R. G.; Kulldorff, M.; Bresalier, R.; Weissfeld, J. L.; Flood, A.; Schatzkin, A.; Hayes, R. B. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* **2003**, *361*, 1491-1495.
- (6) Ferguson, L. R.; Harris, P. J. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* **1996**, *350*, 173-184.
- (7) Turesky, R. J. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 101-117.
- (8) Berlau, J.; Glej, M.; Pool-Zobel, B. L. Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 737-743.
- (9) Ferguson, L. R.; Robertson, A. M.; Watson, M. E.; Kestell, P.; Harris, P. J. The adsorption of a range of dietary carcinogens by α -cellulose, a model insoluble dietary fiber. *Mutation Res.* **1993**, *319*, 257-266.

-
- (10) Harris, P. J.; Triggs, C. M.; Roberton, A. M.; Watson, M. E.; Ferguson, L. R. The adsorption of heterocyclic aromatic amines by model dietary fibres with contrasting compositions. *Chem. Biol. Interact.* **1996**, *100*, 13-25.
- (11) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 29-60.
- (12) Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 3485-3498.
- (13) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5845-5850.
- (14) Funk, C.; Ralph, J.; Steinhart, H.; Bunzel, M. Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 363-371.
- (15) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 128-133.
- (16) Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Grabber, J. H.; Jung, H. G.; Quideau, S.; Helm, R. F. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In *Lignin and Lignan Biosynthesis*; N. G. Lewis and S. Sarkanen, Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1998; pp 209-236.
- (17) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6106-6113.
- (18) Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Steinhart, H. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 653-660.
- (19) Ng, A.; Greenshields, R. N.; Waldron, K. W. Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: Formation of ferulic acid dehydrodimers. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 459-462.
- (20) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J.; Zon, J.; Amrhein, N. Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1077-1082.
- (21) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Kuster, T.; Pell, A. N. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1453-1459.
- (22) Hatfield, R. D.; Jung, H.-J. G.; Ralph, J.; Buxton, D. R.; Weimer, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 51-58.

-
- (23) Robertson, A. M.; Harris, P. J.; Hollands, H. J.; Ferguson, L. R. A model system for studying the adsorption of a hydrophobic mutagen to dietary fibre. *Mutation Res.* **1990**, *244*, 173-178.
- (24) Bunzel, M.; Ralph, J.; Lu, F.; Hatfield, R. D.; Steinhart, H. Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6496-6502.
- (25) Bunzel, M.; Seiler, A.; Steinhart, H. Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9553-9559.
- (26) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. Modeling lignification in grasses with monolignol dehydropolymerisate-cell wall complexes. In *Lignin and Lignan Biosynthesis*; N. G. Lewis and S. Sarkanen, Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1998; pp 163-171.
- (27) Bunzel, M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. PhD thesis, Hamburg, 2001.
- (28) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 193-200.
- (29) Jägerstad, M.; Skog, K. I.; Arvidsson, P.; Solyakov, A. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1998**, *207*, 419-427.
- (30) Mongeau, R.; Brooks, S. P. J. Chemistry and analysis of lignin. In *Handbook of dietary fibers*; Cho, S. S., Dreher, M. L., Eds.; Dekker: Ottawa, Canada, 2001; pp 321-373.

3.4 Studien zum Abbau lignifizierter Zellwände durch die menschliche Darmflora und Einfluss auf die Adsorption heterozyklischer aromatischer Amine

Die in diesem Kapitel präsentierte Veröffentlichung befasst sich mit der Fermentation lignifizierter Zellwände durch humane Darmmikroorganismen. Neben dem Einfluss der Lignifizierung auf die Fermentierbarkeit der Zellwände wurde untersucht, inwiefern die Fermentation die Adsorptionseigenschaften lignifizierter Zellwände für HAA verändert. Die Arbeiten für die hier vorgestellte Studie wurden selber in den Laboratorien in Hamburg, Madison und Potsdam durchgeführt.

Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,
624 (1-2), 41-48, 2007

Model studies of lignified fiber fermentation by human fecal microbiota and its impact on heterocyclic aromatic amine adsorption

CAROLA FUNK ^a, ANNETT BRAUNE ^b, JOHN H. GRABBER ^c, HANS STEINHART ^a, MIRKO BUNZEL ^{a,*}

^a Institute of Biochemistry and Food Chemistry, Department of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

^b German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Department of Gastrointestinal Microbiology, Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Nuthetal, Germany

^c U.S. Dairy Forage Research Center, USDA-Agricultural Research Service, 1925 Linden Drive West, Madison, WI 53706, USA

* To whom correspondence should be addressed.

Tel.: +49-40-42838-4379

Fax: +49-40-42838-4342

E-mail: mirko.bunzel@uni-hamburg.de

[†] University of Hamburg

[‡] German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke

[§] U.S. Dairy Forage Research Center

Abstract

This study examined how shifts in pH and fiber fermentation may alter the adsorption of mutagenic heterocyclic aromatic amines (HAAs) 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (AcC) to dietary fiber in the human

small intestine and colon. Nonlignified and artificially lignified maize cell walls were fermented *in vitro* with human fecal microbiota for 0, 8, or 24 h. We then assessed the adsorption of HAAs to unfermented fiber at pH 6.5 and to unfermented and fermented fibers at pH 7.4 to mimic conditions in the small intestine and colon, respectively. HAAs were effectively adsorbed to lignified fiber by up to 74 % at pH 6.5 and by up to 68 % at pH 7.4. Increasing the lignin content of unfermented fiber from 0.4 % to about 14 % increased HAA adsorption by 2 to 3 fold. This increase in lignification reduced microbial fiber degradation from 51 % to minimum 8 % after 24 h of fermentation, whereas variations in the guaiacyl and syringyl makeup of lignin had smaller but significant impacts on fiber degradation. A 24 h fermentation decreased the AαC adsorption to lignified fiber at pH 7.4 by up to one-third, while PhIP adsorption was not affected. Our results indicate that lignification increases the adsorption of hydrophobic HAAs to fiber but shifts in pH and fermentation may somewhat diminish adsorption of some HAAs as fiber passes from the small intestine into and through the colon.

Key words

Heterocyclic aromatic amines; Adsorption studies; Lignin; Dietary Fiber; Fermentation; Human fecal microbiota.

Introduction

The adsorption of heterocyclic aromatic amines (HAAs) by dietary fiber is widely held as a mechanism of cancer reduction [1]. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (AαC) (**63**, **64**, Fig. 3.14) are among the most abundant HAAs, detected in heated meat and fish products in quantities approaching 500 ng/g [2]. Adsorption and excretion of HAAs with dietary fiber may prevent their absorption from the intestine and metabolism in the liver into activated forms that are mutagenic and possibly carcinogenic. Due to its hydrophobicity, lignin in dietary fiber is thought to be especially effective for adsorbing HAAs [3,4].

Lignins are natural complex macromolecules composed of mainly guaiacyl (G) and syringyl (S) units derived from oxidative radical coupling of coniferyl alcohol and sinapyl alcohol (**65**, **66**, Fig. 3.14) [5]. Previous HAAs adsorption studies partially lacked specificity because model dietary fibers differed not only in lignin properties but also other fiber characteristics as well. Recent studies with dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls, a biomimetic model of lignified fiber, unambiguously demonstrated that the hydrophobic PhIP and AαC could strongly adsorb to lignified fiber in the small intestine whereas adsorption of the less hydrophobic 2-amino-3,8-

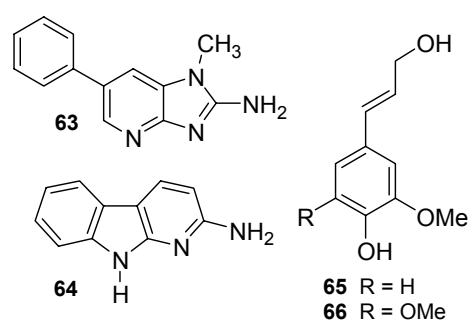


Figure 3.14: Structures of heterocyclic aromatic amines: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) **63, 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (AαC) **64**, and monolignols coniferyl alcohol **65** and sinapyl alcohol **66**.**

dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) was less influenced by lignification [6]. This study also revealed that lignin composition had a secondary effect on the adsorption of some HAAs. For example, PhIP and AαC were better adsorbed by G-rich DHP-cell walls, whereas the less hydrophobic MeIQx showed an increased affinity to S-rich DHP-cell walls. The adsorption of HAAs, may however, be altered as fiber undergoes compositional changes due to fermentation in the colon [7,8]. For example, work by Ryden et al. indicated that fermentation of cereal bran with human fecal microbiota for 18 h enhanced the fibers adsorption affinity and capacity for MeIQx [8]. In this *in vitro* study, we used DHP-cell walls to investigate how shifts in pH from the small intestine to colon and fermentation in the colon may alter the adsorption of PhIP and AαC to lignified fiber.

Materials and Methods

General

Coniferyl alcohol and sinapyl alcohol were synthesized by the method of Kim and Ralph [9]. Glucose oxidase was from Sigma (St. Louis, MO, USA). PhIP and AαC were from Toronto Research Chemicals (North York, Canada). Triethylamine phosphate buffer was freshly prepared before each HPLC analysis. Nylon-bags (4.5 x 9.0 cm) used in fermentation experiments were made from polyamide 6.6 monofilament fabric (NITEX) with a mesh opening of 10 μm (Sefar, Freibach, Switzerland). Prior to use, nylon bags were heated for 30 min at 100 °C and stored at 55 - 60 °C to minimize bacterial contamination. Brain heart infusion (BHI) broth was from Roth (Karlsruhe, Germany).

Synthesis of DHP-cell walls

DHP-cell walls were prepared from nonlignified maize suspension cultures (*Zea mays* L. cv. Black Mexican) according to Grabber et al. [10] as previously described in Funk et al. [6]. Briefly, isolated maize walls (2.6 - 5.1 g dry weight) were suspended in homopiperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (HOMOPIPES) buffer (pH 5.5) with glucose oxidase (about 930 U/g dry weight of cell walls) and then treated with glucose (0.15 mmol/g dry weight of cell walls, in HOMOPIPES) to stimulate diferulate cross-linking by cell-wall peroxidases and *in situ* generated H₂O₂. Cell walls were then artificially lignified over a 9 to 32 h period by dropwise additions of coniferyl alcohol or a 1:1 molar ratio of coniferyl and sinapyl alcohol (0.3 - 1.0 mmol/g dry weight of cell walls) and glucose (0.3 - 1.1 mmol/g dry weight of cell walls) prepared in acetone/HOMOPIPES buffer (5/95, v/v). An aliquot of cell walls stirred without monolignol additions served as nonlignified control. After monolignol additions were completed, cell walls were stirred for an additional 12 to 24 h before being thoroughly washed with water followed by acetone. After evaporating residual acetone in a hood, DHP-cell walls were oven dried at 55 °C.

Cell wall characterization

Lignin concentrations were determined gravimetrically as Klason lignin [11]. Neutral carbohydrate components were analyzed as alditol acetates [12,13]. Briefly, cell walls were pre-treated with 12 M H₂SO₄ at 35 °C for 2 h to dissolve cellulose, hemicelluloses and pectins. Following dilution to 2 M H₂SO₄, hydrolysis was performed for 1 h at 100 °C. Direct hydrolysis using 2 M H₂SO₄ without pre-treatment with 12 M H₂SO₄ was done to quantify noncellulosic glucose. Neutral monosaccharides were reduced with NaBH₄ and the resulting alditols were acetylated with acetic anhydride using 1-methylimidazole as catalyst. Erythritol was used as internal standard. Alditolacetates were determined by GC-FID (GC Focus Series, Thermo Electron Corporation, Milan, Italy) using a 0.32 mm × 30 m DB-5 capillary column with a 0.25 µm film thickness (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). GC conditions were as follows: initial column temperature, 150 °C, held for 3 min, ramped at 4 °C/min to 220 °C, held for 2 min, ramped at 10 °C/min to 300 °C, and held for 10 min; injector temperature 250 °C, split ratio 1:6, flame ionization detection (detector temperature 290 °C). He (1.6 mL/min) was used as the carrier gas. Neutralized acid hydrolyzates were also used for the colorimetric determination of uronic acids according to Blumenkrantz and Asboe-Hansen [14].

Cell wall fermentation

Fecal samples were collected from nine healthy volunteers (six female and three male) with a mean age of 41 years (range 25 to 61 years). Volunteers had not undergone antibiotic therapy within six months prior to the study. Aliquots of freshly voided feces (approximately 5 - 12 g per person) were combined to a total of 80.7 g. Pooled fecal samples were mixed with 320 mL BHI broth in a stomacher bag, homogenized (Stomacher Model 3500, Seward Ltd., London, UK), and filtered through a sieve (mesh opening 1 mm) to remove large particles. Aliquots (10 mL) of the resulting suspension were added to 500-mL bottles containing 190 mL of BHI broth. To each bottle, a nylon bag containing 850 mg of cell walls was added and the bottles were sealed with natural rubber stoppers and screw caps. To estimate non-fermentative losses during incubation and subsequent sample handling, bags with cell walls were also placed in bottles with BHI broth but without fecal suspension. Except for feces homogenization, preparation of fermentation bottles was carried out under an atmosphere of N₂/CO₂/H₂ (80/10/10, v/v/v) in a glove box (MACS Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, England). Fermentation bottles were incubated in duplicate on a rotary shaker (200 rpm) at 37 °C for 8 h or 24 h. Following fermentation, sample bags were thoroughly washed with water, followed by acetone. Fermentation residues were carefully dried under N₂ and further oven dried for two days at 55 °C before weighing for gravimetric determination of degradation. The fermentation residues were chemically characterized as described above.

Adsorption studies

Adsorption studies were performed as previously described [6] by incubating HAAs with cell walls (15 mg) or with residues recovered following the fermentation of 15 mg of cell walls. Briefly, intact cell walls or residues were swollen overnight in phosphate buffered saline at pH 6.5 or 7.4 (67 mM sodium phosphate buffer, containing 130 mM sodium chloride). Resulting suspensions were incubated with PhIP or AαC (180 ng/1.2 mL) on a rotating shaker (35 rpm) at 37 °C for 1 h. Following centrifugation (2000 x g), supernatants of incubated samples were analyzed for non-adsorbed HAAs by HPLC-UV D-6000A interface, L-6200 intelligent pump, L-4250 UV-vis detector, Merck, Darmstadt, Germany; autosampler ISS-101, Perkin Elmer, Überlingen, Germany; column oven, Knauer, Berlin, Germany) using a 250 x 4.6 mm i.d., 5 μm Luna Phenyl-Hexyl 100Å column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Column temperature was 45 °C, the flow rate was maintained at 1.2 mL/min and injection volume was 40 μL. Elution was performed for 15 min using an isocratic elution system consisting of triethylamine phosphate buffer (10 mM, pH 6.5) and acetonitrile (PhIP: 67/33, v/v, AαC: 58/42, v/v). PhIP was detected at 315 nm and AαC at 338 nm. To compensate for HAA losses due to unspecific adsorption to glassware (or other losses during the procedure), external calibration was performed by incubating and analyzing standard solutions of HAA in a manner analogous to that used for cell walls and cell wall residues.

Statistical analysis

Data were statistically analyzed using the unpaired t-test or by a one- or two-factorial analysis of variance. Statistical analysis was performed at the 0.05 level of significance, using SPSS software for Windows, Version 11.5.2.1.

Results and discussion

Cell wall characteristics

Previous work demonstrated that artificial lignins formed in this cell-wall model system are structurally similar to natural lignins [10]. Coniferyl alcohol and a 1:1 mixture of coniferyl and sinapyl alcohols were polymerized by *in situ* peroxidases in maize cell walls to produce DHP-cell wall complexes composed of G- and G/S-lignins, respectively. Two levels of monolignol addition were used to produce DHP-cell walls with an average of 8.5 and 14.4 % Klason lignin (Tab. 3.5). We formed DHP-cell wall complexes with differing lignin concentrations and compositions in order to represent various types of lignified dietary fiber. Lignin concentrations of about 8.5 % have, for example, been reported for insoluble fiber of kiwi and rhubarb while insoluble pear fiber may contain up to 23.5 % lignin [15]. Lignin composition also varies considerably; natural G-dominated lignins were recently detected in carrot and kiwi insoluble fibers while lignin or polyphenolic lignin-like compounds of insoluble fiber from wheat and apple contain roughly equal amounts of G- and S-units [15-17].

Table 3.5: Concentration of Klason lignin in dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls formed by adding monolignols to isolated nonlignified cell walls of maize.

cell wall type	precursors for DHP-cell wall complexes	Klason lignin (%)
DHP-cell walls 1 (G-lignin)	coniferyl alcohol	8.1
DHP-cell walls 2 (G-lignin)	coniferyl alcohol	15.2
DHP-cell walls 3 (G/S-lignin)	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol 1:1	9.0
DHP-cell walls 4 (G/S-lignin)	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol 1:1	13.5
nonlignified control	none	~ 0.4, Ref. [18]

Based on monosaccharide analysis (Tab. 3.6), cellulose and arabinoxylans were the predominant polysaccharides within DHP-cell walls. On average, DHP-cell walls contained 224 mg/g of glucose derived from cellulose, whereas another 53 mg/g of glucose originated from hemicelluloses such as mixed-linked β -glucans or xyloglucans. DHP-cell walls also contained 134 mg/g arabinose and 117 mg/g xylose derived mainly from arabinoxylans and possibly partially from glucuronoarabinoxylans. The high arabinose/xylose ratio suggests some arabinose was derived from arabinan side chains of pectins. In addition, uronic acids, derived mainly from pectins, made up 88 mg/g of the DHP-cell walls. Minor quantities of mannose (< 10 mg/g) and rhamnose (< 4 mg/g) were also detected.

Table 3.6: Concentrations of major monosaccharides and Klason lignin in nonlignified cell walls and dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls before and after fermentation with human fecal microbiota for 8 and 24 h.

cell wall type	fermentation time [h]	monosaccharide concentration [mg/g] ^a					Klason lignin [mg/g] ^a
		glucose ^b	arabinose	xylose	galactose	uronic acids	
DHP-cell walls 1 (8.1 % G-lignin)	0	291 (237/53)	131	115	67	90	81
	8	258 (229/30)	116	105	59	75	82
	24	248 (229/18)	59	70	31	43	73
DHP-cell walls 2 (15.2 % G-lignin)	0	265 (217/48)	131	113	62	86	152
	8	251 (216/34)	96	89	54	71	150
	24	246 (219/27)	82	87	43	65	157
DHP-cell walls 3 (9.0 % G/S-lignin)	0	267 (214/53)	137	122	75	90	90
	8	238 (214/24)	103	97	57	77	90
	24	243 (229/15)	53	65	28	41	80
DHP-cell walls 4 (13.5 % G/S-lignin)	0	267 (216/51)	126	111	70	83	135
	8	233 (208/24)	98	90	57	77	117
	24	231 (213/17)	69	76	34	51	124
nonlignified control	0	294 (236/58)	143	126	72	92	4 [18]
	8	253 (234/20)	97	91	48	67	n.d. ^c
	24	237 (226/11)	30	40	18	18	n.d. ^c

^a Carbohydrate and Klason lignin concentrations in mg/g are referred to the original cell wall before fermentation.

^b total glucose; cellulosic/hemicellulosic glucose concentrations are shown in parentheses

^c n.d.: not determined

HAA adsorption to unfermented DHP-cell walls

In order to evaluate HAA adsorption under conditions mimicking the small intestine and the colon, adsorption studies with unfermented cell walls were performed at pH 6.5 and at pH 7.4, respectively. At pH 6.5, adsorption to DHP-cell walls ranged from 48 - 68 % (5.8 - 8.2 ng/mg) for PhIP (0 h, pH 6.5, Fig. 3.15a) and 46 - 74 % (5.6 - 8.9 ng/mg) for AaC (0 h, pH 6.5, Fig. 3.15b). HAA adsorption varied depending on the concentration of lignin formed in cell walls. In agreement with our previous study [6], the adsorption of both HAAs was enhanced by greater concentrations of lignin ($P < 0.05$). For example, AaC adsorption at pH 6.5 to cell walls containing G-lignin increased from 46 to 70 % as Klason lignin concentration increased from 8.1 to 15.2 %. The lignin composition had no considerable impact on HAA adsorption in this study. Both, G- and G/S-lignin containing DHP-cell walls had comparable adsorption properties. This is also in agreement with our previous study, which showed similar HAA adsorption rates for G- and G/S-lignin containing cell walls, whereas S-lignin containing cell walls adsorbed less PhIP and AaC [6]. Adsorption of both HAAs at pH 6.5 to

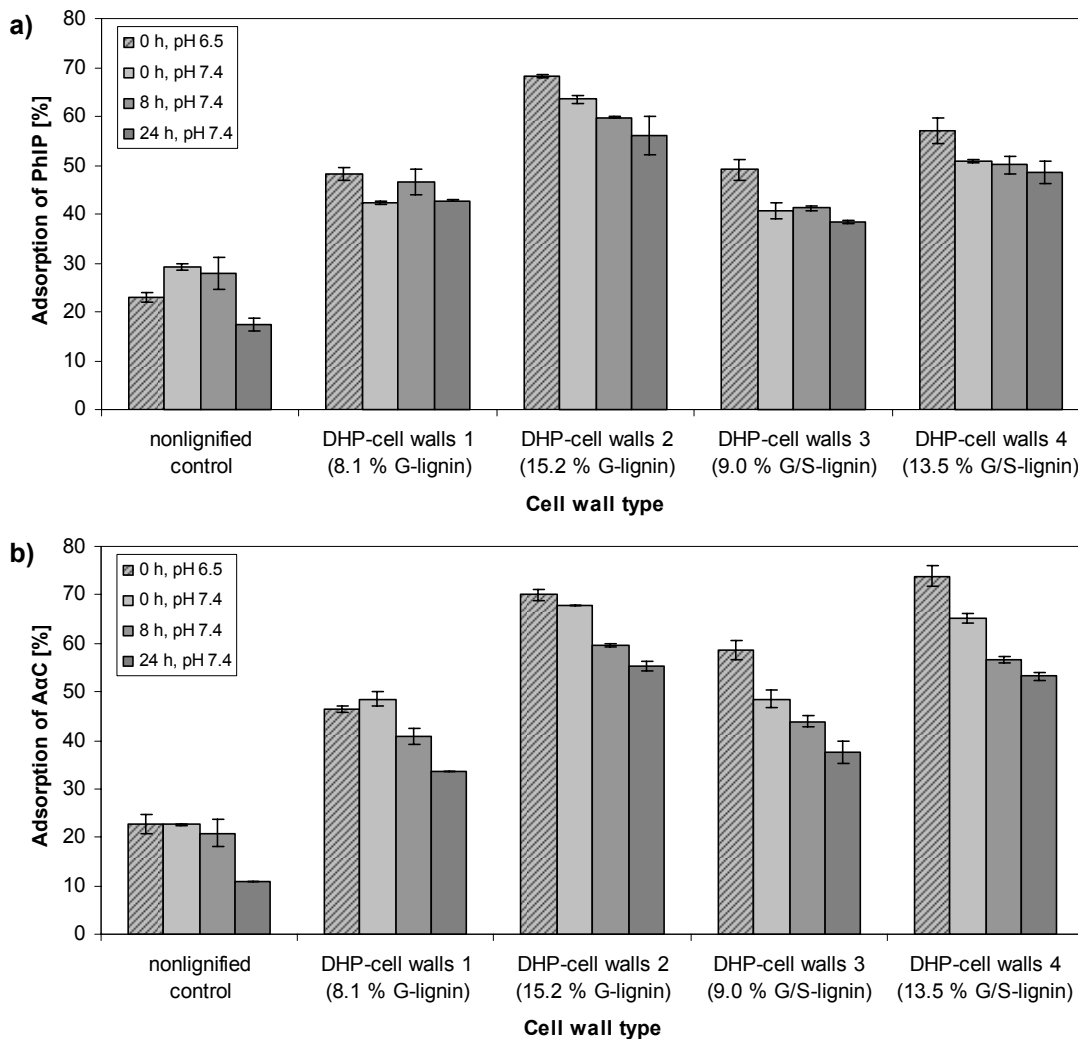


Figure 3.15: Adsorption of a) PhIP and b) AaC to cell walls with varying lignin concentrations and lignin compositions under conditions mimicking the small intestine (pH 6.5, 0 h of fermentation) or under conditions mimicking 0, 8, or 24 h of fermentation in the colon (pH 7.4). G = guaiacyl, G/S = guaiacyl/syringyl.

nonlignified control cell walls averaged only 23 %, further highlighting the importance of small amounts of lignin in enhancing PhIP and A α C adsorption.

Shifting the pH from 6.5 to 7.4 to mimic fiber passage through the colon in some cases depressed HAA adsorption to DHP-cell walls; adsorption ranged from 41 - 63 % (4.9 - 7.6 ng/mg) for PhIP (0 h, pH 7.4, Fig. 3.15a) and 49 - 68 % (5.8 - 8.1 ng/mg) for A α C (0 h, pH 7.4, Fig. 3.15b). Adsorption of PhIP to DHP-cell walls 1 - 3 was significantly lower at pH 7.4 than at pH 6.5 ($P < 0.05$). By contrast, A α C adsorption to DHP-cell walls containing G-lignins was unaffected by pH, whereas adsorption to G/S-lignins was significantly lower at pH 7.4 ($P < 0.05$). As observed at pH 6.5, adsorption of HAAs at pH 7.4 was lowest for nonlignified cell walls (PhIP 29 %, A α C 23 %) and each level of lignification enhanced HAA adsorption ($P < 0.05$). Overall, the data indicate that HAA adsorption to lignified fibers may be somewhat reduced due to pH shifts during passage from the small intestine into and through the colon. The degree of desorption, however, may vary depending on the type of HAA and the type of lignin in fiber.

Cell wall fermentation

DHP-cell walls were fermented in nylon bags for 8 and 24 h under conditions mimicking the human colon. Fecal samples were pooled from nine healthy volunteers to provide a representative spectrum of microbiota. Based on the work of Ryden and Robertson [8], the pore size of nylon bags used in our study (10 μ m) should be sufficient to permit access of microorganisms while minimizing the loss of unfermented cell walls. We found losses of cell walls due to sample handling, especially subsequent to fermentation, were only 6 %. These losses were considered in all calculations for determining the degradation of DHP-cell walls.

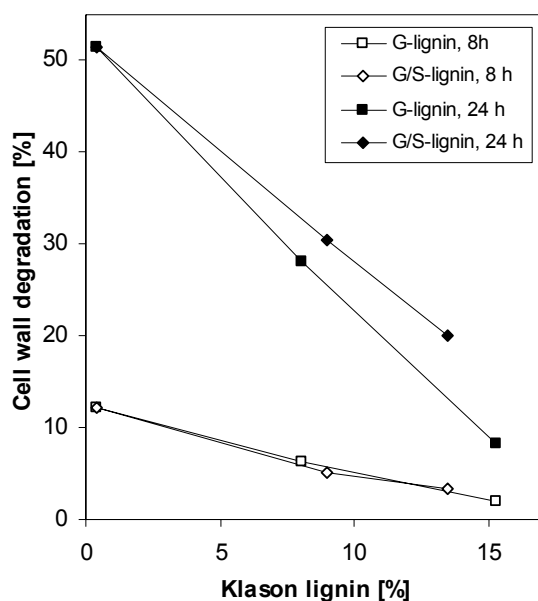


Figure 3.16: Influence of lignin concentration and composition on the degradation of cell walls fermented for 8 h or 24 h with human fecal microbiota. G = guaiacyl, G/S = guaiacyl/syringyl.

The degradation of nonlignified cell walls was 12 % after 8 h and 51 % after 24 h of fermentation. Artificial lignification reduced ($P < 0.05$) cell wall degradation after 24 h (Fig. 3.16). For example, increasing the G-lignin content from 0.4 % in nonlignified cell walls [18] to 15.2 % in DHP-cell walls reduced degradation from 12 % to 2 % after 8 h of fermentation and even from 51 % to 8 % after 24 h of fermentation. Lignin composition had no effects on cell wall degradation after 8 h, but after 24 h G/S-lignins were less inhibitory to fermentation than G-lignins ($P < 0.05$).

The artificial lignin within the DHP-cell walls was quite resistant against degradation. Klason lignin analysis of unfermented and fermented cell walls revealed that up to 10 % of lignins were lost from bags after

24 h of fermentation (Tab. 3.6). This loss may be ascribed to a loss of lignin particles from bags due to degradation of polysaccharides from the cell wall matrix. However, recent studies from Begum et al. [19] using a rat model indicated that lignins could be partially degraded to lignans by gut microbiota.

Monosaccharide analysis of cell wall residues recovered after fermentation indicated that pectins and hemicelluloses such as arabinoxylans and mixed-linked β -glucans were degraded during fermentation, whereas cellulose was not (Tab. 3.6). After 24 h of fermentation, carbohydrate degradation was influenced by both lignin concentration and composition. Increasing concentrations of G- or G/S-lignin decreased ($P < 0.05$) the release of xylose, arabinose, galactose, and uronic acids from cell walls, whereas the release of glucose was not affected (Fig. 3.17). At comparable lignin concentrations, however, the release of xylose, arabinose, galactose and uronic acids from cell walls were 3 to 68 % greater with G/S-lignins than with G-lignin (Fig. 3.17).

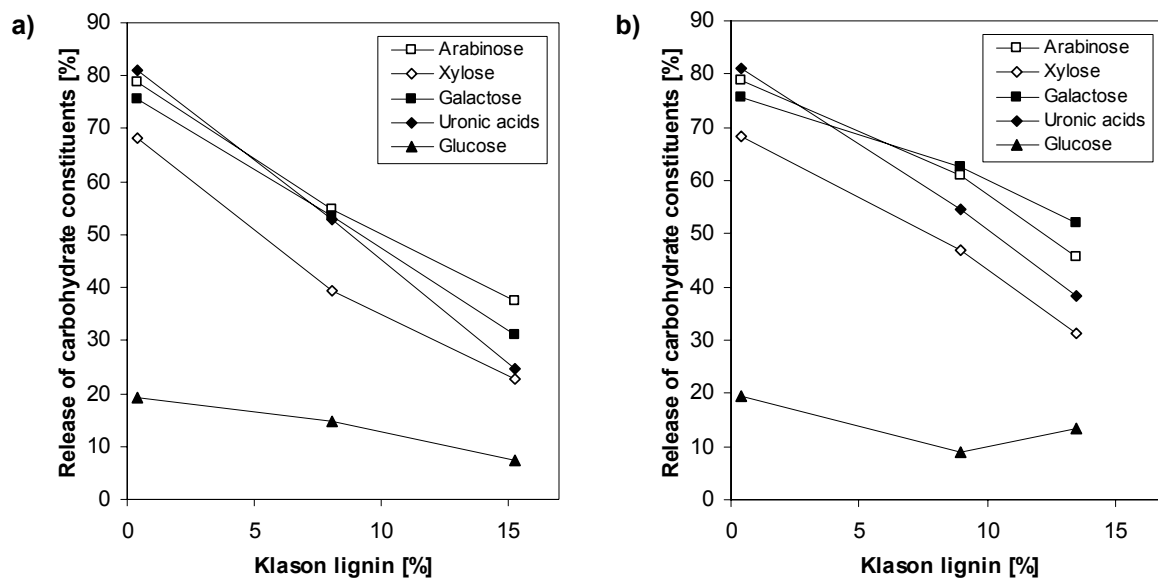


Figure 3.17: Influence of lignin concentration and composition on the loss of carbohydrate constituents from cell walls fermented 24 h with human fecal microbiota. Cell walls contained a) guaiacyl (G)-lignin or b) guaiacyl/syringyl (G/S)-lignin.

The results confirm a role of lignin in limiting cell wall degradation by human gut microbiota. Numerous studies have suggested a direct correlation between lignin concentration and ruminal fiber degradability [20]. However, the use of naturally lignified cell walls for this kind of study is problematic because such cell walls differ not only in lignin concentration and composition but other matrix constituents as well [21]. In our study, the use of various types of lignin in a uniform cell wall matrix permits a direct and unambiguous assessment of the role of lignin concentration and composition in controlling cell wall degradation by human fecal microbiota. Our results extend the findings of Grabber et al. [22] who showed that G- and G/S-lignins reduced the degradability of DHP-cell walls by fungal hydrolases. The inhibitory

influence of lignin on cell wall degradation is probably related to steric factors. Lignin-polysaccharide linkages may limit access of fibrolytic enzymes to polysaccharide substrates. The hydrophobicity of lignin and its coating of the cell wall matrix may also prevent penetration of hydrolytic enzymes and their access to structural polysaccharides [20,21]. In contrast to our results, Grabber et al. [22] did not observe an influence of lignin composition on the cell wall degradation. This may reflect differences in the hydrolytic activities of fungal enzymes compared to those of human fecal microbiota; one notable difference is the apparent lack of cellulase activity of human intestinal microbiota.

Influence of fermentation on HAA adsorption

The adsorption of HAAs to cell walls fermented for 0, 8, and 24 h by human fecal microbiota was examined at pH 7.4 to reveal how passage of lignified fiber through the colon may alter adsorption of carcinogens. In these studies, we compared the HAA adsorption to 15 mg of unfermented cell walls to undigested residues recovered from fermentation of an equal mass of cell walls. Compared to unfermented controls, adsorption of PhIP and AαC to nonlignified cell walls was not affected by 8 h of fermentation (8 h, pH 7.4, Fig. 3.15), but 24 h of fermentation reduced HAA adsorption by about one-half (from 29 to 17 % for PhIP and from 23 to 11 % for AαC) (24 h, pH 7.4, Fig. 3.15). Although 8 and 24 h of fermentation tended to decrease PhIP adsorption to DHP-cell walls 2 and 4, these changes were not statistically significant ($P > 0.05$). By contrast, adsorption of AαC to DHP-cell walls fermented up to 24 h was decreased ($P < 0.05$). Compared to AαC adsorption to unfermented DHP-cell walls, decrease comprised 10 - 16 % after 8 h and 18 - 31 % after 24 h of fermentation. As noted above, all of the cellulose and more than 90 % of the lignin were recovered following fermentation suggesting that changes in HAA adsorption were probably not due to unspecific losses of fermented cell-wall particles from bags.

Adsorption results of this study are generally based on the comparison of HAA adsorption to 15 mg of unfermented cell walls and to the fermented cell wall residues that stem from 15 mg of cell walls. Additionally, we here compared the HAA adsorption to equal amounts of unfermented and fermented cell walls. This calculated adsorption capacity for PhIP of 1 mg cell wall sample increased by maximum 2 ng/mg after 24 h of fermentation. The calculated cell wall adsorption capacity for AαC was not increased by fermentation, agreeing with the measured total decrease in AαC adsorption described above.

Unfermented DHP-cell walls adsorbed up to 2- and 3-fold more PhIP and AαC than nonlignified cell walls, highlighting lignin as the predominant factor influencing the adsorption of hydrophobic HAAs. However, our data also suggests other factors in addition to lignification have some influence on HAA adsorption. For example, HAAs may have different adsorption affinities to specific polysaccharides, which are degraded to varying degrees during fermentation. However, this would not explain the similar extensive reduction in adsorption for both PhIP and AαC to fermented nonlignified cell wall residues compared to the corresponding unfermented cell walls. In addition, it has to be considered that polysaccharides, structural proteins and lignins are not separated within the cell-wall but form a complex, highly organized composite. Therefore, it is not always possible to explain the physicochemical proper-

ties of the cell wall by regarding the separated polymers. The whole complex and structural changes within this complex caused by fermentation might be important for the adsorption of HAAs. HAA adsorption could also be affected by microbiota associated to fermented cell wall residues, but our extensive washing of cell wall residues with both acetone and water should minimize these effects.

Although fermentation and shifts in pH reduced HAA adsorption to lignified cell walls in some cases, adsorption of PhIP and A α C by fermented residues could still promote fecal excretion of HAA. To our knowledge, data concerning the absorption of free HAAs from the colon are not available. In addition, it is not known whether biotransformation of free HAAs in the gut has harmful consequences. Recent studies have shown that incubation with human fecal bacteria for 72 h transformed PhIP with efficiencies from 47 - 95 % to 7-hydroxy-5-methyl-3-phenyl-6,7,8,9-tetrahydropyrido[3',2':4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-5-ium chloride. However, data about the biological activity of this metabolite are not available yet [23]. Data about biotransformation of A α C in the human colon have not been published. It is also not known whether adsorption of HAAs to fiber could prevent HAA transformation by intestinal microbiota. Finally, we must concede that our examination of post-fermentative adsorption of HAAs may not fully reflect the process *in vivo* where HAAs are adsorbed in the small intestine prior to major cell wall fermentation in the colon.

Conclusions

Our studies demonstrated that lignification was the predominant factor enhancing the adsorption of PhIP and A α C and limiting fermentation of cell walls. Some hydrophobic HAAs, which are adsorbed to lignified dietary fiber in the small intestine, may be partly released during passage to and through the colon. Release of HAAs in the colon may occur in part from an increase in pH and, in case of A α C, partial degradation of fiber by gut microbiota. However, even if HAAs are partly released in the colon, fermentation residues of lignified cell walls still show a substantial capacity to adsorb hydrophobic HAAs. Future studies should examine the fate of free and fiber-adsorbed HAAs in the gut, such as microbial transformation or absorption, to further clarify the role of lignified fiber in preventing cancer.

Abbreviations

HAA: heterocyclic aromatic amine; PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine; A α C: 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole; G: guaiacyl; S: syringyl; DHP: dehydrogenation polymer.

Acknowledgements

We are grateful to Hoon Kim and Fachuang Lu for synthesizing monolignols and to the H. Wilhelm Schaumann Stiftung for funding Carola Funk's visit to the U.S. Dairy Forage Research Center in Madison, USA.

References

- [1] L.R. Ferguson, P.J. Harris. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer, *Mutation Res.* 350 (1996) 173-184.
- [2] M. Jägerstad, K.I. Skog, P. Arvidsson, A. Solyakov. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 207 (1998) 419-427.
- [3] L.R. Ferguson, P.J. Harris. Adsorption of carcinogens by dietary fiber, in: S.S. Cho and M.L. Dreher (Eds.), *Handbook of dietary fiber*, Marcel Dekker Inc., New York, 2001, pp. 207-218.
- [4] P.J. Harris, C.M. Triggs, A.M. Robertson, M.E. Watson, L.R. Ferguson. The adsorption of heterocyclic aromatic amines by model dietary fibres with contrasting compositions, *Chem. Biol. Interact.* 100 (1996) 13-25.
- [5] J. Ralph, K. Lundquist, G. Brunow, F. Lu, H. Kim, P.F. Schatz, J.M. Marita, R.D. Hatfield, S.A. Ralph, J.H. Christensen, W. Boerjan. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids, *Phytochem. Rev.* 3 (2004) 29-60.
- [6] C. Funk, P. Weber, J. Thilker, J.H. Grabber, H. Steinhart, M. Bunzel. Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1860-1867.
- [7] B.J.H. Stevens, R.R. Selvendran. Changes in composition and structure of wheat bran resulting from the action of human faecal bacteria, *Carbohydr. Res.* 183 (1988) 311-319.
- [8] P. Ryden, J.A. Robertson. The effect of fibre source and fermentation on the apparent binding properties of wheat bran preparations for the mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), *Carcinogenesis* 16 (1995) 209-216.
- [9] H. Kim, J. Ralph. Simplified preparation of coniferyl and sinapyl alcohol, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3693-3695.
- [10] J.H. Grabber, J. Ralph, R.D. Hatfield, S. Quideau, T. Kuster, A.N. Pell. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1453-1459.
- [11] R.D. Hatfield, H.-J.G. Jung, J. Ralph, D.R. Buxton, P.J. Weimer. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures, *J. Sci. Food Agric.* 65 (1994) 51-58.
- [12] H.N. Englyst, M.E. Quigley, J.H. Geoffrey. Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars, *Analyst* 119 (1994) 1497-1509.
- [13] A.B. Blakeney, P.J. Harris, R.J. Henry, B.A. Stone. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydr. Res.* 113 (1983) 291-299.

-
- [14] N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen. New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.* 54 (1973) 484-489.
- [15] M. Bunzel, A. Seiler, H. Steinhart. Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9553-9559.
- [16] M. Bunzel, J. Ralph, F. Lu, R.D. Hatfield, H. Steinhart. Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6496-6502.
- [17] M. Bunzel, J. Ralph. NMR Characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8352-8361.
- [18] J.H. Grabber, R.D. Hatfield, J. Ralph, J. Zon, N. Amrhein. Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions, *Phytochemistry* 40 (1995) 1077-1082.
- [19] A.N. Begum, C. Nicolle, I. Mila, C. Lapierre, K. Nagano, K. Fukushima, S.-M. Heinenon, H. Adlercreutz, C. Remesy, A. Scalbert. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats, *J. Nutr.* 134 (2004) 120-127.
- [20] H.G. Jung, D.A. Deetz. Cell wall lignification and degradability, in: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (Eds.), *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, 1993, pp. 315-346.
- [21] J.H. Grabber. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies, *Crop Sci.* 45 (2005) 820-831.
- [22] J.H. Grabber, J. Ralph, R.D. Hatfield, S. Quideau. *p*-Hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2530-2532.
- [23] L. Vanhaecke, N. van Hoof, W. van Brabant, B. Soenen, A. Heyerick, N. de Kimpe, D. de Keukeleire, W. Verstraete, T. van de Wiele. Metabolism of the food-associated carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human intestinal microbiota, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3454-3461.

3.5 Untersuchung eines möglichen Einflusses der Lignifizierung von Maiszellwänden auf die Adsorption von Gallensäuren

Die in diesem Kapitel dargestellte Arbeit beschreibt die Untersuchung der Adsorption von Gallensäuren an Pflanzenzellwände. Im Vordergrund steht hierbei der Einfluss des Ligningehaltes sowie der Ligninzusammensetzung auf die Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen. Praktische Arbeiten im Kooperationslabor in Madison wurden selber durchgeführt.

Cereal Chemistry, in press, 2007

Artificial lignification of maize cell walls does not affect *in vitro* bile acid adsorption

CAROLA FUNK ^a, JOHN H. GRABBER ^b, HANS STEINHART ^a, MIRKO BUNZEL ^{a,c,*}

Running title: Adsorption of bile acids by maize cell walls

^a Department of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

^b U.S. Dairy Forage Research Center, USDA-Agricultural Research Service, 1925 Linden Drive West, Madison, WI 53706, USA

^c Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, 1334 Eckles Avenue, St. Paul, MN 55108, USA

* Corresponding author.

Tel.: +1-612-624-1764

Fax: +1-612-625-5272

E-mail address: mbunzel@umn.edu

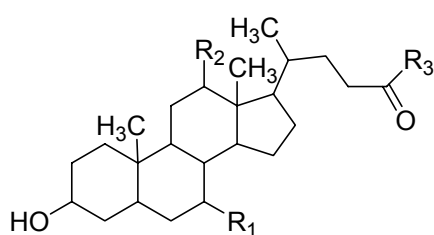
Abstract

Bile acid adsorption by lignified dietary fiber in the human intestine is proposed as a mechanism for lowering blood cholesterol level and reducing colon cancer risk. In this study, we investigated how the concentration and composition of lignin in fiber influences the *in vitro* adsorption of primary bile acids (glycocholate, taurocholate and glycochenodeoxycholate) and a secondary bile acid (deoxycholate). Adsorption studies were performed by incubating nonlignified and artificially lignified maize cell walls (dehydrogenation polymer-cell walls) with bile acids under conditions imitating the small intestine and distal colon. Artificially lignified cell walls had varying but defined lignin concentrations (4.8 - 19.0 %) and compositions (varying from pure guaiacyl to pure syringyl lignins), but a uniform polysaccharide-protein matrix. Adsorption of bile acids by cell walls varied from 6 - 31 % (4 - 26 nmol bile acids/mg

cell walls), with glycochenodeoxycholate showing the highest adsorption rates. Neither lignin concentration nor lignin composition influenced bile acid adsorption, thus disproving a major role of lignin in bile acid adsorption.

Introduction

Diets rich in dietary fibers are thought to provide a multitude of health benefits. For example, dietary fibers may adsorb carcinogens such as heterocyclic aromatic amines and transport them out of the body without being absorbed (Ferguson and Harris 1996). Adsorption of bile acids (Fig. 3.18) to dietary fibers is also widely discussed as a mechanism to prevent cholesterol related diseases (Kritchevsky 1996). Primary bile acids, mainly cholic acid (**67**, $R_3 = H$) and chenodeoxycholic acid (**69**, $R_3 = H$), are biosynthesized from cholesterol in the liver, conjugated with either glycine or taurine ($R_3 = NH-CH_2-COOH$ or $NH-CH_2-CH_2-SO_3H$) (Fig. 3.18), and secreted into the upper region of the small intestine, where they take part in the enterohepatic circulation (Hofmann 1999; Mukhopadhyay and Maitra 2004). Secondary bile acids, mainly deoxycholic acid (**70**) (Fig. 3.18), are produced by deconjugation and dehydroxylation of primary bile acids by bacteria located in the human ileum and colon. According to Rossi et al (Rossi et al 1987) cholate, chenodeoxycholate and deoxycholate conjugates comprise 37 %, 39 %, and 16 %, respectively, of the bile acids found in the human bile.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃
67	OH	OH	NH-CH ₂ -COOH
68	OH	OH	NH-CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ H
69	OH	H	NH-CH ₂ -COOH
70	H	OH	OH

Figure 3.18: Structures of glycocholic acid 67, taurocholic acid 68, glycochenodeoxycholic acid 69, and deoxycholic acid 70.

Their physiological functions include solubilization and transport of lipids, activation of bile acid-activated lipase, and cholesterol homeostasis (Mukhopadhyay and Maitra 2004). Primary bile acid adsorption by dietary fibers may increase bile acid excretion, thus stimulating additional bile acid synthesis and lowering blood cholesterol levels. In addition, adsorption of secondary bile acids may reduce their availability in the gut. Some secondary bile acids such as deoxycholate are implicated in promoting colon cancer growth and progression (Pai et al 2004). *In vivo* studies have shown that diets rich in cereal fibers increase fecal excretion of bile acids (Cummings et al 1976; Nagengast 1992). These observations are in agreement with *in vitro* adsorption studies showing that bile acids are adsorbed by dietary fibers, though to varying extents (Eastwood and Hamilton 1968; Górecka et al 2005; Huang and Dural 1995; Kahlon and Woodruff 2003; Kern et al 1978; Story and Kritchevsky 1976). Various adsorption studies positively correlate the extent of adsorption with bile acid hydrophobicity

(Eastwood and Hamilton 1968; Górecka et al 2002; Huang and Dural 1995). Statements about the adsorption abilities of individual dietary fiber constituents are contradictory. The main hydrophobic component of fiber, lignin (a complex macromolecules formed by oxidative radical coupling of mainly coniferyl and sinapyl alcohols, Fig. 3.19) has often been implicated as an effective adsorber of bile acids (Eastwood and Hamilton 1968; Gallaher and Schneeman 1986; Górecka et al 2002; Huang and Dural 1995; Sayar et al 2006; Story and Kritchevsky 1976). Other studies, however, question a predominant role of lignin in bile acid adsorption (Elhardallou 1992; Górecka et al 2005; Nixon et al 1986), and instead promote the importance of soluble, viscous dietary fiber compounds (Glore et al 1994) such as β -glucans (Braaten et al 1994; Wood 2001) or psyllium (Fulgoni 2001) for blood cholesterol reduction. Since the adsorption of bile acids is now regarded as a complex process, depending not only on the cell wall constituents but also on the cell wall structure (Drzikova et al 2005), *in vitro* studies should go beyond work with isolated cell wall components to include whole cell walls with precisely defined matrix characteristics.

The aim of this study was to clearly delineate whether lignin in a cell wall matrix influences the adsorption of glycocholate, taurocholate, glycochenodeoxycholate, and deoxycholate under conditions mimicking the small intestine and distal colon. Our *in vitro* adsorption studies were performed with artificially lignified maize cell walls, so called dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls, having defined lignin concentration and composition characteristics and a uniform protein-polysaccharide matrix.

Materials and methods

General

Coniferyl alcohol and sinapyl alcohol were synthesized as described previously (Kim and Ralph 2005). Sodium glycocholate hydrate, sodium taurocholate and sodium glycochenodeoxycholate were from Sigma (St. Louis, MO). Deoxycholic acid was from Merck (Darmstadt, Germany). The enzymatic kit used for deoxycholate quantification (Procedure No. 450) was from Trinity Biotech Plc (Bray, Ireland).

Synthesis of DHP-cell walls

DHP-cell walls were prepared according to Grabber et al (Grabber et al 1996) as previously described by Funk et al (2006) (Fig. 3.20a). In brief, cells from maize suspension cultures (*Zea mays* L. 'Black Mexican') were ruptured by a Parr nitrogen bomb. Cell wall fragments were washed and resuspended in homopiperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) buffer (pH 5.5). Diferulate formation within the cell walls by wall-bound peroxidase was stimulated (Funk

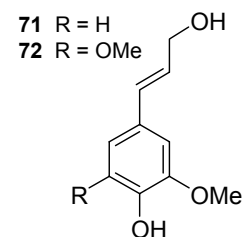


Figure 3.19: Structures of coniferyl alcohol 71 and sinapyl alcohol 72, the primary monolignols polymerized into lignin.

et al 2006; Funk et al 2007a) by adding an aqueous H_2O_2 solution (0.2 mmol of H_2O_2 /gram dry weight of cell walls) over a 60 - 90 min period, followed by 30 min of additional stirring. DHP-cell wall complexes were formed by drop-wise addition of separate solutions of monolignols (0.3 - 1.0 mmol of monolignol/gram dry weight of cell walls) and aqueous H_2O_2 (0.5 - 1.5 mmol of H_2O_2 /gram dry weight of cell walls) over a 5 - 26 hr period. Monolignol solutions consisted of coniferyl alcohol (**71**), sinapyl alcohol (**72**) (Fig. 3.19) or mixtures of both monolignols dissolved in water/acetone (80/20 or 95/5, v/v). In some cases, DHP-cell walls were formed using H_2O_2 generated from glucose oxidase and glucose in place of aqueous H_2O_2 (Grabber et al 1996). An aliquot of cell walls stirred without monolignol additions served as nonlignified control. After monolignol additions were completed, cell wall suspensions were stirred for an additional 24 hr. Cell walls were then collected on glass microfiber filters (3.1 μm retention) and washed thoroughly with water followed by acetone. After air-drying, cell walls were oven-dried at 55 - 60°C prior to analysis. The lignin concentration of DHP-cell walls was determined using a modified Klason lignin method (Hatfield et al 1994).

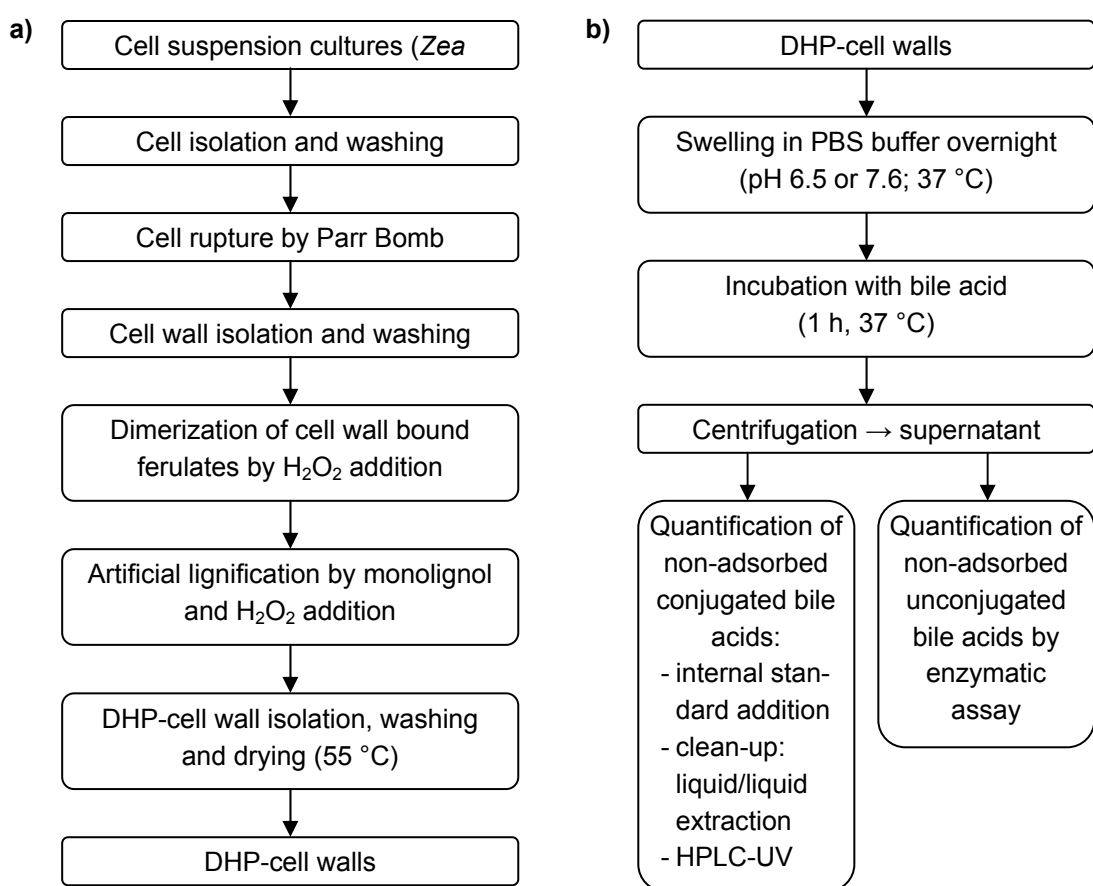


Figure 3.20: Scheme for a) preparation of dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls from cell suspension cultures of *Zea mays* and b) determination of bile acid adsorption to DHP-cell walls.

Incubation of DHP-cell walls with bile acids

Adsorption studies with bile acids were generally performed in triplicate using a modification of a previously published method (Funk et al 2006) (Fig. 3.20b). Cell walls (15 mg) were swollen overnight in 0.7 mL of phosphate-buffered saline (PBS, 67 mM sodium phosphate buffer, containing 13 mM sodium chloride) in conical glass centrifuge tubes. Experiments with individual conjugated bile acids (glycocholate, taurocholate, or glycochenodeoxycholate) were performed at pH 6.5 to simulate conditions in the small intestine, whereas deoxycholate was incubated at pH 7.6 to simulate conditions in the colon. After adding 0.6 mg of a conjugated bile acid in 0.5 mL of PBS (pH 6.5) or 0.6 mg of deoxycholic acid in 0.5 mL of PBS (pH 7.6)/MeOH (85/15, v/v), respectively, cell wall suspensions were incubated on a rotating mixer (35 rpm) at 37°C for 1 hr and then centrifuged (2000 x g). Supernatants (20 µL) from adsorption studies with deoxycholate were directly used for enzymatic analysis as described below. Supernatants (300 µL) from adsorption studies with conjugated bile acids were mixed with 100 µL of internal standard solution (1.2 mg/mL PBS (pH 6.5)). Glycochenodeoxycholate was used as an internal standard for glycocholate and taurocholate while glycocholate was used as an internal standard for glycochenodeoxycholate. Supernatants were then extracted four times with 400 µL diethyl ether to remove minor impurities. Bile acids were quantitatively recovered following diethyl ether extraction. Organic phases were discarded and the aqueous phase was directly used for HPLC analysis as described below.

Quantification of non-adsorbed bile acids

Adsorption of bile acids to DHP-cell wall samples was determined indirectly by quantifying non-adsorbed bile acids in the supernatants recovered after incubation. Non-adsorbed glycocholate, taurocholate and glycochenodeoxycholate were quantified by Reversed Phase-HPLC with ultraviolet (UV)-detection (D-6000A interface, L-6200 intelligent pump, L-4250 UV-vis detector, Merck, Darmstadt, Germany; autosampler ISS-101, Perkin Elmer, Überlingen, Germany; column oven, Knauer, Berlin, Germany) using a Nucleosil 100-5 C 18 HD column (250 x 4 mm i.d., 5 µm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The injection volume was 20 µL, the column temperature was 45°C, and the flow rate was maintained at 1 mL/min. Elution was performed by using a binary gradient system consisting of KH₂PO₄ buffer (5 mM, pH 5.3)/acetonitrile (80/20, v/v) (A) and KH₂PO₄ buffer/acetonitrile (20/80, v/v) (B). The gradient was initially A 100 %, held isocratically for 5 min, linear over 5 min to A 67 % and B 33 %, held isocratically for 5 min, followed by an equilibration step. UV-detection was carried out at 205 nm.

Since UV-detection of unconjugated bile acids shows lack of sensitivity, we analyzed deoxycholate enzymatically using Trinity Biotech Bile Acids reagents (Procedure No. 450). In brief, deoxycholate was oxidized to 3-oxo-deoxycholate by NAD and 3-hydroxysteroid dehydrogenases. The NADH generated by the reaction was used to reduce nitro blue tetrazolium salt to formazan in the presence of diaphorase. The absorbance of formazan was measured at 530 nm (Lamda 2 UV/VIS Spectrophotometer, Perkin-Elmer, Überlingen, Germany). External calibration was performed using deoxycholate, prepared at 0.1 to 0.5 mg/mL.

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using the paired t-test at the 0.05 level of significance.

Results and discussion

Cell wall characteristics

Primary cell walls from maize cell suspensions are typical of grasses, consisting of glucose (294 mg/g), arabinose (143 mg/g), xylose (126 mg/g), uronic acids (92 mg/g), galactose (72 mg/g), mannose (< 10 mg/g) and rhamnose (< 4 mg/g) (Funk et al 2007b). Most of the glucose (about 80 %) is derived from cellulose while other carbohydrates are derived mainly from arabinoxylans and pectins and from small amounts of mixed-linked β -glucans and xyloglucans. The balance the cell wall consists mainly of small amounts of protein (30 mg/g) (Grabber et al 2003), ferulate esters (16 mg/g) (Funk et al 2007a) and guaiacyl-type lignin (4 mg/g) (Grabber et al 1995).

Wall-bound peroxidases were used to form DHPs from added monolignols and hydrogen peroxide. As previously shown by Grabber et al (Grabber et al 1996), the distribution and structure of artificial lignins in DHP-cell wall complexes is similar to naturally formed lignin in grass cell walls.

The DHP-cell walls prepared for our bile adsorption studies varied in both lignin content and composition (Tab. 3.7). Klason lignin concentrations in DHP-cell walls ranged from 4.8 to 19.0 %. From analyzing Klason lignin contents of the nonlignified cell walls (Grabber et al 1995; Grabber et al 1996) it is deduced that other cell wall components than lignins only slightly, if at all, contribute to the measured Klason lignin levels of our cell walls. Although we cannot fully exclude that acid insoluble complexes formed from lignins and other cell wall components may partly result in an overestimation of the Klason lignin contents of the synthesized DHP-cell walls, a major contribution of non-lignin components to the Klason lignin contents seems not likely in the system used. Low lignin levels were chosen to mimic lignin or lignin-like polymer concentrations detected in insoluble dietary fibers of cereals (e.g. rye bran 4.5 %, maize bran and wheat whole grain 5.7 % (Bunzel et al 2004) and of some vegetables such as kohlrabi (3.8 %) or asparagus (5.6 %) (Bunzel et al 2005). Medium lignin concentrations were recently reported for insoluble fibers of kiwi (8.3 %) and rhubarb (9.0 %). Some types of fiber such as insoluble pear fiber have even higher lignin concentrations (23.5 %) (Bunzel et al 2005). Monolignols used for the formation of the DHP-cell walls were coniferyl alcohol, sinapyl alcohol or a mixture of both monolignols. Coniferyl and sinapyl alcohols, forming guaiacyl- and syringyl-units, respectively, are the predominant monolignols in lignins or lignin-like polymers from cereals, fruits and vegetables (Bunzel et al 2004; Bunzel et al 2005; Bunzel and Ralph 2006). DHP-cell walls containing pure guaiacyl- or syringyl-lignins were prepared to represent plant lignins with extremely high or low guaiacyl/syringyl-ratios, such as carrot, kiwi, and rhubarb insoluble fiber lignin (Bunzel et al 2005). Monolignol mixtures containing coniferyl and sinapyl alcohol in the ratios 1:2 and 2:1 were chosen to mimic guaiacyl/syringyl-ratios typically found in cereal insoluble fibers such as rye and maize bran (Bunzel et al 2004).

Table 3.7: Precursors and Klason lignin concentrations of dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls prepared for bile acid adsorption studies.

cell wall type	precursors for DHP-cell wall complexes	Klason lignin [%]
DHP-cell walls 1	coniferyl alcohol	7.56
		13.86 ^a
		13.90
		19.02 ^b
DHP-cell walls 2	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol 2:1	7.51
		10.95
		13.92
DHP-cell walls 3	coniferyl alcohol + sinapyl alcohol 1:2	6.88
		9.62
		12.42
DHP-cell walls 4	sinapyl alcohol	4.80
		6.76
		9.48
nonlignified control	none	~ 0.4 (Grabber et al., 1995)

^a Cell walls were only used for adsorption studies with glycocholic acid, taurocholic acid, and glycochenodeoxycholic acid.

^b Cell walls were only used for adsorption studies with deoxycholic acid.

Adsorption of bile acids to cell walls

We evaluated the adsorption properties of glycocholate (**67**), taurocholate (**68**), glycochenodeoxycholate (**69**), and deoxycholate (**70**) (Fig. 3.18) to various kinds of artificially lignified maize cell walls. In addition to representing the major forms in the human body (Rossi et al 1987), these bile acids allowed us to assess how differing degrees of conjugation (e.g. glycocholate vs. taurocholate) and hydroxylation (e.g. glycocholate vs. glycochenodeoxycholate) influence adsorption. While cholate and chenodeoxycholate conjugates represent primary bile acids, deoxycholate was chosen as a secondary bile acid which is relevant in its unconjugated form in the human colon. Bile acid concentrations used in our study (0.9 - 1.2 mM) represent concentrations at the lower range suggested for the human intestine (1 - 12 mM total bile acids) (Huang and Dural 1995; Huang and Hosney 1999). Extensive swelling limited the quantity of DHP-cell walls used in incubations, resulting in a bile acid/cell wall ratio of 40 µg/mg (70 - 100 nmol/mg). Adsorption studies were done with continuous agitation in PBS at 37°C to mimic conditions in the small intestine for the primary bile acids (pH 6.5) and the distal colon for deoxycholate (pH 7.6).

As shown in Figure 3.21, all bile acids were adsorbed to all types of DHP-cell walls. Adsorption rates did not exceed 31 % (12 mg bile acid/g of cell walls or 26 µmol/g, respectively), which is intermediate compared to previous studies with other sources of dietary fiber. Previously reported bile acid adsorption to cereal products varied between 5 and 54 µmol bile acid/g (Kahlon and Woodruff 2003; Drzikova et al 2005; Górecka et al 2005; Sayar et al 2006). In addition, several adsorption studies performed with vegetable dietary fiber showed

varying adsorption rates from 0 - 46 μmol bile acids/g sample (Chen et al 1982; Hoagland and Pfeffer 1987; Kern et al 1978; Pickardt et al 2004). Górecka et al even detected adsorption rates of up to 200 μmol deoxycholate/g of baked carrot (Górecka et al 2002). However, the use of widely differing experimental conditions hampers comparisons among adsorption studies. For example, bile acid adsorption is known to be influenced by parameters such as sample preparation, dietary fiber particle size, bile acid concentration and pH in addition to fiber source (Huang and Dural 1995; Kern et al 1978; Pickardt et al 2004).

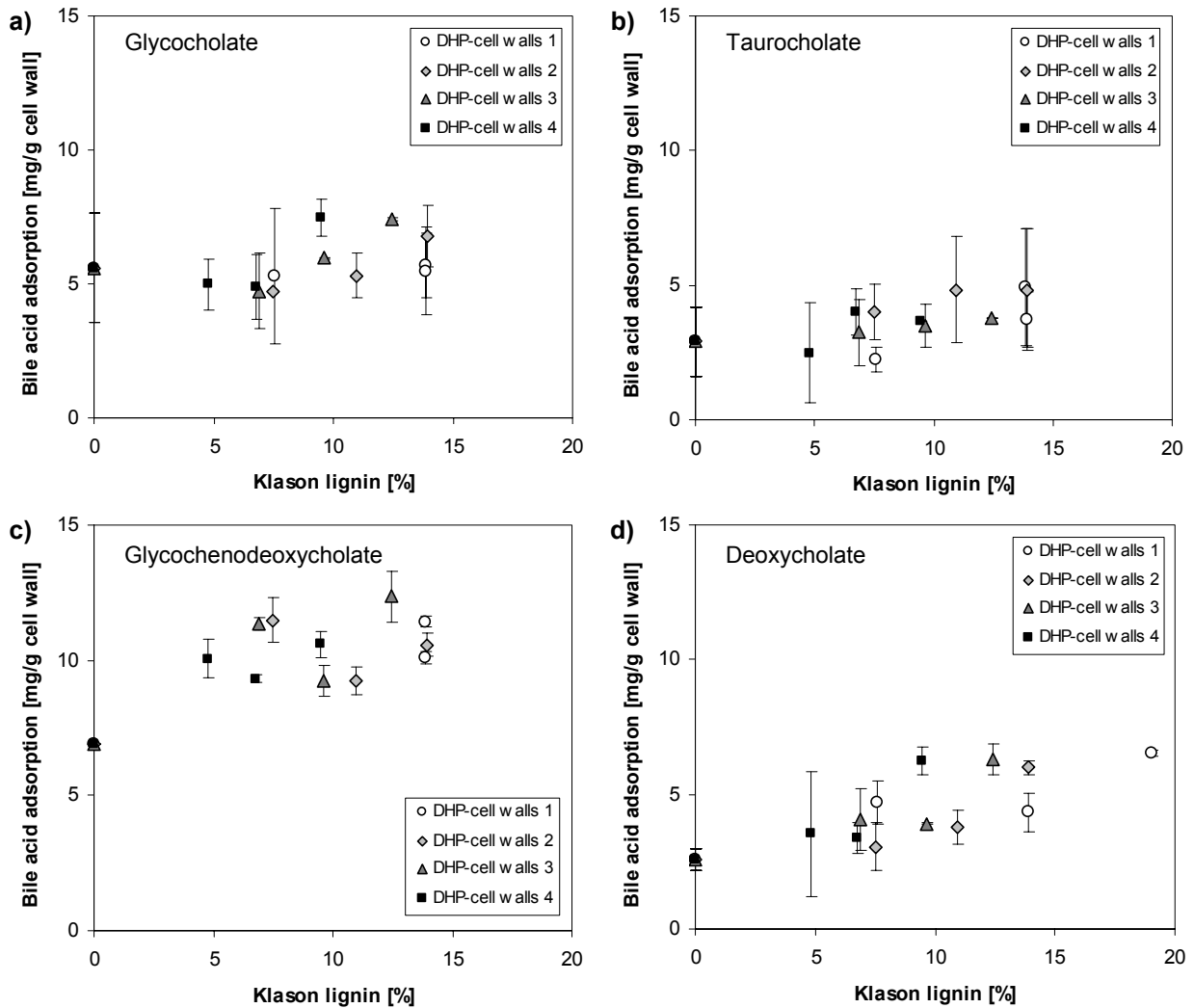


Figure 3.21: Adsorption of a) glycocholate, b) taurocholate, c) glycochenodeoxycholate, and d) deoxycholate to dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls with varying Klason lignin concentrations and lignin compositions (Tab. 3.7). Bars represent standard deviations.

In our studies, adsorption rates of bile acids to cell walls were greatest for glycochenodeoxycholate with 17 - 31 % (6.9 - 12 mg bile acid/g of cell walls) (Fig. 3.21c), intermediate for glycocholate with 12 - 19 % (4.7 - 7.4 mg/g) (Fig. 3.21a), and lowest for deoxycholate with 6 - 16 % (2.6 - 6.6 mg/g, at different pH of 7.6) (Fig. 3.21d) and taurocholate with 6 - 12 % (2.2 - 4.9 mg/g) (Fig. 3.21b). As indicated in Figure 3.21, standard deviations for bile acid adsorp-

tion varied from 0.004 - 2.5 mg/g. In agreement with previous studies (Camire and Dougherty 2003; Eastwood and Hamilton 1968; Kern et al 1978; Story and Kritchevsky 1976), our results indicate that glycine conjugates of bile acids are better adsorbed than taurine conjugates ($P < 0.05$). Furthermore, fewer hydroxyl groups facilitated bile acid adsorption ($P < 0.05$), as was noted by Drzikova et al (2005) who found that glycochenodeoxycholate was better adsorbed than glycocholate to dietary fiber rich extrudates from oats. Similar negative correlations between hydroxylation and adsorption were previously shown for unconjugated bile acids (Carpita 1990; Chen et al 1982; Kern et al 1978; Kritchevsky 1996), although a few studies also detected contrary adsorption properties (Camire and Dougherty 2003; Górecka et al 2005).

Influence of lignin on bile acid adsorption

As shown in Figure 3.21, neither lignin concentration nor lignin composition had consistent effects on bile acid adsorption to DHP-cell walls. Differences in bile acid adsorption observed for different cell walls with varying lignin concentration and composition were fairly small and did not reflect any obvious tendency. For example, adsorption rates of glycocholate and taurocholate only covered an adsorption range of less than 3 mg/g. Even if the nonlignified control cell walls showed the lowest adsorption rates in case of glycochenodeoxycholate and deoxycholate, enhancing the lignin concentrations did not lead to steadily increasing adsorption rates (Fig. 3.21c,d). Since the application of descriptive statistics does not show any impact of lignin on the adsorption of bile acids, further statistical tests were not performed. Overall, our results do not support a major role of lignin in bile acid adsorption. Others have also questioned the role of lignin in bile acid adsorption (Elhardallou 1992; Górecka et al 2005; Nixon et al 1986). Although they are amphipathic molecules, the adsorption of bile acids to fiber has been attributed to hydrophobic interactions, in particular with lignin (Eastwood and Hamilton 1968; Górecka et al 2002; Huang and Dural 1995). However, this mechanism has not been unambiguously proven and our results highlight the need to reassess the role of hydrophobic interactions in controlling bile acid adsorption. For example, Sayar et al (2006) found that synergistic interactions between β -glucans and Klason lignin influence bile acid adsorption. Acid-insoluble Klason residues, however, contain not only lignin but other constituents such as suberin, cutin, waxes, structural protein and protein-tannin complexes. Recent NMR studies showed that "lignins" were hard to isolate from wheat (Bunzel and Ralph 2006) and rye (Bunzel et al, unpublished results) and that the isolated extracts showed different compositions than lignins usually found in highly lignified tissues. Therefore it is possible that previously detected correlations between bile acid adsorption and Klason lignin are due to non-lignin components in fiber that are analyzed as Klason lignin but that are not necessarily structurally related to lignins according to their definition.

Conclusions

Our experimental design enabled us to unambiguously test how bile acid adsorption was influenced by various kinds of lignin integrated into a cell wall matrix. Although rates of ad-

sorption were comparable to other studies, our results demonstrated that neither lignin concentration nor lignin composition affects bile acid adsorption to fiber. Finally, future studies should consider how cell-wall constituents associated with or acting synergistically (Sayar et al 2006) with lignin might influence bile acid adsorption.

Acknowledgements

We are grateful to Juliane Peters for experimental support and to Hoon Kim and Fachuang Lu for synthesizing the monolignols used for preparing DHP-cell wall complexes. We thank the H. Wilhelm Schaumann Stiftung for funding Carola Funk's visit to the US Dairy Forage Research Center in Madison, USA.

Literature cited

- Braaten, J. T., Wood, P. J., Scott, F. W., Wolynetz, M. S., Lowe, M. K., Bradleywhite, P., and Collins, M. W. 1994. Oat β -glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. of Clin. Nutr.* 48:465-474.
- Bunzel, M., Ralph, J., Lu, F., Hatfield, R. D., and Steinhart, H. 2004. Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 52:6496-6502.
- Bunzel, M., Seiler, A., and Steinhart, H. 2005. Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 53:9553-9559.
- Bunzel, M., and Ralph, J. 2006. NMR Characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 54:8352-8361.
- Camire, M. E., and Dougherty, M. P. 2003. Raisin dietary fiber composition and *in vitro* bile acid binding. *J. Agric. Food Chem.* 51:834-837.
- Carpita, N. C. 1990. The chemical structure of the cell walls of higher plants. Pages 15-30 in: *Dietary fiber: Chemistry, physiology and health effects*. D. Kritchevsky, C. Bonfield, and J. W. Anderson, eds. Plenum Press: New York.
- Chen, M. L., Chang, S. C., and Guoo, J. Y. 1982. Fiber contents of some chinese vegetables and their *in vitro* binding capacity of bile acids. *Nutr. Rep. Int.* 26:1053-1059.
- Cummings, J. H., Hill, M. J., Jenkins, D. J. A., Pearson, J. R., and Wiggins, H. S. 1976. Changes in fecal composition and colonic function due to cereal fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 29:1468-1473.
- Drzikova, B., Dongowski, G., Gebhardt, E., and Habel, A. 2005. The composition of dietary fibre-rich extrudates from oat affects bile acid binding and fermentation *in vitro*. *Food Chem.* 90:181-192.
- Eastwood, M. A., and Hamilton, D. 1968. Studies on the adsorption of bile salts to non-absorbed components of diet. *Biochim. Biophys. Acta* 152:165-173.

- Elhardallou, S. B. 1992. The bile acids binding of the fibre-rich fractions of three starchy legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* 42:207-218.
- Ferguson, L. R., and Harris, P. J. 1996. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* 350:173-184.
- Fulgoni, V. L. 2001. Effects of psyllium on serum cholesterol levels. Pages 221-225 in: *Advanced Dietary Fibre Technology*. B. V. McCleary and L. Prosky, eds. Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK.
- Funk, C., Weber, P., Thilker, J., Grabber, J. H., Steinhart, H., and Bunzel, M. 2006. Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines. *J. Agric. Food Chem.* 54:1860-1867.
- Funk, C., Braune, A., Grabber, J. H., Steinhart, H., and Bunzel, M. 2007a. Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 55:2418-2423.
- Funk, C., Braune, A., Grabber, J. H., Steinhart, H., and Bunzel, M. 2007b. Model studies of lignified fiber fermentation by human fecal microbiota and its impact on heterocyclic aromatic amine adsorption. *Mutat. Res.* 624: 41-48.
- Gallaher, D., and Schneeman, B. O. 1986. Intestinal interaction of bile acids, phospholipids, dietary fibers, and cholestyramine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 250:420-426.
- Glore, S. R., Vantreeck, D., Knehans, A. W., and Guild, M. 1994. Soluble fiber and serum-lipids - a literature-review. *J. Am. Diet Assoc.* 94:425-436.
- Górecka, D., Korczak, J., Balcerowski, E., and Decyk, K. 2002. Sorption of bile acids and cholesterol by dietary fiber of carrots, cabbage and apples. *Electr. J. Pol. Agric. Univ. Food Sci. Technol.* 5. Published online at <http://www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/food/art-02.html>.
- Górecka, D., Korczak, J., Konieczny, P., Hes, M., and Flaczyk, E. 2005. Adsorption of bile acids by cereal products. *Cereal Foods World* 50:176-178.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D., Ralph, J., Zon, J., and Amrhein, N. 1995. Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions. *Phytochemistry* 40:1077-1082.
- Grabber, J. H., Ralph, J., Hatfield, R. D., Quideau, S., Kuster, T., and Pell, A. N. 1996. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *J. Agric. Food Chem.* 44:1453-1459.
- Grabber, J. H., Hatfield, R. D., and Ralph, J. 2003. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *J. Agric. Food Chem.* 51:4984-4989.
- Hatfield, R. D., Jung, H.-J. G., Ralph, J., Buxton, D. R., and Weimer, P. J. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* 65:51-58.

- Hoagland, P. D., and Pfeffer, P. E. 1987. Cobinding of bile acids to carrot fiber. *J. Agric. Food Chem.* 35:316-319.
- Hofmann, A. F. 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol. Sci.* 14:24-29.
- Huang, C.-M., and Dural, N. H. 1995. Adsorption of bile acids on cereal type food fibers. *J. Food Proc. Eng* 18:243-266.
- Huang, W. N., and Hosney, R. C. 1999. Isolation and identification of a wheat flour compound causing sticky dough. *Cereal Chem.* 76:276-281.
- Kahlon, T. S., and Woodruff, C. L. 2003. *In vitro* binding of bile acids by rice bran, oat bran, barley and β -glucan enriched barley. *Cereal Chem.* 80:260-263.
- Kern, F., Jr., Birkner, H. J., and Ostrower, V. S. 1978. Binding of bile acids by dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 31:175-179.
- Kim, H., and Ralph, J. 2005. Simplified preparation of coniferyl and sinapyl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 53:3693-3695.
- Kritchevsky, D. 1996. *In vitro* binding of bile acids and other lipids by dietary fiber. *Agr. Food Ind. Hi Tec.* 7:27-29.
- Mukhopadhyay, S., and Maitra, U. 2004. Chemistry and biology of bile acids. *Curr. Sci.* 87:1666-1683.
- Nagengast, F. M. 1992. Dietary fiber and bile acid metabolism. Pages 217-231 in: *Dietary fibre - a component of food*. T. F. Schweizer and C. A. Edwards, eds. Springer: London.
- Nixon, A., Mason, A. N., and Bilton, R. F. 1986. The binding of bile acids by *in vitro* enzymically digested vegetable fibre. *Biochem. Soc. Trans.* 14:369-370.
- Pai, R., Tarnawski, A. S., and Tran, T. 2004. Deoxycholic acid activates β -catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* 15:2156-2163.
- Pickardt, C., Dongowski, G., and Kunzek, H. 2004. The influence of mechanical and enzymatic disintegration of carrots on the structure and properties of cell wall materials. *Eur. Food Res. Technol.* 219:229-239.
- Rossi, S. S., Converse, J. L., and Hofmann, A. F. 1987. High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids. *J. Lipid Res.* 28:589-595.
- Sayar, S., Jannink, J.-L., and White, P. J. 2006. *In vitro* bile acid binding activity within flour fractions from oat lines with typical and high β -glucan amounts. *J. Agric. Food Chem.* 54:5142-5148.
- Story, J. A., and Kritchevsky, D. 1976. Comparison of the binding of various bile acids and bile salts *in vitro* by several types of fiber. *J. Nutr.* 106:1292-1294.

Wood, P. J. 2001. Cereal β -glucans: Structure, properties and health claims. Pages 315-327 in: Advanced Dietary Fibre Technology. B. V. McCleary and L. Prosky, eds. Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK.

4 ZUSAMMENFASSEND E DISKUSSION

4.1 Ferulasäure und ihre oligomeren Verbindungen

4.1.1 Strukturanalyse oligomerer Ferulasäureverbindungen

Die Eigenschaft von Ferulasäure, unter oxidativen Bedingungen dimere Verbindungen zu bilden, wurde bereits 1971 durch Geissman & Neukom (1) gezeigt und fünf Jahre später durch die Isolierung der ersten 5-5-gekoppelten Diferulasäure aus Weizenkeimen bestätigt (3). Eine systematische Aufklärung weiterer Diferulasäure-Verbindungen erfolgte anschließend durch Ralph et al. und Bunzel et al. (4, 5). Als Cross-Links verbinden Diferulasäuren Polysaccharidketten untereinander sowie Polysaccharidketten mit Ligninen und, nach neuesten Studien zu urteilen, auch mit Proteinen (2, 6, 7). Sie beeinflussen so maßgeblich die Zellwandstruktur. Infolgedessen werden für Ferulasäure-Cross-Links zahlreiche Eigenschaften diskutiert, die u. a. sowohl die Pflanzenphysiologie, die Lebensmittelchemie als auch die Lebensmitteltechnologie betreffen (8-14).

Die Existenz höherer Ferulasäureoligomere als Diferulasäuren war lange Zeit umstritten. Anhand von *in vitro*-Studien wurde 2001 gezeigt, dass freie Ferulasäure durch Peroxidase katalysierte Oxidation neben 8-8- und 8-5-gekoppelten Diferulasäuren ebenfalls mindestens zwei trimere Verbindungen bildet (Abb. 2.6) (15). Da die Konzentration dieser Trimere mit zunehmender Behandlung mit Wasserstoffperoxid/Peroxidase abnahm, wurde vermutet, dass sowohl Diferulasäuren als auch Triferulasäuren Zwischenprodukte sind, die zu höheren Oligomeren umgesetzt werden können. Die Bildung von Triferulasäuren *in vivo* erschien jedoch aus sterischen Gründen unwahrscheinlich, da drei Ferulasäure-Einheiten trotz ihrer Bindung an - wie damals angenommen - wenig flexible Polysaccharidketten in direkter Nähe aufeinander treffen müssten, um miteinander reagieren zu können. Inzwischen wird jedoch davon ausgegangen, dass Arabinoxylane flexiblere Strukturen als zuvor erwartet aufweisen (16-18). Des Weiteren ist denkbar, dass vor allem Ferulasäure-Einheiten an den Enden von Polysaccharidketten in die Ausbildung von Ferulasäureoligomeren involviert sind, da diese beweglicher sind. Fry et al. (19) erhielten durch radioaktive Markierung von Ferulasäure-Vorläufern erste Hinweise auf die Existenz von polysaccharidgebundenen Triferulasäuren und höheren Oligomeren in Mais-Suspensionskulturen, konnten diese jedoch nicht näher charakterisieren.

Der tatsächliche Beweis für die Bildung von Triferulasäuren in Pflanzen *in vivo* wurde schließlich 2003 durch die erstmalige Isolierung und Charakterisierung der 5-5-,8-O-4-Triferulasäure aus Maiskleie erzielt (20, 21). Hieraus resultierte die Frage, ob die entdeckte Triferulasäure wirklich in der Lage ist, drei verschiedene Polysaccharidketten als Cross-Link miteinander zu verknüpfen. Eine entscheidende Rolle schien hierbei die 5-5-Kopplung der Triferulasäure zu spielen. Hatfield & Ralph (22) zeigten mit Hilfe von „Molecular Modelling“ Studien, die jedoch anhand von relativ starren, kurzen Xylanabschnitten durchgeführt wurden, dass die 5-5-Diferulasäure die einzige Diferulasäure ist, die durch intramolekulare Kopplung entstehen kann, d.h. durch Kopplung zweier Ferulasäure-Einheiten an der gleichen Polysaccharidkette. Voraussetzung für eine intramolekulare Kopplung ist, dass die bei-

den Ferulasäure-Einheiten so positioniert sind, dass zwischen den Xylose-Einheiten, an die sie über Arabinose gebunden sind, genau zwei weitere Xylose-Einheiten liegen (22). Demnach könnte die 5-5,8-O-4-Triferulasäure entstehen, indem zunächst intramolekular eine 5-5-Diferulasäure gebildet wird, die sich anschließend über eine 8-O-4-Kopplung mit einer an einer anderen Polysaccharidkette befindlichen Ferulasäure verbindet (Abb. 4.1a). Für die 5-5,8-O-4-Triferulasäure ist folglich eine Verknüpfung zweier Polysaccharidketten ebenso denkbar wie die Verknüpfung dreier Ketten. Angenommen, die Triferulasäure verbindet nur zwei Polysaccharidketten, stellt sich im Umkehrschluss die Frage, ob eine 5-5-Kopplung Voraussetzung für die Bildung einer Triferulasäure ist.

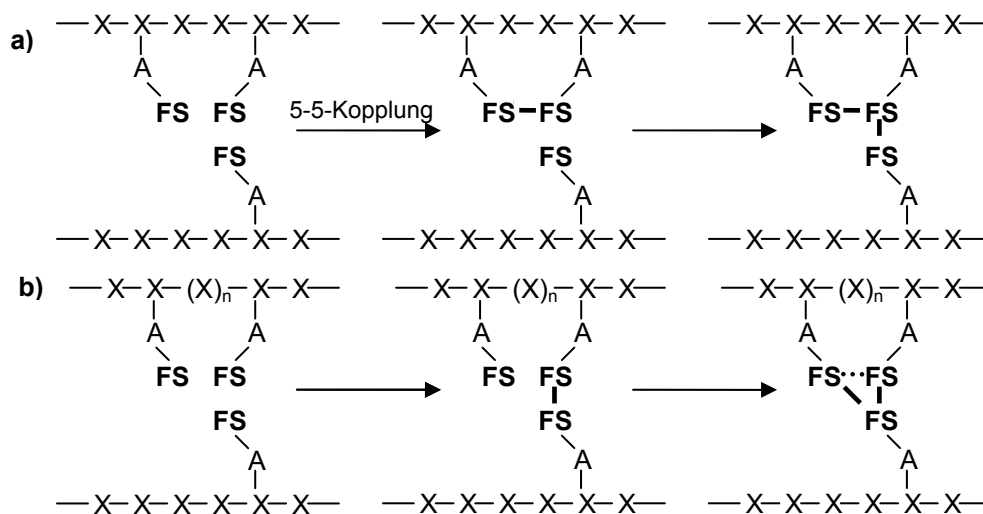


Abbildung 4.1: Mögliche Bildungsmechanismen Arabinoxyylan-gebundener Triferulasäuren ($X = \text{Xylose}$, $A = \text{Arabinose}$, $FS = \text{Ferulasäure}$) unter Einbeziehung zweier Polysaccharidstränge. a) Kopplung zweier Ferulasäure-Einheiten zu einer 5-5-Diferulasäure, dann Bildung eines Cross-Links mit einer dritten Ferulasäure-Einheit; b) Zwei Ferulasäure-Einheiten koppeln zu einer Diferulasäure (Cross-Link), an die dann eine weitere Ferulasäure-Einheit koppelt („back-crossing“) (2).

Dass dies nicht der Fall ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Charakterisierung zweier weiterer Triferulasäuren gezeigt werden, die beide keine 5-5-Kopplung aufweisen: die 8-O-4,8-O-4-Triferulasäure und die 8-8(zyklische Form),8-O-4-Triferulasäure (Kap. 3.1). Die Triferulasäuren wurden mit Hilfe von Sephadex LH-20 Chromatographie und semipräparativer HPLC aus Maiskleie isoliert und anhand ihrer UV-Spektren, sowie MS- und 1D/2D-NMR-Daten identifiziert. Jedoch erlaubt auch die Identifizierung dieser Substanz keine Aussagen darüber, ob die Triferulasäure-Cross-Links zwei oder drei Polysaccharidketten miteinander verbinden. Zwar fällt die Möglichkeit der intramolekularen Kopplung einer 5-5-Diferulasäure-Einheit weg, doch ist ebenso ein so genanntes „back-crossing“ möglich, eine Kopplungsmöglichkeit, die nicht durch genannte Molecular Modelling Experimente erfasst wurde. Back-crossing beschreibt die Möglichkeit, dass zunächst zwei Ferulasäure-Einheiten, die an zwei verschiedene Polysaccharidketten gebunden sind, zu einer Diferulasäure reagieren. Eine

weitere Ferulasäure-Einheit an einer der beiden Ketten könnte nun mit der bereits vorhandenen Diferulasäure-Einheit koppeln und so eine Triferulasäure bilden (Abb. 4.1b). Des Weiteren ist nach den bereits beschriebenen neueren Informationen über die Konformation von Arabinoxylanen fraglich, ob die 5-5-gekoppelte Diferulasäure wirklich die einzige Diferulasäure ist, die intramolekular gebildet werden kann. Liegen Arabinoxylane tatsächlich auch spiralförmig oder gefaltet vor (17), ist es wahrscheinlich, dass auch andere Diferulasäuren intramolekulare Cross-Links ausbilden können.

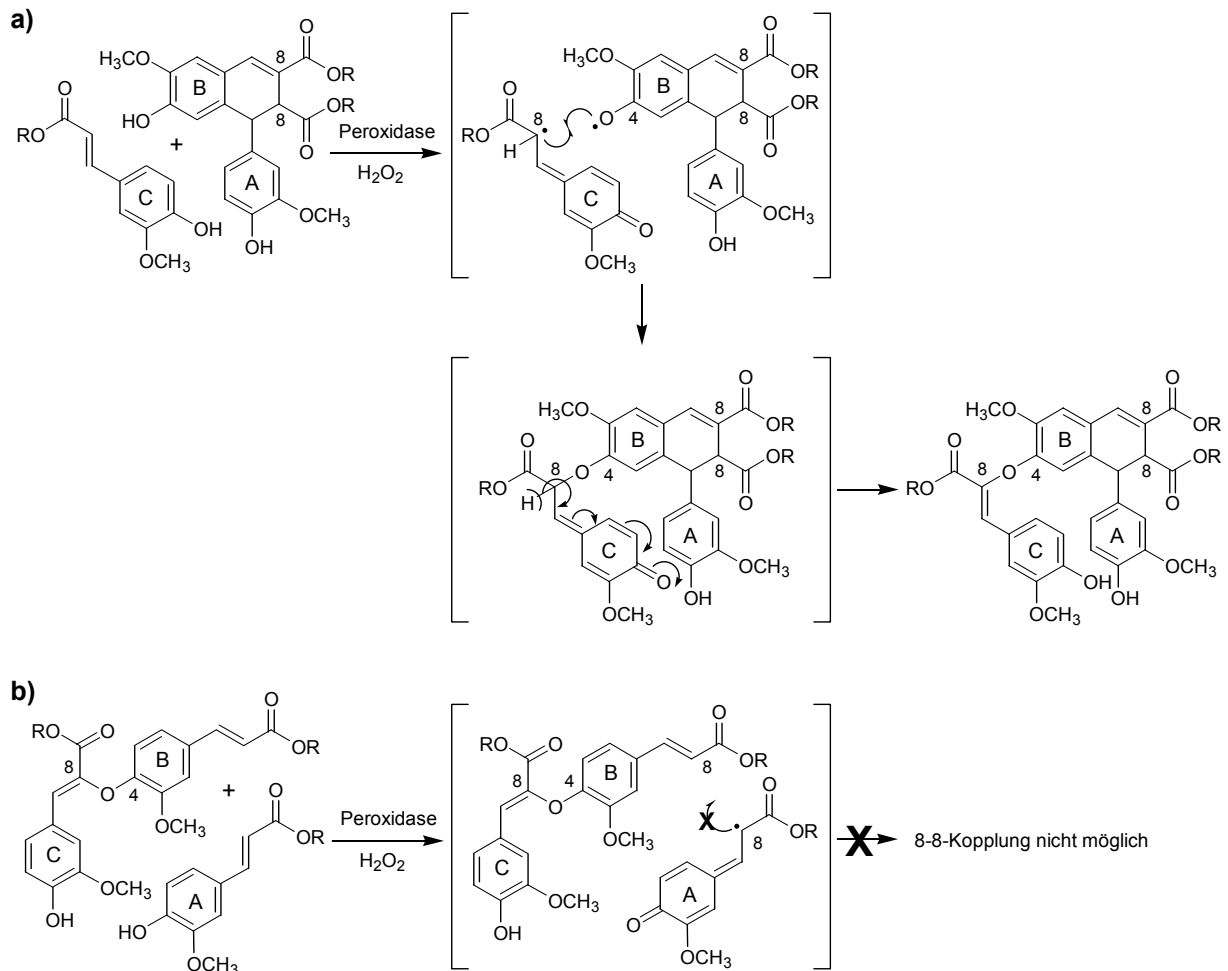


Abbildung 4.2: a) Theoretisch hergeleiteter Bildungsmechanismus der 8-8(zyklische Form)/8-O-4-Triferulasäure durch Kopplung einer 8-8(zyklische Form)-Diferulasäure mit einer weiteren Ferulasäure-Einheit. b) Die Bildung der 8-8(zyklische Form)/8-O-4-Triferulasäure durch Kopplung einer 8-O-4-Diferulasäure mit einer weiteren Ferulasäure-Einheit ist nicht möglich, da in C8-Position der 8-O-4-Diferulasäure keine Radikalbildung möglich ist.

Während also bislang ungeklärt ist, ob Ferulasäureoligomere tatsächlich als intermolekulare Cross-Links fungieren können und wenn ja, wie viele Polysaccharidstränge über Di- bzw. Trimere der Ferulasäure miteinander verknüpft werden können, kann aufgrund mechanistischer Überlegungen für einige Triferulasäuren hergeleitet werden, in welcher Abfolge die Bindungen ausgebildet werden. So kann für die in dieser Arbeit präsentierte 8-8(zyklische

Form),8-O-4-Triferulasäure angenommen werden, dass zunächst eine 8-8(zyklische Form)-Diferulasäure gebildet wird. In einem zweiten Schritt folgt dann die Kopplung einer weiteren Ferulasäure-Einheit über eine der beiden phenolischen Hydroxylgruppen, in diesem Fall an die Ferulasäure-Einheit B (Abb. 4.2a). Eine umgekehrte Reihenfolge ist nicht möglich (Abb. 4.2b). Die Bildung einer 8-8-Kopplung setzt die Radikalbildung an C8-Position voraus. Dies bedingt aufgrund der hierfür benötigten Elektronen-Delokalisierung bzw. Radikalbildung im ersten Schritt freie phenolische Hydroxylgruppen bei beiden Kopplungspartnern (Abb. 2.4), was bei der 8-O-4-Diferulasäure für die Ferulasäure-Einheit B jedoch nicht gegeben ist.

Sowohl die 5-5,8-O-4-Triferulasäure als auch die beiden neu charakterisierten 8-8(zyklische Form),8-O-4- und 8-O-4,8-O-4-Triferulasäuren konnten in den in dieser Arbeit verwendeten Maiszellwänden (*Zea mays* L. cv. Black Mexican) nach Vortrennung an Sephadex LH-20 Material mittels HPLC-DAD nachgewiesen werden (Kap. 3.2). Aufgrund ihrer geringen Gehalte war eine sichere Quantifizierung jedoch nicht möglich.

Die Isolierung der 8-O-4,8-O-4-Triferulasäure und der 8-8(zyklische Form),8-O-4-Triferulasäure zeigt, dass die Bildung von Triferulasäuren nicht auf wenige Kopplungsarten wie die 5-5-Kopplung begrenzt ist. Neben den in diesem Kapitel bereits diskutierten 8-8-, 8-O-4- und 5-5-Kopplungen ist ebenso eine Triferulasäure mit einer 8-5-Kopplung denkbar, wohingegen die 4-O-5-Kopplung vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt. Aufgrund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Kopplungen ist die Bildung einer Vielzahl verschiedener Triferulasäuren bzw. ihrer Regioisomere möglich. Unter Vernachlässigung der 4-O-5-Bindung ist z. B. die Bildung von mindestens 19 verschiedenen Triferulasäuren möglich (2). In der Tat wurden kürzlich vier weitere Triferulasäuren aus Maiskleie isoliert: die 8-5(offene Form),5-5-Triferulasäure, 8-8(THF-Form),5-5-Triferulasäure, 8-O-4,8-5(offene Form)-Triferulasäure sowie eine 5-5,8-O-4(H₂O)-Triferulasäure (Abb. 2.7) (23, 24). Hierbei ist zu bedenken, dass 8-5-Kopplungen in der Pflanze sehr wahrscheinlich in ihrer zyklischen Form vorliegen. Die Bildung der nicht zyklischen 8-5-Bindung erfolgt erst während der alkalischen Hydrolyse des Isolierungsprozesses. Bemerkenswert ist auch der Nachweis der 8-8(THF-Form),5-5-Triferulasäure. Zum einen ist sie die einzige bislang isolierte Triferulasäure, die keine 8-O-4-Bindung enthält. Zum anderen wurde die 8-8(THF-Form)-Bindung als möglicher Kopplungstyp für Ferulasäureester erst vor kurzem entdeckt (25). Ihre Einbindung in Triferulasäuren bestätigt ihre Bedeutung für die pflanzliche Zellwand.

Das Bild der Ferulasäureoligomere als strukturgebende, Polysaccharid-verknüpfende Verbindungen wird durch die kürzlich erfolgte, erstmalige Isolierung zweier Dehydrotetraferulasäuren aus Maiskleie erneut komplexer. Beide in Abbildung 2.8 dargestellten Tetramere enthalten die in Maiskleie unter den Ferulasäuretrimeren dominierende 5-5,8-O-4-Triferulasäure als Strukturelement. Jedoch können aufgrund dieser neu charakterisierten Strukturen weder Aussagen über die Anzahl der gekoppelten Polysaccharidstränge noch über die genauen Bildungsmechanismen (z. B. Kopplung einer Ferulasäure-Einheit an ein Triferulasäurederivat oder Kopplung zweier Diferulasäurederivate) gemacht werden (24).

4.1.2 Einfluss von Ferulasäure und Diferulasäure-Cross-Links auf die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Amininen an Ballaststoffe

Die Adsorption von HAA an Ballaststoffe wird als direkter Mechanismus zur Reduzierung des Krebsrisikos diskutiert (26). Wie in Kapitel 2.3.3 erläutert, soll die Adsorption an die Ballaststoffe eine Absorption der HAA im Dünndarm vermeiden. Hierdurch würden die HAA eine metabolische Aktivierung in der Leber umgehen und stattdessen, an die Ballaststoffe adsorbiert, aus dem Körper heraustransportiert werden. Sowohl in früheren Studien als auch in dieser Arbeit wurde die Adsorption von HAA *in vitro* untersucht. *In vitro*-Modellstudien können niemals vollständig *in vivo*-Situationen widerspiegeln. Dennoch sind sie ein wertvolles Werkzeug, um erste Einsichten in die äußerst komplexen Mechanismen und Wechselwirkungen im menschlichen Körper zu bekommen. Allein anhand von *in vivo*-Studien wäre die Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht möglich, da die Vorabinformationen aus *in vitro*-Studien unerlässlich sind, um die deutlich aufwendigeren und aufgrund ethischer Vorbehalte auf ein Minimum zu reduzierenden *in vivo*-Studien gezielt zu planen. Des Weiteren können in *in vitro*-Studien einzelne Reaktionsabfolgen gezielt untersucht werden, eine Möglichkeit, die für *in vivo*-Experimente häufig nur schwer realisierbar ist. So konnte anhand von *in vitro*-Adsorptionsstudien in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass die Adsorption von HAA an Ballaststoffe in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren variiert. Zum einen scheint die Hydrophobizität der untersuchten HAA eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Adsorption von HAA nimmt mit deren Hydrophobizität zu, was zu der Annahme führte, dass die Adsorption auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht (27, 28). Zum anderen konnten für Ballaststoffe aus verschiedenen Quellen stark variierende Adsorptionseigenschaften festgestellt werden. Eigene Studien mit den HAA MeIQx, IQ, PhIP und AxC zeigten z. B., dass vor allem aus Kiwi gewonnene unlösliche Ballaststoffe hohe Adsorptionseigenschaften (58 bis ca. 93 % HAA) aufweisen. Ebenso wurden die vier untersuchten HAA effektiv von unlöslichen Ballaststoffen aus Rhabarber und Birne adsorbiert (43 bis ca. 74 % HAA). Aus Karotte, Kohlrabi und Grünkohl isolierte Ballaststoffe adsorbierten hingegen PhIP und AxC in moderaten Mengen (20 bis 66 %), wohingegen IQ und MeIQx nur in sehr geringen Mengen adsorbiert wurden (3 bis 12 %) (unveröffentlichte Daten). Harris et al. (28) versuchten die Adsorption an verschiedene Modellballaststoffe mit deren Zusammensetzung zu korrelieren. Sie erzielten die höchsten Adsorptionsraten von MeIQx, IQ, MeIQ, PhIP, Trp-P-2 und Trp-P-1 für Kork-Zellwände (74 - 92 % HAA), die sie als suberin- und wachshaltige Modellballaststoffe charakterisierten. Im Durchschnitt mittlere Adsorptionsraten wurden für ligninhaltige Modellballaststoffe von Weizenstroh und Kohlstengeln erreicht, die jedoch je nach HAA stark variierten (18 - 97 %). Die geringsten Adsorptionseigenschaften wiesen Parenchymzellen von Kartoffeln auf (6 - 28 %), die überwiegend aus Pektinen und neutralen, auch als Pektinseitenketten vorliegenden, Polysacchariden wie Arabinanen, Galactanen und Arabinogalactanen zusammengesetzt sind. Diese Studien machen den großen Einfluss der Zellwandzusammensetzung auf die Adsorption von HAA deutlich. Auf die besondere Rolle von hydrophoben Zellwandkomponenten wie Suberin und Lignin wird später eingegangen (Kap. 4.2.1). An dieser Stelle werden zunächst die Adsorptionseigenschaften der lignin- bzw. suberinfreien Zellwandmatrix diskutiert. Wie die Studien von Harris bzw. Ferguson et al. (27, 28)

sowie eigene Studien (Kapitel 3.3) zeigten, besitzt die hauptsächlich aus Polysacchariden bestehende Zellwandmatrix an sich die Fähigkeit, HAA zu adsorbieren.

Ferulasäure und Diferulasäuren/Triferulasäuren verändern, wie in Kapitel 4.1.1 erläutert, die physikochemischen Eigenschaften der pflanzlichen Zellwand und könnten ebenso die Adsorption von HAA beeinflussen. Zum einen können sich Wechselwirkungen zwischen den Ferulasäure-Einheiten und den HAA ausbilden, z. B. π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Einheiten. Zum anderen wäre es denkbar, dass eine intensive Verknüpfung der Polysaccharide durch Diferulasäure- bzw. Triferulasäure-Cross-Links hydrophobere Bereiche schafft, die wiederum eine Adsorption der HAA begünstigen. Die Adsorption von HAA wurde im Rahmen dieser Arbeit an einem Zellwand-Modellsystem untersucht, das auf isolierten Maiszellwänden beruhte, die strukturell mit primären, nicht differenzierten Zellwänden vergleichbar sind (29). Ein entscheidender Vorteil dieses Modellsystems ist, dass einzelne Parameter gezielt variiert werden können, während die restliche Polyaccharid-Protein-Zellwandmatrix praktisch unverändert bleibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden z. B. der Gesamtferulasäuregehalt von 15 mg/g Zellwand, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, durch Zugabe von AIP während des Zellwachstums um 57 bzw. 84 % reduziert. Die Bildung von Diferulasäure-Cross-Links (4 mg/g Zellwand) wurde durch Inkubation der isolierten Zellwände mit Wasserstoffperoxid um 30 % gesteigert. Die Maiszellwände wiesen eine komplexe, aber definierte Zellwandmatrix auf. Dies ist für die Simulierung natürlicher Bedingungen entscheidend, denn es hat sich gezeigt, dass sich isolierte Zellwandkomponenten anders verhalten als wenn sie in der Zellwandmatrix eingelagert vorliegen. Viele bisherige Ferulasäure-Studien basierten auf der Verwendung nicht zellwandassoziiertes, freier Ferulasäure oder ihrer Derivate (z. B. Ethylester), die die realen Bedingungen der pflanzlichen Zellwand nicht widerspiegeln. Andere Studien waren zwar durch den Einsatz aus Pflanzen isolierter Xylane, die polysaccharidgebundene Ferulasäure enthielten, realitätsnaher, jedoch weisen auch isolierte Xylane nicht die Eigenschaften auf, die sie in einer intakten Zellwand zeigen würden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zellwand-Modellsystem lagen Ferulasäure und ihre Oligomere hingegen zellwandgebunden vor. Das verwendete Zellwand-Modell ermöglichte daher die gezielte Untersuchung der Effekte einzelner Zellwandparameter, während die Zellwandmatrix den *in planta* vorliegenden Zellwänden ähnlich war.

Die HAA-Adsorptionsstudien dieser Arbeit wurden *in vitro* durchgeführt. Eine direkte Übertragbarkeit absoluter Adsorptionsraten auf den Menschen war hierbei nicht von primärer Bedeutung und kann realistischere durch *in vitro*-Studien auch nicht erreicht werden. Die Zielsetzung dieser Arbeit, gezielt den Einfluss ausgewählter Zellwandkomponenten auf die Adsorption von HAA zu untersuchen, wäre jedoch anhand von *in vivo*-Studien nur schwer realisierbar gewesen. Das Nachvollziehen einer HAA-Adsorption in z. B. Tierversuchen ist äußerst komplex, da HAAs nach Aufnahme im Körper eine vielfältige Metabolisierung durchlaufen, die zudem je nach Spezies variieren kann (30, 31). Wollte man die nicht adsorbierten HAA im Urin oder in den Fäzes umfassend quantifizieren, müsste die Analytik sämtliche mögliche Metabolite erfassen, die jedoch teilweise noch gar nicht bekannt sind. Vor allem bezüglich einer Metabolisierung im Kolon liegen kaum Studien vor (32), sodass hier noch viel

Klärungsbedarf besteht. Im Körper verbleibende HAA, z. B. in Form von DNA-Addukten, wären nur schwer erfassbar. Die Quantifizierung der an Ballaststoffe adsorbierten HAA selbst erscheint wiederum aufgrund der vielfältigen Zusammensetzung der Fäzes in Kombination mit HAA-Mengen im Spurenbereich und zusätzlich ausgeschiedenen nicht adsorbierten HAA-Metaboliten schwierig und unpräzise, zumal bislang unklar ist, ob und in welcher Weise auch adsorbierte HAA durch Darmmikroorganismen metabolisiert werden.

Die durchgeführten *in vitro*-Adsorptionsstudien simulierten den Dünn- bzw. Dickdarm des Menschen lediglich in stark vereinfachter Form. Neben der Temperatur (37 °C), dem pH-Wert (6,5 bzw. 7,4), vorliegenden Salzen (Phosphat gepufferte Salzlösung) und einer kontinuierlich rotierenden, taumelnden Bewegung (35 rpm) wurde vor allem auf ein realistisches Verhältnis zwischen HAA und Zellwänden Wert gelegt. Ausgehend von einer Aufnahme von 7 µg HAA (aus 200 g Fleisch) zusammen mit 4 g Ballaststoffen (aus 200 g Mais) wäre ein HAA/Ballaststoff-Verhältnis von ca. 2 ng/mg vorstellbar (33, 34). In den Adsorptionsstudien wurden 180 ng HAA zu 15 mg Zellwänden gegeben, was einem Verhältnis von 12 ng/mg entspricht. Das gewählte Verhältnis ist zwar leicht erhöht, liegt aber dennoch in der Größenordnung der natürlichen Gegebenheiten. Die HAA-Konzentration konnte aufgrund des Erreichens der Bestimmungsgrenze nicht weiter herabgesetzt und die Menge an Zellwänden aufgrund deren starken Quellung nicht erhöht werden, sodass ein kleineres HAA/Zellwand-Verhältnis nicht realisierbar war.

Die in Kapitel 3.3 präsentierten Ergebnisse der Adsorptionsstudien bestätigten die oben erläuterte Abhängigkeit der Adsorption von der Hydrophobizität der HAA. Die Adsorption stieg in der Reihenfolge MeIQx < IQ < PhIP < AαC von durchschnittlich 11 % auf 35 % an. Hingegen waren weder für den Gesamtferulasäuregehalt noch für den Grad der Diferulasäure-Bildung Abhängigkeiten zur Adsorption auszumachen. Ferulasäure und die Verknüpfung von Polysacchariden durch Diferulasäure-Cross-Links spielen entsprechend für die Adsorption von HAA keine Rolle. Dies gilt zumindest für die in den Modellzellwänden vorliegenden Ferulasäure- bzw. Diferulasäuregehalte, die z. B. denen in unlöslichen Ballaststoffen von Roggen und Reis ähnelten, jedoch um das 2.5 - 3.5fache kleiner waren als die in unlöslichen Ballaststoffen von Maiskleie vorliegenden Gehalte (35, 36). Ein Einfluss höherer Gehalte an zellwandgebundener Ferulasäure bzw. Diferulasäuren auf die Adsorption von HAA kann aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, zumal höhere Konzentrationen die Ausbildung hydrophober Bereiche erleichtern sollten. Die Simulation von höheren Ferulasäure- bzw. Diferulasäuregehalten, wie sie z. B. in unlöslichen Ballaststoffen von Maiskleie vorliegen, ist jedoch bislang anhand des in dieser Arbeit verwendeten Zellwand-Modellsystems nicht möglich, da bei der Züchtung der Zellwandsuspensionen bisher nur eine Hemmung der Ferulasäuresynthese mit AIP, nicht jedoch eine Stimulierung der Synthese erzielt werden konnte.

Da die untersuchten nicht lignifizierten Maiszellwände dennoch eine nicht zu vernachlässigende Adsorption bewirkten, stellte sich die Frage, welche Zellwandpolysaccharide die Adsorption der HAA verursachen. In früheren Studien waren nur die Adsorptionseigenschaften von Cellulose als unlöslicher Modellballaststoff bestimmt worden, nicht jedoch im Vergleich mit anderen Polysacchariden (27, 37). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun analog zu den

oben beschriebenen Studien die Adsorption von IQ an verschiedene charakteristische Zellwandpolysaccharide bestimmt. Teilweise lösliche Polysaccharide wurden vor einer Quantifizierung des nicht adsorbierten IQs mittels HPLC durch Ultrafiltration (Polyethersulfon, Molekulargewicht-Cut-off 10 kDa) abgetrennt.

Xyloglucan wies mit 39 % die am stärksten ausgeprägten Adsorptionseigenschaften auf (Abb. 4.4). Im Vergleich hierzu lagen die Adsorptionsraten von IQ an Xylan und β -Glucan im mittleren Bereich (27 %), während Cellulose nur eine geringe Affinität zu dem HAA aufwies (12 %). An Pektin aus Zitrusfrüchten wurde IQ nicht adsorbiert. Diese Daten zeigen beispielhaft den Einfluss verschiedener Polysaccharide auf die Adsorption von HAA, wobei die unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften einzelner

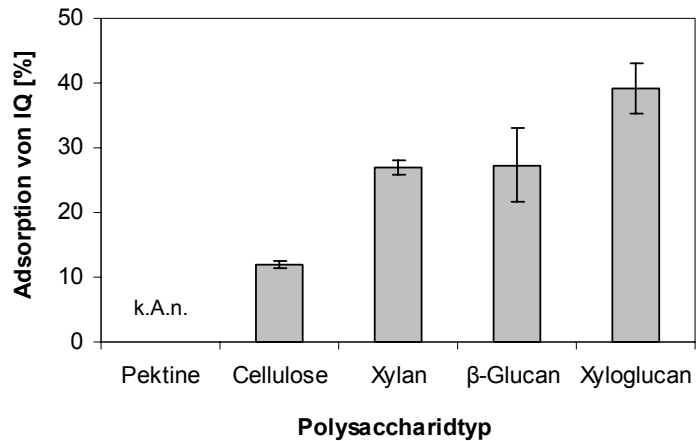


Abbildung 4.4: Adsorption von IQ an ausgewählte Polysaccharide (k.A.n. = keine Adsorption nachweisbar, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an).

Polysaccharide deutlich werden. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch, dass die Polysaccharide in der Zellwand nicht isoliert vorliegen, sondern ein dreidimensionales, komplexes Netzwerk darstellen. Die Untersuchung von Einzelkomponenten der Zellwand, wie hier am Beispiel von IQ und verschiedenen Zellwandpolysacchariden beschrieben, kann entsprechend niemals vollständig die komplexen Verhältnisse der Zellwand widerspiegeln.

4.1.3 Einfluss von Ferulasäure und Diferulasäure-Cross-Links auf den fermentativen Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota

Der Grad der Ferulasäure-Substitution von Arabinoxylanen bzw. der Ausbildung von Diferulasäure-Cross-Links wird vielfach mit dem Ausmaß des fermentativen Zellwandabbaus in Zusammenhang gebracht. Zunächst wurde angenommen, dass phenolische Säuren auf Mikroorganismen toxisch wirken und so den Zellwandabbau hemmen (38). Mittlerweile wird jedoch davon ausgegangen, dass Ferulasäure und vor allem Diferulasäure-Cross-Links den Kontakt von z. B. Endoxylanasen mit dem Substrat Arabinoxylan sterisch behindern und so den Abbau der Arabinoxylane limitieren (38-40). Studien mit nicht lignifizierten Maiszellwänden zeigten, dass Diferulasäure-Cross-Links die Geschwindigkeit und in geringerem Maße den Umfang des Abbaus von Xylanen durch Enzymgemische mit Xylanaseaktivität bzw. Xylanase- und Ferulasäureesteraseaktivität reduzieren (9). Analog stellten Beaugrand et al. eine negative Korrelation zwischen dem Abbau von Weizenkleie bzw. Fraktionen dieser durch Xylanasen und dem Gehalt an Ferulasäure und Diferulasäuren her (10, 41). Während bisherige Studien im Allgemeinen mit Enzymgemischen durchgeführt wurden oder Wieder-

käuer betrafen, war die Rolle der Ferulasäure bzw. Diferulasäuren beim Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota bisher unbekannt.

Dieser Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von *in vitro*-Fermentationsstudien mit humanen Fäzessuspensionen untersucht (Kap. 3.2). Als Substrate dienten die bereits in Kapitel 4.1.2 erläuterten Maiszellwände, die „normale“ oder reduzierte Ferulasäuregehalte aufwiesen sowie „normale“ oder erhöhte Diferulasäuregehalte. Die Fermentationsstudien wurden mit gepoolten Fäzesproben unter anoxischen, den Dickdarm simulierenden Bedingungen durchgeführt. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der in Fäzesproben enthaltenen Darmmikrobiota der Zusammensetzung der im Kolon befindlichen Darmmikrobiota sehr nahe kommt (42). Durch die Verwendung von Fäzessuspensionen anstatt isolierter Fäzesbakterien wurde zum einen die Vielzahl und Vielfältigkeit der Mikroorganismen erhalten, zum anderen wurde deren Wachstum und Metabolismus durch in den Fäzes verbliebene Substrate, ergänzend zu den Substraten des BHI-Mediums, möglichst realitätsnah unterstützt. Durch das Poolen verschiedener Fäzesproben von Probanden unterschiedlichen Alters und Geschlechts wurden zudem individuelle Unterschiede der Darmmikrobiota ausgeglichen. Zwar sind *in vitro*-Studien, wie bereits diskutiert, bezüglich ihrer direkten Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation begrenzt, doch ermöglichen sie, den Fermentationsverlauf durch Abbruch der Fermentation nach verschiedenen Zeitpunkten, in diesem Fall nach 4, 8 bzw. 24 Stunden, zu verfolgen. Um nach der erfolgten Fermentation eine Rückgewinnung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellwandrückstände zu gewährleisten, wurden die Zellwände in Nylonbags verschweißt fermentiert. Die Porengröße der Nylonbags stellte hierbei einen kritischen Punkt dar. Sie musste zum einen groß genug sein, um den ungehinderten Zugriff der Mikroorganismen bzw. der gebildeten Enzyme auf die zu fermentierende Probe zu gewährleisten. Auf der anderen Seite musste die Porengröße klein genug sein, um das Auswaschen nicht abgebauter Probenpartikel weitestgehend zu verhindern. Die in den hier präsentierten Studien gewählte Porengröße von 10 µm erfüllte beide Ansprüche (43). Die Abbauraten der fermentierten Zellwandproben wurden gravimetrisch bestimmt.

In der in Kapitel 3.2 präsentierten Studie wurden alle Zellwände effektiv abgebaut: zu durchschnittlich 5 % nach 4-stündiger, 24 % nach 8-stündiger und 65 % nach 24-stündiger Fermentation. Hierbei wurden vor allem Pektine und Hemicellulosen wie Arabinoxylane, Xyloglucane und β -Glucane fermentiert, während die Cellulose keinem Abbau unterlag. Überraschenderweise hatte weder der Ferulasäuregehalt, noch der Diferulasäuregehalt insgesamt einen Einfluss auf den fermentativen Zellwandabbau. Dies spiegelte sich auch in der Freisetzung von Arabinose und Xylose aus den Zellwandarabinoxylanen wider, die (mit Ausnahme der Zellwand mit reduziertem Ferulasäure- und erhöhtem Diferulasäuregehalt nach 4-stündiger Fermentation) in allen untersuchten Zellwänden zu allen Zeitpunkten statistisch vergleichbar war. Innerhalb der ersten vier Stunden der Fermentation könnten die Daten der Arabinose- und Xylosetreisetzung auf eine anfängliche Abhängigkeit der Fermentation vom Ferulasäure- bzw. Diferulasäuregehalt hindeuten, die jedoch zum Zeitpunkt „4 Stunden“ in diesen Studien statistisch nicht zu belegen war. Ein Einfluss dieser Parameter auf den Arabinoxylanabbau nach 8 und 24 Stunden Fermentation konnte ausgeschlossen werden. Wäh-

rend des Abbaus der Zellwände fand eine Freisetzung monomerer Ferulasäure sowie von Diferulasäuren statt. Es konnte jedoch im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden, ob freie Ferulasäure bzw. Diferulasäuren oder Ferulasäure- bzw. Diferulasäureoligosaccharide freigesetzt wurden. Nach 24-stündiger Fermentation wurden mehr als 85 % der zellwandgebundenen Ferulasäure und mehr als 93 % der Diferulasäuren freigesetzt. Eine Anreicherung von Diferulasäuren bezogen auf die Xylose im Zellwandrückstand fand in den Zellwänden mit maximalen Ferulasäure- und Diferulasäuregehalten statt, hatte jedoch offensichtlich keinen Einfluss auf die gesamte Abbaubarkeit.

Die Ergebnisse zeigen, dass die in den Maiszellwänden enthaltenen Ferulasäure-Einheiten und Diferulasäure-Cross-Links keine Hemmung des Zellwandabbaus verursachen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass höhere als in diesem Experiment vorliegende Gehalte an Ferulasäure bzw. Diferulasäuren eine Inhibierung des Zellwandabbaus bewirken können. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 erläutert, sind die in diesen Studien verwendeten Ferulasäure- bzw. Diferulasäuregehalte zwar mit den Gehalten in unlöslichen Ballaststoffen verschiedener Getreide vergleichbar, jedoch liegen insbesondere in unlöslichen Ballaststoffen von Mais durchaus höhere Gehalte vor (35, 36).

Des Weiteren lassen die Ergebnisse vermuten, dass in der humanen Darmmikrobiota Ferulasäureesterasen aktiv sind, die einer Hemmung des Abbaus durch vor allem Diferulasäure-Cross-Links effektiv entgegenwirken. Dass Ferulasäureesterasen monomere Ferulasäure aus komplexen Matrices wie Maiskleie und Zuckerrübenpulpe freisetzen können, wurde anhand einer aus *Penicillium funiculosum* isolierten Esterase gezeigt (44). Pilze spielen jedoch in einer gesunden Darmflora keine Rolle. Hingegen konnte eine Ferulasäurefreisetzung durch eine aus *Lactobacillus acidophilus* isolierte Ferulasäureesterase nur aus Ferulasäure enthaltenden Oligosacchariden, nicht aber aus Polysacchariden erreicht werden (45). Die Isolierung von Ferulasäureesterase aus weiteren Mikroorganismen, die für die menschliche Darmflora relevant sind, wurde bislang nicht beschrieben. Eine Freisetzung von Diferulasäuren aus komplexen Matrices durch Ferulasäureesterasen konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Offen bleibt daher die Frage, in welcher Form die in den Fermentationsstudien gezeigte Freisetzung von Diferulasäuren stattfand. Es ist sowohl eine Freisetzung als freie Säuren als auch als Diferulate, die noch mit Arabinoxylanfragmenten verestert vorliegen, denkbar. Des Weiteren haben kürzlich Untersuchungen zur mikrobiellen Umsetzung von Diferulasäuren gezeigt, dass die Mikroorganismen der menschlichen Darmflora in der Lage sind, 8-O-4-gekoppelte Diferulasäure zu spalten, 5-5-gekoppelte Diferulasäure jedoch nicht (unveröffentlichte Daten am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke). Zwar wurden die Studien lediglich mit freien Diferulasäuren als Modellverbindungen durchgeführt, jedoch sollte dennoch auch für bestimmte zellwandgebundene Diferulasäuren, wie die 8-O-4-gekoppelte Diferulasäure, die Möglichkeit einer Cross-Link-Spaltung durch Darmmikroorganismen in Betracht gezogen werden. Für die im Rahmen der Fermentationsstudien dieser Arbeit beobachtete Freisetzung von Diferulasäuren dürfte ein derartiger Mechanismus jedoch, dem sehr konstanten Diferulasäuremuster in den Zellwandrückständen nach zu urteilen, maximal eine untergeordnete Rolle spielen.

4.2 Lignin

4.2.1 Einfluss von Lignin auf die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Amininen an Ballaststoffe

Lignin wird für eine Vielzahl von Eigenschaften der Ballaststoffe eine Schlüsselrolle zugesprochen, so auch für die Adsorption von HAA im menschlichen Körper. Wie erwähnt, wurde anhand von *in vitro*-Studien gezeigt, dass neben suberinhaltigen „Ballaststoffen“ ligninhaltige „Ballaststoffe“ (z. B. aus Weizenstroh oder Kohlstengeln) HAA effektiv adsorbieren können (28) - ein möglicher direkter Mechanismus zur Reduktion des Krebsrisikos. Die besondere Affinität lignifizierter Ballaststoffe zu HAA wird mit dem hydrophoben Charakter von Lignin begründet. Ein Nachteil der bisherigen Studien war jedoch, dass lediglich aus verschiedenen Pflanzen isolierte Modell-Ballaststoffe bezüglich ihrer Adsorptionseigenschaften untersucht wurden. Zwar konnten diese Ballaststoffe als „ligninhaltig“ oder „ligninfrei“ charakterisiert werden, doch unterschieden sich die Ballaststoffe ebenso in der restlichen Zellwandmatrix. Zudem variieren Lignine unterschiedlicher Pflanzenquellen nicht nur in ihrem Gehalt, sondern auch in ihrer Zusammensetzung. Beides wurde in der Literatur nicht oder nicht zufrieden stellend bestimmt. Insofern erscheinen aus den Ergebnissen der Adsorptions-Studien abgeleitete Zusammenhänge zwischen Lignin und Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen als fragwürdig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine direkte Analyse des Einflusses von Lignin auf die Adsorption von HAA ermöglicht, indem Adsorptionsstudien mit so genannten DHP-Zellwänden durchgeführt wurden. Die verwendeten DHP-Zellwände besaßen die gleiche Zellwandmatrix, überwiegend aus Polysacchariden und Proteinen. Durch eine gezielte künstliche Lignifizierung wurden Zellwände mit variierenden Ligningehalten und Ligninzusammensetzungen erhalten. Frühere Arbeiten von Grabber et al. zeigten, dass das künstlich erzeugte Lignin der DHP-Zellwandkomplexe zum einen gleichmäßig verteilt in der Zellwand vorliegt und zum anderen strukturell mit dem natürlichen Lignin von Gräsern vergleichbar ist (46). Ein Nachteil ist jedoch, dass natürliche lignifizierte Pflanzenzellwände aufgrund ihrer Primär- und Sekundärwand komplexer aufgebaut sind als die DHP-Zellwände, die lediglich eine Primärwand aufweisen. Die Verwendung von Modellzellwänden mit zusätzlicher sekundärer Zellwand wäre jedoch mit dem Ziel künstlich gezielt lignifizierter Zellwände nicht möglich, da in den Zellen parallel zur Bildung einer sekundären Zellwand ebenso eine eigenständige, unkontrollierte Lignifizierung stattfinden würde (46).

Mit Hilfe von nicht lignifizierten und DHP-Zellwänden wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Ligninkonzentration und -zusammensetzung auf die Adsorption der vier HAA MeIQx, IQ, PhIP und AαC untersucht (Kap. 3.3). Hierbei wiesen die DHP-Zellwände Klason-Ligningehalte auf, die von 5 % bis 20 % variierten und repräsentativ für Ligninkonzentrationen in verschiedenen Ballaststoffen sind (47, 48). Die DHP-Zellwände enthielten analog zu natürlichen Ballaststoffen Guaiacyl-Lignin, Syringyl-Lignin oder Guaiacyl/Syringyl-Lignin (Guaiacyl/Syringyl-Verhältnisse von 2:1 bis 1:2) (47, 48). Zudem wurden DHP-Zellwände verwendet, bei denen neben Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten andere 4-Hydroxyphenylpropanoide in das Lignin integriert waren. Hierzu zählten 5-Hydroxyconiferylalkohol, Di-

hydroconiferylalkohol, Coniferaldehyd und γ -acetylierter Sinapylalkohol. Der Einbau derartiger Vorstufen in Ligninmoleküle spielt zwar im Allgemeinen eine untergeordnete Rolle, ist jedoch in mutierten und transgenen, aber auch in natürlichen Pflanzen zu beobachten (48, 49). Die Adsorptionsstudien erfolgten *in vitro* unter den Dünndarm simulierenden Bedingungen (pH 6,5). Die Vor- und Nachteile von *in vitro*-Adsorptionsstudien wurden bereits in Kapitel 4.1.2 erläutert.

Analog zu den in Kapitel 4.1.2 diskutierten Ergebnissen bestätigen die erzielten Adsorptionsraten an die DHP-Zellwände die in der Literatur beschriebene Korrelation zwischen Hydrophobizität der HAA und ihrer Adsorption an Zellwände (27, 28). Das am stärksten hydrophobe HAA dieser Studie, A α C, wurde am effektivsten von den DHP-Zellwänden adsorbiert (bis zu 72 %), gefolgt von dem weniger hydrophoben PhIP (bis zu 58 %). MeIQx und IQ, die die geringste Hydrophobizität aufweisen, wurden am wenigsten adsorbiert (bis zu 29 %).

Die in Kapitel 3.3 präsentierte Studie zeigte deutlich einen Einfluss der Ligninkonzentration auf die Adsorption der HAA. Die Adsorptionsraten aller HAA stiegen mit wachsenden Ligningehalten der Zellwände an. Besonders ausgeprägt war dies für die hydrophoben HAA PhIP und A α C. Hier wurden für DHP-Zellwände Adsorptionsraten erreicht, die bis zu 2 - 3fach höher lagen als die Adsorptionsraten an die nicht lignifizierte Kontrollzellwände. Für die weniger hydrophoben HAA MeIQx und IQ war ein Einfluss der Ligninkonzentration zwar erkennbar, doch erschien er im Vergleich zur Adsorption an die restliche Zellwandmatrix weniger relevant, zumal die Adsorptionsraten nicht 29 % überstiegen.

Die Ligninzusammensetzung spielte ebenso eine Rolle bei der Adsorption von HAA. Jedoch zeigte diese Arbeit, dass sich Aussagen diesbezüglich nicht für alle HAA verallgemeinern lassen. PhIP und A α C z. B. wiesen im Vergleich zu Guaiacyl-Lignin- und Guaiacyl/Syringyl-ligninhaltigen DHP-Zellwänden eine verringerte Affinität zu Syringyl-ligninhaltigen Zellwänden auf. MeIQx hingegen adsorbierte bevorzugt an Syringyl-ligninhaltige Zellwände, während kein Einfluss der Ligninzusammensetzung auf die Adsorption von IQ festgestellt wurde. Auch der Einbau der anderen oben erläuterten 4-Hydroxyphenylpropanoide in das Lignin bewirkte unterschiedliche Adsorptionsraten. So wurden mit Zellwänden, deren Lignin 5-Hydroxyconiferylalkohol oder Coniferaldehyd enthielten, höhere Adsorptionsraten erzielt als mit dihydroconiferylalkoholhaltigen DHP-Zellwänden. Die Adsorption an DHP-Zellwände, in deren Lignin γ -acetylierter Sinapylalkohol integriert war, gewann mit wachsender Hydrophobizität des jeweiligen HAAs an Bedeutung.

Die erzielten Ergebnisse weisen eine direkte Korrelation zwischen Ligningehalt und Adsorption von HAA an Zellwände nach und belegen des Weiteren einen Einfluss der Ligninzusammensetzung auf die Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen. Es ist zu vermuten, dass der gemessene Einfluss der Ligninzusammensetzung weniger auf den unterschiedlichen Ligninmonomeren an sich beruht, sondern vielmehr durch die unterschiedlichen Ligninstrukturen, die von verschiedenen Ligninmonomeren z. B. aufgrund unterschiedlicher bevorzugter bzw. möglicher Bindungstypen gebildet werden, verursacht wird. Vor allem verdeutlichen sie jedoch die Vielzahl der Parameter, die die Adsorption von HAA beeinflussen. So wiesen die verschiedenen untersuchten HAA jeweils eigene Adsorptionscharakteristika auf, so dass Aussagen differenziert zu sehen sind. Während lignifizierte Ballaststoffe z. B. PhIP

und A α C äußerst effektiv adsorbieren können, dürfte der Einfluss von Lignin auf die Adsorption von MeIQx und IQ im Vergleich eine untergeordnete Rolle spielen.

Des Weiteren ergab sich die Frage, wie sich die Adsorptionsfähigkeit der Ballaststoffe während des Transportes durch den Körper verändert. Diese Fragestellung erschien besonders für die effektiv adsorbierbaren HAA PhIP und A α C relevant. Adsorptionsstudien bei verschiedenen pH-Werten wurden bislang nur für MeIQx (50) und IQ (51) durchgeführt. Beide Adsorptionsstudien ergaben ein Adsorptionsmaximum im schwach sauren Milieu (ca. pH 4 - 6), unterschieden sich jedoch im Detail. Eigene Studien zeigten, dass die Adsorption von PhIP und A α C bei einem saurem pH-Wert von 3, wie er beim Transport durch den Magen zum Dünndarm durchschritten wird, bis zur Hälfte reduziert wird (unveröffentlichte Daten). Die in Kapitel 3.4 präsentierte Studie sollte klären, welche Auswirkungen die pH-Wert-Verschiebung, die beim Transport vom Dünndarm zum distalen Kolon erfolgt, auf die Adsorption dieser beiden HAA hat. Die Adsorptionsstudien wurden hierfür bei pH 6,5 (Dünndarm) sowie 7,4 (distales Kolon) durchgeführt.

Während die Adsorption von PhIP an DHP-Zellwände mit Guaiacyl- und Guaiacyl/Syringyl-Lignin (1:1) im Allgemeinen durch den höheren pH-Wert um bis ein Sechstel reduziert wurde, traf eine Reduzierung der Adsorption von A α C nur für die Guaiacyl/Syringyl-ligninhaltigen DHP-Zellwände zu. Dies verdeutlicht erneut das unterschiedliche Adsorptionsverhalten verschiedener HAA. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass im Dünndarm an lignifizierte Ballaststoffe adsorbiertes PhIP, und begrenzt auch A α C, während der folgenden Passage durch den Körper aufgrund von pH-Wert-Verschiebungen teilweise freigesetzt werden können. Trotz der verminderten Adsorption bei einem pH-Wert von 7,4 wurden für PhIP jedoch noch immer Adsorptionsraten von bis zu 63 % erreicht.

Bei dem Transport durch den Körper zum distalen Kolon hin erfolgt jedoch nicht nur eine pH-Wert-Verschiebung, sondern es findet vor allem im Kolon eine Fermentation der Ballaststoffe durch die menschliche Darmflora statt. Die hierdurch bewirkten strukturellen Veränderungen der Ballaststoffe können sich wiederum auf die Adsorptionseigenschaften für HAA auswirken. Studien diesbezüglich sind selten. Ryden et al. (43) zeigten anhand von *in vitro*-Fermentationsstudien mit humanen Fäzessuspensionen, dass die Adsorptions-Affinität und -Kapazität von Weizenkleie für MeIQx durch eine 18-stündige Fermentation erhöht wird. Im Rahmen der hier präsentierten Arbeit wurde der Einfluss einer Zellwandfermentation auf die Adsorption der im Dünndarm effektiv adsorbierbaren HAA PhIP und A α C untersucht (Kap. 3.4). Hierfür wurden die Adsorptionseigenschaften bei pH 7,4 von unfermentierten DHP-Zellwänden mit den Adsorptionseigenschaften von nach 8- bzw. 24-stündiger Inkubation mit humanen Fäzessuspensionen erhaltenen Zellwandrückständen verglichen. Hierbei wurde die für die Adsorptionsstudien eingesetzte Menge an Zellwandrückstand im Vergleich zu der verwendeten Menge an intakten, nicht fermentierten Zellwänden entsprechend des erfolgten Abbaus reduziert, d.h. je höher der Zellwandabbau war, desto niedriger war die Menge an Zellwandrückstand, die mit dem jeweiligen HAA inkubiert wurde. Die Fermentation der DHP-Zellwände wird in Kapitel 4.2.3 im Detail diskutiert.

Die Ergebnisse der Adsorptionsstudien zeigten erneut ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten für PhIP und AαC. Für alle untersuchten DHP-Zellwandtypen unterschied sich die Adsorption von PhIP an fermentierte DHP-Zellwandrückstände nicht signifikant von der Adsorption an die nicht fermentierten DHP-Zellwände. Die Adsorptionseigenschaften der nicht lignifizierten Zellwände wurden hingegen sowohl für PhIP als auch für AαC durch eine Fermentation drastisch (um bis zu 40 bzw. 52 %) reduziert. Bezüglich AαC bewirkte ebenso eine Fermentation der DHP-Zellwände eine Reduktion der Adsorptionseigenschaften. Verglichen mit der Adsorption an die nicht fermentierten DHP-Zellwände wurde die Adsorption von AαC an DHP-Zellwandrückstände nach 24-stündiger Fermentation um bis zu einem Drittel reduziert. Die Studien zeigen, dass eine mikrobielle Fermentation die Adsorptionseigenschaften von Pflanzenzellwänden für PhIP und AαC unterschiedlich beeinflusst. Ein Erklärungsversuch wären verschiedene Adsorptionseigenschaften der Polysaccharide der Pflanzenzellwand für PhIP und AαC. Je nach Abbau der einzelnen Polysaccharide würde somit die Adsorption des jeweiligen HAA unterschiedlich stark beeinflusst werden. Allerdings geht dieser Erklärungsansatz vereinfachend von Polysacchariden als isoliert betrachtete Ballaststoffkomponenten aus, während die Pflanzenzellwand ein komplexes Netzwerk aus Polysacchariden, Strukturproteinen, Ligninen und anderen aufgelagerten oder integrierten Substanzen darstellt. Insofern ist es fraglich, ob die Adsorptionseigenschaften derart komplexer Strukturen anhand von einzelnen Strukturkomponenten wie Polysaccharide oder auch Lignin erklärt werden können.

Neben der oben erläuterten pH-Wert-Verschiebung kann folglich auch die Fermentation von Ballaststoffen im Kolon zu einer Freisetzung einzelner HAA führen. Während die Freisetzung von HAA infolge einer pH-Wert-Verschiebung vor allem PhIP und nur begrenzt AαC betraf, scheint die Fermentation lediglich die Adsorptionseigenschaften lignifizierter Ballaststoffe für AαC zu reduzieren. Die aufgezeigte mögliche Freisetzung von HAA beim Transport zum distalen Kolon wirft die Frage auf, was mit den freien HAA im Kolon geschieht. Eine mögliche Absorption freier HAA im Kolon konnte bislang nicht gezeigt werden. Hingegen gibt es Studien, die eine Transformation von PhIP durch Darmbakterien darstellen (32). Inwiefern der resultierende Metabolit eine (negative) biologische Aktivität aufweist oder ob zusätzlich weitere Metabolite gebildet werden, ist bislang ungeklärt. Für AαC liegen bislang keine analogen Studien vor.

4.2.2 Einfluss von Lignin auf die Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe

Besonders ausgeprägte Adsorptionseigenschaften lignifizierter Ballaststoffe wurden bislang nicht nur für HAA diskutiert, sondern ebenso für Gallensäuren (26). Die Adsorption primärer Gallensäuren an Ballaststoffe im Gastrointestinaltrakt und ihre Ausscheidung wird als möglicher Mechanismus betrachtet, den Cholesterinspiegel zu senken, indem die Gallensäuresynthese aus Cholesterin angeregt wird. Außerdem wird die Adsorption und Ausscheidung sekundärer Gallensäuren positiv bewertet, da einige sekundäre Gallensäuren als krebsfördernd diskutiert werden (52). Die Rolle einzelner Ballaststoffkomponenten bei der Adsorption von Gallensäuren wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Vielzahl von Studien beschreibt

den Cholesterinspiegel senkende Eigenschaften für viskose, lösliche Ballaststoffkomponenten wie β -Glucane, Pektine, Psyllium oder Guar Gummi (53-57). Andere Studien wiederum bringen das Ausmaß der Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe, obgleich Gallensäuren amphiphile Verbindungen darstellen, mit ihrer Hydrophobizität in Verbindung (58-60). Lignin als hydrophobes Makromolekül wurde folglich in zahlreichen Studien als besonders effektiv für die Adsorption von Gallensäuren hervorgehoben (58, 59, 61-63). Jedoch gibt es ebenso Studien, die die Adsorptionseigenschaften von Lignin für Gallensäuren in Frage stellen (64, 65). Wie bereits in Kapitel 4.2.1 erläutert, ist die Aussagekraft der bisherigen Studien mit natürlichen Ballaststoffen bzw. natürlichen Pflanzengeweben, die als Modell-Ballaststoffe dienen sollten, aufgrund deren komplexen, häufig unzureichend charakterisierten und von Pflanze zu Pflanze variierenden Zusammensetzung begrenzt.

Im Rahmen dieser Arbeit dienten auch hier DHP-Zellwände dazu, den direkten Zusammenhang zwischen der *in vitro*-Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe sowie Ligninkonzentration und -zusammensetzung der Ballaststoffe zu klären (Kap. 3.5). Die *in vitro*-Adsorptionsstudien sind hierbei ähnlich wie die der HAA zu bewerten. Auch hier wären *in vivo*-Studien zwar realitätsnaher, aber aufgrund der oben genannten Gründe schwierig. Allerdings ist bei Gallensäuren die Zahl der möglichen Metabolite begrenzt und eine Messung vermehrt ausgeschiedener Gallensäuren bzw. ihrer Metabolite ist besser realisierbar, wie frühere Studien gezeigt haben (66, 67). Eine gezielte Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen anhand von *in vivo*-Untersuchungen wäre jedoch durch die im Körper stattfindende selbstregulierende Gallensäurebiosynthese aus Cholesterin erheblich erschwert. Die in dieser Arbeit präsentierten Adsorptionsstudien erfolgten analog zu den oben beschriebenen Studien unter den Dünndarm und das distale Kolon simulierenden Bedingungen. Während der Inkubation der Zellwandsuspensionen mit den Gallensäuren lagen letztere in einer Konzentration von 0,5 mg/mL (0,9 - 1,2 mM) vor. Dies entsprach dem unteren Bereich der bisher für die Dünndarmregion angenommenen Gallensäurenkonzentrationen von 1 - 12 mM (58, 68).

Die Adsorptionsstudien wurden mit den drei primären Gallensäurekonjugaten Glycocholol, Taurocholol und Glycochenodesoxycholol bei pH 6,5 (Dünndarm) und der sekundären Gallensäure Desoxycholol bei pH 7,6 (distales Kolon) durchgeführt. Die Adsorptionsraten der Gallensäuren bzw. ihrer Konjugate umfassten 6 - 31 % (2 - 12 mg/g Zellwand bzw. 4 - 26 μ mol/g) und lagen im Vergleich zu bisherigen Adsorptionsstudien verschiedener Gallensäuren an Mehle, Getreidefraktionen und Getreideballaststoffe im mittleren Bereich (63, 69-71).

Die Ergebnisse der in Kapitel 3.5 dargestellten Studie konnten einige publizierte Daten über das Adsorptionsverhalten von Gallensäuren an Ballaststoffe bestätigen. So wurde z. B. bereits in früheren Studien gezeigt, dass Glycinkonjugate besser adsorbiert werden als Taurinkonjugate (59, 61, 66, 72). Auch in der hier präsentierten Studie wurde Taurocholol am wenigsten adsorbiert. Glycochenodesoxycholol hingegen erreichte die höchsten Adsorptionsraten, was die Aussage einiger bisheriger Studien zunächst zu bestätigen scheint, dass die Adsorption von Gallensäuren mit sinkendem Hydroxylierungsgrad und somit wachsender Hydrophobizität steigt (66, 71, 73-75).

Im Widerspruch zu der weit verbreiteten Auffassung, dass Lignin eine besondere Rolle für die Adsorption von Gallensäuren spielt, konnte die in Kapitel 3.5 dargestellte Studie jedoch deutlich zeigen, dass, obgleich die verschiedenen Gallensäuren unterschiedlich stark adsorbiert wurden, weder der Ligningehalt noch die Ligninzusammensetzung die Adsorption von Gallensäuren bzw. ihren Konjugaten beeinflusst. Diese eindeutigen Ergebnisse verdeutlichen die Probleme und Misinterpretationen, die durch das Aufstellen direkter Korrelationen nur durch Vergleich verschiedener, komplexer, in vielen Parametern differierender Ballaststoffe unterschiedlicher Pflanzen auftreten. Hinzu kommt, dass der Begriff des Lignins teilweise sehr undifferenziert betrachtet wird. Aus realen Ballaststoffen gewonnenes Klason-Lignin, welches lediglich einen Rückstand nach saurer Hydrolyse repräsentiert, gibt keinen Aufschluss über den wahren Ligningehalt. Bei der Bestimmung des Klason-Lignins werden häufig Begleitsubstanzen wie Strukturproteine, Suberin, Cutin, Wachse und Protein-Tannin-Komplexe miterfasst. Hierdurch bedingt wurden bisher viele Bestandteile des Klason-Lignins fälschlicherweise als Lignin gedeutet. Zwar ist seit längerem bekannt, dass die Methode der Klason-Lignin-Bestimmung für Lebensmittel wenig geeignet ist (76), doch fanden diese Erkenntnisse in der bisherigen Ballaststoffforschung nicht die notwendige Beachtung. Die Arbeiten von Manas et al. (76) fanden kürzlich Unterstützung durch eine Studie, in der gezeigt wurde, dass es sich bei bisher als Lignin angenommene Strukturen in einigen Lebensmitteln, wie z. B. in Weizen, lediglich um Lignin-ähnliche Strukturen handelt, denen jedoch weitgehend die für Lignin typischen Charakteristika fehlen (77).

Des Weiteren werfen die erzielten Ergebnisse die Frage auf, welche Rolle hydrophobe Wechselwirkungen wirklich bei der Adsorption von Gallensäuren spielen, wenn Lignin als hydrophobes Makromolekül keine zusätzliche Adsorption bewirken kann. Aufschluss hierüber könnte die Korrelation der Adsorption von Gallensäuren mit weiteren Ballaststoffkomponenten geben. Sayar et al. (63) vermuten z. B. aufgrund ihrer Studien mit verschiedenen Haferfraktionen einen synergistischen Effekt von Klason-Lignin und β -Glucanen auf die Adsorption von Gallensäuren.

4.2.3 Einfluss von Lignin auf den fermentativen Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota

Die Rolle des Lignins für den ruminalen fermentativen Abbau von Pflanzenzellwänden wurde bereits in früheren Studien diskutiert. Hierbei wurde Lignin, das bislang selbst als weitgehend resistent gegen einen fermentativen Abbau angesehen wurde, in Zusammenhang mit einer verminderten Abbaubarkeit lignifizierter Pflanzenzellwände gestellt (38, 78, 79). Erklärungen hierfür basieren im Allgemeinen auf sterischen Aspekten. Zum einen könnte Lignin aufgrund seiner Verknüpfung mit Polysacchariden den Abbau dieser durch Carbohydrasen behindern. Zum anderen könnte ein Eindringen der Enzyme in die Zellwandstrukturen durch die Hydrophobizität der Ligninkomplexe erschwert werden (38, 80). Bei den bisherigen Studien stand jedoch vor allem der ruminale Abbau lignifizierter Pflanzenzellwände im Mittelpunkt, der im Zusammenhang mit der Futtermittelverwertbarkeit von Interesse ist (81). Die in Kapitel 3.4 vorgestellten Arbeiten hingegen befassen sich mit der Fermentation lignifizierter Pflanzenzellwände durch die humane Darmmikrobiota, die sich von der des Pansens erheb-

lich unterscheidet, u. a. durch das Fehlen von Pilzen (in einer intakten Darmflora) und von Protozoen. Zwar wurde in bisherigen Studien z. B. gezeigt, dass Hafer, Mais- und Weizenkleie, die vor allem unlösliche Ballaststoffe enthalten, schlechter von der humanen Darmmikrobiota fermentiert werden als Guar Gummi, Gummi Arabicum und Zitruspektin, die Quellen für lösliche Ballaststoffe darstellen (82), jedoch ist die Rolle des Lignins bei der Fermentation von Ballaststoffen durch die humane Darmmikrobiota bislang unklar. Eine teilweise Reduzierung der Abbaubarkeit bzw. eine Herabsetzung der Fermentationsrate von Pflanzenzellwänden durch Lignin wäre aus gesundheitlichen Aspekten wünschenswert. Sicherlich spielen die durch die Fermentation von Ballaststoffpolysacchariden gebildeten kurzkettigen Fettsäuren eine Schlüsselrolle in der Gesunderhaltung des menschlichen Darms. Auf der anderen Seite führt ein erhöhtes Stuhlvolumen, überwiegend hervorgerufen durch nicht fermentierbare Ballaststoffkomponenten, zu einer Anregung der Darmperistaltik. Die hieraus resultierende reduzierte Transitzeit des Darminhaltes durch das Kolon verkürzt wiederum die Kontaktzeit zwischen Darmmukosa und unerwünschten Substanzen wie Kanzerogenen oder zytotoxischen Substanzen. Eine nur verlangsamte, nicht aber vollständig unterbundene Ballaststofffermentation würde zudem die Freisetzung kurzkettiger Fettsäuren auf die distalen Darmbereiche ausweiten, während im Allgemeinen die aus dem Kohlenhydratabbau resultierenden kurzkettigen Fettsäuren lediglich im proximalen Kolon gebildet werden. Dies wäre ebenfalls als positiv zu bewerten, vor allem unter Berücksichtigung, dass die meisten Dickdarmerkrankungen im distalen Kolon auftreten.

Im Rahmen der in Kapitel 3.4 präsentierten Arbeiten wurden nicht lignifizierte sowie künstlich lignifizierte Maiszellwände, DHP-Zellwände, mit variierenden Ligningehalten (8,0 - 15,2 % Klason-Lignin) und variierender Ligninzusammensetzung (reines Guaiacyl-Lignin und Guaiacyl/Syringyl-Lignin (1:1)) mit humanen, gepoolten Fäzesproben für 8 bzw. 24 Stunden unter anoxischen Bedingungen fermentiert. Da die Zellwände während der Fermentation in Nylonbags vorlagen, konnten die Zellwandrückstände nach der Fermentation wiedergewonnen werden und so der Umfang des erfolgten Zellwandabbaus gravimetrisch bestimmt werden. Die Vor- und Nachteile derartiger *in vitro*-Studien wurden bereits in Kapitel 4.1.3 diskutiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Lignin in der Tat den fermentativen Zellwandabbau durch die humane Darmmikrobiota stark hemmt. Während z. B. die nicht lignifizierten Zellwände nach 24-stündiger Fermentation zu 51 % abgebaut waren, reduzierte ein Klason-Ligningehalt von 15,2 % den Zellwandabbau auf nur 8 %. Aber auch bereits für natürliche Ballaststoffe typischere, geringere Ligninkonzentrationen zwischen 8 und 9 %, wie sie z. B. in unlöslichen Ballaststoffen von Kiwi und Rhabarber vorliegen (48), bewirkten nach 24-stündiger Fermentation im Vergleich zu nicht lignifizierten Zellwänden eine Reduktion des Zellwandabbaus von 51 % auf durchschnittlich 29 %. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien mit DHP-Zellwänden, in denen ein solcher Einfluss auf den Zellwandabbau durch aus Pilzen isolierten Hydrolasen nachgewiesen wurde (78). Während genannte Studien jedoch keinen Einfluss der Ligninzusammensetzung auf den Zellwandabbau erkennen ließen, konnte in unseren Studien nach 24-stündiger Fermentation ein Einfluss der Ligninzusammensetzung auf den Zellwandabbau beobachtet werden. Hierbei wurde der Abbau von DHP-Zellwänden mit Guaiacyl-Lignin stärker gehemmt als der Abbau von DHP-Zellwänden mit

Guaiacyl/Syringyl-Lignin. Der durch die Fermentation hervorgerufene Verlust an Lignin selbst erreichte teilweise bis zu 10 %, ein unerwartet hoher Abbau oder zumindest Verlust an Lignin. Dies könnte neuere Studien unterstützen, die einen teilweisen Abbau von Lignin zu Lignanen beschreiben, allerdings durch die Darmmikrobiota von Ratten (83). Die Analyse der Polysaccharide der in unseren Studien fermentierten DHP-Zellwände zeigte in Übereinstimmung mit den Arbeiten in Kapitel 3.2, dass Pektine und Hemicellulosen wie z. B. Arabinoxylane, Xyloglucane und β -Glucane gut fermentierbar sind, während Cellulose gegen den Abbau durch die humane Darmmikrobiota resistent ist.

Die in Kapitel 3.4 präsentierten Arbeiten belegen, dass der Grad und die Art der Lignifizierung von Ballaststoffen einen entscheidenden Einfluss auf deren Fermentierbarkeit haben. Ob eine verzögerte Fermentation der Ballaststoffkohlenhydrate einhergehend mit einer eventuellen Fermentation der Polysaccharide und Bildung von kurzkettigen Fettsäuren im distalen Kolon tatsächlich Erkrankungen des distalen Kolons vorbeugen kann, bleibt hingegen in weiteren Studien, z. B. in Tierstudien, zu untersuchen.

4.3 Literatur

- (1) Geissmann, T. und Neukom, H. Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxidative phenolische Kupplung. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 1108-1112.
- (2) Ralph, J.; Bunzel, M.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Grabber, J. H. und Steinhart, H. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 79-96.
- (3) Markwalder, H. U. und Neukom, H. Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 836-837.
- (4) Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H. und Hatfield, R. D. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 3485-3498.
- (5) Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. und Steinhart, H. Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3166-3169.
- (6) Ralph, J.; Grabber, J. H. und Hatfield, R. D. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* **1995**, *275*, 167-178.
- (7) Piber, M. und Koehler, P. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5276-5284.
- (8) Taiz, L. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1984**, *35*, 585-657.
- (9) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. und Ralph, J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *77*, 193-200.

- (10) Beaugrand, J.; Crônier, D.; Debeire, P. und Chabbert, B. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *J. Cereal Sci.* **2004**, *40*, 223-230.
- (11) Bunzel, M.; Steinhart, H. und Ralph, J. Strukturbildende phenolische Verbindungen in Getreideballaststoffen am Beispiel löslicher und unlöslicher Roggenballaststoffe. *Getreide, Mehl und Brot* **2002**, *56*, 281-286.
- (12) Kroon, P. A. und Williamson, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 355-361.
- (13) Kamisaka, S.; Takeda, S.; Takahashi, K. und Shibata, K. Diferulic and ferulic acid in the cell-wall of *Avena* coleoptiles - their relationships to mechanical properties of the cell-wall. *Physiol. Plant.* **1990**, *78*, 1-7.
- (14) Parr, A. J.; Waldron, K. W.; Ng, A. und Parker, M. L. The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *71*, 501-507.
- (15) Ward, G.; Hadar, Y.; Bilkis, I.; Konstantinovskiy, L. und Dosoretz, C. G. Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18734-18741.
- (16) Adams, E. L.; Kroon, P. A.; Williamson, G. und Morris, V. J. Characterisation of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 771-780.
- (17) Kerr, E. M. und Fry, S. C. Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture. *Planta* **2003**, *217*, 327-339.
- (18) Dervilly-Pinel, G.; Thibault, J. F. und Saulnier, L. Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* **2001**, *330*, 365-372.
- (19) Fry, S. C. Menage a trois: oxidative coupling of feruloyl polysaccharides *in vivo* proceeds beyond dimers. *Polyphénols Actualités* **2000**, *19*, 8-12.
- (20) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C. und Steinhart, H. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 128-133.
- (21) Rouau, X.; Cheynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudec, E.; Louis-Montero, J. und Criton, M. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 899-903.
- (22) Hatfield, R. D. und Ralph, J. Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 425-427.
- (23) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C. und Steinhart, H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5845-5850.

- (24) Bunzel, M.; Ralph, J.; Brüning, P. und Steinhart, H. Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6409-6418.
- (25) Schatz, P. F.; Ralph, J.; Lu, F.; Guzei, I. A. und Bunzel, M. Synthesis and identification of 2,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-tetrahydrofuran-3,4-dicarboxylic acid, an unanticipated ferulate 8-8-coupling product acylating cereal plant cell walls. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2801-2806.
- (26) Ferguson, L. R. und Harris, P. J. Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutation Res.* **1996**, *350*, 173-184.
- (27) Ferguson, L. R.; Robertson, A. M.; Watson, M. E.; Kestell, P. und Harris, P. J. The adsorption of a range of dietary carcinogens by α -cellulose, a model insoluble dietary fiber. *Mutation Res.* **1993**, *319*, 257-266.
- (28) Harris, P. J.; Triggs, C. M.; Robertson, A. M.; Watson, M. E. und Ferguson, L. R. The adsorption of heterocyclic aromatic amines by model dietary fibres with contrasting compositions. *Chem. Biol. Interact.* **1996**, *100*, 13-25.
- (29) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J.; Zon, J. und Amrhein, N. Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1077-1082.
- (30) Turesky, R. J. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 101-117.
- (31) Frederiksen, H. Two food-borne heterocyclic amines: metabolism and DNA adduct formation of amino- α -carbolines. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 263-273.
- (32) Vanhaecke, L.; van Hoof, N.; van Brabant, W.; Soenen, B.; Heyerick, A.; de Kimpe, N.; de Keukeleire, D.; Verstraete, W. und van de Wiele, T. Metabolism of the food-associated carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by human intestinal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3454-3461.
- (33) Jägerstad, M.; Skog, K. I.; Arvidsson, P. und Solyakov, A. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1998**, *207*, 419-427.
- (34) Mongeau, R.; Brooks, S. P. J. Chemistry and analysis of lignin. In *Handbook of dietary fibers*; Cho, S. S., Dreher, M. L., Eds.; Dekker: Ottawa, Canada, 2001; pp 321-373.
- (35) Bunzel, M.; Ralph, J.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D. und Steinhart, H. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 653-660.
- (36) Bunzel, M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. Dissertation, Hamburg, 2001.

- (37) Egoshi, K.; Nakaoka, H.; Oka, T. und Abo, K. Adsorption of heterocyclic aromatic amines by low molecular weight cellulose. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **1997**, *38*, 435-440.
- (38) Jung, H. G. und Deetz, D. A. Cell wall lignification and degradability. In *Forage cell wall structure and digestibility*; H. G. Jung; D. R. Buxton; R. D. Hatfield und J. Ralph, Eds.; ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, 1993; pp 315-346.
- (39) Hatfield, R. D. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In *Forage cell wall structure and digestibility*; H. G. Jung; D. R. Buxton; R. D. Hatfield und J. Ralph, Eds.; ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, 1993; pp 285-313.
- (40) Jung, H. G. und Allen, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* **1995**, *73*, 2774-2790.
- (41) Beaugrand, J.; Cronier, D.; Thiebeau, P.; Schreiber, L.; Debeire, P. und Chabbert, B. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7108-7117.
- (42) Blaut, M. Ökologie des Darmes. In *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes*; W. F. Caspary; M. Kist und J. Stein, Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2006; pp 45-55.
- (43) Ryden, P. und Robertson, J. A. The effect of fibre source and fermentation on the apparent binding properties of wheat bran preparations for the mutagen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 209-216.
- (44) Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N. M.; Archer, D. B. und Belshaw, N. J. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6740-6752.
- (45) Wang, X.; Geng, X.; Egashira, Y. und Sanada, H. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2367-2372.
- (46) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Kuster, T. und Pell, A. N. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1453-1459.
- (47) Bunzel, M.; Ralph, J.; Lu, F.; Hatfield, R. D. und Steinhart, H. Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6496-6502.
- (48) Bunzel, M.; Seiler, A. und Steinhart, H. Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9553-9559.
- (49) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H. und Boerjan, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 29-60.

- (50) Ryden, P. und Robertson, J. A. The effects of pH and bile salts on the binding of MeIQx to wheat bran fibre. *Mutation Res.* **1996**, *351*, 45-52.
- (51) Barnes, W. S.; Maiello, J. und Weisburger, J. H. *In vitro* binding of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline to dietary fibers. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**, *70*, 757-760.
- (52) Pai, R.; Tarnawski, A. S. und Tran, T. Deoxycholic acid activates β -catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 2156-2163.
- (53) Glore, S. R.; Vantreeck, D.; Knehans, A. W. und Guild, M. Soluble fiber and serum-lipids - a literature-review. *J. Am. Diet Assoc.* **1994**, *94*, 425-436.
- (54) Plaami, S. P. Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev. Int.* **1997**, *13*, 29-76.
- (55) Braaten, J. T.; Wood, P. J.; Scott, F. W.; Wolynetz, M. S.; Lowe, M. K.; Bradleywhite, P. und Collins, M. W. Oat β -glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. of Clin. Nutr.* **1994**, *48*, 465-474.
- (56) Wood, P. J. Cereal β -glucans: Structure, properties and health claims. In *Advanced Dietary Fibre Technology*; B. V. McCleary und L. Prosky, Eds.; Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK, 2001; pp 315-327.
- (57) Fulgoni, V. L. Effects of psyllium on serum cholesterol levels. In *Advanced Dietary Fibre Technology*; B. V. McCleary und L. Prosky, Eds.; Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK, 2001; pp 221-225.
- (58) Huang, C.-M. und Dural, N. H. Adsorption of bile acids on cereal type food fibers. *J. Food Proc. Eng* **1995**, *18*, 243-266.
- (59) Eastwood, M. A. und Hamilton, D. Studies on the adsorption of bile salts to non-absorbed components of diet. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *152*, 165-173.
- (60) Górecka, D.; Korczak, J.; Balcerowski, E. und Decyk, K. Sorption of bile acids and cholesterol by dietary fiber of carrots, cabbage and apples. *Electr. J. Pol. Agric. Univ. Food Sci. Technol.* **2002**, *5*, published online at www.ejpau.media.pl/series/volume5/issue2/food/art-02.html.
- (61) Story, J. A. und Kritchevsky, D. Comparison of the binding of various bile acids and bile salts *in vitro* by several types of fiber. *J. Nutr.* **1976**, *106*, 1292-1294.
- (62) Gallaher, D. und Schneeman, B. O. Intestinal interaction of bile acids, phospholipids, dietary fibers, and cholestyramine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **1986**, *250*, 420-426.
- (63) Sayar, S.; Jannink, J.-L. und White, P. J. *In vitro* bile acid binding activity within flour fractions from oat lines with typical and high β -glucan amounts. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5142-5148.

- (64) Elhardallou, S. B. The bile acids binding of the fibre-rich fractions of three starchy legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1992**, *42*, 207-218.
- (65) Nixon, A.; Mason, A. N. und Bilton, R. F. The binding of bile acids by *in vitro* enzymically digested vegetable fibre. *Biochem. Soc. Trans.* **1986**, *14*, 369-370.
- (66) Kern, F., Jr.; Birkner, H. J. und Ostrower, V. S. Binding of bile acids by dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* **1978**, *31*, 175-179.
- (67) Güldütuna, S.; You, T.; Kurts, W. und Leuschner, U. High performance liquid chromatographic determination of free and conjugated bile acids in serum, liver biopsies, bile, gastric juice and feces by fluorescence labeling. *Clin. Chim. Acta* **1993**, *214*, 195-207.
- (68) Huang, W. N. und Hosenev, R. C. Isolation and identification of a wheat flour compound causing sticky dough. *Cereal Chem.* **1999**, *76*, 276-281.
- (69) Górecka, D.; Korczak, J.; Konieczny, P.; Hes, M. und Flaczyk, E. Adsorption of bile acids by cereal products. *Cereal Foods World* **2005**, *50*, 176-178.
- (70) Kahlon, T. S. und Woodruff, C. L. *In vitro* binding of bile acids by rice bran, oat bran, barley and β -glucan enriched barley. *Cereal Chem.* **2003**, *80*, 260-263.
- (71) Drzikova, B.; Dongowski, G.; Gebhardt, E. und Habel, A. The composition of dietary fibre-rich extrudates from oat affects bile acid binding and fermentation *in vitro*. *Food Chem.* **2005**, *90*, 181-192.
- (72) Camire, M. E. und Dougherty, M. P. Raisin dietary fiber composition and *in vitro* bile acid binding. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 834-837.
- (73) Kritchevsky, D. *In vitro* binding of bile acids and other lipids by dietary fiber. *Agr. Food Ind. Hi Tec.* **1996**, *7*, 27-29.
- (74) Chen, M. L.; Chang, S. C. und Guoo, J. Y. Fiber contents of some chinese vegetables and their *in vitro* binding capacity of bile acids. *Nutr. Rep. Int.* **1982**, *26*, 1053-1059.
- (75) Carpita, N. C. The chemical structure of the cell walls of higher plants. In *Dietary fiber: Chemistry, physiology and health effects*; D. Kritchevsky; C. Bonfield und J. W. Anderson, Eds.; Plenum Press: New York, 1990; pp 15-30.
- (76) Manas, E.; Bravo, L. und Saura-Calixto, F. Sources of error in dietary fibre analysis. *Food Chem.* **1994**, *50*, 331-342.
- (77) Bunzel, M. und Ralph, J. NMR Characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8352-8361.
- (78) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. und Quideau, S. *p*-Hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2530-2532.
- (79) Grabber, J. H.; Ralph, J. und Hatfield, R. D. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferaldehyde. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, *78*, 81-87.

- (80) Grabber, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* **2005**, *45*, 820-831.
- (81) Hatfield, R. D.; Ralph, J. und Grabber, J. H. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Sci.* **1999**, *39*, 27-37.
- (82) Bourquin, L. D.; Titgemeyer, E. C. und Fahey, G. C. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr. Res.* **1996**, *16*, 1119-1131.
- (83) Begum, A. N.; Nicolle, C.; Mila, I.; Lapierre, C.; Nagano, K.; Fukushima, K.; Heinonen, S.-M.; Adlercreutz, H.; Remesy, C. und Scalbert, A. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 120-127.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Seit Jahrzehnten stehen Ballaststoffe aufgrund ihrer vielfältigen ernährungsphysiologischen Eigenschaften im Interesse der Forschung. Dennoch sind viele Fragen nach wie vor ungeklärt, sowohl die Ballaststoffstrukturen betreffend als auch die Wirkungsweisen einzelner Ballaststoffkomponenten im menschlichen Körper.

Während z. B. Diferulasäuren in Ballaststoffen und ihre Funktion als Cross-Links zwischen Polysacchariden intensiv untersucht wurden, war zu Beginn dieser Arbeit lediglich eine, als 5-5,8-O-4-gekoppelte Triferulasäure charakterisierte Triferulasäure-Struktur bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere bislang unbekannte Triferulasäuren aus Pflanzenmaterial (Maiskleie) nach alkalischer Hydrolyse mittels Sephadex LH-20-Chromatographie und semipräparativer HPLC erstmalig isoliert. Anhand ihrer MS- und 1D- bzw. 2D-NMR-Daten konnten diese als 8-8(zyklische Form),8-O-4- und 8-O-4,8-O-4-gekoppelte Triferulasäuren identifiziert werden. Im Gegensatz zu der bisher bekannten 5-5,8-O-4-Triferulasäure konnte bei der 8-8(zyklische Form),8-O-4-Triferulasäure aufgrund ihrer Struktur ein Bildungsmechanismus hergeleitet werden. Offen bleibt jedoch die Frage, wie viele Polysaccharidstränge über Ferulasäuretrimere verknüpft werden.

In dieser Arbeit wurde zur Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ein Zellwand-Modellsystem angewandt, das auf der künstlichen Lignifizierung von Maiszellwänden (Dehydrogenierungspolymer (DHP)-Zellwände) bzw. auf der Manipulation von Ferulasäure-Parametern (2-Aminoindan-2-Phosphonsäure (AIP)-Zellwände) beruht. Bei reproduzierbarer und vergleichbarer Protein-Polysaccharid-Zellwandmatrix wurden gezielt Ligningehalt und -zusammensetzung der DHP-Zellwände bzw. der Ferulasäuregehalt und die Diferulasäure-Cross-Link-Bildung der AIP-Zellwände variiert.

Mit Hilfe des Zellwand-Modellsystems wurde als viel diskutierter Wirkungsmechanismus von Ballaststoffen die Adsorption exogener als auch endogener Substanzen im menschlichen Dünndarm, verbunden mit einem Ausscheiden dieser Substanzen aus dem Körper, untersucht. Die Adsorption von heterozyklischen aromatischen Aminen (HAA) wird z. B. in Zusammenhang mit einer Reduzierung des Krebsrisikos gebracht, während die Adsorption von Gallensäuren bezüglich einer Senkung des Cholesterinspiegels und für einige sekundäre Gallensäuren ebenfalls bezüglich eines verminderten Krebsrisikos diskutiert wird. Hierbei werden im Allgemeinen für die Ballaststoffkomponente Lignin besonders ausgeprägte Adsorptionseigenschaften vermutet. Die Wirkung von zellwandgebundener Ferulasäure und Diferulasäure-Cross-Links auf die Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen wurde bislang noch nicht untersucht.

Anhand von *in vitro*-Studien, in deren Mittelpunkt die Inkubation von Zellwänden mit HAA unter den Dünndarm (bzw. das distale Kolon) simulierenden Bedingungen und die anschließende Quantifizierung der nicht adsorbierten HAA mittels HPLC stand, wurde die Adsorption der HAA 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin (MeIQx), 2-Amino-3-methylimidazo-

[4,5-*f*]chinolin (IQ), 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) und 2-Amino-9H-pyrido[2,3-*b*]indol (AαC) an DHP- und AIP-Zellwände bestimmt. Die Adsorption der HAA an AIP-Zellwände lag, je nach untersuchtem HAA, zwischen 8 und 37 %. Hierbei hatte weder der Gesamtferulasäuregehalt noch das Ausmaß der Cross-Link-Bildung durch Diferulasäuren einen Einfluss auf die Adsorption der HAA. Die Studien mit den DHP-Zellwänden zeigten, dass lignifizierte Ballaststoffe unter den Dünndarm simulierenden Bedingungen insbesondere die hydrophoben HAA PhIP und AαC effektiv adsorbierten (28 - 58 % bzw. 35 - 72 %), während die Adsorption der hydrophileren HAA MeIQx und IQ sehr viel geringer war (13 - 29 % bzw. 16 - 29 %). Ein Einfluss der Ligninkonzentration auf die Adsorption wurde für alle vier HAA nachgewiesen. Den stärksten Einfluss hatte die Lignifizierung auf die Adsorption von PhIP und AαC, die im Vergleich zu der Adsorption an nicht lignifizierte Zellwände um das bis zu Zwei- bis Dreifache erhöht war. Die Ligninzusammensetzung der DHP-Zellwände wirkte sich ebenfalls auf die Adsorption der HAA aus. Während PhIP und AαC bevorzugt an Guaiacyl-ligninhaltige Zellwände adsorbierten, war die Adsorption von IQ unabhängig von der Guaiacyl/Syringyl-Natur des Lignins in den Zellwänden. MeIQx wies eine erhöhte Affinität zu Syringyl-ligninhaltigen Zellwänden auf. Aber auch die Integration anderer, eher untypischer 4-Hydroxyphenylpropanoide wie Coniferaldehyd, 5-Hydroxyconiferylalkohol, Dihydroconiferylalkohol und γ -acetyliertem Sinapylalkohol in die DHP-Zellwandkomplexe führte zu variierenden Adsorptionseigenschaften.

Die im Dünndarm an lignifizierte Ballaststoffe adsorbierten HAA sind während der weiteren Passage durch den Gastrointestinaltrakt einer Vielzahl, die Adsorption beeinflussende Faktoren ausgesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Einfluss einer pH-Wert-Verschiebung von 6,5 (Dünndarm) auf 7,4 (distales Kolon) sowie die Auswirkung einer partiellen Fermentation mit humaner Darmmikrobiota auf die *in vitro*-Adsorption von PhIP und AαC an DHP-Zellwände bestimmt. Während die Adsorption von PhIP an DHP-Zellwände bei pH 7,4 im Vergleich zu 6,5 im Allgemeinen signifikant kleiner war, wurde die Adsorption von AαC durch die pH-Wert-Verschiebung nur an Zellwände mit gemischtem Guaiacyl/Syringyl-Lignin signifikant reduziert. Im Vergleich zu der Adsorption an nicht fermentierte DHP-Zellwände, war die Adsorption von AαC an die nach 8- bzw. 24- stündiger Fermentation erhaltenen Zellwandrückstände um bis zu ein Drittel verringert, während die Adsorption von PhIP sich als unabhängig vom Fermentationsgrad der Zellwände erwies. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass während des Transportes der an lignifizierte Ballaststoffe adsorbierten HAA durch den Dün- und Dickdarm durch pH-Wert-Verschiebung und Fermentation eine teilweise Freisetzung dieser erfolgen kann. Die Folgen einer Freisetzung von HAA wie z. B. mikrobielle Transformation oder Absorption sind bislang unklar.

Analog zu den Adsorptionsstudien der HAA wurde die Adsorption der primären Gallensäuren Glycocholol, Taurocholol und Glycochenodesoxycholol (den Dünndarm simulierend) sowie der sekundären Gallensäure Desoxycholol (das distale Kolon simulierend) an DHP-Zellwände untersucht. Die Quantifizierung der Gallensäuren erfolgte mittels HPLC-UV bzw. Enzymatik. Glycochenodesoxycholol erzielte die höchsten Adsorptionsraten (17 - 31 %), gefolgt von Glycocholol (12 - 19 %) und schließlich Desoxycholol und Taurocholol (6 - 16 % bzw. 6 - 12 %). Die Ergebnisse deuten an, dass Glycinkonjugate von lignifizierten Zellwänden besser

adsorbiert werden als Taurinkonjugate und dass eine verminderte Anzahl an Hydroxylgruppen am Steroidgerüst eine Adsorption begünstigt. Entgegen der in der Literatur häufig vertretenen Hypothese, dass Lignin eine effektive Adsorption von Gallensäuren bewirkt, konnte anhand dieser *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass sich weder die Ligninkonzentration noch die Ligninzusammensetzung von Pflanzenzellwänden auf die Adsorption von Gallensäuren auswirkt. Dies stellt die in zahlreichen Studien vorgeschlagenen hydrophoben Wechselwirkungen als Grundlage der Adsorption von Gallensäuren an Ballaststoffe in Frage.

Schließlich wurde die Rolle von zellwandgebundener Ferulasäure und Diferulasäure-Cross-Links sowie von Lignin bei der Fermentation von Ballaststoffen im menschlichen Darm untersucht. In *in vitro*-Studien wurden AIP- sowie DHP-Zellwände für 4, 8 und 24 Stunden mit humanen Fäzesproben fermentiert. Der Zellwandabbau wurde gravimetrisch bestimmt und die Zellwandrückstände bezüglich ihrer Kohlenhydrat-Zusammensetzung sowie des Klason-Ligningehaltes analysiert. Der Zellwandabbau der AIP-Zellwände betrug im Durchschnitt nach 4-stündiger Fermentation 5 %, nach 8 Stunden 24 % und nach 24 Stunden 65 %. Hierbei wurden vor allem die Kohlenhydrate der Hemicellulosen (z. B. Arabinoxylane, β -Glucane) freigesetzt, während Cellulose gegenüber einem Abbau resistent war. Entgegen der in der Literatur häufig beschriebenen These, dass Ferulate den fermentativen Abbau von Pflanzenzellwänden hemmen, zeigten die Studien dieser Arbeit, dass weder moderate Ferulasäuregehalte noch das Ausmaß der Polysaccharidquervernetzung durch Diferulasäure-Cross-Links die durch die menschliche Darmflora bedingte Fermentation von Pflanzenzellwänden beeinflussen. Sowohl Ferulate als auch Diferulate wurden während der Fermentation effektiv freigesetzt. Ob die Freisetzung in Form der freien Säuren oder an Oligosaccharide gebunden erfolgt, bleibt ungeklärt. Fermentationsstudien mit DHP-Zellwänden zeigten, dass der Lignin-gehalt mit einer verminderten fermentativen Abbaubarkeit der DHP-Zellwände korreliert. 15 % Guaiacyl-Lignin in den DHP-Zellwänden reduzierte z. B. den Zellwandabbau im Vergleich zu nicht lignifizierten Zellwänden nach 8-stündiger Fermentation von 12 auf 2 % und nach 24-stündiger Fermentation von 51 auf 8 %. Nach 24-stündiger Fermentation war zusätzlich ein Einfluss der Ligninzusammensetzung zu erkennen, wobei Guaiacyl-Lignin im Vergleich zu Guaiacyl/Syringyl-Lignin den Zellwandabbau stärker hemmte.

SUMMARY

Due to their impact on various health benefits, dietary fibers have been of interest to researchers for decades. Nevertheless, many questions still need to be answered. Both dietary fiber structures and the effects of dietary fiber components on human health are a matter of interest.

Diferulates in dietary fibers and their cross-linking function between polysaccharides were extensively investigated in the past but by the time starting this thesis, only one triferulate structure was known, characterized as 5-5,8-O-4-coupled triferulic acid. Here, two additional, formerly unknown triferulic acids were isolated from plant material (maize bran) by Sephadex LH-20 chromatography and semipreparative HPLC. On the basis of MS and 1D- 2D-NMR data, these triferulates were identified as 8-8(cyclic form),8-O-4- and 8-O-4,8-O-4-coupled triferulic acid, respectively. In contrast to the already known 5-5,8-O-4-triferulic acid, the structure of the 8-8(cyclic form),8-O-4-triferulic acid enabled us to conclude a formation mechanism. It is still not possible to conclude on the number of polysaccharide chains cross-linked by ferulate trimers.

In this thesis, cell wall model systems were used to elucidate structure-function relationships. These model systems were based on the artificial lignification of maize cell walls (dehydrogenation polymer (DHP)-cell walls) and manipulation of ferulate related parameters (2-aminoindan-2-phosphonic acid (AIP)-cell walls), respectively. Having a reproducible and comparable protein-polysaccharide-cell wall matrix, lignin concentration and composition of DHP-cell walls as well as ferulate concentration and diferulate cross-link formation of AIP-cell walls were varied.

Using these cell wall model systems, the adsorption of exogenous and endogenous substances to dietary fiber in the human small intestine followed by the excretion of these substances, a widely discussed mechanism of dietary fibers to contribute to health benefits, was investigated. For example, the adsorption of heterocyclic aromatic amines (HAAs) is thought to reduce cancer risk, while the adsorption of bile acids is discussed in the context of lowering blood cholesterol and, for some secondary bile acids, also in the context of reducing cancer risk. Generally, the dietary fiber component lignin is supposed to be an effective adsorber. The influence of cell wall bound ferulic acid and diferulate cross-linking on the adsorption properties of dietary fibers has not been investigated to date.

The adsorption of the HAAs 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), and 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (AαC) to DHP- and AIP-cell walls was determined in *in vitro* studies, which were based on incubation of the cell walls with HAAs under conditions simulating the small intestine (and the distal colon, respectively), followed by quantification of non-adsorbed HAAs by HPLC. HAA adsorption rates to AIP-cell walls were between 8 and 37 %, depending on the investigated HAA. Neither total ferulate concentration

nor degree of diferulate cross-linking in AIP-cell walls influenced HAA adsorption. Studies with DHP-cell walls showed that lignified fibers effectively adsorb the hydrophobic HAAs PhIP and A α C under conditions simulating the small intestine (28 - 58 % and 35 - 72 %, respectively), whereas the adsorption of the less hydrophobic HAAs MeIQx and IQ was much lower (13 - 29 % and 16 - 29 %, respectively). The influence of lignin concentration on HAA adsorption was proven. The adsorption of PhIP and A α C to DHP-cell walls was most effectively influenced by lignification, being up to 2- to 3-fold higher than the adsorption to non-lignified cell walls. Lignin composition also affected HAA adsorption. While PhIP and A α C were better adsorbed by DHP-cell walls containing guaiacyl-lignin, the adsorption of IQ to DHP-cell walls was independent from the lignin's guaiacyl-syringyl-nature. MeIQx showed a higher affinity to DHP-cell walls containing syringyl-lignin. Integration of rather untypical 4-hydroxyphenylpropanoids like coniferyl aldehyde, 5-hydroxyconiferyl alcohol, dihydroconiferyl alcohol and γ -acetylated sinapyl alcohol into the DHP-cell wall complexes led to varying adsorption properties as well.

HAAs that are adsorbed to lignified fibers in the small intestine are exposed to a variety of factors possibly affecting the adsorption while further passing the intestine. The influence of a pH-drift from 6.5 (small intestine) to 7.4 (distal colon) and the effect of partial fermentation by human fecal microbiota on the *in vitro* adsorption of PhIP and A α C to DHP-cell walls were determined. At a pH of 7.4, the adsorption of PhIP was significantly lower to most DHP-cell walls if compared to a pH of 6.5. The adsorption of A α C, however, was only significantly reduced by the pH-drift to cell walls with mixed guaiacyl/syringyl-lignin. Compared to the adsorption to unfermented DHP-cell walls, the adsorption of A α C to cell wall residues recovered after 8 or 24 hours of fermentation was reduced by up to a third, whereas the adsorption of PhIP was not influenced by cell wall fermentation. The results show that due to both pH-drift and fermentation, HAAs adsorbed to lignified fibers may be partly released during passage through the small and large intestine. To date, the consequences of HAA release in the colon such as microbial HAA transformation or absorption remain unclear.

In analogy to the HAA adsorption studies, adsorption of the primary bile acids glycocholate, taurocholate, glycochenodeoxycholate (simulating the small intestine) and the secondary bile acid deoxycholate (simulating the distal colon) to DHP-cell walls was investigated. Quantification of bile acids was performed by HPLC and enzymatic assays, respectively. Glycochenodeoxycholate showed the highest adsorption rates (17 - 31 %), followed by glycocholate (12 - 19 %), and finally deoxycholate and taurocholate (6 - 16 % and 6 - 12 %, respectively). The results indicate that glycine conjugates are better adsorbed by lignified cell walls than taurine conjugates, and that a reduced number of hydroxyl groups at the steroid nucleus promote adsorption. However, in contrast to an often discussed hypothesis arguing that lignin is an effective adsorber of bile acids, our *in vitro* studies showed that neither lignin concentration nor lignin composition affect the adsorption of bile acids to plant cell walls. These results also challenge an often discussed adsorption mechanism that describes hydrophobic interactions as basis for bile acid adsorption to dietary fiber.

Finally it was investigated how cell wall bound ferulates, diferulate cross-links, and lignin influence dietary fiber fermentation by human gut microorganisms. AIP- and DHP-cell walls were fermented *in vitro* by human feces samples for 4, 8, and 24 hours. Cell wall degradation was determined gravimetrically and cell wall residues were analyzed for carbohydrate composition and Klason lignin concentration. The cell wall degradation of AIP-cell walls averaged 5 % after 4 hours of fermentation, 24 % after 8 hours, and 65 % after 24 hours. In the course of fermentation, carbohydrates deriving from hemicelluloses (e.g. arabinoxylans, β -glucans) were primarily released, whereas cellulose was resistant against degradation. Contrary to an often described hypothesis, that ferulates impede the fermentative degradation of plant cell walls, these studies showed that neither moderate ferulate concentrations nor the degree of polysaccharide cross-linking by diferulates influence the plant cell wall fermentation by human gut microorganisms. Both ferulate and diferulates were effectively released during fermentation. Whether ferulates and diferulates are released as free acids or still linked to oligosaccharides remains to be elucidated. Fermentation studies with DHP-cell walls demonstrated that lignin concentrations in the DHP-cell walls correlate with a reduced microbial cell wall degradation. For example, compared to nonlignified cell walls, a proportion of 15 % guaiacyl-lignin in the DHP-cell walls decreased cell wall degradation from 12 to 2 % after 8 hours of fermentation and from 51 to 8 % after 24 hours of fermentation. Additionally, an influence of lignin composition on cell wall degradation was detected after 24 hours of fermentation showing that guaiacyl-lignin impedes cell wall degradation more heavily than guaiacyl/syringyl-lignin.

6 ANHANG

6.1 Liste der Publikationen

Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber, *European Food Research and Technology*, 217, 128-133, 2003.

Bunzel, M., Funk, C., Steinhart, H., Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran, *Journal of Separation Science*, 27, 1080-1086, 2004.

Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H., Bunzel, M., Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran, *Phytochemistry*, 66(3), 363-371, 2005.

Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran, *Tetrahedron Letters*, 46, 5845-5850, 2005.

Funk, C., Weber, P., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Binding of heterocyclic aromatic amines to specifically lignified maize cell walls, *EURO FOOD CHEM XIII Proceedings Volume 1*, 306-309, 2005.

Funk, C., Weber, P., Thilker, J., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1860-1867, 2006.

Funk, C., Braune, A., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2418-2423, 2007.

Funk, C., Braune, A., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Model studies of lignified fiber fermentation by human fecal microbiota and its impact on heterocyclic aromatic amine adsorption, *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 624 (1-2), 41-48, 2007.

Funk, C., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Artificial lignification of maize cell walls does not affect *in vitro* bile acid adsorption, *Cereal Chemistry*, in press, 2007.

6.2 Liste der Vorträge

Funk, C., Weber, P., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Binding of heterocyclic aromatic amines to specifically lignified maize cell walls, EURO FOOD CHEM XIII, Hamburg, September 2005.

Funk, C., Weber, P., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Bindung von heterozyklischen aromatischen Aminen an gezielt lignifizierte Getreidezellwände, 56. Tagung für Getreidechemie, Detmold, Juni 2005.

Funk, C., Braune, A., Steinhart, H., Bunzel, M., Fermentation künstlich lignifizierter Maiszellwände durch die menschliche Darmflora, Regionaltagung Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Gießen, März 2007.

6.3 Liste der Poster

Funk, C., Steinhart, H., Bunzel, M., Präparative Isolierung von Dehydrodiferulasäuren aus Maiskleie, 31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt am Main, September 2002.

Funk, C., Febiri, M., Steinhart, H., Bunzel, M., Dehydrotriferulasäuren in Getreideballaststoffen, 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, September 2004.

Funk, C., Grabber, J.H., Weber, P., Thilker, J., Steinhart, H., Bunzel, M., Influence of lignin on the adsorption of heterocyclic aromatic amines by insoluble fiber, Dietary Fibre 2006 Multifunctional Complex of Components, Helsinki, Juni 2006.

Funk, C., Braune, A., Grabber, J.H., Steinhart, H., Bunzel, M., Einfluss von Lignin und Ferulasäure auf die Fermentation von Maiszellwänden, 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, September 2006.