Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Komponenten in Maisballaststoffen und ihr Einfluss auf den mikrobiellen Abbau

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
des Departments Chemie der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie,
Abteilung Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Ella Allerdings
aus Naltschik

Hamburg 2007

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2001 bis Oktober 2004 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping

Begutachtende der Disputaion:

Prof. Dr. Dr. Steinhart

Prof. Dr. E. Stahl-Biskup

Dr. A. Paschke

Tag der Disputation: 21.12.2007

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des GRK 464 und von der H. Wilhelm Schaumann Stiftung finanziell gefördert.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart und Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferates und für die Unterstützung bei der Durchführung von mikrobiologischen Untersuchungen.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel für seine kompetente Unterstützung, wertvolle Diskussionen und Korrektur der Arbeit aussprechen.

Herzlicher Dank geht an Nadine Stein, Wiebke Puschmann, Diana Gniechwitz, Christine Westphal und Andreas Heinze, die tatkräftig am Gelingen der Arbeit mitgewirkt haben.

Herrn Prof. Dr. John Ralph und Herrn Dr. Volker Sinnwell möchte ich für die zuverlässige Aufnahme der NMR-Spektren und Herrn Dr. Paul Schatz für die Durchführung der mathematischen Simulation des ^{1}H-NMR-Spektrums bedanken. Mein Dank gilt auch Fernando Campos Ziegenbein und Carolin Kellersmann für die praktische Unterstützung.

Bei den Mitgliedern des Arbeitskreises Lebensmittelchemie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima. In besonderer Weise danke ich der Arbeitsgruppe Ballaststoffe mit Prof. Dr. Mirko Bunzel, Carola Funk, Diana Gniechwitz, Diane Dobberstein, Reiko Yonekura und Andreas Heinze für die vielen netten Momente im Labor und privat, die noch lange in Erinnerung bleiben werden.

Herrn Dr. Christian Wunderlich danke ich für die Durchsicht des Skriptes.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Alexander, meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und an das Gelingen dieser Arbeit geglaubt haben.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

1.1 Definition von Ballaststoffen 1

1.2 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Ballaststoffen 2

1.3 Ballaststoffkomponenten 4
1.3.1 Zellwandpolysaccharide 4
1.3.2 Lignin 6
1.3.3 Phenolcarbonsäuren und ihre Funktion als Crosslinks in Getreideballaststoffen 6

1.4 Fermentation im menschlichen Dickdarm 12

1.5 Problemstellung 14

2 MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Pflanzliches Untersuchungsmaterial 16

2.2 Bakterienstämme 17

2.3 Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Sacchariden aus Maiskleie 18
2.3.1 Gewinnung unlöslicher Ballaststoffe 18
2.3.2 Saure Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe 19
2.3.3 Reinigung des Hydrolysates an Amberlite® XAD-2 19
2.3.4 Fraktionierung von monomeren Phenolcarbonsäure-Sacchariden an Sephadex™ LH-20 20
2.3.5 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Oligosacchariden an Sephadex™ LH-20 bzw. Bio-Gel® P-2 21
2.3.6 Charakterisierung der isolierten GPC-Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS 21
2.3.7 Reinigung bzw. weitere Fraktionierung der isolierten GPC-Fraktionen 22
2.3.8 Bestimmung der relativen Molekülmasse mittels MS 23
2.3.9 Identifizierung der Kohlenhydratkomponenten der isolierten Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Saccharide 24
2.3.10 Identifizierung der Dehydrodiferulasäuren der isolierten Dehydrodiferulasäure-Saccharide 25
2.3.11 Identifizierung isolierter Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Saccharide mittels NMR 25
2.3.12 Identifizierung isolierter Phenolcarbonsäure-Oligosaccharide mittels Methylierungsanalyse 28
2.3.13 Zusammenfassung der Methoden zur Isolierung und Identifizierung von monomeren Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Sacchariden aus Maiskleie 30

2.4 Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung 31
2.4.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien 31
2.4.2 Fermentation von 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose und β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose durch ausgewählte Bakterienstämme 31
2.4.3 Mikrobiologische und chemische Bestimmungen nach mikrobieller Fermentation der Substrate 33

2.4.4 Zusammenfassung der Methoden zur mikrobiologischen *in vitro* Untersuchung 36

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 37

3.1 Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Sacchariden aus Maiskleie 37
3.1.1 Isolierung und Identifizierung von zwei Ferulasäure-Oligosacchariden aus der Fraktion F1 38
3.1.1.1 Identifizierung der Fraktion F1a 39
3.1.1.2 Identifizierung der Fraktion F1b 48
3.1.2 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Oligosaccharids aus der Fraktion F2 52
3.1.3 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Saccharids aus der Fraktion F3 57
3.1.4 Isolierung und Identifizierung von zwei Phenolcarbonsäure-Sacchariden aus der Fraktion F4 58

3.2 Isolierung und Identifizierung von DFS-Sacchariden aus Maiskleie 61
3.2.1 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden mittels GPC an Sephadex™ LH-20 und Identifizierung von ausgewählten gereinigten Fraktionen 61
3.2.2 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden mittels GPC an Bio-Gel® P-2 und Identifizierung von ausgewählten gereinigten Fraktionen 73
3.2.2.1 Strukturcharakterisierung der gereinigten Fraktion F2ger-Bio 75
3.2.2.2 Strukturcharakterisierung der Komponenten F3a-Bio und F3b-Bio 81

3.3 Rückschlüsse aus den identifizierten Verbindungen auf die Struktur und Abbaubarkeit der Heteroxylane aus Maiskleie 86

3.4 *In vitro* Fermentation von 5-*O-trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose und β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O-trans*-feruloyl-L-arabinofuranose mit einzelnen Bakterienstämmen 88

4 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY 105

5 ANHANG 109

5.1 Arbeitsvorschriften 109
5.1.1 Gewinnung unlöslicher Ballaststoffe 109
5.1.2 Saure Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe 109
5.1.3 Isolierung von Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Sacchariden 110
5.1.3.1 Reinigung des sauren Hydrolysates an Amberlite® XAD-2 110
5.1.3.2 Fraktionierung von Phenolcarbonsäure-Sacchariden mittels GPC an Sephadex™ LH-20 110
5.1.3.3 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden 111
5.1.3.4 Charakterisierung der isolierten GPC-Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS 111
5.1.3.5 Reinigung bzw. weitere Fraktionierung von monomeren Phenolcarbonsäure-Sacchariden 112
5.1.3.6 Reinigung bzw. weitere Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden mittels semipräparativer HPLC 112
5.1.4 Identifizierung der isolierten Phenolcarbonsäure-/Dehydrodiferulasäure-Saccharide 113
5.1.4.1 Identifizierung mittels MS 113
5.1.4.2 Identifizierung von Monosacchariden als Alditolacetate mittels GC 113

5.1.4.3 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Monosacchariden durch eine GC-Analyse an einer chiralen stationären Phase 114
5.1.4.4 Identifizierung von Dehydrodiferulasäuren mittels HPLC 114
5.1.4.5 Identifizierung mittels NMR 115
5.1.4.6 Identifizierung mittels Methylierungsanalyse 115
5.1.5 Mikrobiologische Untersuchungen 116
5.1.5.1 Kultivierung und Lagerung von Einzelbakterienstämmen 116
5.1.5.2 Fermentation von 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose bzw. β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose mit Einzelbakterienstämmen (der Gattung *Bifidobakterium* und *Bacteroides*) 118
5.1.5.3 Bestimmungen nach der Fermentation 120

5.2 Chromatographiebedingungen, Geräte- und Messparameter 123
5.2.1 GPC 123
5.2.1.1 GPC an Sephadex™ LH-20 123
5.2.1.2 GPC an Bio-Gel® P-2 124
5.2.2 HPLC 124
5.2.2.1 Charakterisierung der isolierten GPC-Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS 124
5.2.2.2 Reinigung bzw. Fraktionierung von ausgewählten monomeren Phenolcarbonsäure-Saccharide mittels semipräparativer HPLC 126
5.2.2.3 Reinigung bzw. Fraktionierung von ausgewählten Dehydrodiferulasäure-Saccharide mittels semipräparativer HPLC 126
5.2.2.4 Identifizierung von Dehydrodiferulasäuren 127
5.2.2.5 Quantifizierung von 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose bzw. β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose neben *trans*-Ferulasäure nach mikrobiologischen Untersuchungen 128
5.2.2.6 Charakterisierung der Verbindungen nach mikrobiologischen Untersuchungen mittels HPLC-DAD-MS 129
5.2.2.7 Quantifizierung von kurzkettigen Fettsäuren nach mikrobiologischen Untersuchungen 130
5.2.3 GC 131
5.2.3.1 Identifizierung von Monosacchariden als Alditolacetate aus isolierten monomeren Phenolcarbonsäure-Saccharide 131
5.2.3.2 Identifizierung von Monosacchariden als Alditolacetate aus isolierten Dehydrodiferulasäure-Verbindungen und nach mikrobiologischen Untersuchungen 131
5.2.3.3 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Monosacchariden aus isolierten Phenolcarbonsäure-Saccharide 132
5.2.3.4 Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosaccharide mittels Methylierungsanalyse / GC-MS 132
5.2.4 Hochauflösende MS 133
5.2.5 NMR 133
5.2.6 Sonstige Geräte und Hilfsmittel 134

5.3 Spektren, Diagramme, Chromatogramme und Tabellen 135

5.4 Verwendete Enzyme, Nährmedien und Chemikalien 144

6 LITERATUR 146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Arabinose (in Abbildungen)
AACC	American Association of Cereal Chemists
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AP	Atmospheric Pressure
Ara bzw. Ara*f*	Arabinose bzw. Arabinofuranose (in Tabellen und Abbildungen)
ATCC	American Type Culture Collection
autokl.	autoklaviert (in Tabellen)
ax	axial
bidest.	bidestilliert
COSY	Correlated Spectroscopy
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
DAD	Dioden-Array-Detektor
DFS	Dehydrodiferulasäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EI	Elektronenstoßionisation
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutriation
eq	äquatorial
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Ferulasäure (in Tabellen und Abbildungen)
FA	5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose
FAX	β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
FAXG	α-L-Galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
FAXGG	α-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
FAXGX	α-D-Xylopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
FID	Flammenionisationsdetektion / Flammenionisationsdetektor
G	Galactose (in Abbildungen)
Gal*p*	Galactopyranose (in Tabellen)
GC	Gaschromatographie
ger	gereinigt
Gew.	Gewicht

Glc	Glucose (in Tabellen und Abbildungen)
GPC	Gelpermeationschromatographie
HD	High Density
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IS	interner Standard
KBE	Kolonie bildende Einheiten
MO	Mikroorganismensuspension (in Tabellen und Abbildungen)
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
n. b.	nicht bestimmt (in Tabellen)
NMR	Kernresonanzspektroskopie, Nuclear Magnetic Resonance
OMe	Methoxyl-Gruppe (in Tabellen und Abbildungen)
pC	*p*-Cumarsäure (in Abbildungen)
pCA	5-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-L-arabinofuranose
PCS	Phenolcarbonsäuren
PMAA	partiell methylierte Alditolacetate
Ref.	Referenz (in Tabellen)
RP	Reversed-Phase
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (short-chain fatty acids)
TeFS	Dehydrotetraferulasäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFS	Dehydrotriferulasäure
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
X	Xylose (in Abbildungen)
Xyl bzw. Xyl*p*	Xylose bzw. Xylopyranose (in Tabellen und Abbildungen)

Symbole:

${}^{n}J$	Kopplungskonstante über *n* Bindungen
δ_C	Chemische Verschiebung des ^{13}C-Atoms
δ_H	Chemische Verschiebung des Protons

1 Einleitung und Problemstellung

Ballaststoffe sind wichtige Lebensmittelbestandteile. Es besteht derzeit kein Zweifel daran, dass sie entgegen ihrer Bezeichnung keinen Ballast in der Nahrung darstellen, sondern die Gesundheit des Menschen überwiegend positiv beeinflussen. Von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung wurde bereits 1985 empfohlen, 30 g Ballaststoffe pro Tag aufzunehmen. Die statistisch ermittelte tägliche Aufnahme von Ballaststoffen in den meisten europäischen Ländern liegt jedoch deutlich unter diesem Richtwert.

Ballaststoffreiche Nahrung besitzt nachweislich Cholesterin senkende, Blutzucker regulierende und abführende Eigenschaften. Auch eine präventive Wirkung bezüglich der Entstehung von Darmkrebs wird mit einem vermehrten Verzehr von Ballaststoffen in Verbindung gebracht. Die positiven ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen stehen im engen Zusammenhang mit den chemischen Strukturen ihrer Komponenten, welche bislang nur unzureichend charakterisiert sind. Die Strukturaufklärung der Ballaststoffkomponenten und der Einfluss der einzelnen Strukturen auf die physiologischen Effekte ist daher von großem Interesse. Besonders Getreideballaststoffe, in vielen Ländern die bedeutendste Ballaststoffquelle, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Bei der Erforschung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen gilt den phenolischen Strukturmerkmalen besonderes Interesse. Eine wichtige phenolische Komponente der Getreideballaststoffe ist die Ferulasäure, die in der Pflanzenzellwand gebunden vorliegt und in der Lage ist, Polysaccharidstränge, Polysaccharide und Lignin oder Polysaccharide und Proteine zu verknüpfen. Da der Verknüpfungsgrad im Zusammenhang mit einigen physikochemischen Eigenschaften genannter Makromoleküle steht, wird angenommen, dass sich dies auf die funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen auswirkt. Viele physiologische Eigenschaften der Ballaststoffe hängen eng mit ihrer Abbaubarkeit durch Mikroorganismen im Dickdarm zusammen. Deswegen spielt die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Mikroflora im Dickdarm und den Ballaststoffkomponenten eine wichtige Rolle in der heutigen Forschung.

1.1 Definition von Ballaststoffen

Die Definition von Ballaststoffen (englisch dietary fibre) unterliegt bis heute einer Entwicklung.

Unter dem Begriff „dietary fibre“ wurden erstmals vor ca. 50 Jahren unverdauliche Bestandteile der Pflanzenzellwände zusammengefasst (Hipsley, 1953). Später wurde dieser Begriff von Trowell, Burkitt, Painter und Walker aufgenommen und mit einer Anzahl gesundheitsbezogener Hypothesen in Verbindung gebracht (Burkitt et al., 1972, Trowell, 1972a, 1972b, 1974). Dabei definierten sie Ballaststoffe als „Überreste pflanzlicher Bestandteile, die gegenüber der Hydrolyse durch menschliche Verdauungsenzyme resistent

sind“ (Trowell, 1974). Seitdem wurde die Definition von Ballaststoffen ständig verändert, bis sie zuletzt 2001 im Auftrag der American Association of Cereal Chemistry (AACC) von einem wissenschaftlichen Komitee aktualisiert wurde. Sie ist allgemein anerkannt und basiert auf den Ergebnissen jahrzehntelanger Forschung (AACC-Report, 2001):

„Ballaststoffe sind essbare Pflanzenteile oder analoge Kohlenhydrate, die gegenüber der Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden. Zu den Ballaststoffen gehören Polysaccharide, Oligosaccharide, Lignin und assoziierte Pflanzenstoffe. Ballaststoffe fördern positive physiologische Vorgänge: Sie besitzen abführende Eigenschaften und/oder eine Blutcholesterinspiegel senkende und/oder Blutzuckerspiegel regulierende Wirkung.“

1.2 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Ballaststoffen

Schon in der Definition von Ballaststoffen finden gut untersuchte spezifische physiologische Eigenschaften von Ballaststoffen, wie die Blutcholesterin senkende und Blutzuckerspiegel regulierende Wirkung sowie deren abführende Effekte, Erwähnung. Deswegen ist es unbestritten, dass sie, ihrer deutschen Bezeichnung zum Trotz, kein unnötiger Ballast in der Ernährung sind, sondern einen positiven Einfluss auf die Gesundheit der Menschen ausüben können.

Eine ballaststoffreiche Kost geht in der Regel mit einem niedrigen Verzehr an Fett, gesättigten Fettsäuren, Cholesterin und tierischem Eiweiß einher und führt üblicherweise zu einem reduzierten Energiegehalt der Nahrung bei größerem Nahrungsvolumen. Durch die verringerte Energieaufnahme bei gleichzeitig größerem und lang anhaltendem Sättigungsgefühl wird Fettleibigkeit vorgebeugt (McDougall et al., 1996).

In zahlreichen Studien wurde den Ballaststoffen eine Blutzucker regulierende Wirkung zugeschrieben. Insbesondere für lösliche Ballaststoffe, wie z. B. β-Glucane oder Pektine, wurde ein Blutzucker senkender Effekt gezeigt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass einige Ballaststoffe in der Lage sind, hochviskose Lösungen zu bilden. Durch die Erhöhung der Viskosität der aufgenommenen Nahrung wird die Magenentleerung verlangsamt und die Diffusion von Glucose zur Dünndarmschleimhaut verzögert. Dadurch wird die Absorption verlangsamt und der Blutzuckeranstieg reduziert (Plaami, 1997).

Vornehmlich lösliche Ballaststoffe zeigen einen Blutcholesterin senkenden Effekt. Dadurch wird das Risiko, an Arteriosklerose und deren Folgen zu erkranken, vermindert. Die Blutcholesterin senkende Wirkung ist nach derzeitigem Wissensstand zum einen auf ihre Fähigkeit, Gallensäuren zu binden bzw. zu adsorbieren, zurückzuführen. Dadurch wird der Gallensäurepool vermindert. Um ihn aufrechtzuerhalten, wird Cholesterin zur Gallensäuresynthese benötigt, was eine Senkung des Serumcholesterinspiegels zur Folge hat. Als Gallensäure adsorbierende Ballaststoffe wurden neben den löslichen Ballaststoffen auch unlösliche „lignifizierte“ Ballaststoffe beschrieben (Sayar et al., 2006). Ein anderer Grund für die Cholesterin senkende Wirkung ist die Fähigkeit der bei der Fermentation von

Ballaststoffen entstehenden kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, short-chain fatty acids), die Cholesterinsynthese in der Leber zu hemmen (Plaami, 1997). Ob die im Dickdarm gebildeten und zur Leber transportierten Mengen an SCFA, v.a. Propionat, tatsächlich ausreichen, um den erwähnten Effekt zu induzieren, ist fraglich.

Ein weiterer durch ballaststoffreiche Ernährung begünstigter Effekt ist die Erhöhung des Stuhlgewichtes und –volumens, wodurch die Darmperistaltik positiv beeinflusst und die gastrointestinale Transitzeit verkürzt wird. Obstipation und diversen Darmerkrankungen wird auf diese Weise vorgebeugt. Die Erhöhung des Stuhlgewichtes wird hauptsächlich auf die Quelleigenschaften (englisch Bulking) der Ballaststoffe, bedingt durch ein hohes Wasserbindungsvermögen, zurückgeführt. Insbesondere Ballaststoffe mit einem hohen Anteil an unlöslichen Ballaststoffkomponenten (z. B. Weizenkleie), die im Dickdarm nur teilweise fermentiert werden, besitzen ausgeprägte Bulking-Kapazität. Lösliche, weitgehend fermentierbare Ballaststoffe (z. B. Pektin, β-Glucane) weisen eine geringe Bulking-Kapazität auf, fördern aber das Bakterienwachstum im Dickdarm, wodurch die fäkale bakterielle Masse erhöht wird (McDougall et al., 1996).

Durch teilweise oder vollständige Fermentation von Ballaststoffen im Kolon entstehen u.a. SCFA (z. B. Acetat, Propionat, n-Butyrat) und organische Säuren (u.a. Milchsäure, Bernsteinsäure). Der dadurch erniedrigte pH-Wert stellt günstige Wachstumsbedingungen für bestimmte Mikroorganismen (z. B. Milchsäurebakterien) dar, die allgemein als gesundheitsfördernd angesehen werden (Blaut, 2002). Weiterhin wird durch Senkung des pH-Wertes die bakterielle Umwandlung von primären in sekundäre Gallensäuren gehemmt und die Löslichkeit der sekundären Gallensäuren, die im gelösten Zustand toxisch auf Kolonzellen wirken, herabgesetzt (Plaami, 1997). Ein besonderer Schutzeffekt bei der Kolonkarzinogenese wird n-Butyrat zugeschrieben, das in größeren Anteilen z. B. bei der Fermentation von bestimmten resistenten Stärke-Typen gebildet wird (Priebe et al., 2002). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass n-Butyrat das Wachstum von Krebszellen hemmt und Apoptose (programmierter Zelltod) induziert (Scheppach, 1996).

Die vor Dickdarmkrebs schützende Wirkung einer ballaststoffreichen Kost ist derzeit noch nicht hinreichend durch Ergebnisse von Langzeitstudien abgesichert. Obgleich einige epidemiologische Studien keinen Zusammenhang zwischen vermehrter Ballaststoffaufnahme und Senkung des Risikos, an Darmkrebs zu erkranken, zeigen konnten (Harris und Ferguson, 1999), wurde ein ebensolcher Effekt in der 2003 publizierten EPIC- (European Prospective Investigation into Cancer and Nutriation) Studie überzeugend dargestellt (Bingham et al., 2003). Da die Beziehung zwischen Ernährung und der Entstehung von Krankheiten sehr komplex ist und neben der aufgenommenen Menge an Ballaststoffen noch viele andere Faktoren berücksichtigt werden müssen, ist es äußerst schwierig, aussagekräftige Langzeitstudien durchzuführen.

1.3 Ballaststoffkomponenten

Gemäß Definition zählen viele Bestandteile der pflanzlichen Zellwände (z. B. Cellulose, Hemicellulosen, Pektin, Lignin), nicht verdaubare Speicherpolysaccharide (z. B. resistente Stärke, Inulin), Pflanzenschleime und Pflanzengummis sowie Zellwand assoziierte Substanzen (z. B. Wachse, Cutin, Tannine, Suberin, Saponine, Phytat) zu den Ballaststoffen. Des Weiteren sind den Ballaststoffen auch „analoge Kohlenhydrate“ zugeordnet. Hierunter versteht man technologisch veränderte Kohlenhydrate, die durch menschliche Enzyme nicht abgebaut werden (z. B. Polydextrose) (AACC-Report, 2001). Im Folgenden werden die Bestandteile der pflanzlichen Zellwand, die im Allgemeinen die bedeutendsten Ballaststoffkomponenten darstellen, näher vorgestellt.

1.3.1 Zellwandpolysaccharide

Das in der Natur meist verbreitete Polysaccharid ist ***Cellulose***. Cellulose besteht aus unverzweigten β-D-Glucopyranose-Einheiten, die (1→4)-glykosidisch gebunden sind. Aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen liegen die Cellulosemoleküle in Form von kompakten Aggregaten, den Mikrofibrillen, vor. Das Quellvermögen der Cellulose ist gering, ebenso wird sie durch Darmbakterien nicht abgebaut (Funk et al., 2007).

Hemicellulosen sind der zweite Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand. Zu den wichtigsten Hemicellulosen gehören mixed-linked β-Glucane, Arabinoxylane und Xyloglucane. In den Zellwänden dikotyler Pflanzen dominieren Xyloglucane, während die Zusammensetzung der Hemicellulosen in den Zellwänden monokotyler Pflanzen stärker variabel ist. So enthalten z. B. Weizen, Roggen und Mais überwiegend Arabinoxylane, während in der Gerste und Hafer β-Glucane vorherrschend sind (McDougall et al., 1996).

Xyloglucane zeigen die Grundstruktur der Cellulose, sind aber regelmäßig in *O*-6-Position u.a. mit α-Xylopyranose-Einheiten substituiert (Pena et al., 2001). In den meisten Pflanzen besteht die Grundstruktur der Xyloglucane aus einer wiederkehrenden Heptasaccharid-Einheit, die eine Cellotetraose-Einheit und drei Xylose-Einheiten beinhaltet. In dikotylen Pflanzen kann der prozentuale Anteil der Xyloglucane bis zu 25 % an der Zellwand ausmachen. In den Zellwänden aus Getreide liegen nur geringe Gehalte an Xyloglucanen vor, die sich strukturell, z. B. durch einen geringeren Substitutionsgrad mit Xylose, von denen der dikotylen Pflanzen unterscheiden.

Neutrale Arabinoxylane sind v.a. im Getreideendosperm zu finden. Sie bestehen aus linearen (1→4)-gebundenen β-D-Xylopyranose-Einheiten, die unsubstituiert, in *O*-3- oder *O*-2-Stellung mit Arabinose-Einheiten monosubstituiert oder in *O*-3- und *O*-2-Stellung mit Arabinose-Einheiten disubstituiert sein können (Abb. 1.1) (Theander et al., 1993). Arabinoxylane weisen strukturelle Heterogenität auf. In wasserlöslichen Roggenarabinoxylanen konnten z. B. zwei Arabinoxylantypen charakterisiert werden (Andersson und Aman, 2001). In der Arabinoxylan I-Struktur sind ca. 40 % der Xylose-Einheiten der Hauptkette in *O*-3-Stellung mit α-gebundenen Arabinofuranose-Einheiten

substituiert. In der Arabinoxylan II-Struktur sind ca. 70 % der Xylopyranose-Einheiten in den *O*-2- und *O*-3-Stellungen desselben Moleküls mit Arabinofuranose-Einheiten disubstituiert. Arabinoxylan I- und II-Strukturen können entweder in verschiedenen Polymeren oder in verschiedenen Regionen eines Polymers vorkommen.

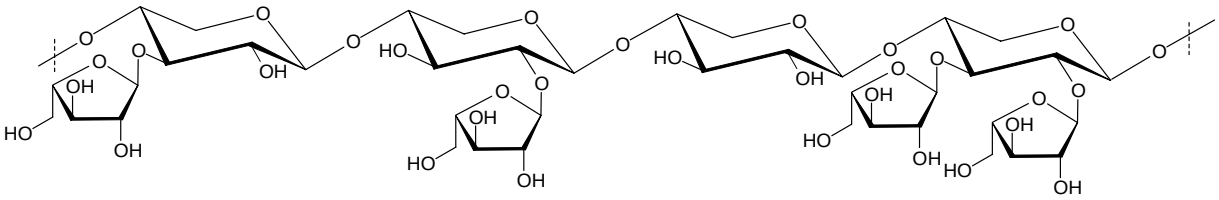


Abb. 1.1: Bindungsmöglichkeiten der Arabinose-Einheiten in neutralen Arabinoxylanen

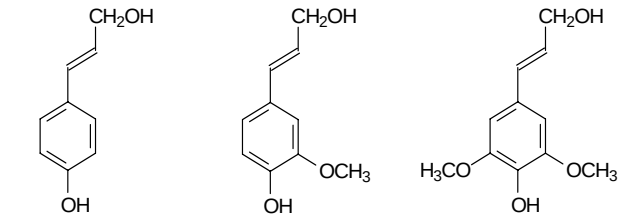
An die Arabinose-Einheiten können andere Zuckerbausteine gebunden sein, wobei Seitenketten unterschiedlicher Länge entstehen (Izydorczyk und Biliaderis, 1995). In *O*-5-Position der Arabinose können Getreidearabinoxylane mit Ferulasäure verestert sein (Ishii, 1997). Die Arabinoxylane verschiedener Getreidearten unterscheiden sich erheblich. Unterschiede bestehen v.a. in der Anordnung der Arabinosereste entlang der Xylanhauptkette, im Grad der Verzweigung, in der Molekülgröße sowie im Gehalt an Ferulasäure (Izydorczyk und Biliaderis, 1995).

Die unverzweigten mixed-linked β-Glucane sind aus β-D-Glucopyranose-Monomeren aufgebaut, die in einem Verhältnis ca. 3:1 (1→4)- und (1→3)-glykosidisch gebunden sind. Die Ketten der mixed-linked β-Glucane setzen sich hauptsächlich aus (1→4)-gebundenen Cellotriosyl- und Cellotetraosyl-Einheiten zusammen, die über (1→3)-Bindung verknüpft sind (Wood, 2001). Durch die integrierten (1→3)-Bindungen ist die molekulare Struktur der β-Glucane unregelmäßiger als die der Cellulose, wodurch ihre bessere Wasserlöslichkeit zu erklären ist.

Die Zellwände der dikotylen Pflanzen weisen meistens hohe Gehalte an ***Pektinen*** auf. Die Hauptkette der Pektine besteht vorwiegend aus (1→4)-gebundenen α-D-Galactopyranuronsäure-Einheiten (Homogalacturonan), die z.T. methyliert bzw. acetyliert sind. Die Hauptkette kann Abschnitte enthalten (Rhamnogalacturonan Typ I), in denen α-(1→2)-gebundene L-Rhamnopyranose-Einheiten integriert sind. In Getreidezellwänden kommen Pektine nur in geringer Menge vor (Carpita, 1990).

1.3.2 Lignin

Lignin ist ein hydrophobes komplexes Naturprodukt, das in die pflanzliche Zellwand eingelagert wird und dadurch die Verholzung der Zelle bewirkt. Es entsteht durch enzymatisch initiierte radikalische Polymerisation dreier Produkte des Phenylpropan-Stoffwechsels, *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol, die als Monolignole bezeichnet werden (Abb. 1.2). Dabei vernetzen sich die Monolignole in vielfältiger Form (Ether und C-C-Bindungen) miteinander, so dass ein dreidimensionales, komplexes Netzwerk entsteht (Ralph et al., 2004b). Der relative Anteil der drei Alkohole im Polymer variiert zwischen Vertretern der Pflanzengruppen sowie in Abhängigkeit vom betrachteten Pflanzenteil und der Lokalisierung in der Pflanzenzellwand.



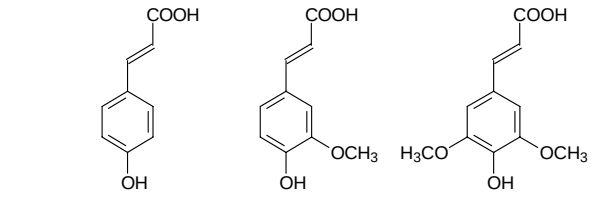
p-Cumarylalkohol Coniferylalkohol Sinapylalkohol

Abb. 1.2: Monolignole

In pflanzlichen Zellwänden liegt Lignin oftmals an Polysaccharide kovalent gebunden vor und kann dadurch die Polymere innerhalb der Zellwand fixieren. Die Bindung von Lignin an Polysaccharide erfolgt meistens über Phenolcarbonsäuren (PCS), die mit dem Polysaccharid verestert sind (Quideau und Ralph, 1997, Ralph et al., 1995, Ralph et al., 1998, Ralph et al., 2004b).

1.3.3 Phenolcarbonsäuren und ihre Funktion als Crosslinks in Getreideballaststoffen

Pflanzenzellwände enthalten kleine Mengen an PCS (oft auch Hydroxyzimtsäuren genannt), die eine zentrale Rolle im Phenylpropan-Stoffwechsel der Pflanze einnehmen (Bunzel, 2001). *trans*-Ferulasäure, *trans*-*p*-Cumarsäure und *trans*-Sinapinsäure (Abb. 1.3) sind die dominierenden Vertreter dieser Gruppe. In Gräsern sind größere Mengen an Ferulasäure vor allem in den Getreidekleien zu finden, während *p*-Cumarsäure die dominierende PCS in Getreidehalmen und –stengeln darstellt (Faulds und Williamson, 1999). Sinapinsäure wurde in bedeutender Menge bisher nur im Reis und im Wildreis nachgewiesen (He und Terashima, 1989, Bunzel et al., 2002a), wobei Vermutungen aufgestellt wurden, dass sie während der Extraktion als Abbauprodukt von Lignin gebildet wird (He und Terashima, 1989).



trans-*p*-Cumarsäure *trans*-Ferulasäure *trans*-Sinapinsäure

Abb. 1.3: Phenolcarbonsäuren

Gestützt auf die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen lässt sich feststellen, dass in den meisten Getreideballaststoffen PCS über eine Esterbindung an die *O*-5-Stellung der Arabinose-Einheiten der Heteroxylane gebunden sind, während sie in dikotylen Pflanzen mit Pektinen assoziiert sind. Eine Reihe von Ferulasäure-Oligosacchariden wurde aus

verschiedenen pflanzlichen Materialien isoliert und identifiziert (Bunzel et al., 2002a, Ishii, 1997, Saulnier et al., 1995). Das bisher größte Ferulasäure-Oligosaccharid wurde nach enzymatischer Hydrolyse aus Weizenkleie isoliert (Abb. 1.4) (Lequart et al., 1999).

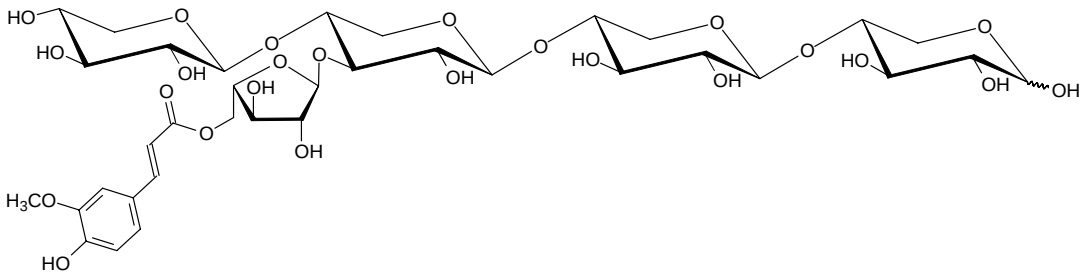


Abb. 1.4: Aus Getreidearabinoxylanen freigesetztes und isoliertes Ferulasäure-Oligosaccharid

Nach der Hydrolyse von Ballaststoffen unter milden sauren Bedingungen wurden verschiedene, mit Ferulasäure assoziierte Seitenketten der Heteroxylane nachgewiesen (Bunzel et al., 2002a, Saulnier et al., 1995). Die komplexeste mit Ferulasäure assoziierte Heteroxylanseitenkette wurde bisher aus Maiskleie isoliert und als α-L-Galactopyranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-(5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose) identifiziert (Abb. 1.5). Die Struktur von Heteroxylanseitenketten, insbesondere aus Maiskleie, ist aber komplexer als bisher gedacht.

PCS können dimerisieren und als Crosslinks zwischen Polysaccharidketten fungieren. Für die Bildung von Dimeren wurden zwei Reaktionsmechanismen beschrieben:

a) Photochemische Kopplung unter Bildung von Cyclobutanderivaten,

b) Radikalische Kopplung unter Bildung von Ferulasäuredehydrodimeren.

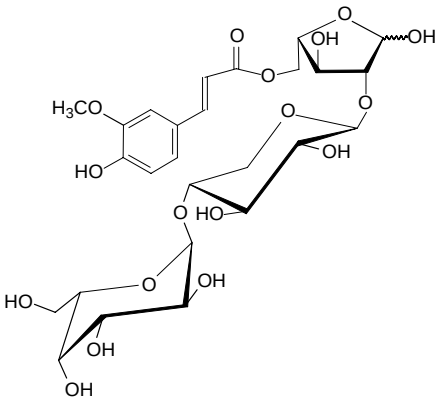


Abb. 1.5: Struktur der komplexesten, mit Ferulasäure assoziierten Heteroxylan-Seitenkette (aus Maiskleie isoliert)

Bei der photochemischen Kopplungsreaktion handelt es sich um eine UV-Licht katalysierte [2+2]-Cycloaddition. Dieser Mechanismus ist *in vitro* und *in vivo* bevorzugt bei *p*-Cumarsäure, aber auch bei Ferulasäure und deren Ester zu beobachten. Eine Reihe von Ferulasäure- und *p*-Cumarsäure- Homo- und Hetero-Cyclobutanderivaten konnte, u.a. in einigen Getreideballaststoffen, nachgewiesen werden (Packert, 1993).

Die radikalische Kopplung ist der dominierende Dimerisierungsmechanismus für Ferulasäure-Ester in der Pflanze (Ralph et al., 1994). Dieser Mechanismus stellt eine oxidative Kopplungsreaktion dar, die über die Phenoxyradikale (Bildung durch zellwandgebundene Peroxidase und H_2O_2) als Zwischenstufe verläuft (Abb. 1.6).

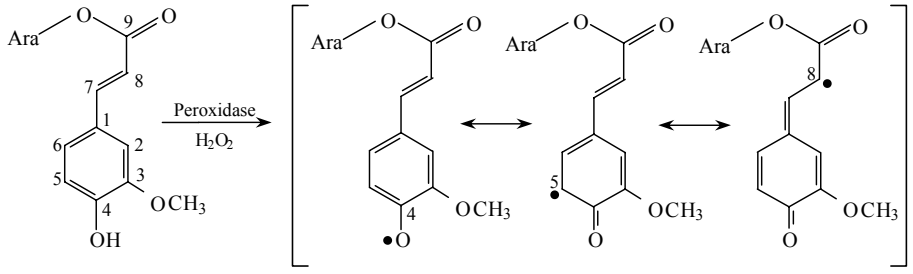


Abb. 1.6: Bildung der Radikale beim Dimerisierungsprozess estergebundener Ferulasäure (mesomere Grenzstrukturen)

Anhand der mesomeren Grenzstrukturen der elektronendelokalisierten Phenoxyradikale lassen sich die theoretisch möglichen Ester der Dehydrodiferulasäuren (DFS) ableiten.

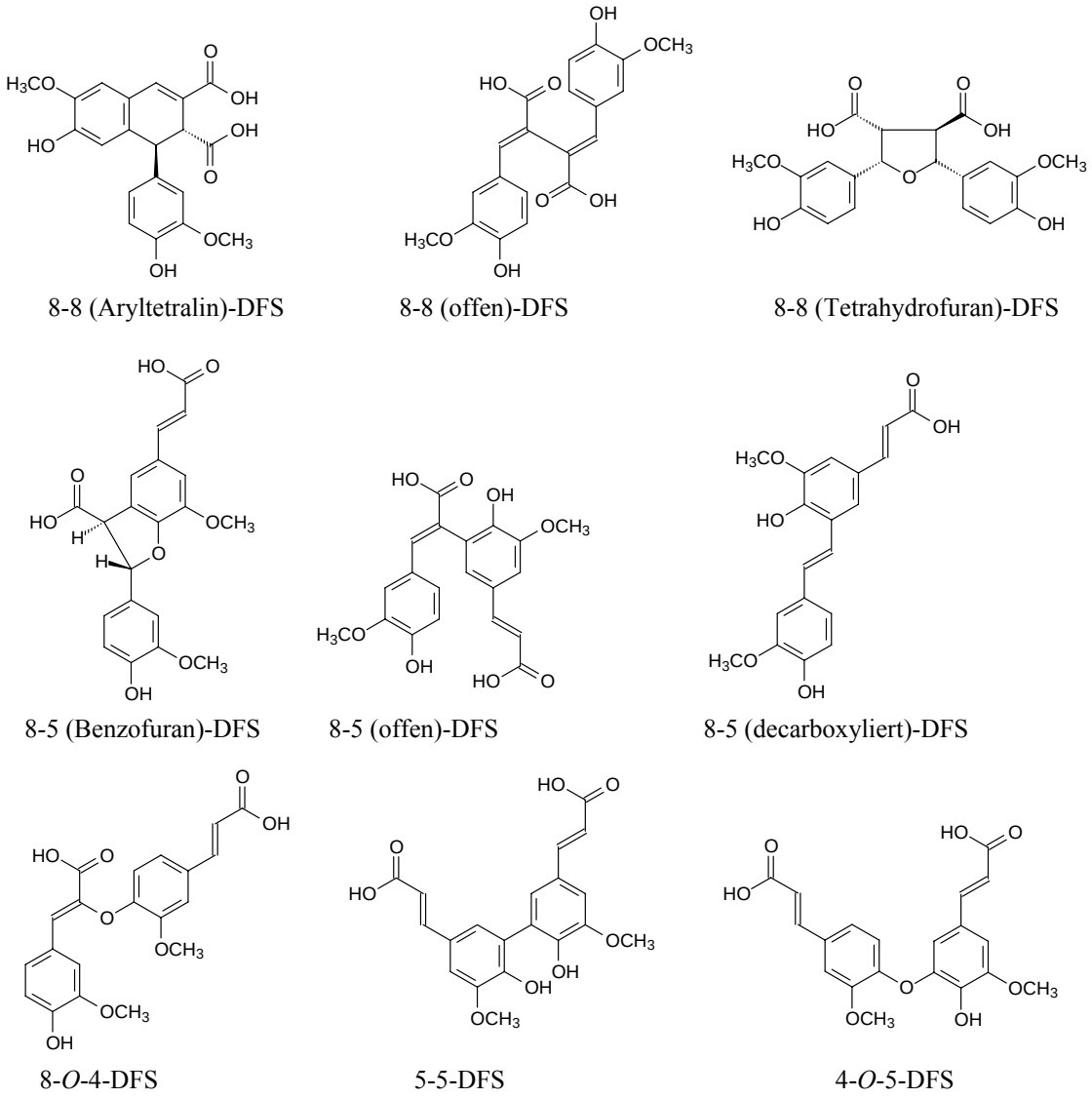
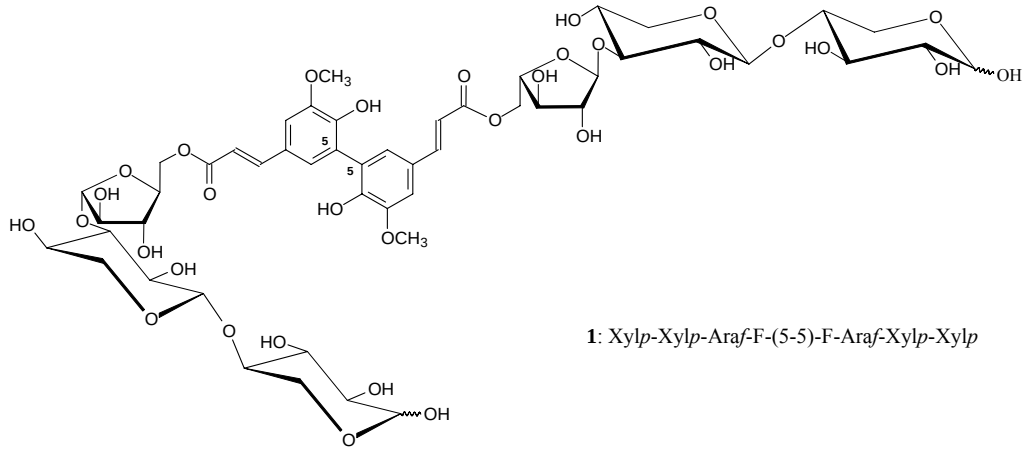


Abb. 1.7: Dehydrodiferulasäuren (DFS)

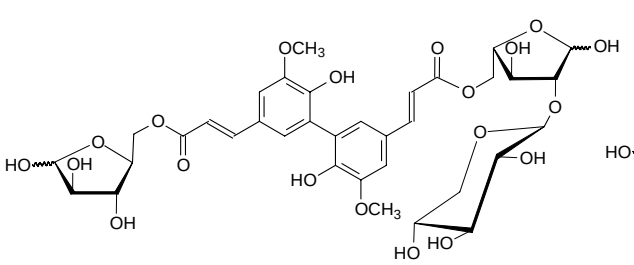
Demnach können 8-*O*-4-, 5-5-, 8-8-, 8-5- und 4-*O*-5-gekoppelte DFS-Ester gebildet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass 8-8-gekoppelte DFS in einer offenen Form bzw. in zwei zyklischen Formen (Aryltetralin oder Tetrahydrofuran) vorliegt. 8-5-gekoppelte DFS kann eine offene, zyklische (Benzofuran) oder decarboxylierte Struktur aufweisen. In Abb. 1.7 sind die chemischen Strukturen bislang bekannter DFS dargestellt. Alle neun DFS wurden bereits in Zellwänden verschiedener mono- und dikotyler Pflanzen nach alkalischer Hydrolyse in unterschiedlichen Mengen (2.4–12.6 mg/g in unlöslichen und 40–230 µg/g in löslichen Ballaststoffen) nachgewiesen (Bunzel et al., 2000, Bunzel et al., 2001, Grabber et al., 1995, Micard et al., 1997, Parr et al., 1997, Parr et al., 1996, Ralph et al., 2000, Ralph et al., 1994, Schatz et al., 2006, Waldron et al., 1997).

Obwohl in alkalischen Hydrolysaten unterschiedlicher Pflanzen alle neun DFS nachgewiesen werden konnten, wurde dadurch nicht der Beweis erbracht, dass alle identifizierten DFS auch nativ in pflanzlichen Zellwänden vorkommen. So ist es sehr wahrscheinlich, dass 8-5-DFS in der Pflanze nur in ihrer zyklischen Form (Benzofuran) vorliegt, und dass es sich bei 8-5-DFS (offen) und 8-5-DFS (decarboxyliert) um Strukturen handelt, die erst unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse entstehen (Ralph et al., 1994). Eine weniger eindeutige Situation liegt bei den 8-8-gekoppelten DFS vor. Hier ist bisher völlig unklar, welche der möglichen Strukturen (offen, zyklisch (Aryltetralin) oder zyklisch (Tetrahydrofuran)) in der Pflanze vorkommt. Zur Aufklärung dieser Fragestellung sind Untersuchungen erforderlich, bei denen alkalische Aufarbeitungsschritte vermieden werden.

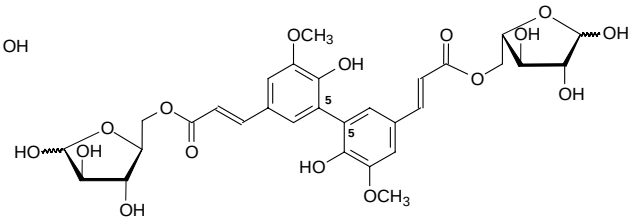
Die Fähigkeit estergebundener Ferulasäure zu dimerisieren eröffnet die Möglichkeit, dass DFS in Pflanzenzellwänden als Crosslinks fungieren und so die Polysaccharide intra- oder intermolekular verbinden. Der erste experimentelle Beweis hierfür wurde durch Isolierung eines DFS-Arabinoxylan-Hexasaccharids aus den Zellwänden von Bambussprossen (nach enzymatischer Hydrolyse mit Driselase) erbracht (**1** in Abb. 1.8) (Ishii, 1991). Einige Jahre später konnten aus Maiskleie nach saurer Hydrolyse zwei weitere DFS-Oligosaccharide isoliert werden (**2** und **3** in Abb. 1.8) (Saulnier et al., 1999). Bei allen drei Verbindungen handelt es sich um 5-5-DFS-assoziierte Saccharide. Die Isolierung von 5-5-DFS-Sacchariden liefert aber keinen Beweis für eine mögliche intermolekulare Verknüpfung von zwei Polysaccharidketten. „Molecular Modelling"-Experimente des Dimerisierungsprozesses von Ferulasäure-Oligosacchariden zeigten, dass 5-5-gebundene DFS wahrscheinlich die einzige DFS ist, die in der Lage ist, Polysaccharide intramolekular zu verbinden (Hatfield und Ralph, 1999). Der Beweis, dass Heteroxylane intermolekular über DFS gebunden werden können, steht noch aus.



1: Xyl*p*-Xyl*p*-Ara*f*-F-(5-5)-F-Ara*f*-Xyl*p*-Xyl*p*



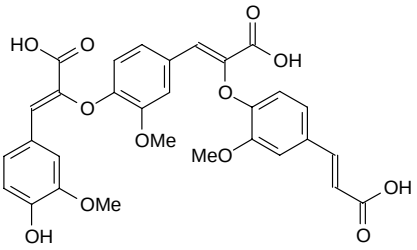
2: Ara*f*-F-(5-5)-F-(Xyl*p*)-Ara*f*



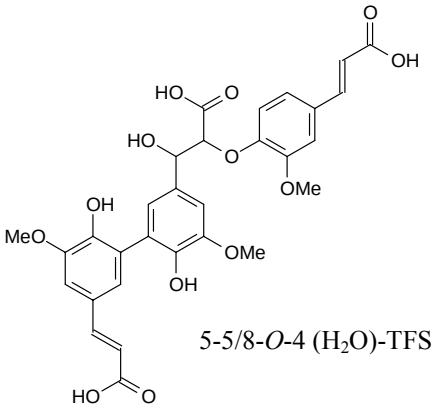
3: Ara*f*-F-(5-5)-F-Ara*f*

Abb. 1.8: ***Aus Bambussprossen (1) und aus Maiskleie (2 und 3) isolierte 5-5-Dehydrodiferulasäure-Oligosaccharide.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, F: trans-Ferulasäure*

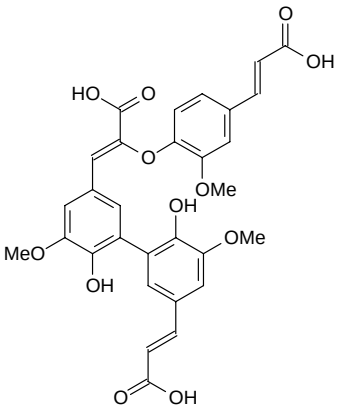
Durch radikalische Kopplungsreaktionen können neben DFS auch Dehydrotriferulasäuren (TFS) oder höher polymerisierte Verbindungen entstehen. Bereits sieben unterschiedliche TFS wurden aus Maiskleie isoliert und als 8-*O*-4/8-*O*-4-, 5-5/8-*O*-4-, 5-5/8-*O*-4(H_2O)-, 8-8 (Aryltetralin)/8-*O*-4-, 8-*O*-4/8-5(offen)-, 8-5 (offen)/5-5- und 8-8 (Tetrahydrofuran)/5-5-TFS identifiziert (Abb. 1.9) (Bunzel et al., 2006, Bunzel et al., 2003, 2005, Funk et al., 2005). Ebenfalls aus der Maiskleie wurden zwei Dehydrotetraferulasäuren (TeFS) isoliert, die als 4-*O*-8/5-5/8-*O*-4- und 4-*O*-8/5-5/8-5(offen)-TeFS identifiziert wurden (Abb. 1.9) (Bunzel et al., 2006).



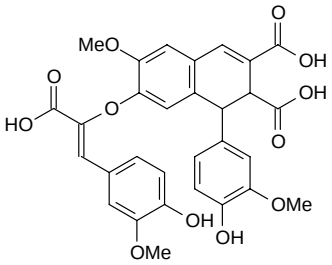
8-*O*-4/8-*O*-4-TFS



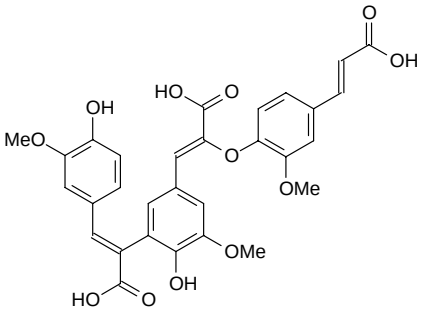
5-5/8-*O*-4 (H_2O)-TFS



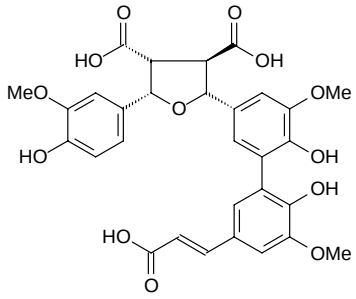
5-5/8-*O*-4-TFS



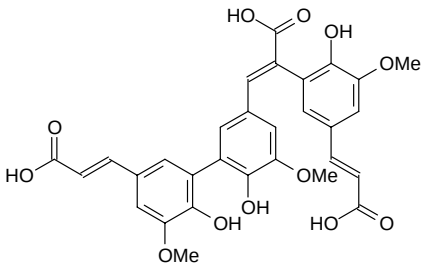
8-8 (Aryltetralin)/8-*O*-4-TFS



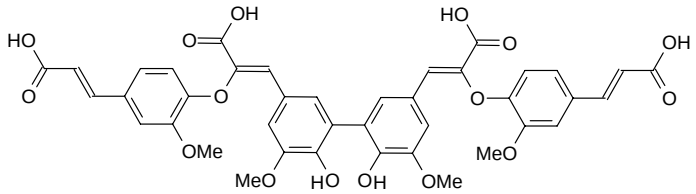
8-*O*-4/8-5 (offen)-TFS



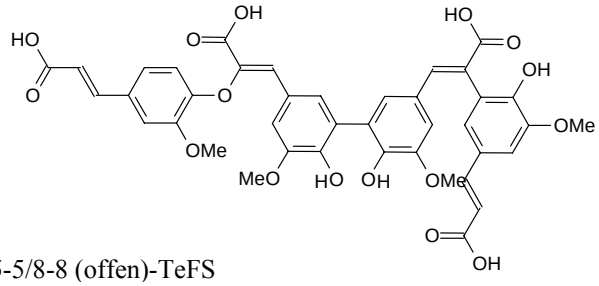
8-8 (Tetrahydrofuran)/5-5-TFS



8-5 (offen)/5-5-TFS



4-*O*-8/5-5/8-*O*-4-TeFS



4-*O*-8/5-5/8-8 (offen)-TeFS

Abb. 1.9: Chemische Strukturen von bisher isolierten und identifizierten Dehydrotriferulasäuren (TFS) und Dehydrotetraferulasäuren (TeFS)

Die Isolierung von TFS und TeFS aus pflanzlichem Material rechtfertigt die Hypothese, dass TFS oder TeFS als Crosslinks von mehr als zwei Polysaccharidsträngen fungieren können. In Abb. 1.10 ist dargestellt, wie möglicherweise bis zu drei Polysaccharidstränge über eine TFS verknüpft werden können.

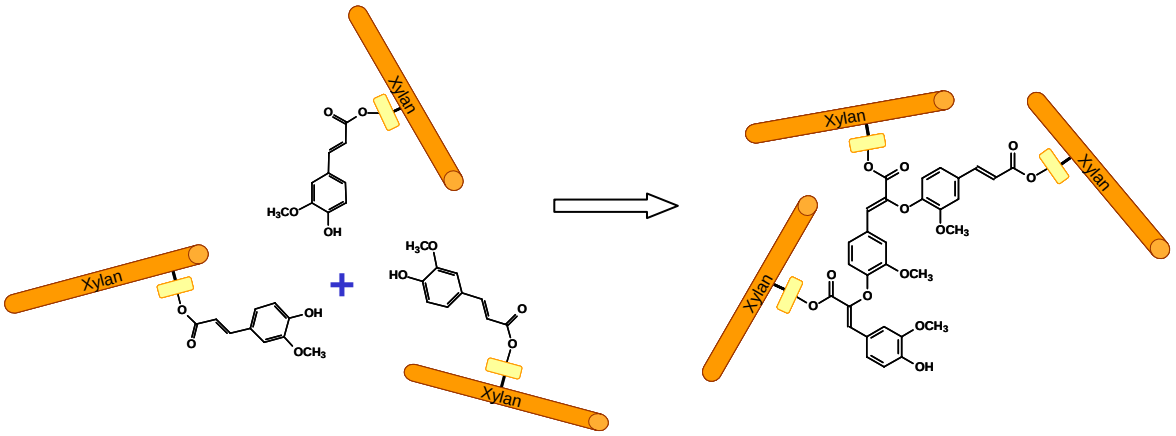


Abb. 1.10: Schematische Darstellung eines möglichen Bildungsmechanismus von Dehydrotriferulasäure in Pflanzen *(orange: Xylanhauptkette, gelb: Arabinose-Einheit)*

Durch die Bildung von Crosslinks über Ferulasäure und ihre Di-, Tri- oder Tetramere können die funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Arabinoxylane verändert werden. Durch DFS-Crosslinks wird die Viskosität von Arabinoxylanen erhöht (Ng et al., 1997), was einen Einfluss auf die Blutzucker regulierende Wirkung und auf den Blutcholesterin senkenden Effekt von Ballaststoffen haben kann. Des Weiteren setzt ein erhöhter Vernetzungsgrad sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß des enzymatischen Abbaus von Arabinoxylanen durch Xylanasen herab (Grabber et al., 1998). So kann eine erhöhte Vernetzung die Anlagerung der Xylanasen an ihr Substrat erschweren, was zur geringeren Abbaubarkeit der Arabinoxylane führen kann. Jedoch wurde kürzlich gezeigt, dass ein moderater DFS-Gehalt in pflanzlichen Zellwänden nicht den Abbau der Pflanzenzellwände durch die Darmmikrobiota negativ beeinflusst (Funk et al., 2007).

1.4 Fermentation im menschlichen Dickdarm

Der Dickdarm stellt ein stark besiedeltes, komplexes mikrobiologisches Ökosystem dar, das durch das Substratangebot qualitativ und quantitativ beeinflusst wird. Die mikrobiellen Stoffwechselprozesse werden von über 10^{11} Bakterien/g Dickdarminhalt bewirkt. Daran beteiligen sich über 500 verschiedene Bakterienspezies in unterschiedlichen Anteilen (Salminen et al., 1998). Jede Spezies ist durch ein charakteristisches Enzymspektrum gekennzeichnet.

Die meisten im Dickdarm wachsenden Bakterien sind nicht-sporenbildende Anaerobier. Die im Dickdarm dominierenden Bakterien gehören zu der Gattung *Bacteroides* spp.. Diese Mikroorganismen können bis zu 30 % der gesamten Darmmikroflora ausmachen (Gibson, 1996). Aber auch andere anaerobe Bakterien, wie z. B. *Bifidobacterium* spp. oder

Eubacterium spp., zählen zu den wichtigen Vertretern der Darmflora (Gibson, 1996). Aerobe Bakterien wie *E. coli*, Enterokokken und Lactobazillen machen nur ca. 1 % der Kolonbakterien aus (Salminen et al., 1998).

Einigen Darmbakterien, wie z. B. *Bifidobacterium* spp. und *Lactobacillus* spp., wird eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen. Sie gelangen häufig als Probiotika in fermentierten Lebensmitteln (Joghurt, Gemüse und Fleisch) in den Handel. Als Probiotika werden nach klassischer Definition lebende Mikroorganismen bezeichnet, die durch eine Verbesserung des mikrobiellen Gleichgewichtes gesundheitsfördernd auf den Wirt wirken (Fuller, 1989).

Zu potentiell schädlichen Bakterien werden Clostridien, Mitglieder der *Enterobacteriaceae*, wie z. B. *E. coli*, aber auch sulfatreduzierende Spezies gezählt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass einigen Clostridien aufgrund ihrer Enzymausstattung jedoch durchaus nützliche Funktionen in einer intakten Darmflora zugesprochen werden.

Ballaststoffe werden im Dickdarm durch die dort ansässige Mikroorganismenflora vollständig, teilweise oder nicht fermentiert. Das Ausmaß der Fermentation von Ballaststoffen ist von der chemischen Struktur, der Löslichkeit sowie dem Lignifizierungsgrad der Ballaststoffkomponenten abhängig. So wird z. B. Pektin beinahe vollständig, Lignin hingegen fast gar nicht abgebaut (Haenel und Grütte, 1984). Spezies, die an dem Abbau von Kohlenhydraten beteiligt sind, gehören zu den Gattungen *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* und *Clostridium*. Manche Spezies, wie z. B. *Bacteroides*, sind aufgrund ihrer Enzymausstattung in der Lage, längere Polysaccharidketten abzubauen, während andere, wie z. B. *Bifidobacterium*, hauptsächlich niedermolekulare Kohlenhydrate (oft Oligosaccharide) fermentieren (Van Laere et al., 2000).

Der Abbau von phenolischen Verbindungen im menschlichen Gastrointestinaltrakt hängt ebenfalls von vielen Faktoren ab. So unterscheiden sich die PCS-Ester von den PCS hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit. Freie Ferulasäure kann z. B. sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm absorbiert werden. PCS-Ester hingegen werden hauptsächlich im Dickdarm abgebaut. Obgleich menschliche Hydroxyzimtsäure-Esterasen im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen wurden (Andreasen et al., 2001), scheint die Freisetzung von Hydroxyzimtsäuren aus PCS-Estern bevorzugt im Dickdarm durch mikrobielle Esterasen zu erfolgen. Freie Ferulasäure wird dabei von Mikroorganismen metabolisiert (Watzl und Rechkemmer, 2001).

Die wichtigsten Fermentationsprodukte des Kohlenhydratabbaus sind Essig-, Propion- und Buttersäure. Diese entstehen bei ballaststoffreicher Nahrung durchschnittlich in molaren Verhältnissen von 69:21:10 (Pomare et al., 1985). Das Verhältnis der gebildeten SCFA ist jedoch abhängig von der vorherrschenden Ballaststoffquelle (Amado, 2005). Aus Resistenten Stärken wird z. B. ein überdurchschnittlich hoher Anteil an Butyrat gebildet. Weitere Endprodukte bzw. Intermediate des Kohlenhydratabbaues sind z. B. Ethanol, Milchsäure, Bernsteinsäure, Ameisensäure, Valeriansäure und Hexansäure. Verzweigte Fettsäuren, wie

Isobuttersäure, Isovaleriansäure und Isohexansäure sowie Ammoniak, Amine, Phenol- und Indolderivate entstehen als Produkte des Protein-Stoffwechsels. Pro Tag werden ca. 300-400 mmol SCFA gebildet (Cummings und MacFarlane, 1997, MacFarlane und MacFarlane, 1997).

1.5 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Strukturaufklärung von PCS enthaltenden Ballaststoffkomponenten der Maiskleie voranzutreiben und mögliche ernährungsphysiologische Einflüsse der isolierten und identifizierten Strukturkomponenten zu ermitteln. Der Schwerpunkt der Arbeit wurde auf die Freisetzung, Isolierung und Identifizierung PCS bzw. DFS assoziierter Saccharide aus den Seitenketten der Heteroxylane aus Maisballaststoffen gesetzt. Ferulasäure und *p*-Cumarsäure sind die zwei wichtigen monomeren phenolischen Komponenten, die in pflanzliche Zellwände integriert und in Maiskleie in besonders hohen Mengen enthalten sind. Ballaststoffe aus Maiskleie werden zu ca. 40 % aus Heteroxylanen gebildet.

Neben der Isolierung und Identifizierung von PCS- bzw. DFS-Sacchariden sollte die *in vitro* Fermentierbarkeit der isolierten PCS-Saccharide durch einzelne Bakterienstämme des menschlichen Dickdarmes untersucht werden.

Die Charakterisierung von PCS-Heteroxylanseitenketten aus Maisballaststoffen sollte erfolgen, da die Eigenschaften von Heteroxylanen durch die Verteilung und den Aufbau von PCS assoziierten Heteroxylanseitenketten beeinflusst werden können. Komplexe Seitenketten können z. B. den Zugang von Carbohydrasen an den Xylanhauptstrang erschweren oder die PCS-Ester vor einem enzymatischen Angriff durch Esterasen schützen. Dies sollte auch einen Einfluss auf die mikrobielle Fermentation der Heteroxylane im Dickdarm haben, d.h. die Fermentation könnte auf diese Weise verzögert oder verhindert werden. Die Isolierung der PCS- und DFS-Saccharide sollte nach saurer Hydrolyse der Maisballaststoffe (unter milden Bedingungen) durch chromatographische Verfahren wie Gelpermeationschromatographie (GPC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) durchgeführt werden. Die Identifizierung isolierter Substanzen sollte hauptsächlich mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR), unterstützt durch Massenspektrometrie (MS), Gaschromatographie (GC) und HPLC erfolgen.

Die Isolierung und Identifizierung von DFS-Sacchariden war von Bedeutung, um den Beweis zu erbringen, dass DFS tatsächlich an Heteroxylane gebunden sind und folglich als Crosslinks zwischen diesen Polysacchariden fungieren können. Von der Crosslink-Funktion der DFS in Ballaststoffen wird zwar allgemein ausgegangen, jedoch konnte hierfür mit Ausnahme der 5-5-DFS kein endgültiger Beweis erbracht werden. Obwohl bereits mehrere DFS-Oligosaccharide aus pflanzlichen Materialien isoliert wurden, handelte es sich in jedem Fall um 5-5-DFS-Saccharide. So steht der Beweis noch aus, dass auch andere als 5-5-gekoppelte DFS an der Ausbildung der Crosslinks in Ballaststoffen beteiligt sind. Die Fähigkeit von Ferulasäure, Crosslinks auszubilden, hat mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Auswirkung auf

die physiologischen Eigenschaften von Arabinoxylanen und ist daher von besonderem Interesse. Die Isolierung von DFS-Sacchariden sollte nach deren Freisetzung aus Maisballaststoffen mittels saurer Hydrolyse mit Hilfe unterschiedlicher chromatographischer Methoden erfolgen. Zur Identifizierung sollten NMR, MS, GC und HPLC eingesetzt werden.

Bezüglich *der Fermentierbarkeit von Ballaststoffkomponenten* durch die Dickdarmmikroflora im Allgemeinen sowie des Einflusses von PCS bzw. DFS auf die Fermentierbarkeit bestimmter Oligosaccharid-Verbindungen im Speziellen besteht derzeit noch großer Forschungsbedarf. Im Rahmen dieser Arbeit sollten *in vitro* Untersuchungen mit einzelnen mikrobiologischen Bakterienstämmen durchgeführt werden. Die Abbaubarkeit der ausgewählten Substrate, zwei Ferulasäure enthaltende Mono- und Disaccharide, durch einige wichtige Vertreter der menschlichen Dickdarmflora sowie der Einfluss der gebundenen Ferulasäure auf die Fermentationsprozesse sollten untersucht werden. Auch das Verteilungsmuster der SCFA nach erfolgter Inkubation war von Interesse, da SCFA eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Darmgesundheit nachgesagt wird. Die für die Fermentationsversuche als Substrat benötigten Ferulasäure-Saccharide sollten aus Maiskleie im präparativen Maßstab (ca. 100 mg) isoliert werden. Die zur Isolierung von ca. 10 mg Substrat bestehenden Methoden sollten im Rahmen dieser Arbeit an präparative Verhältnisse angepasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzliches Untersuchungsmaterial

Als pflanzliches Material zur Isolierung und Identifizierung von phenolischen Kohlenhydratverbindungen wurde Maiskleie (Hammermühle Diät GmbH, Kirrweiler) verwendet.

Maiskleie ist ein ballaststoffreiches Nebenprodukt, das bei der Herstellung von Maismehl oder Maisgrieß anfällt und überwiegend aus den äußeren Schichten der Maiskörner sowie wenig Endosperm besteht. Maiskleie setzt sich hauptsächlich aus Zellwandpolysacchariden zusammen, v.a. aus Heteroxylanen und Cellulose. Sie ist relativ arm an Lignin und beinhaltet ca. 4 % PCS. Die Heteroxylane bestehen hauptsächlich aus Arabinose und Xylose, enthalten jedoch zusätzlich kleinere Mengen an Galactose und Glucuronsäure (Tab. 2.1) (Saulnier et al., 1995).

Tabelle 2.1: ***Zusammensetzung von Maiskleie nach Saulnier et al. (1995)***

Komponente	Gehalt [Gew.-%][a]
Glucuronsäure	4.2
Arabinose	22.8
Galactose	5.6
Xylose	34.3
Glucose	22.5
Acetat	4.2
Phenolische Säuren	5.5
Proteine	2.4
Lignin	1.0

[a] Gehalt in Maiskleie nach Abbau von Stärke

Tabelle 2.2: ***Gehalte an monomeren und dimeren Phenolcarbonsäuren in unlöslichen Ballaststoffen aus Mais nach Bunzel et al. (2001)***

Komponente	Gehalt [Gew.-%]
p-Cumarsäure	0.22
Ferulasäure	2.48
Sinapinsäure	0.09
5-5-DFS	0.32
8-*O*-4-DFS	0.26
4-*O*-5-DFS	0.04
Σ 8-5-DFS[a]	0.46
Σ 8-8-DFS[b]	0.21

[a] Summe aus 8-5 (Benzofuran)-, 8-5 (offen)- und 8-5 (decarboxyliert)-Dehydrodiferulasäure (DFS)
[b] Summe aus 8-8 (offen)- und 8-8 (Aryltetralin)-DFS

Im Vergleich zu anderen Getreidearten stellt Mais eine besonders reiche Quelle an Ferulasäure und DFS dar (24.8 mg/g bzw. 12.9 mg/g unlösliche Ballaststoffe) (Tab. 2.2) (Bunzel, 2001). Unterschiedliche Ferulasäure-Saccharide (Saulnier et al., 1995) bzw. 5-5-DFS-Saccharide (Saulnier et al., 1999) wurden bereits aus Maiskleie isoliert. Da unlösliche Maisballaststoffe neben 5-5-DFS auch größere Mengen an 8-5-, 8-8- und 8-*O*-4-DFS enthalten (Bunzel et al., 2001), stellte Maiskleie ein geeignetes Untersuchungsmaterial dar.

2.2 Bakterienstämme

Für die mikrobiologischen *in vitro* Untersuchungen wurden aus der Vielzahl von in Frage kommenden Mikroorganismen, die den Dickdarm des Menschen besiedeln, 5 Stämme ausgewählt und von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Entscheidend für die Auswahl war die Fähigkeit des Bakteriums, Arabinose, Xylose oder beide Zucker abzubauen. Außerdem war von Interesse, dass die ausgesuchten Stämme dominierende Vertreter der menschlichen Dickdarm-Mikroflora darstellen.

Folgende Mikroorganismen wurden verwendet:

Bifidobacterium longum	DSM-No. 20219 (entspricht ATCC (American Type Culture Collection) 15707)
Bifidobacterium adolescentis	DSM-No. 20083 (entspricht ATCC 15703)
Bacteroides ovatus	DSM-No. 1896 (entspricht ATCC 8483)
Bacteroides vulgatus	DSM-No. 1447 (entspricht ATCC 8482)
Bacteroides thetaiotaomicron	DSM-No. 2255 (entspricht ATCC 29741)

Gattung Bifidobacterium

Bei Bifidobakterien handelt es sich um gramlabile, unbewegliche, überwiegend anaerobe Stäbchenbakterien verschiedenster Form. Sie sind nicht widerstandsfähig gegen starke Säuren und bilden keine Sporen. Einige Spezies können Sauerstoff tolerieren, aber nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kohlenstoffdioxid. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 37-41 °C und der optimale pH-Wert zwischen 6.5–7.0. Bei pH-Werten von 4.5–5.0 und 8.0–8.5 findet kein Wachstum von Bifidobakterien statt.

Bifidobakterien sind saccharolytisch. Kohlenhydrate werden unter primärer Bildung von Essigsäure und Milchsäure im molaren Verhältnis 3:2 abgebaut. Kleine Mengen von Ameisensäure, Ethanol und Bernsteinsäure (aber kein Kohlenstoffdioxid) können ebenfalls produziert werden. Bifidobakterien bauen bevorzugt Glucose ab, können aber teilweise auch andere Kohlenhydrate verstoffwechseln.

Bifidobakterien kommen im Magen-Darm-Trakt des Menschen und verschiedener Tiere vor und wurden u.a. im Abwasser gefunden. Außerdem gehören sie zur Normalflora von Appendix und Vagina.

Die für die mikrobiologischen *in vitro* Untersuchungen verwendeten Stämme *Bifidobacterium longum* und *Bifidobacterium adolescentis* sind in der Lage, u.a. auch Xylose und Arabinose abzubauen. Sie gehören zu den wichtigen Vertretern der Normalflora des Magen-Darm-Traktes des Menschen (Rasic und Kurmann, 1983).

Gattung Bacteroides

Bei der Gattung *Bacteroides* handelt es sich um obligat anaerobe, pleomorphe, unbewegliche, gramnegative Stäbchenbakterien. Die optimalen Wachstumsbedingungen für die meisten Spezies sind 37 °C bei einem pH-Wert von 7.0.

Vertreter der Gattung *Bacteroides* können Kohlenhydrate, Pepton und Stoffwechselprodukte anderer Organismen abbauen. Fermentationsprodukte von saccharolytischen Spezies sind ein Gemisch aus Bernsteinsäure, Milchsäure, Propionsäure, Essigsäure und Ameisensäure. Buttersäure ist in der Regel kein Hauptprodukt bei der Fermentation von Kohlenhydraten und tritt gewöhnlich zusammen mit Isobuttersäure und Isovaleriansäure (aus Pepton) auf. Aus Pepton produzieren nicht-saccharolytische Spezies entweder a) eine Mischung aus Bernsteinsäure, Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure oder b) eine Mischung aus Essigsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure, Isovaleriansäure, Propionsäure, Isobuttersäure und Alkohol.

Bacteroides gehören zur Normalflora der Schleimhäute des Magen-Darm-Traktes des Menschen und verschiedener Tiere (Holdeman et al., 1984).

Für die mikrobiologischen *in vitro* Untersuchungen wurden die Stämme *Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron* und *Bacteroides vulgatus* ausgewählt. Diese drei Stämme wurden bereits aus dem menschlichen Magen-Darm-Trakt isoliert und sind in der Lage, u.a. auch Xylose und Arabinose zu verstoffwechseln.

2.3 Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Sacchariden aus Maiskleie

2.3.1 Gewinnung unlöslicher Ballaststoffe

Zur Gewinnung der unlöslichen Ballaststoffe aus Maiskleie wurde eine modifizierte, auf präparative Maßstäbe angepasste enzymatisch-gravimetrische Methode nach AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 991.42 eingesetzt (Prosky et al., 1992).

Die entfettete und gemahlene Maiskleie wurde bei 95-100 °C mit Termamyl, einer hitzestabilen α-Amylase, behandelt, wobei die Verkleisterung der Stärke und ein weitgehender Stärkeabbau zu löslichen Dextrinen und Oligosacchariden erfolgte. Der abgetrennte Rückstand wurde mit Wasser, Ethanol und Aceton gewaschen und im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

Der getrocknete Hydrolyserückstand enthielt noch Proteine und hochmolekulare Abbauprodukte der Stärke und entspricht demnach nicht vollständig der Definition von Ballaststoffen. Dennoch wurde auf weitere enzymatische Abbauschritte verzichtet. Die in der AOAC-Methode beschriebenen Schritte der Behandlung mit Protease und Amyloglucosidase sind relativ zeitaufwendig, und eine Proteinentfernung bzw. eine vollständige Stärkeentfernung sind für die hier verfolgten Ziele nicht notwendig. Der so isolierte Hydrolyserückstand wird im Folgenden dennoch vereinfacht als unlösliche Ballaststoffe

bezeichnet. In Abb. 2.1 ist die Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe schematisch dargestellt. Die genaue Arbeitsanweisung ist Anhang 5.1.1 zu entnehmen.

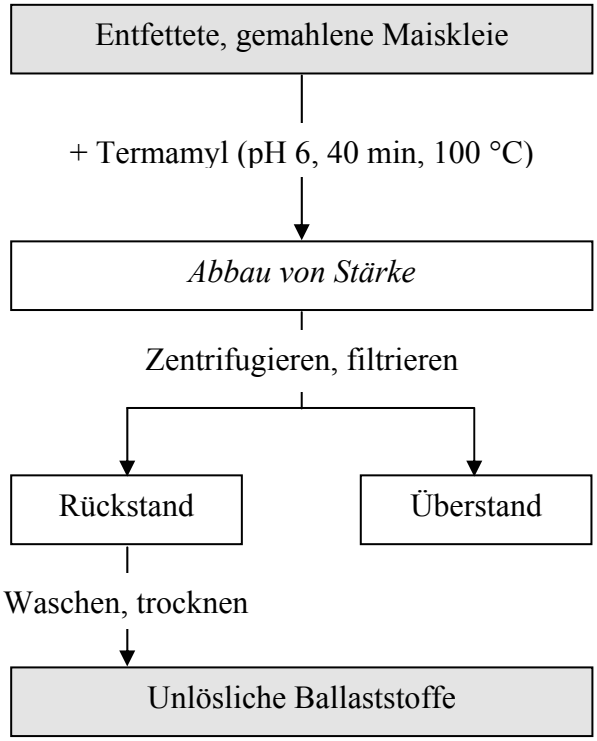


Abb. 2.1: Schematische Darstellung zur Gewinnung „unlöslicher Maisballaststoffe“ (siehe Text)

2.3.2 Saure Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe

Zur Hydrolyse von Ballaststoffen wurden bereits zahlreiche Methoden unter verschiedensten Zielsetzungen entwickelt und angewendet. Zur Isolierung von PCS- und DFS-Heteroxylanseitenketten ist eine Methode notwendig, bei der die glykosidischen Bindungen der Polysaccharide teilweise gespalten werden, die Esterbindungen zwischen PCS und den Polysacchariden aber erhalten bleiben. In Anlehnung an die von Saulnier et al. (1995) optimierte Methode wurde eine saure Hydrolyse mit 50 mM Trifluoressigsäure (TFA) bei 100 °C für 3 h durchgeführt. Da glykosidische Bindungen, die Furanosen enthalten, besonders säurelabil sind, werden unter den gewählten Bedingungen v.a. die Heteroxylanseitenketten abgespalten. Esterbindungen sollen unter diesen Bedingungen nur geringfügig gespalten werden (Saulnier et al., 1995). Enzymatische Methoden zur Hydrolyse von Heteroxylanen, die häufig beschrieben wurden, z. B. (Bunzel et al., 2002a, Ishii und Tobita, 1993), sind hier nicht anwendbar, da die Heteroxylane aus Maiskleie sehr resistent gegenüber Carbohydrasen sind. Die genaue Arbeitsanweisung ist Anhang 5.1.2 zu entnehmen.

2.3.3 Reinigung des Hydrolysates an Amberlite® XAD-2

Nach der sauren Hydrolyse wurde das Hydrolysat von im Überschuss enthaltenden Begleitsubstanzen, z. B. reine Kohlenhydrate, befreit. Die Reinigung wurde an einer mit Amberlite® XAD-2 gefüllten Säule durchgeführt. Amberlite® XAD-2 ist ein polymeres Adsorbens, das an seiner porösen Oberfläche v.a. phenolische Verbindungen anreichern kann.

Nach dem Aufbringen des Hydrolysates auf die Säule werden gemäß den Ergebnissen von Saulnier et al. (1995) und Bunzel (2001) hauptsächlich hochmolekulare Verbindungen sowie neutrale Mono-/ Oligosaccharide und Karamelisierungsprodukte mit Wasser ausgewaschen. Die anschließende Elution mit einem Methanol/Wasser-Gemisch 50/50 (v/v) erfasst den Hauptteil der PCS-/DFS-Saccharide (Bunzel, 2001, Saulnier et al., 1995). Abschließend werden mit Methanol vorwiegend phenolische Verbindungen eluiert (Saulnier et al., 1995). Die genaue Durchführung der Reinigung an Amberlite® XAD-2 ist Anhang 5.1.3 zu entnehmen.

2.3.4 Fraktionierung von monomeren Phenolcarbonsäure-Sacchariden an Sephadex™ LH-20

Zur Trennung von Makromolekülen nach ihrer Molekülgröße wird häufig die GPC eingesetzt. Die stationäre Phase stellt in der Regel eine organische Substanz dar, die in der mobilen Phase quillt und dabei ein Gel bildet. In die Poren des dreidimensionalen Netzwerkes (Gel) können Lösungsmittelmoleküle und Moleküle der Analyten in Abhängigkeit von ihrer effektiven Größe hinein diffundieren. Große Moleküle können nicht eindringen, verbleiben in der freien mobilen Phase und verlassen das chromatographische System am schnellsten. Kleine Moleküle dringen am weitesten in das Netzwerk ein und werden am längsten retardiert.

Zur gelchromatographischen Fraktionierung von phenolischen Kohlenhydratverbindungen wurden in der Literatur überwiegend zwei Säulenmaterialien beschrieben: Sephadex™ LH-20 (Bunzel et al., 2002a, Ishii, 1991, Saulnier et al., 1999, Saulnier et al., 1995) und Bio-Gele® unterschiedlicher Porengröße (Ford, 1989, Kroon et al., 1997a, Ralet et al., 1994).

Zur Isolierung von monomeren PCS-Sacchariden wurde in Anlehnung an die von Bunzel et al. (2002a) beschriebene Methode Sephadex™ LH-20 eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein hydroxypropyliertes Dextrangel mit einem Trennbereich von 100 – 5000 Dalton. Dextrangele besitzen unter bestimmten Bedingungen die Eigenschaft, mit aromatischen Gruppen der Analyten sekundäre Wechselwirkungen einzugehen. Das Gleichgewicht zwischen einer reinen Trennung nach Molekülgröße und einer Trennung aufgrund der Affinität des Analyten zur Gelphase verschiebt sich je nach verwendeten Eluenten. So können organische Lösungsmittel sekundäre Wechselwirkungen zurückdrängen. Eine Trennung vorwiegend nach Molekülgröße ist deswegen durch Verwendung rein organischer Lösungsmittel möglich.

Um eine gute Trennung von unterschiedlichen monomeren phenolischen Oligosacchariden zu erreichen, wurde Wasser als Eluent eingesetzt. Unter wässrigen Bedingungen wird eine Trennung der Fraktionen sowohl nach Molekülgröße als auch aufgrund sekundärer Wechselwirkungen erhalten.

Die Detektion des GPC-Laufes erfolgte mittels präparativem UV-Detektor bei einer Messwellenlänge von 325 nm. Die Chromatographiebedingungen sind Anhang 5.2.1 zu entnehmen, die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.3 dargestellt.

2.3.5 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Oligosacchariden an Sephadex™ LH-20 bzw. Bio-Gel® P-2

Unter den Bedingungen der rein wässrigen Elution verbleiben die DFS-Oligosaccharide auf der Sephadex™ LH-20–Säule. Um diese Verbindungen von der Säule zu eluieren, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Lösungsmittelgemische eingesetzt. Am besten gelang die Isolierung von DFS-Oligosacchariden mit einem Methanol/Wasser-Gemisch 20/80 (v/v). Ein Nachteil dieser Elution war jedoch die geringe Reproduzierbarkeit der Trennung.

Um eine bessere Reproduzierbarkeit der Trennung zu gewährleisten, wurde eine andere Strategie zur Isolierung von DFS-Oligosaccharid-Verbindungen gewählt. So wurden nach Abtrennung von monomeren PCS-Kohlenhydrat-Verbindungen (mit Wasser als Elutionsmittel) die verbliebenen DFS-Oligosaccharide vollständig mit Methanol von der Sephadex™ LH-20–Säule eluiert. Die Lösung wurde eingeengt und auf eine andere GPC-Säule (Bio-Gel® P-2-Material) gegeben. Bei Bio-Gel® P-2 handelt es sich um ein Polyacrylamidgel – ein synthetisches Polymer aus Acrylsäureamid und N,N-Methylenbisacrylsäureamid. Hiermit wurde eine gute Trennung von DFS-Oligosacchariden erreicht. Zwar lieferte auch diese Methode keine vollständig reproduzierbaren Ergebnisse, sie erwies sich aber zur Isolierung von DFS-Sacchariden als besser geeignet im Vergleich zur oben beschriebenen Methode mit Sephadex™ LH-20 als stationäre Phase und einem Eluenten, bestehend aus Wasser und Methanol.

Die Detektion erfolgte mittels präparativem UV-Detektor bei einer Messwellenlänge von 325 nm. Die Chromatographiebedingungen sind Anhang 5.2.1 zu entnehmen, die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.3 dargestellt.

2.3.6 Charakterisierung der isolierten GPC-Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS

Die isolierten GPC-Fraktionen enthalten oft Gemische von co-eluierenden Substanzen. Um möglichst reine Verbindungen zu erhalten, die anschließend sicher identifiziert werden konnten, sollten ausgewählte GPC-Fraktionen weiter fraktioniert bzw. gereinigt werden. Als Entscheidungshilfe bei der Auswahl geeigneter Fraktionen wurden alle isolierten Fraktionen mittels HPLC, gekoppelt mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) und einem MS untersucht. Mittels HPLC wurden die isolierten GPC-Fraktionen auf ihre Reinheit geprüft. Hierzu wurden Gradientenprogramme entwickelt, die die bestmöglichen Trennungen der einzelnen Substanzen gewährleisteten. Durch DAD wurde die Möglichkeit geboten, die phenolischen Komponenten anhand der UV-Spektren zu charakterisieren. Weitere Informationen wurden durch die Ermittelung der Molekülmassen der Verbindungen erhalten. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mit Hilfe eines gekoppelten Quadrupol-MS. Als Ionisationsverfahren wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) eingesetzt. Dieses Ionisationsverfahren, bei dem die Erzeugung der Ionen unter Atmosphärendruck stattfindet, erwies sich als gut geeignet zur Ionisation von PCS- und DFS-Oligosacchariden. Dabei wird eine Substanzlösung durch eine Kapillare in eine Kammer mit entgegenströmendem Trockengas gesprüht. Durch das Anlegen eines Potentials von einigen Kilovolt entstehen

elektrisch geladene Tröpfchen, die unter Verdampfung des Lösungsmittels kleiner werden. Die geladenen Tröpfchen bzw. die nackten Ionen, die nach Coulomb-Explosion entstehen, bewegen sich – getrieben durch das elektrische Feld – durch eine Kapillare in den Analysatorvorraum und werden nach Fokussierung in den Quadrupol-Massen-Analysator gelenkt. Dort werden sie entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt.

Die Art der Spannung, die an der Kapillare angelegt wird, bestimmt die Ladung der Ionen, die analysiert werden. Typischerweise werden entweder $[M+H]^+$-Ionen bzw. $[M-H]^-$-Ionen detektiert. Ein charakteristisches Phänomen bei der ESI ist die Bildung von Addukten mit Bestandteilen des Eluenten ($[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$). Diese Adduktbildung ist ebenfalls mit Bestandteilen der Probenmatrix möglich.

Bei der Untersuchung der GPC-Fraktionen wurde im positiven Modus gearbeitet, so dass positiv geladene Ionen erzeugt wurden.

Durch Anwendung der HPLC-DAD-MS konnten die phenolischen Bestandteile einiger Verbindungen charakterisiert werden und ebenfalls Vermutungen über eventuelle Kohlenhydratkomponenten angestellt werden. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde entschieden, welche GPC-Fraktionen weiter gereinigt bzw. fraktioniert werden sollten.

Die Chromatographiebedingungen sind Anhang 5.2.2.1 zu entnehmen, die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.3.4 dargestellt.

2.3.7 Reinigung bzw. weitere Fraktionierung der isolierten GPC-Fraktionen

Die mittels HPLC-DAD-MS untersuchten GPC-Fraktionen stellten oft ein Gemisch aus unterschiedlichen phenolischen Sacchariden dar und lagen zum Teil stark verunreinigt vor. Für eine eindeutige Identifizierung der isolierten Verbindungen sollte ein hoher Reinheitsgrad angestrebt werden. Anhand der mittels HPLC-DAD-MS erhaltenen Chromatogramme wurde entschieden, mit welcher Methode die Fraktionen gereinigt bzw. weiter fraktioniert werden sollten.

Monomere Phenolcarbonsäure-Saccharide

Zwei Reinigungsmöglichkeiten wurden bei monomeren PCS-Verbindungen in Betracht gezogen: Reinigung mittels GPC an Bio-Gel® P-2 oder Reinigung mittels semipräparativer HPLC an C18-Reversed Phase (RP)-High Density (HD)-Material. Da das Ziel dieser Arbeit u.a. auch die Isolierung von phenolischen Sacchariden im präparativen Maßstab für die nachstehenden Fermentationsversuche war, wurden alle ausgewählten GPC-Fraktionen zur Steigerung der Effizienz zuerst an Bio-Gel® P-2 gereinigt. Es wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 325 nm detektiert. Für drei Fraktionen war die Reinigung an Bio-Gel® P-2 ausreichend, so dass keine weiteren Reinigungsschritte für die in diesen Fraktionen dominierenden Ferulasäure-Mono/Oligosaccharide notwendig waren. Bei einer Fraktion wurde anstelle der Reinigung an Bio-Gel® eine Fraktionierung mittels semipräparativer

HPLC-UV durchgeführt. Mittels semipräparativer HPLC konnte zusätzlich zum dominierenden Ferulasäure-Monosaccharid eine quantitativ weniger bedeutende Substanz isoliert werden.

Bei einer weiteren GPC-Fraktion wurden nach der Reinigung an Bio-Gel® P-2 eine Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC-UV durchgeführt. Zwei monomere PCS-Saccharide wurden so erhalten.

Die genauen Arbeitsanweisungen befinden sich in Anhang 5.1.3.5. Die Chromatographiebedingungen sind in Anhang 5.2.1.2 (GPC) und 5.2.2.2 (HPLC) dargestellt.

Dehydrodiferulasäure-Saccharide

Zur Reinigung bzw. Fraktionierung von GPC-Fraktionen, die DFS-Saccharide enthielten, wurde wegen der geringen Mengen die semipräparative HPLC als Methode gewählt. Zur Fraktionierung wurden, ebenso wie für die Fraktionierung der PCS-Saccharide, binäre Gradientenprogramme angewendet, die für das entsprechende Trennproblem der jeweiligen GPC-Fraktion zuvor entwickelt wurden. Die Optimierung der Trennmethoden erfolgte an C18-RP-HD-Material im analytischen Maßstab. Anschließend wurde die HPLC-Methode vom analytischen auf das semipräparative System übertragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 325 nm. Gemäß der Chromatogramme wurden die Fraktionen per Hand gesammelt.

Die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.3.6 beschrieben. Die Chromatographiebedingungen sind in Anhang 5.2.2.3 (HPLC) dargestellt.

2.3.8 Bestimmung der relativen Molekülmasse mittels MS

MS ist eine wichtige Methode zur Identifizierung und Strukturaufklärung in der organischen Chemie. Die bereits in Kapitel 2.2.6 vorgestellte HPLC-DAD-MS-Anlage mit Elektrospray-Ionenquelle und Quadrupol-Massenanalysator wurde auch bei der Identifizierung von gereinigten Substanzen eingesetzt.

Des Weiteren wurden die Summenformeln ausgewählter Verbindungen mit Hilfe der hochauflösenden MS bestimmt. Dies erfolgte an einem hochauflösenden Sektorfeld-MS unter Zusatz eines geeigneten Standards (Polyethylenglykol). Da die zu untersuchenden Verbindungen bereits gereinigt vorlagen, konnten sie ohne vorgeschaltete HPLC-Apparatur direkt mittels Spritzenpumpe der Ionenquelle (ESI im positiven Modus) zugeführt werden.

Die Geräte- und Messparameter für die massenspektrometrischen Untersuchungen sind Kapitel 5.2.2.1 (HPLC-DAD-MS) und 5.2.4 (hochauflösende MS) zu entnehmen. Die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.4.1 dargestellt.

2.3.9 Identifizierung der Kohlenhydratkomponenten der isolierten Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Saccharide

Viele Verfahren wurden in der Literatur zur sauren Hydrolyse von PCS-Sacchariden beschrieben. Sie unterscheiden sich in der Temperatur (100-120 °C), der Hydrolysedauer (20 min bis 3 h) sowie in der Art und Konzentration der verwendeten Säure. Die von Bunzel (2001) optimierte Hydrolyse (2 M TFA, 120 °C, 30 min) wurde leicht modifiziert (Reaktionszeit auf 60 min verlängert) und zur Freisetzung der Monosaccharid-Einheiten aus den PCS- und DFS-Sacchariden angewendet.

Zur Identifizierung der freigesetzten Zuckerbausteine wurden die Monosaccharide mit Natriumborhydrid im schwach alkalischen Milieu zu den entsprechenden Alditolen reduziert. Unter Verwendung eines Katalysators wurden die nichtflüchtigen Alditole mit Essigsäureanhydrid zu den flüchtigen Alditolacetaten umgesetzt (Blakeney et al., 1983). Die Alditolacetate wurden schließlich mit Chloroform extrahiert und gaschromatographisch an einer HP-5MS-Fused-Silica-Kapillarsäule (bei monomeren PCS-Sacchariden) und DB-5-Fused-Silica-Kapillarsäule (bei DFS-Sacchariden) untersucht. Um Referenzverbindungen zu erhalten, wurden die in Maisballaststoffen überwiegend enthaltenen Neutralzucker (Arabinose, Xylose, Galactose und Glucose) entsprechend reduziert und derivatisiert. Die Identifizierung der Alditolacetate wurde anhand der relativen Retentionszeiten, bezogen auf die Acetate von *myo*-Inosit bzw. *meso*-Erythrit als interne Standardsubstanzen durchgeführt.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 5.1.4.2 beschrieben. Die Chromatographiebedingungen sind Anhang 5.2.3.1 (monomere PCS-Saccharide) und 5.2.3.2 (DFS-Saccharide) zu entnehmen.

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Zucker war eine gaschromatographische Analyse leichtflüchtiger Derivate an einer chiralen stationären Phase notwendig. Die nach Hydrolyse erhaltenen Monosaccharid-Einheiten der PCS-Saccharid-Verbindungen wurden mit Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan derivatisiert und als Trifluoracetate an einer chiralen stationären Phase (Hydrodex-β-6-TBDM) gaschromatographisch untersucht (Sölter, 2004). Nach der gleichen Methode wurde auch mit den zur Identifizierung notwendigen Standardsubstanzen (D-Arabinose, L-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, D-Galactose, L-Galactose) verfahren.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 5.1.4.3 beschrieben. Die Chromatographiebedingen sind Anhang 5.2.3.3 zu entnehmen.

2.3.10 Identifizierung der Dehydrodiferulasäuren der isolierten Dehydrodiferulasäure-Saccharide

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der DFS haben sich bisher gaschromatographische Methoden mit Flammenionisationsdetektion (FID) bzw. MS als geeignet erwiesen. Eine zufriedenstellende Trennung aller DFS-Isomere in Form ihrer Trimethylsilyl-Derivate wurde entwickelt und erfolgreich angewendet (Bunzel et al., 2001). Um auf eine Derivatisierung im Zuge der Probenaufarbeitung verzichten zu können, wurde alternativ vielfach versucht, eine HPLC-Methode zur Bestimmung der DFS zu entwickeln (Andreasen et al., 2000, Waldron et al., 1996). Die Trennung aller DFS mittels HPLC erwies sich bisher jedoch als problematisch. Ein weiteres Problem stellte die Trennung monomerer *trans*- und *cis*-Ferulasäure und 8-8-DFS dar, da sie auf RP18-Phasen ein ähnliches Elutionsverhalten zeigen. Die GC-Methode war deswegen lange Zeit den HPLC-Methoden überlegen. Unserer Arbeitsgruppe ist es jedoch gelungen, eine HPLC-Methode zu entwickeln, die eine gute Trennung aller DFS und Ferulasäure gewährleistet. Diese Methode fand im Rahmen dieser Arbeit Anwendung. Hierzu wurden die gereinigten Fraktionen alkalisch hydrolysiert, mit einem 2 M Phosphorsäure/Methanol-Gemisch 1/1 (v/v) versetzt und direkt mittels HPLC vermessen. Als Trennsäule wurde eine Hexyl-Phenyl-Säule gewählt, die eine bessere Trennung als die herkömmlichen C18- bzw. C18-HD-Materialien gewährleistete. Die Identifizierung der DFS erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und UV-Spektren mit den zuvor aufgenommenen Daten von Standardsubstanzen. Die erforderlichen Standardsubstanzen wurden in unserer Arbeitsgruppe isoliert (Bunzel et al., 2004).

Die genaue Arbeitsvorschrift ist in Kapitel 5.1.4.4 beschrieben. Die Chromatographiebedingungen sind Anhang 5.2.2.4 zu entnehmen.

2.3.11 Identifizierung isolierter Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Saccharide mittels NMR

Unter den spektroskopischen Hilfsmitteln, die zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen zur Verfügung stehen, nimmt NMR die führende Stellung ein. Entsprechend wurde die hochauflösende NMR-Spektroskopie zur Identifizierung der isolierten Fraktionen angewendet. Die NMR-Spektroskopie basiert darauf, dass viele Kerne einen von null verschiedenen Eigendrehimpuls (Kernspin) und ein damit verbundenes magnetisches Moment aufweisen. Die magnetischen Wechselwirkungen der Atomkerne mit äußeren Magnetfeldern sowie die Wechselwirkungen mit der Elektronenhülle des eigenen Atoms und den Elektronen des gesamten Moleküls hängen stark von der Natur der chemischen Bindung und der dreidimensionalen Struktur des Moleküls ab und liefern genaue Informationen über den Aufbau der untersuchten organischen Verbindung.

Die eindimensionale (1D) NMR-Spektroskopie ist die am häufigsten angewandte Strukturaufklärungsmethode der Chemie. ^{1}H und ^{13}C sind die Kerne, die am häufigsten in der organischen Chemie gemessen werden, aber auch ^{15}N, ^{31}P und ^{19}F können spektroskopiert werden, falls sie vorhanden sind. Um die Strukturen von unbekannten Molekülen mittels 1D

^{1}H-NMR-Spektroskopie aufklären zu können, ist das Verständnis der Zusammenhänge zwischen den spektralen Parametern (chemische Verschiebung (des Protons δ_H und des ^{13}C-Atoms δ_C), Spin-Spin-Kopplung sowie Intensitäten der Resonanzsignale) und der Struktur chemischer Stoffe von Bedeutung.

Mit Hilfe der chemischen Verschiebung lässt sich erkennen, in welcher Umgebung sich die betrachteten Kerne der untersuchten Substanz innerhalb des Moleküls befinden. Höhere Elektronendichte (Abschirmung) bewirkt eine Verschiebung der Resonanzsignale hin zum höheren Feld (d. h. kleinere chemische Verschiebungen werden beobachtet), während eine geringe Elektronendichte (Entschirmung) zu einer Verschiebung hin zum tieferen Feld (d. h. größere chemische Verschiebungen werden beobachtet) führt.

Die indirekte Spin-Spin-Kopplung erlaubt es, die relative Lage der Protonen im Molekül festzulegen, da die durch Spin-Spin-Kopplung (^{n}J über n Bindungen) hervorgerufene Feinstruktur der Resonanzsignale von seiner Umgebung (wechselwirkende magnetische Kerndipole) abhängig ist.

Durch Integration der Flächen unter der Signalkurve wird die relative Anzahl der Wasserstoffatome, auf die ein NMR-Signal zurückzuführen ist, gemessen.

Ein außerordentlich wirksames Hilfsmittel zur Strukturaufklärung ist die 1D ^{13}C-NMR-Spektroskopie, da alle organischen Verbindungen Kohlenstoff als Teil ihres Gerüstes enthalten. Das magnetische Moment des ^{13}C-Kernes ist um Faktor 4 kleiner als das des Protons. Die sich daraus ergebende verminderte Empfindlichkeit für das NMR-Experiment führt vor allem in Verbindung mit dem geringen natürlichen Vorkommen (1,07 % ^{13}C und 98,9 % ^{12}C) dazu, dass die ^{13}C-NMR-Spektroskopie wesentlich unempfindlicher ist als die ^{1}H-NMR-Spektroskopie. Das geringe natürliche Vorkommen von ^{13}C-Atomen in den Molekülen hat jedoch den Vorteil, dass die ^{13}C-NMR-Spektren kaum homonukleare ^{13}C-^{13}C-Spin-Spin-Kopplungen zeigen. Es treten dagegen Kopplungen zu benachbarten Wasserstoffatomen auf, was die Spektren komplex erscheinen lässt. Um diese Auswirkung der ^{13}C-^{1}H-Kopplungen zu vermeiden, ist es üblich, die Protonen während der Aufnahme zu entkoppeln. Mittels der ^{1}H-Breitband-Entkopplung wird erreicht, dass die ^{13}C-Signale im Spektrum nicht aufgespalten sind, sondern als einzelne Linien erscheinen. Dazu wird während der eigentlichen ^{13}C-NMR-Messung ein intensives, breites Radiofrequenz-Signal im Bereich ^{1}H-Resonanzen eingestrahlt, das die Resonanzfrequenzen aller Wasserstoffatome vollkommen abdeckt.

Bei komplexen Molekülen ist eine eindeutige Identifizierung anhand der bisher beschriebenen 1D NMR-Spektroskopie kaum möglich. Deswegen wurden zur Identifizierung der isolierten Fraktionen verschiedene zweidimensionale (2D) NMR-Experimente ergänzend zu den 1D Experimenten durchgeführt. Hierbei kamen die homonuklear korrelierten Experimente ^{1}H-^{1}H-COSY (Correlated Spectroscopy) und TOCSY (Total Correlated Spectroscopy) sowie die heteronuklear korrelierten Experimente HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum

Coherence), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) und HSQC-TOCSY zum Einsatz.

Das ^{1}H-^{1}H-COSY-Experiment ist das älteste und meist genutzte 2D Verfahren. COSY-Spektren sind symmetrisch aufgebaut und zeigen Diagonalpeaks mit gleichen chemischen Verschiebungen auf der Ordinate und der Abszisse. Informationsgehalt haben die Diagonalpeaks nicht, im Gegensatz zu den sogenannten Kreuz- oder Korrelationspeaks, die in den beiden Dimensionen unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen. Beim Vorhandensein eines Kreuzsignals kann man davon ausgehen, dass die beiden Protonen skalar (über Bindungen) miteinander koppeln. In der Regel werden Kopplungen über zwei und drei Bindungen erkannt. Unter bestimmten Voraussetzungen können jedoch auch weiterreichende Kopplungen erfasst werden.

Das TOCSY-Experiment kann als Erweiterung des COSY-Experimentes eingesetzt werden. Durch Korrelationspeaks werden bei diesem Verfahren Wechselwirkungen zwischen Protonen gezeigt, die einem gemeinsamen Spinsystem angehören. Dies sind i.a. Kopplungen zwischen all jenen Protonen, die nicht durch ein quartäres Kohlenstoffatom oder ein Heteroatom ohne Wasserstoff als Substituent getrennt sind. Bei der Strukturaufklärung von hochmolekularen Substanzen mit klar definierten Spinsystemen, z. B. Oligosaccharide, ermöglicht dieses Experiment Aussagen darüber, welche Protonen einer bestimmten Monosaccharid-Einheit zuzuordnen sind.

Die HMQC- bzw. HSQC-NMR-Spektroskopie gehören zu den wichtigsten heteronuklearen 2D Experimenten. Mit Hilfe dieser Verfahren werden die ^{1}J-Kopplungen zwischen einem Proton und dem ^{13}C-Kern, an welchen das Proton gebunden ist, gezeigt. Hierbei handelt es sich um ein inverses Experiment (Erzeugung von Kohärenzen im Kanal der unempfindlichen ^{13}C-Kerne und Übertragung auf die empfindlichen Protonen, dessen Resonanzen gemessen werden). So haben die HMQC- bzw. HSQC-Experimente den Vorteil einer deutlich gesteigerten Empfindlichkeit und sind häufig auch dann aussagekräftig, wenn die Substanzmenge für ein ^{13}C-Experiment nicht mehr ausreicht.

Als besonders hilfreich bei der Strukturaufklärung komplexer Moleküle erweist sich das phasensensitive 2D Experiment HSQC-TOCSY. Das zugehörige Spektrum zeigt die Korrelationssignale der Heteroatome (z. B. ^{13}C) mit ihren direkt gebundenen Wasserstoffatomen sowie deren skalar koppelnden Nachbarn. Die gute Dispersion des Kohlenstoffs wird dabei genutzt, um die skalar koppelnden Wasserstoffatome in komplexen Systemen zu erkennen.

In HMBC-Spektren sind Korrelationen über mehrere Bindungen (in der Regel ^{2}J- und ^{3}J-Kopplungen), z. B. zwischen ^{13}C- und ^{1}H-Atomen, zu erkennen. Hierbei werden ^{1}H-^{13}C-Korrelationen auch dann erkannt, wenn ein Heteroatom im Molekül die betrachteten Kerne voneinander trennt. Das HMBC-Experiment ist eines der empfindlichsten Verfahren für Weitbereichskorrelationen, es ist dennoch deutlich unempfindlicher als z. B. die HSQC- bzw. HMQC-Experimente. Nach vollständiger Zuordnung der Protonen- und ^{13}C-Signale kann das

HMBC-Experiment in Oligosacchariden z. B. zur Klärung der Bindungsverhältnisse zwischen Monomeren oder zwischen Kohlenhydrat-Einheiten und phenolischen Komponenten eingesetzt werden. Außerdem kann die Ringform von Monosaccharid-Einheiten (Pyranose oder Furanose) mit Hilfe dieses Verfahrens untersucht werden.

Das Konzept der dreidimensionalen (3D) NMR-Spektroskopie findet vor allem Anwendung in der Proteinchemie, hat jedoch alle Bereiche der Strukturaufklärung organischer Moleküle vorangetrieben. Heteronukleare 3D Experimente beziehen mindestens zwei Kerntypen, z. B. ^{1}H und ^{13}C, in das Experiment ein. In der Proteinchemie wird häufig ein dritter Kerntyp, ^{15}N neben ^{1}H und ^{13}C, in den 3D NMR-Experimenten berücksichtigt. Durch die Verwendung von 3D NMR-Spektroskopie werden die Korrelationssignale in einem Würfel anstatt in einer Ebene wie im 2D Experiment verteilt. Dadurch wird die „Auflösung" der Spektren deutlich verbessert und selbst die Strukturen der Verbindungen, die in 2D Experimenten zu stark überladenen Spektren führen, können eindeutig aufgeklärt werden. 3D Experimente sind ähnlich aufgebaut wie 2D Puls-Experimente. Sie können generell als eine Kombination von zwei 2D Experimenten aufgefasst werden, wobei die Detektionsphase des ersten Experimentes und die Präparationsphase des zweiten Experimentes entfällt. In dieser Arbeit wurde das 3D TOCSY-HSQC-Experiment angewendet, welches eine Kombination der 2D Experimente TOCSY und HSQC darstellt. Wird das erhaltene 3D Spektrum in 2D Ebenen betrachtet, so erhält man bei Betrachtung der f_2-f_3-Ebenen bei definierten ^{1}H-Verschiebungen 2D HSQC-Spektren, bei Betrachtung der f_1-f_2-Ebenen bei definierten ^{1}H-Verschiebungen 2D HSQC-TOCSY-Spektren und bei Betrachtung der f_1-f_3-Ebenen bei definierten ^{13}C-Verschiebungen 2D TOCSY-Spektren.

Eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Substanzen war teilweise erst durch Kombination der Daten aus 1D, 2D und 3D NMR-Experimenten möglich. Als Referenzsubstanz zur Kalibrierung von 1D Spektren diente bei in D_2O gelösten Verbindungen Aceton (δ_H=2.22 ppm, δ_C=30.89 ppm) (Gottlieb et al., 1997). Bei in Aceton-d6/D_2O 9/1 (v/v) gelösten Verbindungen wurde auf den zentralen Peak von Aceton-d6 (δ_H=2.04 ppm, δ_C=29.80 ppm) kalibriert. Die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.4.5 beschrieben. Die Geräteparameter sind dem Anhang 5.2.5 zu entnehmen.

2.3.12 Identifizierung isolierter Phenolcarbonsäure-Oligosaccharide mittels Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse ist eine der ältesten (Björndal et al., 1967, Lindberg, 1972) und auch heute noch angewendeten Methoden in der Kohlenhydratanalytik, die v.a. benutzt wird, um Aussagen über die glykosidischen Bindungen der Monosaccharid-Bausteine in Oligo- und Polysacchariden zu treffen. Grundlage für die hier durchgeführte Analytik bildete u.a. die bei Nunes und Coimbra beschriebene Methode (Nunes und Coimbra, 2001), die jedoch leicht modifiziert wurde. Die freien Hydroxylgruppen der PCS-Oligosaccharide wurden mittels Methyliodid in Dimethylsulfoxid methyliert (Ciucanu und Kerek, 1984). Nach der Methylierung wurden die Oligosaccharide sauer hydrolysiert (2M TFA, 121 °C, 1 h) und mit

Natriumbordeuterid reduziert. Die Verwendung von Natriumbordeuterid hat sich gegenüber der Verwendung von Natriumborhydrid als vorteilhaft herausgestellt, da nach der Reduktion mit Natriumbordeuterid bei der Untersuchung mittels GC-MS Fragmente entstehen, die zweifelsfrei zugeordnet werden können. Dies ist bei der Verwendung von Natriumborhydrid nicht der Fall, Verwechslungen sind hier nicht ausgeschlossen (Jansson et al., 1976). Die resultierenden teilmethylierten offenkettigen Alditole wurden mit Essigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol als Katalysator an den nach Hydrolyse neu entstandenen Hydroxylgruppen acetyliert. Bei den dabei gebildeten partiell methylierten Alditolacetaten (PMAA) gab die Stellung der Acetatgruppen Aufschluss über die in den Oligosacchariden vorliegenden Bindungstypen und über die Ringgrößen der ursprünglichen Monosaccharide. Die Auswertung erfolgte über eine GC-Trennung der PMAA mit anschließender MS-Detektion (Elektronenstoßionisation (EI), Quadrupol). Durch den Vergleich von Retentionszeiten und Massenspektren mit einer zuvor angelegten Bibliothek von Standardsubstanzen konnten die acetylierten Fragmente identifiziert werden, was Informationen über die Bindungsverhältnisse der Zuckerbausteine in den isolierten Fraktionen lieferte.

Die genaue Arbeitsanweisung ist in Anhang 5.1.4.6 beschrieben. Die Geräteparameter sind dem Anhang 5.2.3.4 zu entnehmen.

2.3.13 Zusammenfassung der Methoden zur Isolierung und Identifizierung von monomeren Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Saccharide aus Maiskleie

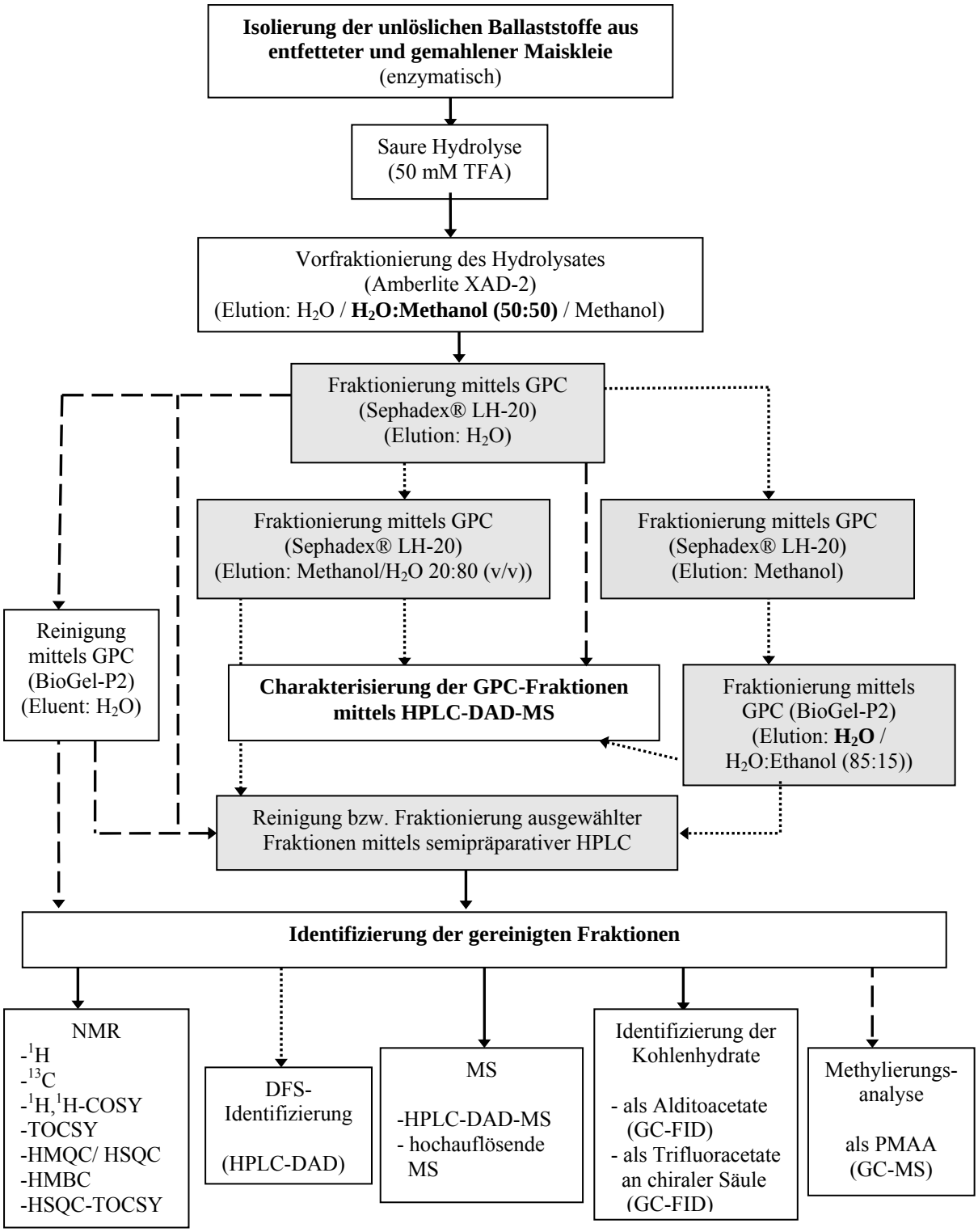


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Methoden zur Isolierung und Identifizierung von monomeren Phenolcarbonsäure (PCS)- und Dehydrodiferulasäure (DFS)-Saccharide *(die Felder mit den wichtigsten Fraktionierungs-Schritten sind grau hinterlegt; grob gestrichelte Linie: Isolierung und Identifizierung von PCS-Saccharide; fein gestrichelte Linie: Isolierung und Identifizierung von DFS-Saccharide; durchgehende Linie: Prozesse, die sowohl PCS- als auch DFS-Saccharide betreffen). PMAA: partiell methylierte Alditolacetate*

2.4 Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung

2.4.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

Die erworbenen, gefriergetrockneten Bakterienstämme wurden in dem von der DSMZ empfohlenen flüssigen Bifidobacterium-Medium (Bifidobakterien-Stämme) unter anaeroben Bedingungen inkubiert, während *Bacteroides*-Stämme durch Kochfleisch-Medium mit allen wichtigen Nährstoffen versorgt wurden.

Um die Kontaminationsgefahr niedrig zu halten, wurde die Kultivierung der Stämme auf Agarplatten durchgeführt. Zur Vereinfachung der Prozedur wurde nach einem Medium gesucht, das zur Kultivierung sowohl von *Bifidobacterium* als auch von *Bacteroides* geeignet war. Als besonders gut geeignet und in der Literatur bereits beschrieben (Van Laere et al., 2000) erwies sich das Thioglycolat-Medium. Bei 37 °C wurde nach 2-3 Tagen auf den Platten ein gutes Wachstum von allen fünf Mikroorganismusstämmen in Form von zahlreichen Kolonien beobachtet. Beim Thioglycolat-Medium handelt es sich um ein Komplexmedium, das besonders gut zur Anzüchtung von anaeroben Mikroorganismen geeignet ist. Thioglycolat und L-Cystin senken das Redoxpotential, wodurch anaerobe Bedingungen hergestellt werden. Auch Quecksilber und andere Schwermetalle werden durch diese Substanzen inaktiviert. Das Medium enthält Resazurin als Redoxindikator, dessen Farbe unter aeroben Bedingungen von gelb nach rosa wechselt. Ein weiterer Vorteil des Thioglycolat-Mediums besteht darin, dass es als Fertigmedium erhältlich ist.

Zur Kulturhaltung wurden die Stämme in einem Rhythmus von 2 Wochen überimpft und bei 4 °C unter den anaeroben Bedingungen aufbewahrt.

Eine langfristige Lagerung erfolgte in Cryo-Röhrchen in einer sterilen 86 %-igen wässrigen Glycerinlösung bei –80 °C.

Die genaue Arbeitsanweisung und die Rezepturen der eingesetzten Medien sind dem Anhang 5.1.5.1 zu entnehmen.

2.4.2 Fermentation von 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose und β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose durch ausgewählte Bakterienstämme

Für die Fermentationsversuche wurden die isolierten Verbindungen 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) als Substrate verwendet. Die Untersuchungen erfolgten *in vitro* in mit zuckerfreier Thioglycolat-Bouillon (pH=7) befüllten Schraubverschlussgläsern (Zusammensetzung siehe Anhang 5.1.5.2). Dieses Medium wurde bereits für die Fermentation von unterschiedlichen Oligosacchariden eingesetzt und in der Literatur beschrieben (Van Laere et al., 2000).

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden vor Beginn der mikrobiologischen Untersuchungen das Nährmedium, alle Gebrauchsgegenstände und Lösungen mit Ausnahme der FA-, FAX- und Ferulasäure-Lösungen autoklaviert. Da FA und FAX unter extremen

Bedingungen im Autoklaven zerstört würden, wurde zur Sterilisation eine schonendere Membranfiltration verwendet. Auch das Autoklavieren von *trans*-Ferulasäure (im leicht alkalischen Milieu) kann zur Zersetzung oder unerwünschten *trans*-*cis*-Isomerisierung führen. Daher wurde auch bei dieser Lösung die Membranfiltration angewendet.

Im zuckerfreien Thioglycolat-Medium stand den ausgesuchten Bakterien fast ausschließlich das Substrat (FA bzw. FAX) als Kohlenhydratquelle zur Verfügung. Der Einfluss von kleineren Kohlenhydrat-Beimengungen durch Hefeextrakt oder Pepton wurde durch den Ansatz eines Blindwertes ohne Substratzufuhr kontrolliert. Es wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass die eingesetzten Substrate nur in Gegenwart von Glucose (zur Anregung des Bakterienwachstums) abgebaut werden. Um dies zu überprüfen wurde parallel eine Fermentation von FA bzw. FAX in Gegenwart von Glucose durchgeführt. Um die Einhaltung der für das Bakterien-Wachstum benötigten Bedingungen zu überprüfen, wurde Glucose als Substrat fermentiert. Zur Untersuchung der SCFA-Verteilung wurden Ansätze mit Arabinose bzw. einem Arabinose-Xylose-Gemisch in die Versuchsreihe eingeschlossen. Die Auswirkung der Ester- (FA, FAX) bzw. glykosidischen Bindungen (FAX) auf die mikrobielle Fermentierbarkeit wurde durch Ansätze von Ferulasäure und Arabinose (in äquivalenten Mengen zu FA) und von Ferulasäure, Arabinose und Xylose (in äquivalenten Mengen zu FAX) überprüft. Durch diese Ansätze konnte auch der Einfluss von freier Ferulasäure auf die Abbaubarkeit von Arabinose bzw. von Arabinose und Xylose untersucht werden. Zur Überprüfung der Keimfreiheit aller eingesetzten Lösungen, Bouillons, Verbrauchsmaterialien usw. wurden zusätzlich Ansätze in Anwesenheit von Glucose, aber ohne Zusatz lebender Kulturen inkubiert. Um die Stabilität von FA und FAX in der Thioglycolat-Bouillon zu kontrollieren, wurden Ansätze mit FA bzw. FAX und autoklavierten Mikroorganismen eingesetzt.

Die Vorbereitung der Bakteriensuspension erfolgte in zuckerfreier Thioglycolat-Bouillon. Hierfür wurden die für drei Tage inkubierten Mikroorganismen von der Agarplatte in die Bouillon überführt. Um für jeden Ansatz die gleiche Menge an Mikroorganismen zu gewährleisten, wurde eine 1:10-Verdünnung der Grundsuspension (mit zuckerfreier Thioglycolat-Bouillon) vorgenommen. Die verdünnte Suspension wurde für die Untersuchungen eingesetzt. Zur besseren Kontrolle des Bakterienwachstums während der Inkubation wurde die Keimzahl der eingesetzten Kulturen vor der Fermentation bestimmt. Es wurde das Oberflächen-Ausstrichverfahren gewählt. Bei dieser Methode werden Keime einer genau abgemessenen Menge der Untersuchungssuspension auf einem Agarnährboden in einer Petrischale gleichmäßig mit Hilfe eines Spatels verteilt. Die gewachsenen Kolonien werden nach der Inkubation ausgezählt. Zur Bestimmung der Keimzahl wurde festes zuckerhaltiges Thioglycolat-Medium benutzt. Da eine hohe Keimzahl zu erwarten war, wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt (dezimal abgestuft bis $1:10^6$). Auswertbar sind in der Regel Platten mit 10–300 KBE (Kolonie bildende Einheiten).

Die Fermentationsversuche und die Keimzahlbestimmung wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Bebrütung erfolgte unter anaeroben Bedingungen in Anaerobiertöpfen nach dem

Hinzufügen eines befeuchteten Anaerocult®-Streifens für 48 Stunden. Anaerocult® A enthält Komponenten, die Sauerstoff innerhalb kurzer Zeit chemisch vollständig binden und ein O_2-freies (anaerobes) Milieu einschließlich einer CO_2-Atmosphäre erzeugen. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung bei jedem Ansatz.

Die genaue Arbeitsanweisung ist dem Anhang 5.1.5.2 zu entnehmen.

2.4.3 Mikrobiologische und chemische Bestimmungen nach mikrobieller Fermentation der Substrate

Keimzahlbestimmung

Unmittelbar nach Beendigung der 48 h–Fermentation erfolgte die Bestimmung der Keimzahl, um eventuelles Bakterienwachstum nachzuweisen (siehe Kapitel 2.4.2).

Messung der pH-Werte

Den ersten Hinweis auf eine erfolgte Substratfermentation lieferten die in jedem Ansatz mit einer Einstab-Messkette gemessenen pH-Werte, da organische Säuren und SCFA die Hauptprodukte des bakteriellen Metabolismus darstellen.

Bestimmung der Gehalte an 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose, β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose und trans-Ferulasäure

Die Gehalte an nicht umgesetztem phenolischen Substrat (FA, FAX und Ferulasäure) wurden mittels HPLC-DAD bestimmt. Da die Möglichkeit bestand, dass Ferulasäure auch aus FA bzw. FAX freigesetzt würde, sollte eine Methode entwickelt werden, die die Bestimmung der FA bzw. FAX neben Ferulasäure ermöglichte. Als stationäre Phase wurde eine C18-HD Phase ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine RP-Phase mit einer hohen Dichte an unpolaren Gruppen, wodurch Wechselwirkungen zwischen freien Silanolgruppen und den zu trennenden Substanzen weitestgehend vermieden werden. Als Elutionsmittel diente ein binäres Gemisch aus 1 mM TFA und Acetonitril. Eluiert wurde bei einer Temperatur von 40 °C. Die Detektion erfolgte bei 280 und 325 nm und die Auswertung über die Peakflächen anhand der Regressionsgeraden der Kalibrierlösungen.

Ein Teil der zu untersuchenden Fermentationssuspension wurde mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch verdünnt und nach Membranfiltration direkt zur chromatographischen Bestimmung eingesetzt. Die Chromatographiebedingungen sind dem Anhang 5.2.2.5 zu entnehmen. Die genaue Versuchsbeschreibung befindet sich in Kapitel 5.1.5.3.

Um eine sichere Zuordnung der Peaks zu gewährleisten und die eventuell nach der Fermentation entstandenen Substanzen zu charakterisieren, wurden die ausgewählten Ansätze mittels HPLC-DAD-MS untersucht. Die Chromatographiebedingungen sind in Kapitel 5.2.2.6 beschrieben.

Für die weiteren unten beschriebenen Untersuchungen wurden alle mit lebenden Kulturen versetzten Ansätze mit Hilfe von Membranfiltern steril filtriert.

Bestimmung der Kohlenhydrate

Gehalte an freien Monosacchariden wurden nach Reduktion und Derivatisierung zu den Alditolacetaten mittels GC-FID bestimmt (vgl. Kapitel 2.3.9). Die Chromatographiebedingungen sind dem Anhang 5.2.3.2 zu entnehmen. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.1.5.3 beschrieben.

Bestimmung der kurzkettigen Fettsäuren

Mehrere Methoden (GC- und HPLC-Methoden) zur Bestimmung der SCFA wurden in der Literatur beschrieben. Bei den GC-Methoden handelt es sich hauptsächlich um Untersuchungen an gepackten Glassäulen (Carlier und Sellier, 1989, Fussell und McCalley, 1987, Tangermann und Nagengast, 1996) und seltener um Analysen an Kapillarsäulen (Scheppach et al., 1987). Bei den HPLC-Methoden kamen sulfonierte Styrol-Divinylbenzol-Säulen am häufigsten zum Einsatz (Krausse und Ullmann, 1991, Rycroft et al., 2001, Stein et al., 1992).

Zur Bestimmung der Gehalte und Verteilungsmuster von SCFA wurde die HPLC-UV-Methode (Detektion bei 210 nm) gewählt. Da sich die Thioglycolat-Bouillon als komplizierte Matrix erwies, die viele bei 210 nm detektierbare Substanzen enthielt, war eine umfassende Probenvorbereitung erforderlich. Es wurden verschiedene Aufarbeitungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit getestet. Als Methode der Wahl hat sich die Vakuumdestillation erwiesen. Um größere Verluste an Ameisen- und Essigsäure zu vermeiden, wurde das Auffanggefäß ständig mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Destilliert wurde in einem geschlossenen System bei 10 mbar und 50 °C. 2-Ethyl-Buttersäure, die von Mikroorganismen nicht gebildet werden kann, wurde als interner Standard (IS) benutzt, um Destillationsverluste abzuschätzen. Die chromatographische Bestimmung erfolgte an einer Rezex^{TM} RHM-Monosaccharid-Säule (protoniertes Polystyrol-Divinylbenzol-Material). Dieses Material ist gut zur Untersuchung von Kohlenhydraten, SCFA und organischen Säuren geeignet. Dabei resultiert die Trennung der Analyten aus einem Zusammenwirken von Ionenausschluss-, Ligandenaustausch- und Adsorptionsmechanismen. Durch die Änderung des als mobile Phase gewählten Eluenten, der Säulentemperatur und des pH-Wertes des Eluenten kann die Selektivität des Materials variiert werden. Die Trennung erfolgte bei 60 °C mit einer 0.005 N Schwefelsäure als Elutionsmittel.

Chromatographiebedingungen sind dem Kapitel 5.2.2.6 zu entnehmen. Die genaue Versuchsbeschreibung ist in Kapitel 5.1.5.3 aufgeführt.

Bestimmung der Gehalte an Milchsäure und Bernsteinsäure

Zur Bestimmung des Gehaltes an L- und D-Milchsäure wurde eine enzymatische D- und L-Milchsäure–Testkombination (UV-Test zur Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien, R-Biopharm) verwendet. Das Prinzip des Tests basiert auf der Oxidation von D- bzw. L-Milchsäure durch das Co-Substrat Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu Pyruvat in Gegenwart von D- bzw. L-Lactat-Dehydrogenasen. Die während dieser Reaktionen gebildete Menge an reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) ist der Menge an D- bzw. L-Milchsäure äquivalent. NADH ist die Messgröße und kann aufgrund der Absorption bei 334, 340 und 365 nm

spektralphotometrisch bestimmt werden. Das Gleichgewicht bei diesen Reaktionen liegt weitgehend auf Seite des Lactats. Daher wird in einer nachgeschalteten Reaktion mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase das Pyruvat in Gegenwart von L-Glutamat abgefangen und das Verhältnis auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben.

Zur Bestimmung des Gehaltes an Bernsteinsäure wurde eine enzymatische Testkombination (UV-Test zur Bestimmung von Bernsteinsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien, R-Biopharm) verwendet. Dabei wird Bernsteinsäure in Gegenwart des Enzyms Succinyl-CoA-Synthetase durch Inosin-5'-triphosphat und Coenzym A zu Succinyl-CoA umgesetzt. Das bei dieser Reaktion entstehende Inosin-5'-diphosphat reagiert mit Phosphoenolpyruvat bei Anwesenheit von Pyruvat-Kinase und bildet Pyruvat. Pyruvat wird durch NADH in Anwesenheit von L-Lactat-Dehydrogenase reduziert. Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Bernsteinsäure-Menge äquivalent. Die verbrauchte Menge an NADH wird spektralphotometrisch analysiert.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche spektralphotometrische Bestimmung von NADH ist die Eliminierung von anderen UV-aktiven Substanzen, die bei 334, 340 oder 365 nm absorbieren. Die Fermentationsversuche wurden u.a. mit *trans*-Ferulasäure, FA und FAX durchgeführt. Je nach Metabolisierung der phenolischen Komponente wurden noch größere Mengen an phenolischen Substanzen in der zu untersuchenden Lösung erwartet. Ferulasäure-Derivate zeigen ein Absorptionsmaximum bei 325 nm, absorbieren aber auch bei 334 und 340 nm noch stark. Zur enzymatischen Bestimmung der Milch- oder Bernsteinsäure wurden deswegen die phenolischen Substanzen aus der Fermentationslösung eliminiert. Hierzu wurde Polyvinylpolypyrrolidon als Adsorbermaterial eingesetzt. Polyvinylpolypyrrolidon wird normalerweise zum Klären und Stabilisieren von Wein und Bier verwendet, da es eine große Affinität gegenüber Polyphenolen und phenolischen Substanzen allgemein aufweist. Durch Behandlung der Fermentationslösung mit diesem Adsorber wurden störende phenolische Substanzen weitgehend den Fermentationslösungen entzogen, so dass eine spektralphotometrische Bestimmung des Gehaltes an NADH bei 365 nm durchgeführt werden konnte.

Die genaue Versuchsbeschreibung ist in Kapitel 5.1.5.3 beschrieben.

2.4.4 Zusammenfassung der Methoden zur mikrobiologischen *in vitro* Untersuchung

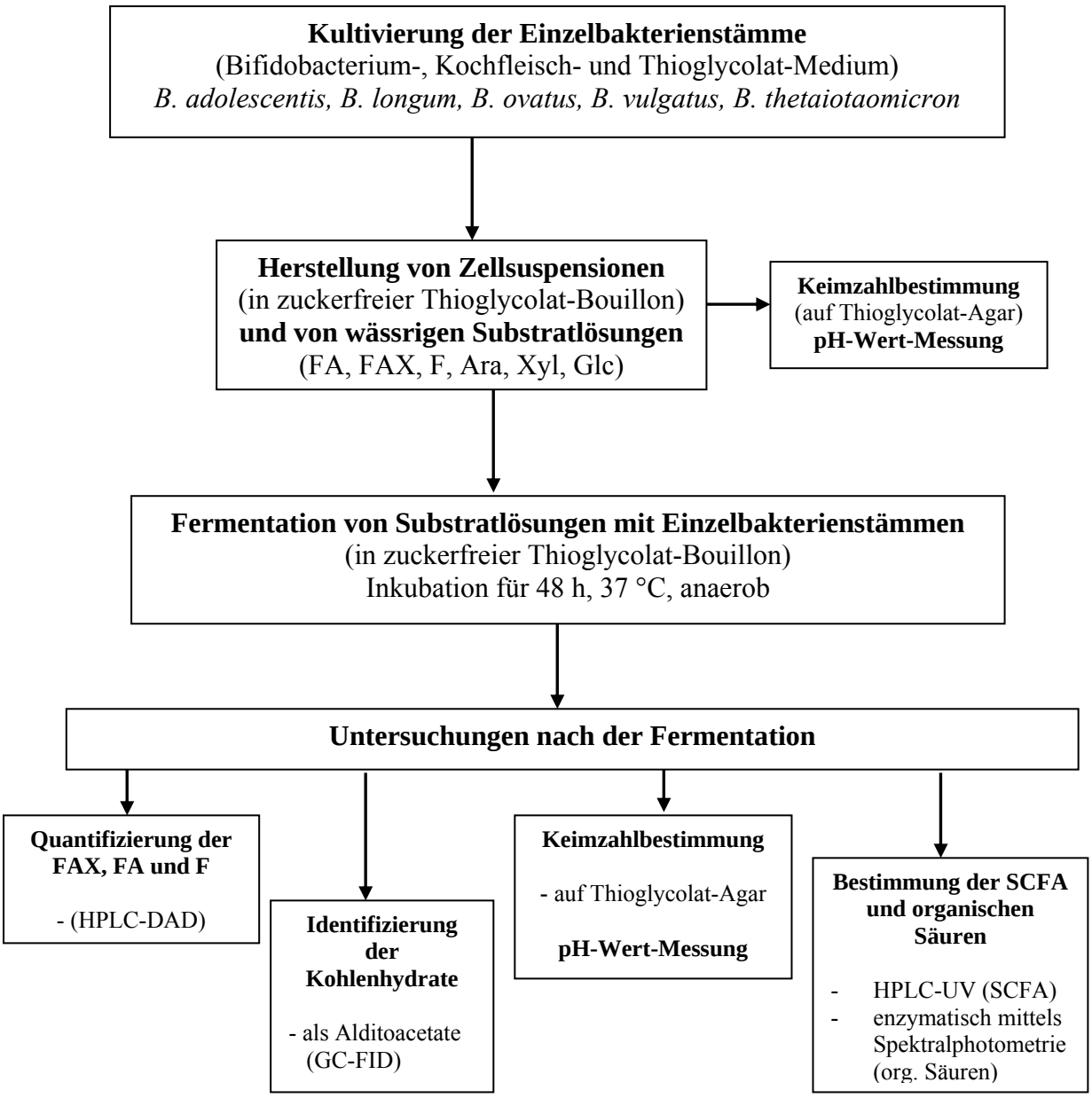


Abb. 2.3: ***Schematische Darstellung der Methoden zur mikrobiologischen in vitro Untersuchungen von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX).*** *F: trans-Ferulasäure, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, Glc: Glucose, SCFA: kurzkettige Fettsäuren*

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Isolierung und Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Saccharid en aus Maiskleie

Nach Anwendung der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen enzymatisch-gravimetrischen Methode auf entfettete Maiskleie wurde ein Hydrolyserückstand von 47-55 % des Ausgangsmaterials erhalten. Der getrocknete Hydrolyserückstand enthielt noch geringe Mengen an Proteinen, hochmolekularen Stärkeabbauprodukten und Asche, wird aber im Folgenden als unlösliche Ballaststoffe bezeichnet.

Durch die Behandlung der unlöslichen Ballaststoffe aus Maiskleie mit 50 mM TFA bei 100 °C für 3 h wurden 60–69 % des Ausgangsmaterials hydrolysiert. Es wurde gezeigt, dass bei Anwendung der gewählten Bedingungen auf unlösliche Ballaststoffe aus Roggen ca. 60 % *trans-p*-Cumarsäure und 75 % *trans*-Ferulasäure (hauptsächlich als PCS-Oligosaccharide) in Lösung gehen (Bunzel, 2001). Der von Saulnier et al. unter ähnlichen Bedingungen aus Maiskleie isolierte Hydrolyserückstand (50 mM TFA, 100 °C, 2 h) bestand hauptsächlich aus Cellulose, wohingegen Heteroxylane zu 80–90 % in Lösung gingen (Saulnier et al., 1995).

Die GPC-Fraktionierung des gereinigten sauren Hydrolysates (Methanol/Wasser-Fraktion nach Amberlite® XAD-2) wurde an Sephadex™ LH-20 mit Wasser als Eluent durchgeführt. Vier spät eluierende Fraktionen (F**1**–F**4**) wurden gesammelt (Abb. 3.1). Die Trennung an Sephadex™ LH-20 mit Wasser als Eluent erwies sich als gut reproduzierbar, so dass die Fraktionen aus unterschiedlichen Läufen vereinigt werden konnten.

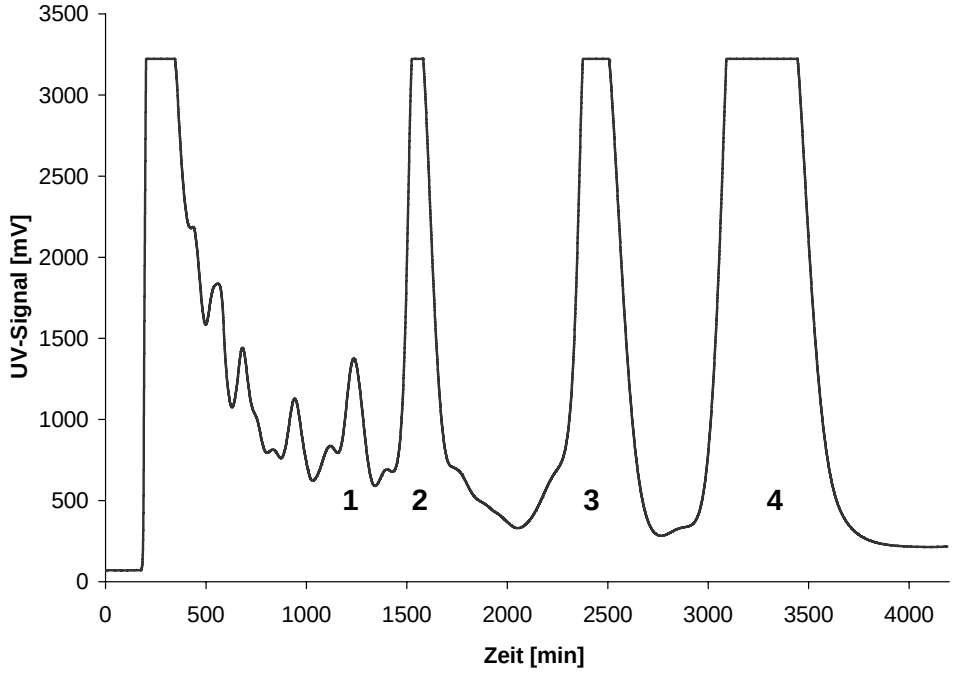


Abb. 3.1: GPC-Chromatogramm des sauren Hydrolysates an Sephadex™ LH-20 (Methanol/H_2O-Fraktion nach Reinigung an Amberlite® XAD-2) (Eluent: H_2O). *Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.1 zu entnehmen.*

3.1.1 Isolierung und Identifizierung von zwei Ferulasäure-Oligosacchariden aus der Fraktion F1

Die Untersuchung der Fraktion F**1** mittels HPLC-DAD-MS ergab, dass es sich um ein Gemisch von mindestens zwei co-eluierenden Komponenten handelte. Beide Hauptsubstanzen wiesen ein Ferulasäure-ähnliches Spektrum auf (siehe Abb. 5.2 in Kapitel 5.3), unterschieden sich jedoch in ihrer Molekülmasse. Da für die Strukturidentifizierung möglichst reine Substanzen vorliegen sollten, wurde F**1** zuerst mittels GPC an Bio-Gel® P-2-Phase gereinigt. Dieser Aufarbeitungsschritt diente zur Abtrennung von Minorkomponenten. Eine endgültige Fraktionierung des gereinigten aus zwei Komponenten bestehenden Gemisches wurde mittels semipräparativer HPLC-UV an C18-RP-HD-Material mit einem zuvor entwickelten Gradienten erreicht. In Abbildung 3.2 ist das bei einer Wellenlänge von 325 nm aufgenommene HPLC-Chromatogramm dargestellt. Im Folgenden werden die in diesem Schritt isolierten Fraktionen als F**1a** und F**1b** bezeichnet. Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurden jeweils ca. 10 mg F**1a** und F**1b** isoliert.

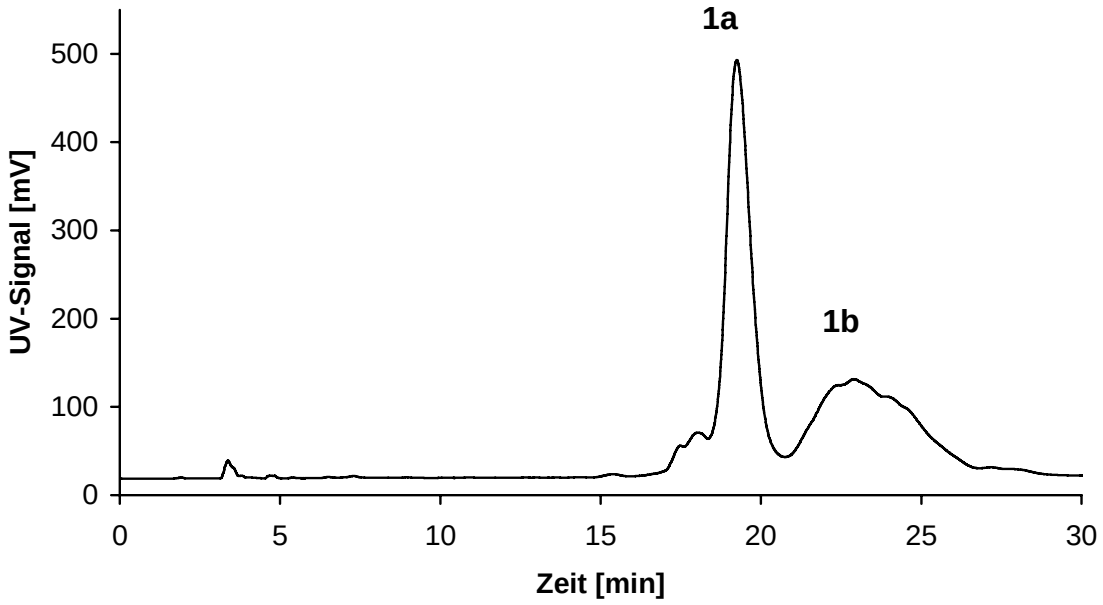


Abb. 3.2: Semipräparatives RP-HPLC-Chromatogramm der GPC-Fraktion F1. *Chromatographiebedingungen sind in Kapitel 5.2.2.2 dargestellt.*

3.1.1.1 Identifizierung der Fraktion F1a

Das mittels HPLC-DAD aufgenommene UV-Spektrum der Fraktion F**1a** (Abb. 3.2 und 3.4) entsprach dem Spektrum von *trans*-Ferulasäure (Abb. 5.2 in Kapitel 5.3). Die Analyse dieser Fraktion mittels HPLC-ESI-MS wurde im positiven Modus durchgeführt. Natrium- bzw. Kalium-Addukte mit *m/z* 805 $[M+Na]^+$ und *m/z* 821 $[M+K]^+$ wurden detektiert, woraus sich eine Molekülmasse von 782 g/mol ableiten ließ. Die Molekülmasse von 782 g/mol entspricht einer Verbindung aus einer *trans*-Ferulasäure, zwei Pentosen und zwei Hexosen. Durch den Einsatz der hochauflösenden MS wurde eine Molekülmasse von 805.23765 g/mol für das Natriumaddukt detektiert. Daraus ließ sich für Fraktion F**1a** die Summenformel $C_{32}H_{46}O_{22}$+Na (berechneter Wert: 805.23783 g/mol) ermitteln, die die Annahme bekräftigt, dass Fraktion F**1a** aus einem Ferulasäure-Molekül, zwei Pentosen und zwei Hexosen aufgebaut ist.

Die in der untersuchten Fraktion vorliegenden Monosaccharid-Einheiten wurden nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung als Alditolacetate mittels GC-FID bestimmt. Über den Vergleich der relativen Retentionszeiten, bezogen auf die internen Standard-Substanzen *meso*-Erythrit und *myo*-Inosit wurden Arabinose, Xylose und Galactose im Verhältnis 1:1:2 identifiziert.

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der einzelnen Kohlenhydratkomponenten wurde Fraktion F**1a** sauer hydrolysiert, und nach Derivatisierung der Monosaccharide wurden diese als Trifluoracetate an einer chiralen stationären Phase mittels GC-FID untersucht. Bei der Trifluoracetylierung entstehen aus einem Monosaccharid bis zu vier Derivate, die den einzelnen Monosacchariden zugeordnet werden können. Anhand des Vergleiches der Retentionszeiten und der chromatographischen Verteilungsmuster der einzelnen Derivate mit den zuvor aufgenommenen Daten von Standardsubstanzen wurde die absolute Konfiguration von Arabinose als L und die von Xylose als D bestimmt. Die beiden Galactosen wiesen unterschiedliche Konfigurationen auf. Eine Galactose-Einheit wurde als L- und die zweite als D-Galactose identifiziert. In Abbildung 3.3 sind Ausschnitte der Gaschromatogramme (Galactose-Region) der trifluoracetylierten Derivate von Standardsubstanzen L-Galactose und D-Galactose, der hydrolysierten Fraktion F**1a** und der mit D-Galactose dotierten hydrolysierten Fraktion F**1a** dargestellt.

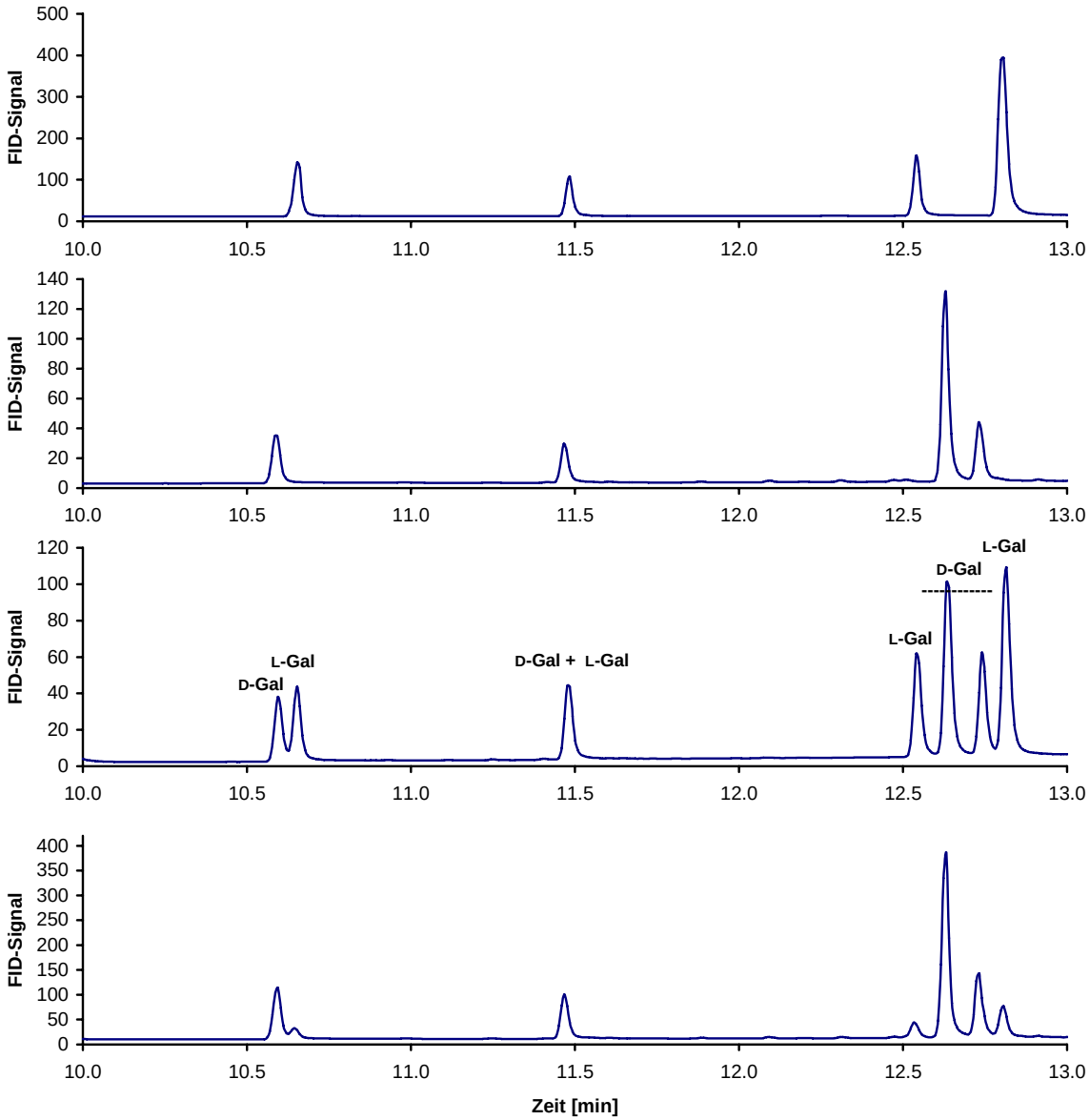


Abb. 3.3: ***Gaschromatogramme (Galactose-Region) der trifluoracetylierten Derivate von L-Galactose (L-Gal), D-Galactose (D-Gal), der hydrolysierten Fraktion F1a und der mit D-Galactose dotierten hydrolysierten Fraktion F1a (von oben nach unten).*** *Chromatographiebedingungen sind in Kapitel 5.2.3.3 beschrieben.*

Die vollständige Strukturaufklärung der Fraktion F**1a** (Abb. 3.4) konnte mit 1D und 2D NMR-Experimenten erzielt werden. Die entsprechenden ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1: ***^{1}H-NMR-Daten für Fraktion F1a (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, Galp: Galactopyranose, OMe: Methoxyl-Gruppe, ax: axial, eq: äquatorial*

	H1 ($J_{1,2}$)	**H2**	**H3**	**H4**	**H5** ($J_{5,6}$)***		**H6**	**H7** ($J_{7,8}$)	**H8**	**OMe**
					$H5_{eq}$	**$H5_{ax}$**				
α-L-Ara*f*	5.395 *(2.30)*	4.112	4.147	4.259	4.385	4.287				
β-L-Ara*f*	5.304 *(4.44)*	4.142	4.258	3.993	4.398	4.215				
β-D-Xyl*p*										
„α“**	4.641 *(7.35)*	3.468	3.648	3.537	3.915	3.296				
„β“**	4.643 *(7.30)*	3.594	3.657	3.597	3.923	3.296				
α-L-Gal*p* 1*										
„α“**	5.366 *(3.76)*	3.968	3.894	4.140	4.200		3.670			
„β“**	5.453 *(3.67)*	3.989	3.943	4.143	4.354		3.677			
α-D-Gal*p* 2*										
„α“**	5.191 *(3.20)*	3.756	3.824	3.893	3.966		3.658			
„β“**	5.190 *(3.36)*	3.766	3.849	3.910	3.989		3.667			
Ferulat										
„α“**		7.106			6.820 *(8.0)*		7.050	7.536 *(15.9)*	6.278	3.802
„β“**								7.547 *(15.9)*	6.282	

* Für die Zuordnung von L- and D-Galactosen siehe Text

** „α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

*** Kopplungskonstante für Ferulat

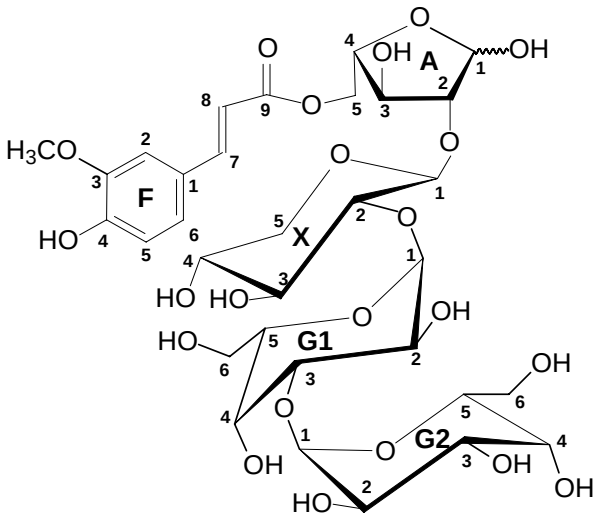


Abb. 3.4: Strukturformel des in Fraktion F1a enthaltenen Ferulasäure-Oligosaccharids: α-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAXGG). *F: trans-Ferulasäure, A: L-Arabinofuranose, X: D-Xylopyranose, G1: L-Galactopyranose, G2: D-Galactopyranose*

Tabelle 3.2: ***^{13}C-NMR-Daten für Fraktion F1a (aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum, in D_2O); chemische Verschiebungen δ_C in ppm.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, Galp: Galactopyranose, OMe: Methoxyl-Gruppe*

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	OMe
α-L-Ara*f*	100.53	90.60	75.57	80.27	64.00					
β-L-Ara*f*	95.37	84.62	73.30	78.96	65.39					
β-D-Xyl*p*										
„α“**	102.59	77.73	76.67	69.84	65.44					
„β“**	103.43	76.48	77.06	69.96	65.52					
α-L-Gal*p* 1*										
„α“**	99.24	68.54	77.88	69.65	71.48	61.71				
„β“**	98.85	68.45	77.96	69.72	71.32	61.51				
α-D-Gal*p* 2*										
„α“**	101.06	69.38	69.96	69.96	72.10	61.97				
„β“**	101.19	69.38	69.96	69.96	72.14	62.04				
Ferulat										
„α“**	126.88	111.89	148.58	149.56	116.45	124.30	147.33	114.19	169.80	56.48
„β“**	126.95	111.84					147.21	114.32	169.90	

* Für die Zuordnung von L- and D-Galactosen siehe Text

** „α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

Die chemischen Verschiebungen der Signale in der aromatischen Region des ^{1}H-NMR-Spektrums der Fraktion F**1a** (Abb. 3.5) deuten auf einen Ferulasäure-Ester hin (Bunzel et al., 2002a, Kato et al., 1987, Saulnier et al., 1995). Die Kopplungskonstante $^3J_{7,8}$ von 15.9 Hz (Tabelle 3.1) weist auf die *trans*-Form der Ferulasäure hin, da in Ethylenderivaten die Kopplung zwischen *cis*-ständigen Protonen ($^3J_{cis}$ = 6–14 Hz, meist 10) kleiner als die zwischen *trans*-ständigen ($^3J_{trans}$ = 14–20 Hz, meist 16) ist. Die Tatsache, dass die erwarteten Dubletts von beiden olefinischen Protonen H7 und H8 der Ferulasäure weiter aufgespalten sind (Abb. 3.5), deutet auf die Bindung von Ferulasäure an einen reduzierenden Zucker, wahrscheinlich Arabinose, hin. Der Einfluss der α-/β-Anomerie der reduzierenden Arabinose auf die weitere Aufspaltung der Signale von benachbarten Protonen wurde bereits mehrfach beschrieben (Bunzel et al., 2002a, Colquhoun et al., 1994, Saulnier et al., 1995). Die Kopplungskonstante $^3J_{5,6}$ von 8.0 Hz ist charakteristisch für *ortho*-ständige Protonen an einem Aromaten (Zanger, 1972).

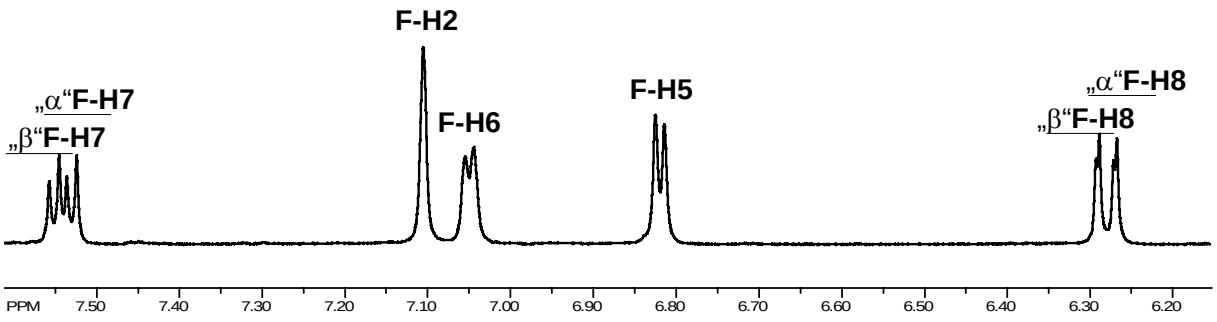


Abb. 3.5 ***^{1}H-NMR-Spektrum der Fraktion F1a (Ferulat-Region).*** *„α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. F: trans-Ferulasäure*

Die Zuordnung der Signale von Kohlenhydratprotonen konnte aufgrund der starken Signalüberlappung nicht allein mit Hilfe des ^{1}H-Spektrums erfolgen. Die Komplexität der Kohlenhydrat-Region ist durch das Vorliegen von vier Monosaccharid-Einheiten zu begründen. Das Spektrum wird durch Signalaufspaltungen, hervorgerufen durch die α/β-Anomere der reduzierenden Arabinose-Einheit, weiter verkompliziert. Erst durch die aufgenommenen 2D Spektren ^{1}H,^{1}H-COSY und TOCSY war eine sichere Zuordnung der Protonen möglich. Ausgehend von den Signalen der anomeren Protonen konnten anhand der Korrelationspeaks im ^{1}H,^{1}H-COSY-Spektrum die Kopplungen der Protonen durch die gesamte Monomer-Einheit verfolgt werden. Die Signale von anomeren Protonen sind normalerweise leicht aufzufinden, da sie am schwächsten abgeschirmt und somit tieffeldverschoben sind. Als Ergänzung bzw. zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem ^{1}H,^{1}H-COSY-Experiment wurden mit Hilfe des TOCSY-Experimentes Protonen, die innerhalb eines Spinsystems (hier innerhalb einer Monosaccharid-Einheit) miteinander koppeln, zugeordnet. Die Zuordnung der Signale von konstitutionell gleichwertigen Protonen (z. B. H5 der Arabinose und der Xylose) erfolgte nach der allgemeinen Regel, dass Signale für äquatoriale Protonen ($H5_{eq}$) bei tieferem Feld erscheinen und somit größere chemische Verschiebungen aufweisen als die axialen Protonen ($H5_{ax}$).

Die chemischen Verschiebungen von Kohlenstoffatomen wurden mit Hilfe des 1D ^{13}C-NMR-Experimentes ermittelt. Die Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Kohlenstoffatomen erfolgte mittels Interpretation von HSQC- und HMBC-Spektren. Ein Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum (Kohlenhydrat-Region) ist in Abb. 3.6 dargestellt. Drei im HSQC-Spektrum mit Fragezeichen markierte miteinander koppelnde Signale konnten der Fraktion F**1a** nicht zugeordnet werden und stammen wahrscheinlich aus Verunreinigungen. Durch Aufnahme eines phasensensitiven HMQC-Spektrums konnte eines der Signale (^{1}H 3.725 ppm/^{13}C 72.90 ppm) einem primären bzw. tertiären C-Atom und die beiden anderen Signale (^{1}H 3,595 ppm/^{13}C 63.31 ppm und ^{1}H 3.504 ppm/^{13}C 63.31 ppm) sekundären C-Atomen zugeordnet werden.

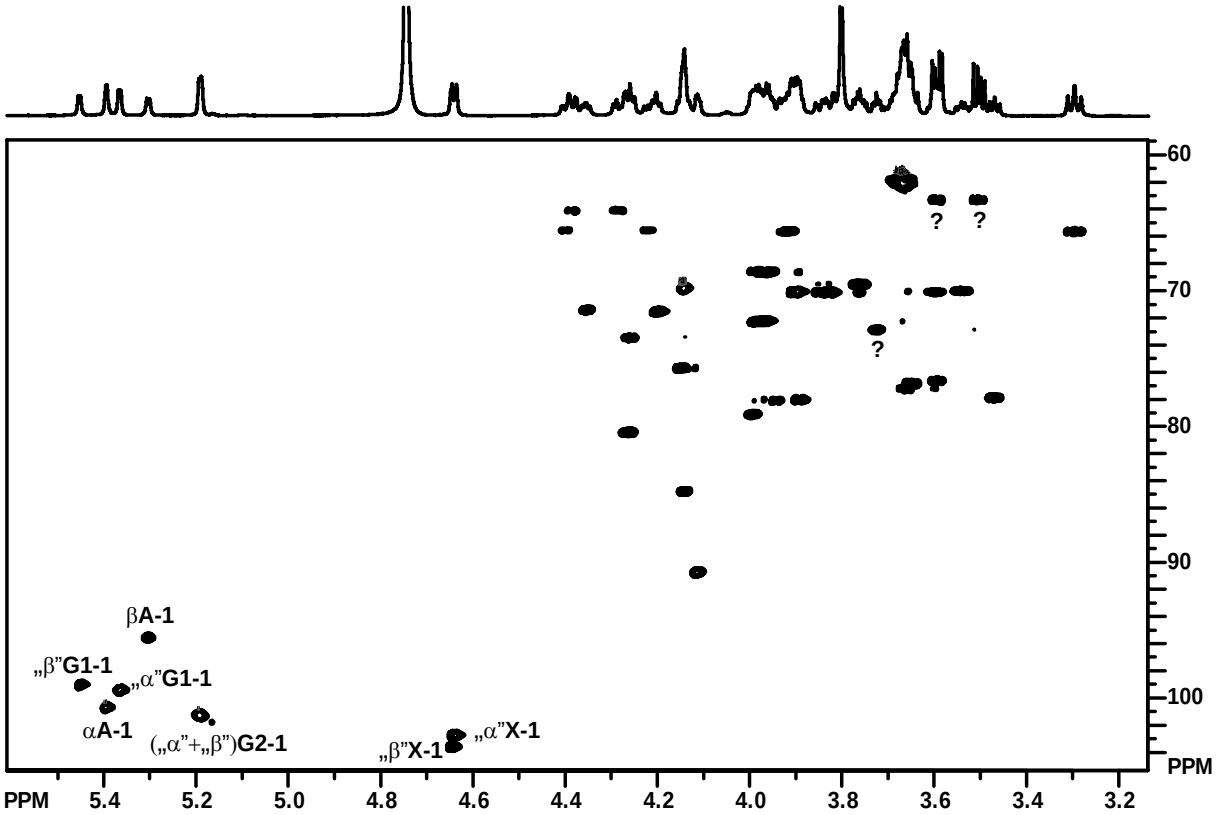


Abb. 3.6: ***HSQC-Spektrum der Fraktion F1a (Kohlenhydrat-Region).*** *„α" und „β" zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. A: L-Arabinofuranose, X: D-Xylopyranose, G1: L-Galactopyranose, G2: D-Galactopyranose*

Das HMBC-Experiment eignet sich aufgrund der C-H-Korrelationen über zwei oder drei Bindungen sehr gut zur Aufklärung der Ringformen der Kohlenhydrate und zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse zwischen den Kohlenhydrat-Einheiten untereinander und zur Ferulasäure (Beispiele in Abb. 3.7).

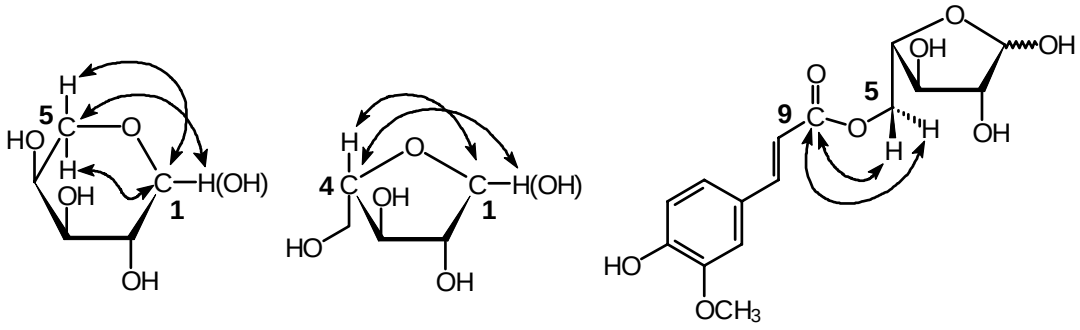


Abb. 3.7: Im HMBC-Spektrum erkennbare Korrelationen am Beispiel der Arabinopyranose (links), Arabinofuranose (Mitte) und der Esterbindung zwischen Ferulasäure und Arabinose (rechts)

Für die Xylose und die beiden Galactosen wurde mit Hilfe des HMBC-Experimentes die Pyranoseform nachgewiesen (Kopplungen zwischen C5 und H1 des jeweiligen Monosaccharids). Für die Arabinose-Einheit war eine Kopplung zwischen C4 und H1 zu erkennen, was gemäß Abbildung 3.7 auf eine furanosidische Ringform hindeutet.

Zur Bestimmung der anomeren Konfiguration von einzelnen Pyranosen wurde die Beziehung von Karplus angewandt (Karplus, 1959, 1963). Karplus gab aufgrund theoretischer Berechnungen die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstanten vom Torsionswinkel an. Koppeln zwei in axialer Stellung stehende Protonen miteinander, so liegt die Kopplungskonstante $^3J_{aa}$ zwischen 7 und 9 Hz. Koppeln zwei Protonen, die beide in äquatorialer Stellung stehen bzw. eins in axialer und eins in äquatorialer Stellung, so beträgt die Kopplungskonstante $^3J_{ee}$ bzw. $^3J_{ae}$ zwischen 2 und 5 Hz. In D-Xylose, L-Galactose und D-Galactose sind die Protonen in 2-Stellung axial angeordnet (X für D-Xylose, G1 für L-Galactose und G2 für D-Galactose in Abb. 3.4). Die ermittelten Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ für Xylose betragen 7.35 bzw. 7.30 Hz (Tabelle 3.1). Daraus kann man ableiten, dass die Xylose in β-Konfiguration vorliegt. Für L-Galactose wurden Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ von 3.76 und 3.67 Hz und für D-Galactose von 3.20 und 3.36 Hz dem ^{1}H-Spektrum entnommen (Tabelle 3.1). Entsprechend ergibt sich für die beiden Galactose-Einheiten die α-Konfiguration.

Für die Arabinose kann die Karplus-Beziehung aufgrund ihrer Furanoseform nicht angewandt werden. Die ermittelten Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ betragen 2.30 (typisch für α-Form) und 4.44 Hz (typisch für β-Konfiguration) und entsprechen den bereits in der Literatur beschriebenen Werten (Bunzel et al., 2002a). Die Integration der Peaks lieferte ein Anomerenverhältnis von α-Arabinose zu β-Arabinose von ca. 60 zu 40.

Ein Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der Fraktion F**1a** ist in Abb. 3.8 abgebildet. Die Korrelationspeaks, die einen Aufschluss über die Bindung der Kohlenhydratkomponenten untereinander geben, sind rot markiert und entsprechend beschriftet. Durch eine gut sichtbare Korrelation zwischen C1 der Xylose und H2 der Arabinose (α- und β-Spur) bzw. zwischen C2 der Arabinose und H1 der Xylose (α- und β-Spur) konnte eine (1→2)-Bindung zwischen Xylose und Arabinose nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten anhand des HMBC-Spektrums eine (1→2)-Bindung der Galactose 1 an die Xylose (durch „α“G1-C1/„α“X-H2, „β“G1-C1/„β“X-H2, „α“X-C2/„α“G1-H1 und „β“X-C2/„β“G1-H1-Kopplungen, „α“/„β“ zeigt Aufspaltung der NMR-Signale aufgrund des Einflusses der reduzierenden Arabinose an) und (1→3)-Bindung der Galactose 2 an die Galactose 1 (durch „α“G1-C3/„α“G2-H1, „β“G1-C3/„β“G2-H1, „α“G2-C1/„α“G1-H3, „β“G2-C1/„β“G1-H3) nachgewiesen werden. Mit Hilfe des HMBC-Spektrums konnte eine Kopplung zwischen dem C9-Atom der Ferulasäure und den beiden H5-Atomen der Arabinose ($H5_{ax}$ und $H5_{eq}$) eindeutig identifiziert werden, was auf eine Esterbindung zwischen der Ferulasäure der Arabinose (*O*-5-Position) hindeutete (nicht in Abb. 3.8 dargestellt).

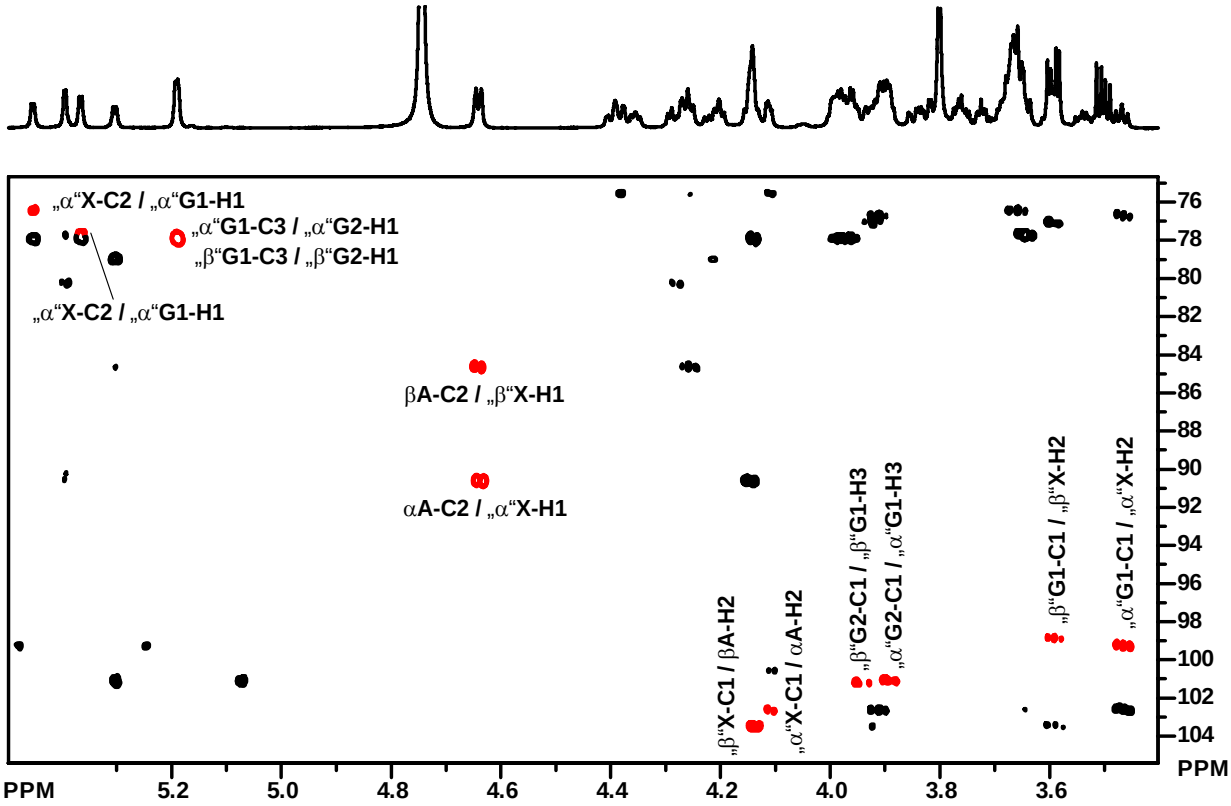


Abb. 3.8: ***HMBC-Spektrum der Fraktion F1a (Ausschnitt) mit rot markierten Korrelationen, die die Bindungen der Kohlenhydratkomponenten untereinander detektieren.*** *„α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. A: L-Arabinofuranose, X: D-Xylopyranose, G1: L-Galactopyranose, G2: D-Galactopyranose*

Zur Bestätigung der Bindungsverhältnisse des Ferulasäure-Oligosaccharids in Fraktion F**1a** wurde die Methylierungsanalyse nach Kapitel 2.3.12 durchgeführt. Vier Komponenten wurden bei der Untersuchung der PMAA der Fraktion F**1a** mittels GC-MS detektiert (Chromatogramme und Spektren nicht abgebildet). Das EI-MS-Spektrum der Komponente **1** (Retentionszeit = 15.5 min) zeigte das durch Spaltung zwischen C2 und C3 entstandene Primärfragment mit *m/z* 161 (nicht-reduzierendes Ende) und die daraus resultierenden Sekundärfragmente mit *m/z* 101 (161-60) durch Essigsäure-Abspaltung und *m/z* 129 (161-32) durch Methanol-Abspaltung. Aus der Spaltung zwischen C3/C4 entstand ein Fragment mit *m/z* 190 (reduzierendes Ende), das seinerseits durch sequentielle Abspaltung von Essigsäure und eines Ketens Sekundärionen mit *m/z* 130 (190-60) und 88 (190-60-42) erzeugte. Aufgrund der Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters wurde die Komponente **1** als 1-Deutero-1,2,4-triacetyl-3,5-dimethyl-pentitol, ein Produkt, das in der Methylierungsanalyse aus 2-substituierter Arabinofuranose entsteht, identifiziert.

Für die Komponente **2** (Retentionszeit = 17.6 min) ergab die EI-MS-Analyse ebenfalls das Primärfragment mit *m/z* 161 (Spaltung zwischen C2 und C3) sowie das daraus resultierende Sekundärion mit *m/z* 101 (161-60). Charakteristisch für Komponente **2** waren die durch Spaltung zwischen C3 und C4 entstandenen Fragmente mit *m/z* 117 (reduzierendes Ende) und 190 (nicht-reduzierendes Ende) sowie entsprechende Sekundärionen mit *m/z* 130 (190-60)

und 88 (190-60-42), die deutlich höhere Intensitäten aufwiesen als die anderen Fragmente. Diese Tatsache ist durch eine bevorzugte Spaltung zwischen zwei methoxylierten Kohlenstoffatomen im Vergleich zu einem methoxylierten und einem acetoxylierten Kohlenstoffatom zu erklären (Björndal et al., 1970). Unter Berücksichtigung der Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters konnte die Komponente **2** als 1-Deutero-1,2,5-triacetyl-3,4-dimethyl-pentitol identifiziert werden, eine Verbindung, die aus 2-substituierter Xylopyranose hervorgeht.

Die Komponente **3** (Retentionszeit=20.9 min) wurde durch Primärfragmente mit *m/z* 118 (C2/C3-Spaltung, reduzierendes Ende), 205 (C2/C3-Spaltung, nicht-reduzierendes Ende), 161 (C3/C4-Spaltung, nicht-reduzierendes Ende) und 162 (C3/C4-Spaltung, reduzierendes Ende) sowie durch Sekundärfragmente mit *m/z* 129 (161-32), 87 (161-32-42), 145 (205-60) und 102 (162-60) als 1-Deutero-1,5-diacetyl-2,3,4,6-tetramethyl-hexitol identifiziert. Der Vergleich der Retentionszeit von Komponente **3** mit den Retentionszeiten von Standardsubstanzen ergab, dass genannte Verbindung hier aus einer terminalen Galactopyranose hervorgeht.

Die Komponente **4** (Retentionszeit=26.7 min) zeigte folgende charakteristische Primärfragmente: m/z 118 (C2/C3-Spaltung, reduzierendes Ende), m/z 161 (C3/C4-Spaltung, nicht-reduzierendes Ende), m/z 234 (C4/C5-Spaltung, reduzierendes Ende) und m/z 277 (C1/C2-Spaltung, nicht-reduzierendes Ende). Die entstandenen Sekundärfragmente konnten durch Essigsäure-, Methanol- und Keten-Abspaltungen erklärt werden [*m/z* 101 (161-60), *m/z* 129 (161-32), *m/z* 87 (161-32-42), *m/z* 174 (234-60), *m/z* 217 (277-60)]. Unter Beachtung der Retentionszeit zusammen mit dem Fragmentierungsmuster der Komponente **4**, konnte 1-Deutero-1,3,5-triacetyl-2,4,6-trimethyl-hexitol nachgewiesen werden, was einer in 3-Stellung substituierten Galactopyranose entspricht.

Die durch das 2D HMBC-Experiment erhaltenen Bindungsverhältnisse konnten mit Hilfe der Methylierungsanalyse bestätigt werden. Die absolute Konfiguration von Monosacchariden ist weder durch NMR-Spektroskopie noch durch Methylierungsanalyse interpretierbar. Durch Untersuchung der Fraktion F**1a** mittels GC-FID an einer chiralen stationären Phase wurde sowohl D-Galactose als auch L-Galactose nachgewiesen (wie zuvor bereits erwähnt). Welche der beiden Galactosen über eine (1→2)-Bindung an Xylose gebunden ist und welches Enantiomer die terminale Galactose darstellt, konnte erst nach der Auswertung der Fraktionen F**1b** und F**2** bestimmt werden. Da in beiden erwähnten Fraktionen L-Galactose als einzige Galactose nachgewiesen wurde, die über eine (1→2)-Bindung an Xylose gebunden ist, wurde auch bei Fraktion F**1a** davon ausgegangen, dass L-Galactose dasjenige Enantiomer ist, das an Xylose gebunden ist. Dementsprechend handelt es sich bei der terminalen Hexopyranose um eine D-Galactose.

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse lässt sich Fraktion F**1a** als α-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAXGG) (Abb. 3.4) identifizieren. Diese Verbindung stellt die längste mit Ferulasäure assoziierte Heteroxylanseitenkette dar, die bisher aus pflanzlichem Material

isoliert wurde. Besonders interessant ist der Nachweis von untypisch aneinander gebundenen L- und D-Galactose in diesem Molekül. Die Strukturkomponenten mit der Kombination von benachbarten L- und D-Galactose in einem Molekül wurden bisher in Polysacchariden unterschiedlicher Rotalgen (Nunn et al., 1974, Takano et al., 2003) und aus Seitenketten der Xyloglucane von Jojobasamen (Hantus et al., 1997) nachgewiesen.

3.1.1.2 Identifizierung der Fraktion F1b

Die Untersuchung der Fraktion F**1b** (Abb. 3.2) mittels HPLC-MS ergab Natrium- bzw. Kalium-Addukte mit *m/z* 775 für $[M+Na]^+$ und *m/z* 791 für $[M+K]^+$, was auf eine Molekülmasse von 752 g/mol hindeutete. Die Molekülmasse von 752 g/mol und das aufgenommene UV-Spektrum, welches weitgehend dem Spektrum von *trans*-Ferulasäure (Abb. 5.2 in Kapitel 5.3) entsprach, gaben erste Hinweise, dass es sich bei Fraktion F**1b** um eine Verbindung bestehend aus einer *trans*-Ferulasäure, drei Pentosen und einer Hexose handelt. Der Einsatz der hochauflösenden MS ergab für das Natrium-Addukt ein *m/z* von 775.22686. Eine solche Molekülmasse entspricht einer Summenformel $C_{31}H_{44}O_{21}$+Na, deren berechneter Wert 775.22727 g/mol ist.

Durch Analyse der Kohlenhydratkomponenten wurden Arabinose, Xylose und Galactose im Verhältnis 1:2:1 identifiziert. GC-Untersuchungen der trifluoracetylierten Derivate an einer chiralen Säule zeigten für die Arabinose und Galactose die L-Konfiguration, während für beide Xylose-Einheiten die D-Form nachgewiesen wurde.

Die vollständige Identifizierung der Fraktion F**1b** (Abb. 3.9) wurde mit Hilfe von 1D und 2D NMR-Experimenten durchgeführt. Die zugeordneten ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten sind den Tabellen 3.3 und 3.4 zu entnehmen.

Die phenolische Region im ^{1}H-NMR-Spektrum (nicht abgebildet) ähnelt stark dem Spektrum der Fraktion F**1a** (Abb. 3.5), was auf eine *trans*-Ferulasäure hindeutet, die an einen reduzierenden Zucker (wahrscheinlich Arabinose) gebunden ist.

Die Zuordnung der Signale der Kohlenhydratprotonen konnte aufgrund der starken Signalüberlappungen erst nach Auswertung der 2D Spektren aus den ^{1}H,^{1}H-COSY- und TOCSY-Experimenten erfolgen.

Tabelle 3.3: ***^{1}H-NMR-Daten für Fraktion F1b (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, Galp: Galactopyranose, OMe: Methoxyl-Gruppe, ax: axial, eq: äquatorial*

	H1 ($J_{1,2}$)	**H2**	**H3**	**H4**	**H5** ($J_{5,6}$)*		**H6**	**H7** ($J_{7,8}$)	**H8**	**OMe**
					$H5_{eq}$	**$H5_{ax}$**				
α-L-Ara*f*	5.385 (-)	4.123	4.122	4.271	4.369	4.278				
β-L-Ara*f*	5.306 *(4.40)*	4.164	4.250	3.993	4.374	4.234				
β-D-Xyl*p*										
„α“**	4.638 *(7.47)*	3.477	3.641	.535	3.910	3.287				
„β“**	4.664 *(7.42)*	3.584	3.650	3.586	3.913	3.287				
α-L-Gal*p*										
„α“**	5.401 *(3.42)*	3.969	3.808	4.049	4.158		3.644			
„β“**	5.460 *(3.40)*	3.988	3.852	4.041	4.342		3.646			
α-L-Xyl*p*										
„α“**	5.082 *(3.56)*	3.429	3.637	3.502	3.584		3.545			
„β“**	5.094 *(3.56)*	3.436	3.643	3.505	3.592		3.552			
Ferulat										
„α“**								7.547 *(15.9)*	6.286	
„β“**		7.114			6.824 *(8.1)*		7.054	7.560 *(15.8)*	6.288	3.801

* Kopplungskonstante für Ferulat

** „α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

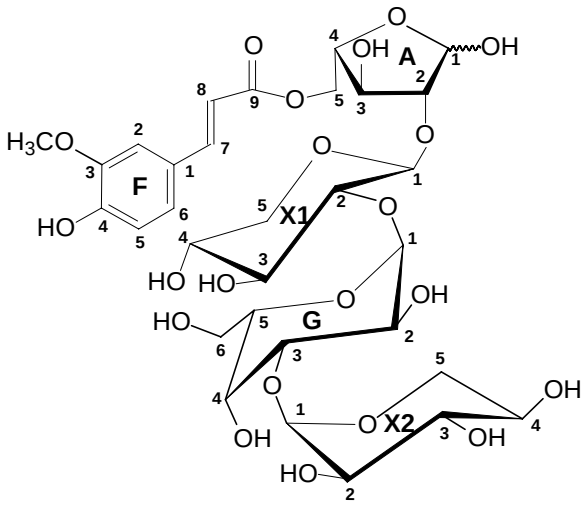


Abb. 3.9: ***Strukturformel des in Fraktion F1b enthaltenen Ferulasäure-Oligosaccharids: α-D-Xylopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAXGX).*** *F: trans-Ferulasäure, A: L-Arabinofuranose, X1 und X2: D-Xylopyranose, G: L-Galactopyranose*

Tabelle 3.4: ***^{13}C-NMR-Daten für Fraktion F1b (aus den 2D HSQC- und HMBC-NMR-Spektren, in D_2O); chemische Verschiebungen δ_C in ppm.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, Galp: Galactopyranose, OMe: Methoxyl-Gruppe*

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	OMe
α-L-Ara*f*	100.7	90.1	75.7	80.5	64.0					
β-L-Ara*f*	95.5	84.1	73.6	79.1	65.2					
β-D-Xyl*p*										
„α“*	102.3	77.2	76.8	69.9	65.5					
„β“*	103.0	76.3	77.1	69.9	65.5					
α-L-Gal*p*										
„α“*	99.0	68.4	78.1	69.8	71.5	61.7				
„β“*	98.8	68.4	78.1	69.9	71.3	61.6				
α-L-Xyl*p*										
„α“*	101.3	72.4	73.6	70.0	62.4					
„β“*	101.4	72.4	73.6	70.0	62.4					
Ferulat										
„α“*	26.9	112.0	148.6	149.5	116.5	124.3	147.4	114.2	169.8	56.5
„β“*	127.1	111.8					147.3	114.3	169.9	

* „α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome konnten mit Hilfe des 1D ^{13}C-NMR-Experimentes nicht ermittelt werden, da die aufgenommenen Spektren nicht auswertbar waren. Deswegen wurden die ^{13}C-Daten für diese Fraktion den 2D Spektren (HSQC und HMBC) entnommen. Ein Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum (Kohlenhydrat-Region) ist in Abb. 3.10 dargestellt. Ähnlich wie bei Fraktion F**1a**, konnten auch bei dieser Fraktion drei Signale (in Abb. 3.10 mit Fragezeichen versehen) keinem ^{1}H- bzw. ^{13}C-Atom zugeordnet werden, was auf eine ähnliche Verunreinigung hindeutet.

Die NMR-Daten bestätigten die Vermutung, dass Fraktion F**1b** aus *trans*-Ferulasäure, einer Arabinose, zwei Xylosen und einer Galactose besteht. Die beiden Xylosen und die Galactose wurden durch die im HMBC-Spektrum erkennbaren C5/H1-Kopplungen als Pyranosen identifiziert (siehe Abb. 3.7). Für die Arabinose wurde durch eine erkennbare Kopplung zwischen C4 und H1 eine furanosidische Ringform nachgewiesen. Mit Hilfe der bestimmten Kopplungskonstanten $^{3}J_{1,2}$ von 3.42 und 3.40 Hz (Tabelle 3.3) wurde nach Anwendung der Karplus-Beziehung (Karplus, 1959, 1963) für die Galactose die α-Konfiguration ermittelt. Für die Xylosen wurden Kopplungskonstanten $^{3}J_{1,2}$ von 7.47 und 7.42 Hz (für Xylose 1) und von 3.56 und 3.56 Hz (für Xylose 2) ermittelt. Hieraus ergibt sich die β-Konfiguration für Xylose 1 und die α-Konfiguration für Xylose 2. Die reduzierende Arabinose liegt sowohl als α- (durch ein verbreitertes Singulett erkennbar) als auch als β-Anomer ($^{3}J_{1,2}$ = 4.40 Hz) vor.

Das Anomerenverhältnis von α-Arabinose zu β-Arabinose beträgt gemäß den Ergebnissen der Integration ca. 60:40.

Aufgrund der Korrelationspeaks im HMBC-Spektrum (nicht abgebildet) wurde eine Esterbindung zwischen Ferulasäure und Arabinose in *O*-5-Position bestimmt. Des Weiteren wurden folgende Bindungsverhältnisse zwischen den einzelnen Monosacchariden nachgewiesen: eine (1→2)-Bindung zwischen der β-Xylose und der Arabinose, eine (1→2)-Bindung zwischen der Galactose und der β-Xylose und eine (1→3)-Bindung zwischen der α-Xylose und der Galactose.

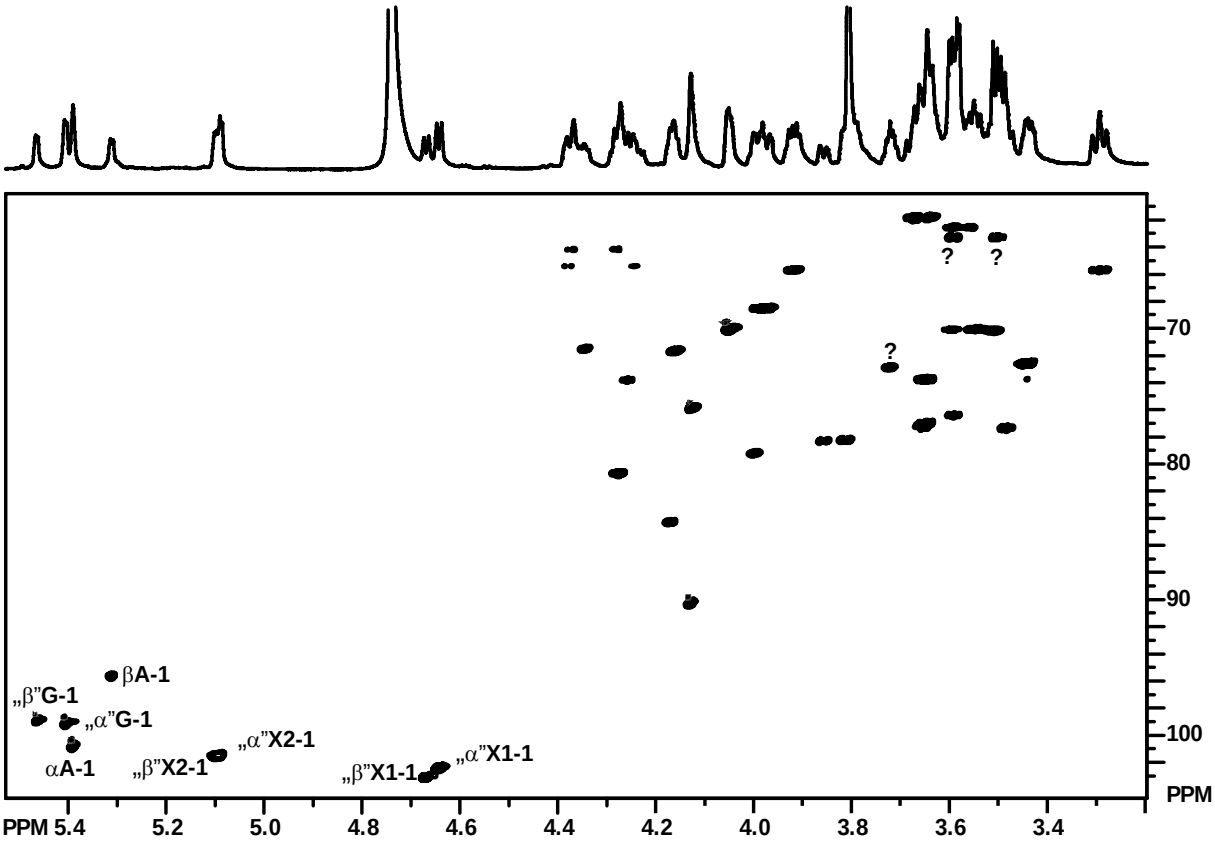


Abb. 3.10: ***HSQC-Spektrum der Fraktion F1b (Kohlenhydrat-Region).*** *„α" und „β" zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. A: L-Arabinofuranose, X1 und X2: D-Xylopyranose, G: L-Galactopyranose*

Zur Bestätigung der Ergebnisse des HMBC-Experimentes wurden die Bindungsverhältnisse mit Hilfe der Methylierungsanalyse untersucht. Vier Komponenten wurden bei dieser Untersuchung detektiert. Drei Peaks zeigten die Existenz der bereits in Fraktion F**1a** nachgewiesenen Substanzen: 2-substituierte Arabinofuranose (Retentionszeit = 15.5 min), 2-substituierte Xylopyranose (Retentionszeit = 17.6 min) und in 3-Stellung substituierte Galactopyranose (Retentionszeit = 26.8 min). Eine Komponente (Retentionszeit = 13.1 min) konnte anhand der Retentionszeit und des Fragmentierungsmusters als 1-Deutero-1,5-diacetyl-2,3,4-trimethyl-pentitol identifiziert werden, eine Verbindung, die aus terminaler Xylose hervorgeht. Folgende Primärfragmente wurden nachgewiesen: durch C3/C4-Spaltung *m/z* 117 (nicht-reduzierendes Ende) und *m/z* 162 (reduzierendes Ende) und durch C2/C3-

Spaltung *m/z* 118 (reduzierendes Ende) und *m/z* 161 (nicht-reduzierendes Ende). Des Weiteren konnten Sekundärionen mit *m/z* 101 (161-60), *m/z* 102 (162-60), *m/z* 87 (160-32-42) und *m/z* 88 (160-32-42) identifiziert werden.

Die dem HMBC-Spektrum entnommenen Bindungsverhältnisse konnten mit Hilfe der Methylierungsanalyse bestätigt werden.

Nach Interpretation aller Analysenergebnisse wurde Fraktion F**1b** als α-D-Xylopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAXGX) (Abb. 3.9) identifiziert. Diese Verbindung wurde bisher aus keinem pflanzlichen Material isoliert. Besonderes Interesse gilt hier der α-Konfiguration der terminalen Xylose, da normalerweise nur β-konfigurierte Xylose in Getreideheteroxylane eingebaut wird (Bunzel, 2001, Saulnier et al., 1995).

3.1.2 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Oligosaccharids aus der Fraktion F2

Ein HPLC-DAD-Screening der GPC-Fraktion F**2** (Abb. 3.1) zeigte, dass die dem Hauptpeak entsprechende Verbindung ein UV-Spektrum und eine Molekülmasse aufweist, die einem Ferulasäure-Oligosaccharid entsprechen. Die kleinen noch vorhandenen Verunreinigungen konnten mittels GPC an Bio-Gel® P-2 entfernt werden.

Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurden ca. 100 mg der Fraktion F**2ger** (gereinigte Fraktion F**2**) isoliert.

Die Analyse der Fraktion F**2ger** mittels HPLC-DAD-MS ergab ein *trans*-Ferulasäure-Derivat als UV-aktive Substanz (vgl. Abb. 5.2 in Kapitel 5.3) und eine Molekülmasse von 620 g/mol (Natrium-Addukt mit *m/z* 643 $[M+Na]^+$ und Kalium-Addukt mit *m/z* 659 $[M+K]^+$). Die Molekülmasse von 620 g/mol steht im Einklang mit einer aus einer Ferulasäure, zwei Pentosen und einer Hexose bestehenden Verbindung. Durch den Einsatz der hochauflösenden MS wurde die Summenformel $C_{26}H_{36}O_{17}$+Na ermittelt (gemessener Wert 643.18589 g/mol, berechneter Wert 643.18501 g/mol).

Als Kohlenhydratkomponenten wurden L-Arabinose, D-Xylose und L-Galactose im Verhältnis 1:1:1 identifiziert.

Zur eindeutigen Identifizierung von F**2ger** (Abb. 3.11) wurden ^{1}H-, ^{13}C-, ^{1}H,^{1}H-COSY-, TOCSY-, HMQC- und HMBC-Experimente durchgeführt. Die zugehörigen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten sind in Tabellen 3.5 und 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.5: ***^{1}H-NMR-Daten für Fraktion F2 (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, Galp: Galactopyranose, OMe: Methoxyl-Gruppe, ax: axial, eq: äquatorial*

	H1 ($J_{1,2}$)	**H2**	**H3**	**H4**	**H5** ($J_{5,6}$)*		**H6**	**H7** ($J_{7,8}$)	**H8**	**OMe**
					$H5_{eq}$	**$H5_{ax}$**				
α-L-Ara*f*	5.441 *(2.14)*	4.160	4.170	4.310	4.434	4.306				
β-L-Ara*f*	5.346 *(4.26)*	4.170	4.300	4.029	4.438	4.256				
β-D-Xyl*p*										
„α"**	4.684 *(7.23)*	3.502	3.686	3.588	3.961	3.333				
„β"**	4.699 *(7.13)*	3.621	3.703	3.651	3.976	3.350				
α-L-Gal*p*										
„α"**	5.388 *(3.07)*	3.816	3.842	3.966	4.195		3.713			
„β"**	5.449 *(3.11)*	3.837	3.867	3.962	4.350		3.720			
Ferulat										
„α"**								7.535 *(15.9)*	6.279	
„β"**		7.095			6.858 *(8.1)*		7.056	7.545 *(15.9)*	6.281	3.829

* Kopplungskonstante für Ferulat

** „α" und „β" zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

Tabelle 3.6: ***^{13}C-NMR-Daten für Fraktion F2 (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_C in ppm.*** *Araf: Arabinofuranose, Xylp: Xylopyranose, Galp: Galactopyranose, OMe: Methoxyl-Gruppe*

	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**C8**	**C9**	**OMe**
α-L-Ara*f*	100.27	90.10	75.39	80.08	63.86					
β-L-Ara*f*	95.19	84.01	73.12	78.71	65.11					
β-D-Xyl*p*										
„α"*	102.09	77.52	76.27	69.63	65.17					
„β"*	102.83	76.71	76.52	69.72	65.11					
α-L-Gal*p*										
„α"*	99.03	68.93	69.53	69.58	1.22	61.56				
„β"*	98.82	68.89	69.72	69.72	71.06	61.36				
Ferulat										
„α"*	126.99	111.53	147.96	148.45	115.89	123.84	146.95	114.04	169.47	56.13
„β"*	127.03	111.50					146.85	114.17	169.38	

* „α" und „β" zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

Im PCS-Bereich des ^{1}H-NMR-Spektrums (nicht abgebildet) waren die bereits bei Fraktion F**1a** (Abb. 3.5) und Fraktion F**1b** nachgewiesenen Signale zu erkennen, die auf eine estergebundene *trans*-Ferulasäure hindeuteten.

Die Zuordnung der in Tabelle 3.5 dargestellten Signale von Kohlenhydratprotonen wurde mit Hilfe der Spektren aus den 2D Experimenten ^{1}H,^{1}H-COSY und TOCSY durchgeführt.

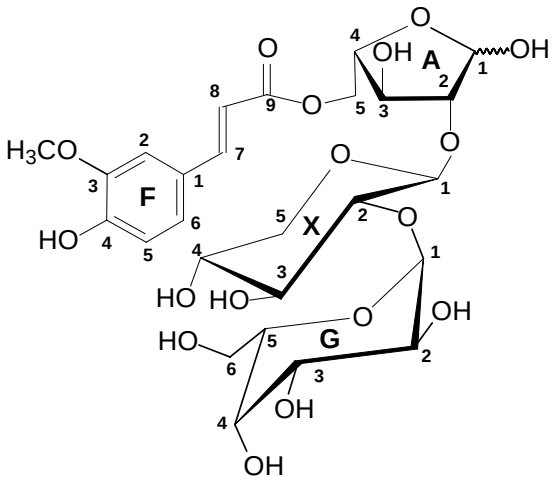


Abb. 3.11: Strukturformel des in Fraktion F2ger enthaltenen Ferulasäure-Oligosaccharids: α-L-Galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAXG). *F: trans-Ferulasäure, A: L-Arabinofuranose, X: D-Xylopyranose, G: L-Galactopyranose*

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome wurden dem 1D ^{13}C-NMR-Spektrum entnommen und mit Hilfe der HMQC (Ausschnitt in Abb. 3.12) und HMBC-Spektren (Ausschnitt in Abb. 3.13) den jeweiligen Kohlenstoffatomen zugeordnet.

Die Auswertung aller NMR-Daten bestätigte die erwartete Zusammensetzung der Verbindung in Fraktion F**2ger**: *trans*-Ferulasäure, Arabinose, Xylose und Galactose. Mit Hilfe des HMBC-Experimentes wurde gezeigt, dass in dieser Verbindung die Arabinose als Furanose, und die Xylose und Galactose als Pyranosen vorliegen. Die Kopplungskonstanten $^{3}J_{1,2}$ von 3.07 und 3.11 Hz (Tabelle 3.5) sprechen nach Karplus (1959, 1963) für die α-Konfiguration der Galactose. Für die Xylose wurde durch die Kopplungskonstanten $^{3}J_{1,2}$ von 7.23 und 7.13 Hz (Tabelle 3.5) die β-Konfiguration ermittelt. Die Arabinose liegt in der wässrigen Lösung im Anomerenverhältnis von 60:40 (α-Arabinose zu β-Arabinose) vor.

Mit Hilfe des HMBC-Experimentes wurde die Esterbindung der Ferulasäure an die *O*-5-Position der Arabinose bestimmt. Zwischen den einzelnen Monosaccharid-Einheiten wurde eine (1→2)-Bindung der Xylose an die Arabinose und eine (1→2)-Bindung der Galactose an die Xylose nachgewiesen (Ausschnitte in Abb. 3.13).

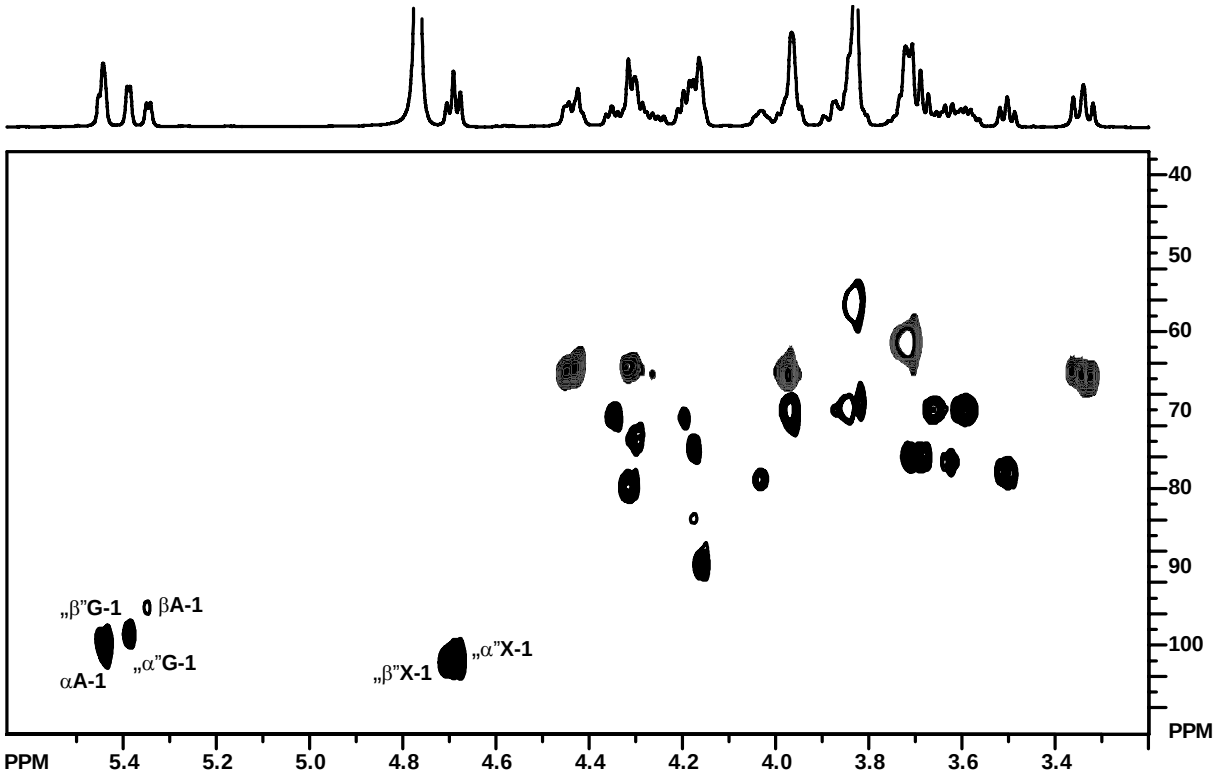


Abb. 3.12: HMQC-Spektrum der Fraktion F2ger (Kohlenhydrat-Region). *„α" und „β" zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. A: L-Arabinofuranose, X: D-Xylopyranose, G: L-Galactopyranose*

Um die bestimmten Bindungsverhältnisse zu bestätigen, wurde die Methylierungsanalyse durchgeführt. Alle drei detektierten Peaks entsprachen den bereits in Fraktion F**1a** nachgewiesenen Komponenten: 2-substituierte Arabinofuranose (Retentionszeit = 15.5 min), 2-substituierte Xylopyranose (Retentionszeit = 17.6 min) und eine terminale Galactopyranose (Retentionszeit = 20.9 min). Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse bestätigten somit die Rückschlüsse aus der NMR.

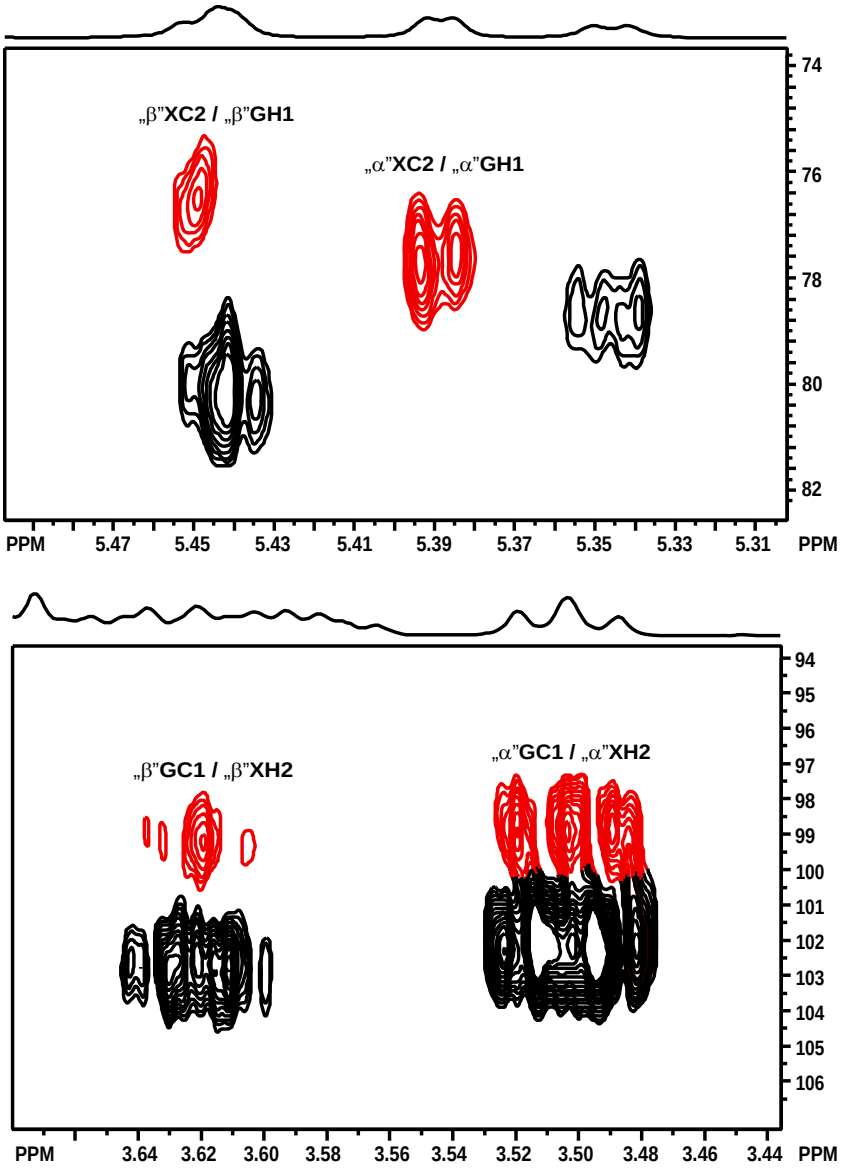


Abb. 3.13: ***Zwei Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum der Fraktion F2ger.*** *Die rotmarkierten Signale, die Korrelationen zwischen Galactose-H1 und Xylose-C2 (oben) und Xylose-H2 und Galactose-C1 (unten) anzeigen, beweisen eine Galactose (1→2)-Xylose-Bindung. „α" und „β" zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. X: D-Xylopyranose, G: L-Galactopyranose*

Bei der isolierten Substanz in der Fraktion F**2ger** handelt es sich um α-L-Galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O-trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAXG) (Abb. 3.11). Diese Substanz wurde bisher nicht aus pflanzlichem Material isoliert. Eine ähnliche Verbindung, jedoch mit einer (1→4)-Bindung zwischen Galactose und Xylose (Abb. 1.5 in Kapitel 1.3.3) wurde aus Maiskleie nach saurer Hydrolyse isoliert und identifiziert (Saulnier et al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Galactose-(1→2)-Xylose-Bindung in FAXG mit zwei unabhängigen Verfahren (NMR und Methylierungsanalyse) sicher nachgewiesen werden. FAXG in der von Saulnier et al. (1995) nachgewiesenen Form konnte nicht identifiziert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die (1→4)-Bindung zwischen Galactose und Xylose in der isolierten Fraktion von Saulnier et al. (1995) falsch interpretiert

wurde. So beschreiben die Autoren, dass die Galactose-(1→4)-Xylose-Bindung mit Hilfe der Methylierungsanalyse nachgewiesen wurde. Dabei wurde das isolierte Ferulasäure-Oligosaccharid nach Methylierung und saurer Hydrolyse mit Natriumborhydrid reduziert. Bei der Reduktion mit Natriumborhydrid können die GC-MS-Fragmente nicht immer zweifelsfrei einer bestimmten Substanz zugeordnet werden. So entsteht nach der Reduktion des methylierten, in (1→2)-Stellung substituierten Xylopyranosyl-Restes mit Natriumborhydrid 1,2,5-Triacetyl-3,4-dimethyl-pentitol, eine Verbindung, die sowohl aus 2- als auch aus 4-substituierter Xylopyranose hervorgehen kann. Erst durch die Verwendung von Natriumbordeuterid kann diese Verwechslung ausgeschlossen werden, da dabei die erste Stellung der Xylose durch eine Deutero-Gruppe fixiert wird. Nach der Reduktion des in (1→2)-Stellung substituierten Xylopyranosyl-Restes mit Natriumbordeuterid entsteht 1-Deutero-1,2,5-triacetyl-3,4-dimethyl-pentitol und nach der Reduktion des in (1→4)-Stellung substituierten Xylopyranosyl-Restes 1-Deutero-1,4,5-triacetyl-2,3-dimethyl-pentitol. Die beiden Verbindungen haben nach der Analyse mittels GC-MS unterschiedliche Fragmentierungsmuster, was eine klare Identifizierung gewährleistet.

3.1.3 Isolierung und Identifizierung eines Ferulasäure-Saccharids aus der Fraktion F3

Die Untersuchung der isolierten GPC-Fraktion F**3** (Abb. 3.1) mittels HPLC-DAD-MS zeigte, dass als Ferulasäure-Oligosaccharid charakterisierte Hauptkomponente nur gering verunreinigt vorlag. Die Reinigung der Fraktion F**3** mittels GPC an Bio-Gel® P-2 ergab ein Ferulasäure-Saccharid F**3ger** mit hohem Reinheitsgrad (> 95 %). Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurden ca. 150 mg der Fraktion F**3ger** isoliert.

Die Analyse der Fraktion F**3ger** ergab, dass es sich dabei um eine bereits aus unterschiedlichen pflanzlichen Materialien (Wildreis, Roggen, Maiskleie, Schwingel) isolierte und identifizierte Substanz FAX (Abb. 3.14) handelt (Bunzel et al., 2002a, Bunzel et al., 2002b, Saulnier et al., 1995, Wende und Fry, 1997). FAX wurde in Rahmen dieser Arbeit im präparativen Maßstab für die nachfolgenden *in vitro* Fermentationsversuche mit einzelnen Bakterienstämmen isoliert.

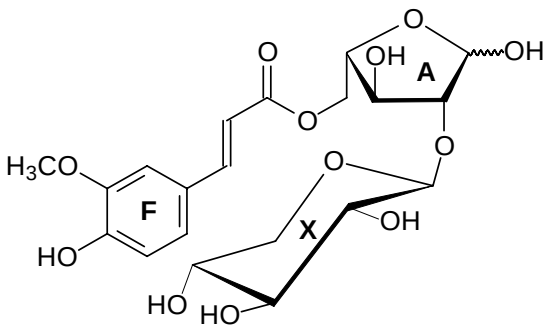


Abb. 3.14: Strukturformel des Ferulasäure-Oligosaccharids aus Fraktion F3ger: β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX). *F: trans-Ferulasäure, A: L-Arabinofuranose, X: D-Xylopyranose*

3.1.4 Isolierung und Identifizierung von zwei Phenolcarbonsäure-Saccharidenaus der Fraktion F4

Beim Screening der Fraktion F**4** mittels HPLC-DAD-MS wurde ein Hauptpeak mit dem Spektrum von *trans*-Ferulasäure (Abb. 5.2 in Kapitel 5.3) beobachtet. Des Weiteren fiel ein kleiner Peak mit *trans-p*-Cumarsäure ähnlichem Spektrum (Abb. 5.2 in Kapitel 5.3) auf. Um die beiden Substanzen voneinander zu trennen, wurde F**4** zuerst mittels GPC an Bio-Gel® P-2-Phase untersucht. Mit Hilfe dieses Aufarbeitungsschrittes konnte eine Komponente F**4ger** mit hohem Reinheitsgrad (> 95 %) gewonnen werden. Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurden ca. 300 mg der Fraktion F**4ger** isoliert. Die Analyse der Fraktion F**4ger** ergab, dass es sich dabei um eine bereits bekannte Verbindung FA (Abb. 3.15) handelt (Bunzel et al., 2002a, Bunzel et al., 2002b, McCallum et al., 1991, Ohta et al., 1994, Ralet et al., 1994, Saulnier et al., 1995). Fraktion F**4ger** wurde im präparativen Maßstab als Substrat für die nachfolgenden mikrobiologischen Untersuchungen isoliert.

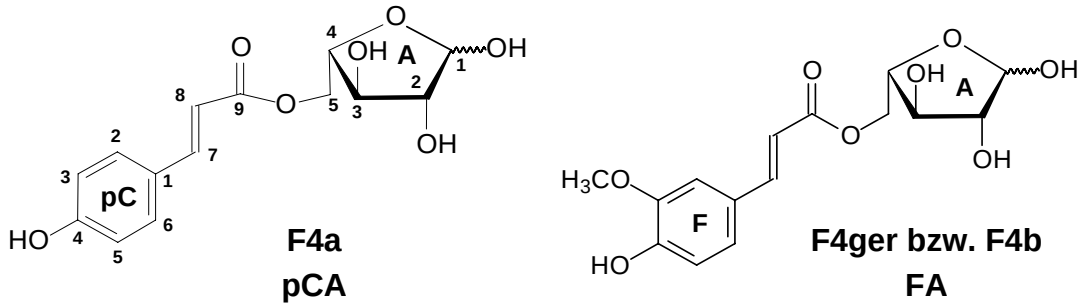


Abb. 3.15: ***Strukturformeln der aus F4 isolierten Fraktionen F4a (5-O-trans-p-Cumaroyl-L-arabinofuranose (pCA)) und F4ger bzw. F4b (5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA)).*** *F: trans-Ferulasäure, pC: p-Cumarsäure, A: L-Arabinofuranose*

Mittels GPC an Bio-Gel® P2 konnte die Komponente mit *p*-Cumarsäure ähnlichem Spektrum der Fraktion F**4** nicht von co-eluierenden Substanzen abgetrennt werden. Eine Isolierung dieser Komponente wurde erst nach Fraktionierung der Fraktion F**4** mittels semipräparativer RP-HPLC-UV erreicht. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen der isolierten Fraktionen F**4a** und F**4b** (Verhältnis ca. 1:300) und ähnlichen Retentionszeiten, wurde die mittels HPLC isolierte Fraktion F**4a** (Abb. 3.15) zur vollständigen Abtrennung von F**4b** (Abb. 3.15) rechromatographiert. Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurde 1 mg der Fraktion F**4a** isoliert.

Die Analyse von F**4b** zeigte, dass diese Fraktion die gleiche Substanz enthielt wie F**4ger**.

Die Untersuchung der Fraktion F**4a** mittels HPLC-DAD-MS ergab ein *trans-p*-Cumarsäure ähnliches UV-Spektrum und die Natrium- bzw. Kalium-Addukt mit *m/z* 319 $[M+Na]^+$ und 335 $[M+K]^+$). Die daraus abgeleitete Molekülmasse von 296 g/mol entspricht einer Verbindung aus einer Cumarsäure und einer Pentose. Der Einsatz der hochauflösenden MS

führte zu einem Natrium-Addukt mit *m/z* 319.07948 $[M+Na]^+$. Daraus wurde die Summenformel $C_{14}H_{16}O_7$+Na ermittelt (berechneter Wert 319.07937).

Als Kohlenhydratkomponente wurde Arabinose identifiziert.

Die eindeutige Identifizierung der Fraktion F**4a** erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher 1D und 2D NMR-Experimente. In Tabellen 3.7 und 3.8 sind die zugeordneten ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten zusammengefasst.

Tabelle 3.7: ***^{1}H-NMR-Daten für Fraktion F4a (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz.*** *Araf: Arabinofuranose, ax: axial, eq: äquatorial*

	H1 ($J_{1,2}$)	**H2** ($J_{2,3}$)*	**H3**	**H4**	**H5** ($J_{5,6}$)*		**H6**	**H7** ($J_{7,8}$)	**H8**
					$H5_{eq}$	**$H5_{ax}$**			
α-L-Ara*f*	5.291 (-)	4.073	4.077	4.340	4.447	4.316			
β-L-Ara*f*	5.325 *(4.57)*	4.127	4.160	4.043	4.469	4.286			
p-Cumarat									
„α“**		7.547 *(8.4)*	6.916		6.916 *(8.4)*		7.547	7.694 *(16.0)*	6.397
„β“**								7.701 *(16.0)*	6.404

* Kopplungskonstante für *p*-Cumarat

** „α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

Tabelle 3.8: ***^{13}C-NMR-Daten für Fraktion F4a (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_C in ppm.*** *Araf: Arabinofuranose*

	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**C8**	**C9**
α-L-Ara*f*	100.93	80.94	75.67	80.42	63.59				
β-L-Ara*f*	95.01	75.61	73.95	78.33	64.66				
p-Cumarat									
„α“*	126.00	130.23	115.66	158.21	115.66	130.23	146.07	113.48	168.95
„β“*	126.03						146.00	113.60	169.34

* „α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an

Das ^{1}H-Spektrum der Fraktion F**4a** (Abb. 3.16) weist im phenolischen Bereich auf eine *trans*-*p*-Cumarsäure hin (Kopplungskonstante $J_{7,8}$ = 16.0 Hz), die unter dem Einfluss eines reduzierenden Zuckers steht (durch Signalaufspaltung sichtbar).

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenhydratprotonen wurden anhand der ^{1}H,^{1}H-COSY- und TOCSY-Spektren ermittelt und die ^{13}C-Signale wurden dem 1D ^{13}C-NMR-Experiment entnommen. Die Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Kohlenstoffatomen erfolgte mit Hilfe der HMQC- und HMBC-Spektren (Ausschnitt in Abb. 3.17).

Nach der Auswertung aller NMR-Daten wurde die Zusammensetzung der Fraktion F**4a** (*trans-p*-Cumarsäure, Arabinose) bestätigt. Mit Hilfe des HMBC-Experimentes wurde eine Esterbindung zwischen *p*-Cumarsäure und der *O*-5-Position der Arabinose nachgewiesen (Abb. 3.17) und die Furanoseform der Arabinose identifiziert. Das Anomerenverhältnis von α-Arabinose zu β-Arabinose in wässriger Lösung betrug gemäß Integration 60:40.

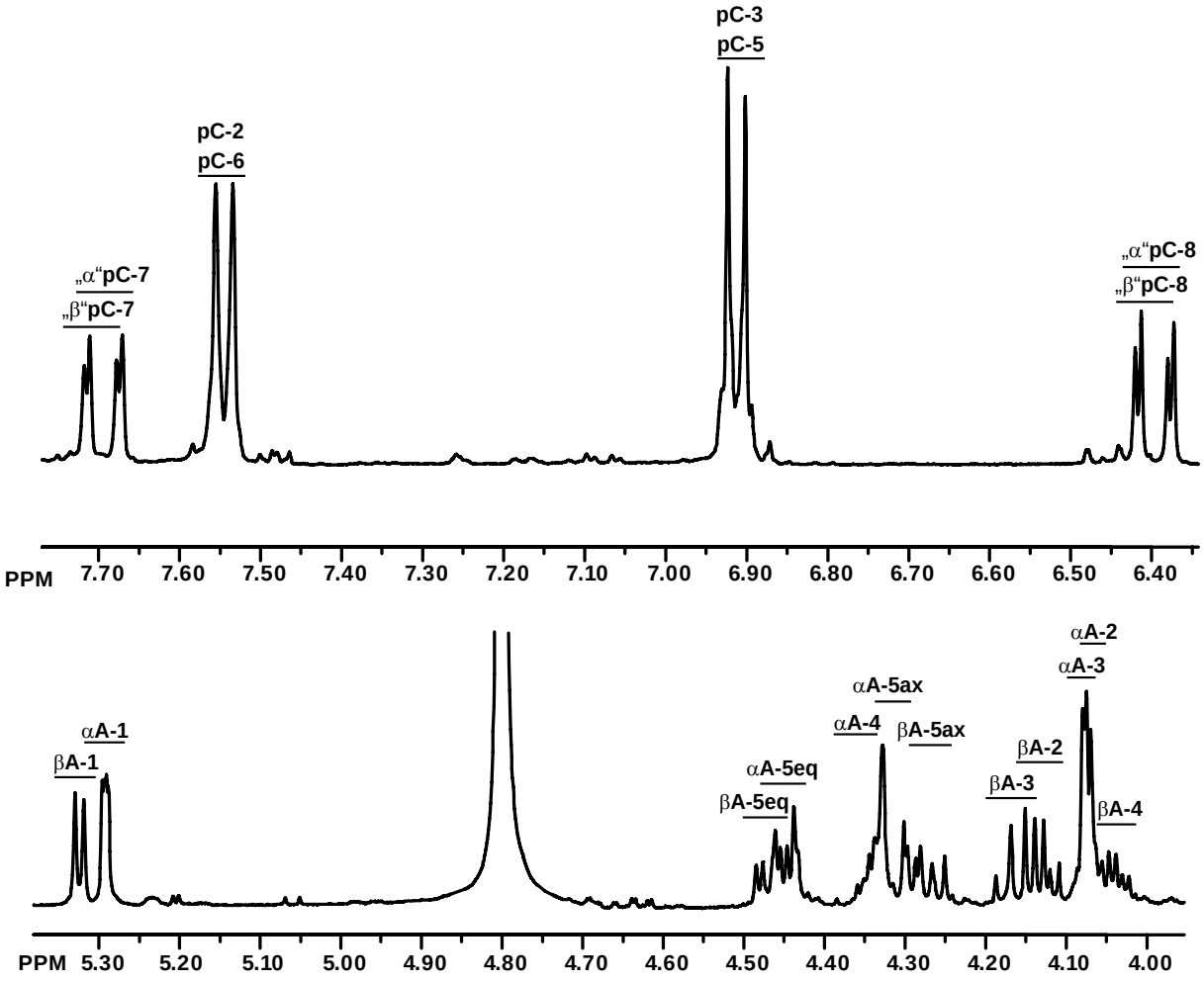


Abb. 3.16: ***^{1}H-NMR-Spektrum der Fraktion F4a (p-Cumarat-Region (oben) und Kohlenhydrat-Region (unten)).*** *„α“ und „β“ zeigen Aufspaltung der Signale aufgrund des Einflusses der α- und β-Anomerie der reduzierenden Arabinose an. pC: p-Cumarsäure, A: L-Arabinofuranose, ax: axial, eq: äquatorial*

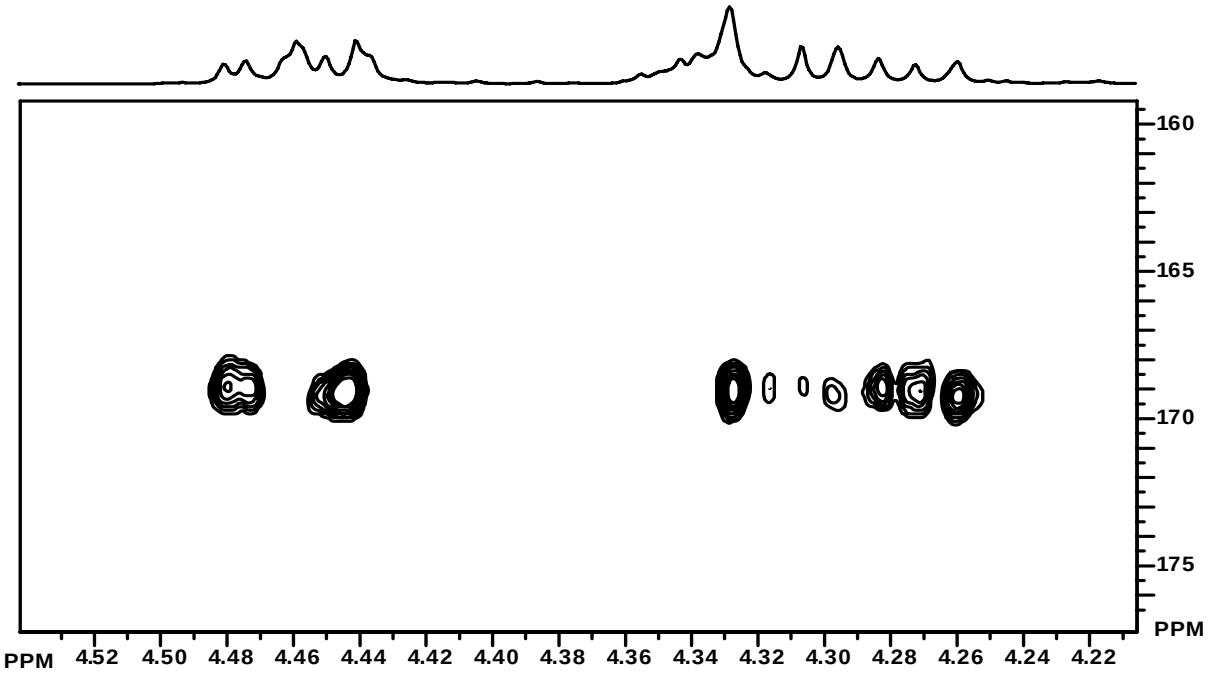


Abb. 3.17: ***Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum der Fraktion F4a, welches mit Korrelationen zwischen dem C9 der trans-p-Cumarsäure und den beiden H5-Atomen der Arabinose zeigt***

Die Verbindung in Fraktion F**4a** wurde als 5-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-L-arabinofuranose (pCA) (Abb. 3.15) identifiziert. Die mit *p*-Cumarsäure substituierten Seitenketten der Heteroxylane wurden bisher aus keinen anderen Getreidekleien bzw. –karyopsen isoliert. *p*-Cumarsäure–Tri- bzw. Tetrasaccharide wurden lediglich in Zellwänden von Gerstenstroh (Mueller-Harvey et al., 1986), Bambussprösslingen (Hartley et al., 1990, Ishii, 1996, Ishii et al., 1990) und Bermudagras (Borneman et al., 1990) nachgewiesen.

3.2 Isolierung und Identifizierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden aus Maiskleie

3.2.1 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden mittels GPC an Sephadex™ LH-20 und Identifizierung von ausgewählten gereinigten Fraktionen

Nach der Fraktionierung von PCS-Sacchariden mittels GPC an Sephadex™ LH-20 mit Wasser, wurden die auf der Säule verbliebenen DFS-Saccharide in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Methoden (Ishii, 1991, Saulnier et al., 1999) mit unterschiedlichen wässrig/organischen Lösungsmittelgemischen isoliert. Die beste Trennung wurde mit einem Methanol/Wasser-Gemisch 20/80 (v/v) erreicht. Ein zugehöriges Chromatogramm ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Mehrere Fraktionen wurden gesammelt und nach alkalischer Hydrolyse auf die Existenz phenolischer Komponenten, insbesondere DFS, mittels HPLC-DAD untersucht. Die relativen Retentionszeiten und die UV-Spektren (Abb. 5.1 in Kapitel 5.3) waren für die Identifizierung ausschlaggebend. Alle Fraktionen beinhalteten mehrere DFS als phenolische Komponenten. Zwei Fraktionen (F**5** und F**6** in Abb. 3.18) wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Die Fraktion F**5** enthielt 5-5-DFS als phenolische

Hauptkomponente. Nach dem Verseifen der Fraktion F**6** wurde ein Gemisch aus 5-5-DFS und 8-*O*-4-DFS identifiziert. Beide Fraktionen (F**5** und F**6**) wurden mittels semipräparativer RP-HPLC-UV gereinigt bzw. fraktioniert.

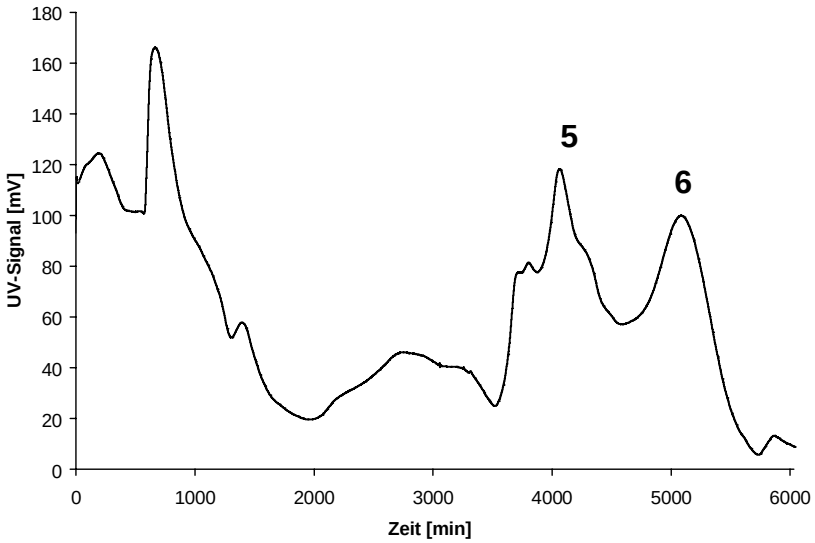


Abb. 3.18: GPC-Chromatogramm der Sephadex™ LH-20-Fraktionierung des sauren, vorfraktionierten Hydrolysates der unlöslichen Ballaststoffe aus Maiskleie (Eluent: Methanol/H_2O-Gemisch 20/80). *Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.1 zu entnehmen*

Die Fraktionierung der Fraktion F**5** mittels semipräparativer HPLC (nicht abgebildet) ergab eine Hauptfraktion F**5ger**, die jedoch noch immer eine Mischung aus unterschiedlichen 5-5-DFS-Sacchariden darstellte (nach HPLC-DAD-MS- und NMR-Untersuchungen) und somit nicht weiter betrachtet wurde.

Zwei Fraktionen (F**6a** und F**6b**) wurden nach der Fraktionierung von F**6** mittels semipräparativer HPLC erhalten (in Abb. 3.19). Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurden ca. 5 mg der Fraktion F**6a** und ca. 4 mg der Fraktion F**6b** isoliert.

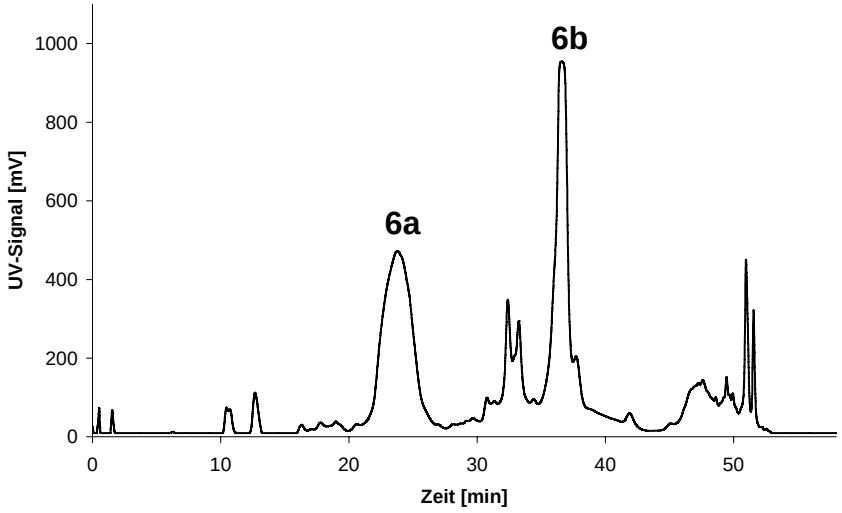


Abb. 3.19: Semipräparatives RP-HPLC-Chromatogramm der GPC-Fraktion F6. *Chromatographiebedingungen sind in Kapitel 5.2.2.3 dargestellt*

Die Identifizierung des phenolischen Anteils der Fraktion F**6a** wurde nach alkalischer Hydrolyse mittels HPLC-DAD durchgeführt. 5-5-DFS (UV-Spektrum in Abb. 5.1 in Kapitel 5.3) wurde als Hauptkomponente im alkalischen Hydrolysat nachgewiesen. Als Ergebnis der HPLC-MS-Analyse der isolierten Fraktion wurde die Molekülmasse von 782 g/mol ermittelt (Natrium-Addukt mit *m/z* 805 $[M+Na]^+$ und Kalium-Addukt mit *m/z* 821 $[M+K]^+$). Diese Molekülmasse entspricht einer Verbindung, die aus einer DFS und drei Pentose-Einheiten besteht. Die Monosaccharid-Bausteine des Moleküls wurden nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung als Alditolacetate mittels GC-FID bestimmt. Arabinose und Xylose wurden im Verhältnis 2:1 nachgewiesen. Die Struktur der Fraktion F**6a** wurde mit Hilfe von 1D und 2D NMR-Experimenten ermittelt. Die NMR-Untersuchungen ergaben, dass es sich bei der Fraktion F**6a** um eine bekannte, aus einer 5-5-DFS, zwei Arabinosen und einer Xylose bestehende Verbindung handelt (Abb. 3.20). Diese Verbindung wurde bereits nach saurer Hydrolyse der unlöslichen Maisballaststoffe isoliert, wobei der erste Beweis erbracht wurde, dass DFS als Crosslinks in Getreideballaststoffen fungieren (Saulnier et al., 1999).

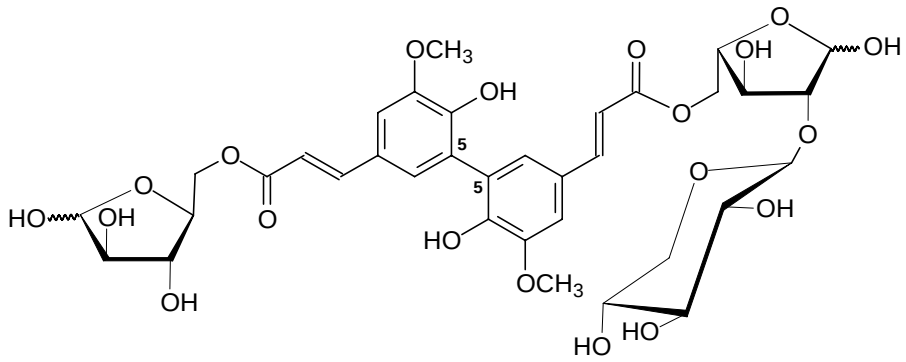


Abb. 3.20: Strukturformel des in Fraktion F6a enthaltenen 5-5-Dehydrodiferulasäure-Trisaccharids

Die einzige phenolische Komponente, die in Fraktion F**6b** (Abb. 3.19) nach alkalischer Hydrolyse mittels HPLC-DAD detektiert wurde, konnte anhand ihrer Retentionszeit und ihres UV-Spektrums (breite Schulter zwischen 290 und 310 nm, Abb. 5.1 in Kapitel 5.3) als 8-*O*-4-DFS identifiziert werden. Eine Untersuchung mittels HPLC-MS im positiven Modus ergab ein Massenspektrum mit *m/z* 673 $[M+Na]^+$ und *m/z* 689 $[M+K]^+$. Die daraus abgeleitete Molekülmasse beträgt 650 g/mol und entspricht einer Verbindung, die aus einer DFS und 2 Pentosen besteht. Der Einsatz der hochauflösenden MS ergab für das Natrium-Addukt *m/z* 673.17516, woraus sich die Summenformel $C_{30}H_{34}NaO_{16}$ (berechnete Molekülmasse: 673.17445 g/mol) ergab. Als einzige Kohlenhydrat-Komponente wurde Arabinose mittels GC-FID identifiziert.

Die genaue Struktur der isolierten Fraktion F**6b** (Abb. 3.21) wurde mit Hilfe verschiedener 1D, 2D und 3D NMR-Experimente aufgeklärt. Die zugehörigen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten sind in den Tabellen 3.9 und 3.10 zusammengefasst.

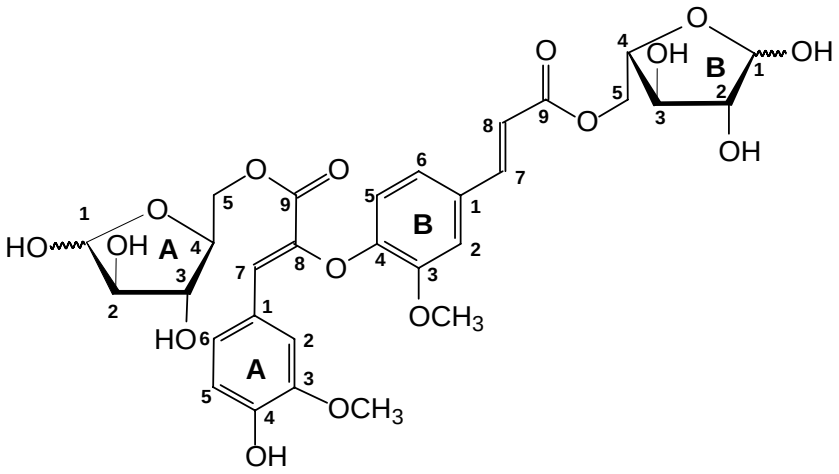


*Abb. 3.21: **Strukturformel des in Fraktion F6b enthaltenen Dehydrodiferulasäure-Saccharids: Di-5-O-L-arabinosyl-Ester von 8-O-4-Dehydrodiferulasäure***

*Tabelle 3.9: **^{1}H-NMR-Daten für Fraktion F6b (in Aceton-d6/D_2O 9:1); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz.** OMe: Methoxyl-Gruppe, ax: axial, eq: äquatorial*

H		Arabinose-Einheit				Ferulat-Einheit					
		Aα	**A**β	**B**α	**B**β	**A**α	**A**β	**B**α**A**α	**B**α**A**β	**B**β**A**α	**B**β**A**β
1		5.102 $J_{1,2}$=2.06	5.197 $J_{1,2}$=4.51	5.135 $J_{1,2}$=2.25	5.202 $J_{1,2}$=4.13						
2		3.956 $J_{2,3}$=3.56	3.911 $J_{2,3}$=5.93	3.972 $J_{2,3}$=3.89	3.907 $J_{2,3}$=6.75	7.4297 $J_{2,6}$=2.1	7.4239 $J_{2,6}$=2.1	7.4259 $J_{2,6}$=2.1	7.4259 $J_{2,6}$=2.1	7.4136 $J_{2,6}$=2.1	7.4145 $J_{2,6}$=2.1
3		3.862 $J_{3,4}$=6.01	4.030 $J_{3,4}$=6.57	3.886 $J_{3,4}$=5.83	4.028 $J_{3,4}$=6.38						
4		4.169 $J_{4,5ax}$=5.99 $J_{4,5eq}$=3.47	3.883 $J_{4,5ax}$=7.05 $J_{4,5eq}$=3.48	4.192 $J_{4,5ax}$=6.72 $J_{4,5eq}$=3.53	3.866 $J_{4,5ax}$=6.40 $J_{4,5eq}$=3.73						
5	**5_{ax}**	4.220 $J_{5ax,5eq}$= −11.52	4.177 $J_{5ax,5eq}$= −11.60	4.174 $J_{5ax,5eq}$= −11.82	4.236 $J_{5ax,5eq}$= −12.19	6.7755 $J_{5,6}$=8.3	6.7725 $J_{5,6}$=8.3	6.7935 $J_{5,6}$=8.3	6.7915 $J_{5,6}$=8.3	6.7995 $J_{5,6}$=8.3	6.7985 $J_{5,6}$=8.3
	5_{eq}	4.362	4.314	4.330	4.333						
6						7.1778	7.1703	7.1105	7.1071	7.1051	7.1015
7						7.4640	7.4967	7.6102 $J_{7,8}$=16.0		7.6155 $J_{7,8}$=16.0	
8								6.4616	6.4628	6.4515	6.4525
OMe						3.673	3.670	3.96	3.96	3.96	3.96

Tabelle 3.10: ***^{13}C-NMR-Daten für Fraktion F6b (in Aceton-d6/D_2O 9:1); chemische Verschiebungen δ_C in ppm; Daten wurden den 2D HSQC- und HMBC-NMR-Spektren entnommen.*** *OMe: Methoxyl-Gruppe*

C	Arabinose-Einheit				Ferulat-Einheit			
	Aα	**A**β	**B**α	**B**β	**A**α	**A**β	**B**α	**B**β
1	103.09	96.93	103.09	96.93	124.69	124.69	129.81	129.92
2	82.91	77.70	83.00	77.70	113.80	113.96	112.22	112.29
3	78.00	76.50	78.18	76.50	148.32	148.32	149.86	149.86
4	81.56	80.30	81.56	80.30	149.48	149.48	148.58	148.58
5	65.70	66.60	65.16	67.00	115.90	115.86	114.35	114.30
6					126.03	126.02	123.09	122.97
7					128.99	129.06	145.53	145.50
8					137.36	137.30	116.79	116.81
9					163.79	163.73	167.71	167.59
OMe					55.69	55.69	56.36	56.36

Die in der phenolischen Region des ^{1}H-NMR-Spektrums der Fraktion F**6b** (Abb. 3.22) enthaltenen Signale zeigen eine deutliche Aufspaltung, die durch die α- oder β-Stellung der anomeren Protonen der jeweils assoziierten Arabinose-Einheiten zu erklären ist. Dieser Einfluss wird durch das Verhältnis der Signalintensitäten **A**7α und **A**7β deutlich, das mit ca. 2:1 dem Anomerenverhältnis von Arabinose (α- zu β ca. 2:1) entspricht. Die **A**7-Singuletts (**A**7α bei 7.4640 ppm und **A**7β bei 7.4967 ppm) liefern den Beweis, dass die Ferulasäure-Einheit **A** (Abb. 3.21) in 8-Stellung gebunden ist. Im Zuge der radikalischen 8-*O*-4-Kopplung von zwei Ferulasäure-Einheiten (**A** und **B**) wurde das saure **A**8-Proton aus dem intermediär auftretenden Chinonmethid eliminiert, so dass keine Aufspaltung des Signals für A**7** in ein Dublett zu beobachten ist. Der Einfluss der α-/β-Anomerie der Arabinose-Einheiten ist bei den aufgespaltenen Signalen **A**5 und **A**6 (je ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 8.3 Hz) ebenfalls deutlich zu erkennen (siehe Abb. 3.22).

Die Protonen des **B**-Ringes der Ferulasäure-Einheit werden sowohl durch die Arabinose-Einheit **A** als auch durch die Arabinose-Einheit **B** beeinflusst. So ist z. B. das Proton **B**8 in vier 16 Hz Dubletts (charakteristisch für *trans*-ständige Protonen) aufgespalten (siehe Abb. 3.22). Die größte Intensität besitzt das Dublett, welches detektiert wird, wenn die beiden Arabinosen **B** und **A** in Form der bevorzugten α-Anomere vorliegen (**B**αAα). Bei geringfügig höherer chemischer Verschiebung ist ein etwa halb so großes Dublett zu sehen, das durch das Proton **B**8 verursacht wird, wenn die Arabinose-Einheit **B** als α-Anomer und die Arabinose-Einheit **A** als β-Anomer vorliegen (**B**αAβ). Bei deutlich niedrigeren chemischen Verschiebungen sind die **B**8-Signale **B**βAα (Arabinose-Einheit **B** in Form des β- und Arabinose-Einheit **A** in Form des α-Anomers) und **B**βAβ (Arabinose-Einheiten **A** und **B** in Form des β-Anomers) ersichtlich. Ähnlich zu den Signalen des Protons **B**8 sind die Signale

der Protonen **B**5 und **B**6 ebenfalls in je vier Dubletts aufgespalten (Abb. 3.22, Daten in Tabelle 3.9).

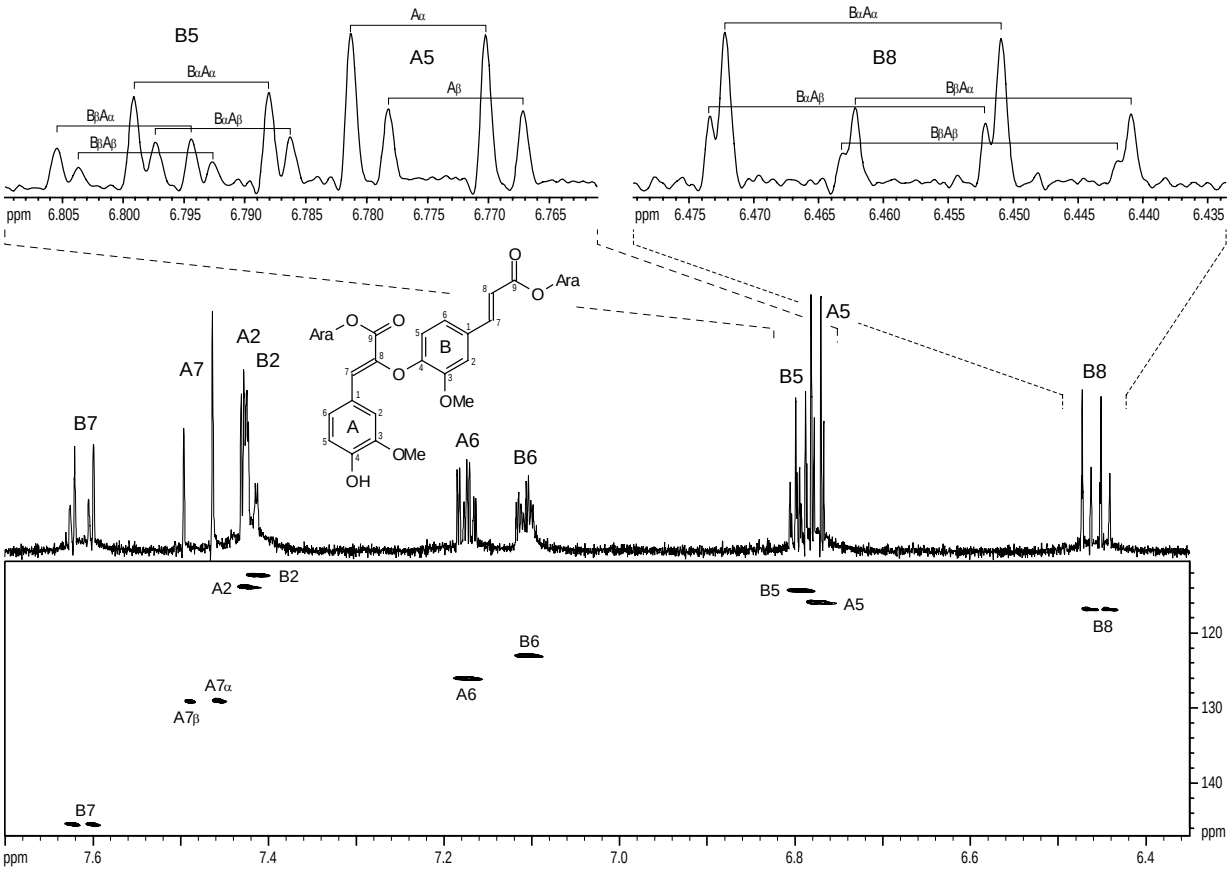


Abb. 3.22: ***^{1}H- und HSQC-NMR-Spektren der Fraktion F6b (phenolische Region)***

Die Zuordnung der Signale in der Ferulat-Region konnte durch das HMBC-Experiment und durch das COSY-Experiment (Korrelationen zwischen **B**7 und **B**8, **B**5 und **B**6, **B**2 und **B**6, **A**7 und **A**8, **A**2 und **A**6) bestätigt werden (nicht abgebildet).

Aufgrund der geringen Substanzmenge der zu identifizierenden Verbindung konnte kein geeignetes 1D ^{13}C-NMR-Spektrum aufgenommen werden. Die ^{13}C-NMR-Daten wurden daher den 2D NMR-Experimenten HSQC und HMBC entnommen (Tabelle 3.10). Die erhaltenen chemischen Verschiebungen für phenolische ^{13}C-Atome wiesen eine gute Übereinstimmung mit veröffentlichten NMR-Daten der 8-*O*-4-DFS auf (Ralph et al., 1994).

Obgleich die Spektren auf einem 750 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen wurden, war die Interpretation der Protonensignale in der aliphatischen Arabinose-Region komplex. Dies ist auf die Anwesenheit von zwei Arabinose-Einheiten zurückzuführen, die sowohl in ihrer α- als auch in ihrer β-anomeren Form vorliegen können und dadurch vier isomere Strukturen verursachen. Die anomeren Protonen von allen vier Isomeren konnten aufgrund der charakteristischen Tieffeldverschiebung (da durch zwei α-ständige Sauerstoffatome am schwächsten abgeschirmt) einfach zugeordnet werden (Abb. 3.23 a). Den β-Anomeren der

beiden Arabinose-Einheiten (anhand der Kopplungskonstanten $^{3}J_{1,2}$ von 4.51 und 4.13 Hz und durch Vergleich mit Literaturdaten (Bunzel et al., 2002a) identifiziert) wurden höhere chemische Verschiebungen zugeordnet als den dominierenden α-Anomeren ($^{3}J_{1,2}$ von 2.06 und 2.25 Hz). Auffällig war außerdem, dass die Signale der anomeren Protonen der **B**-Arabinose-Einheit höhere chemische Verschiebungen aufwiesen als die Signale der Anomeren der **A**-Arabinose-Einheit. Die Zuordnung der restlichen Protonensignale erfolgte mit Hilfe von Daten, die dem TOCSY- (Abb. 3.23 b) und dem COSY-Experiment (Abb. 3.23 c) entnommenen wurden. Durch Interpretation des HSQC-Spektrums (Abb. 3.23 d) konnten die 5-Protonen bzw. Kohlenstoffatome eindeutig identifiziert und die ^{13}C-NMR-Signale den bereits bekannten Protonensignalen zugewiesen werden. Schließlich wurden mit Hilfe des HMBC-Experimentes (nicht abgebildet) die Arabinose-Isomere der jeweiligen Ferulat-Einheit (**A** und **B**) zugeteilt. Die Korrelationen zwischen den C9-Kohlenstoffatomen der Ferulat-Einheiten und den H5-Protonen der Arabinose-Einheiten waren im HMBC-Spektrum für beide Molekülabschnitte (**A** und **B**) deutlich zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass die 8-*O*-4-DFS über beide Carboxyl-Gruppen esterartig an die Arabinose-Einheiten (jeweils in *O*-5-Position) gebunden ist. Für die Zuordnung der beiden Arabinose-Einheiten zu den Einheiten **A** und **B** musste ermittelt werden, welche Arabinose an die Ferulasäure-Einheit **A** und welche an die Ferulasäure-Einheit **B** gebunden ist. Die NMR–Messung von FA als Vergleichssubstanz in Aceton/D_2O 9:1 ergab für C9-Kohlenstoffatome der Ferulasäure eine chemische Verschiebung von 167.9 ppm. FA stellt strukturell den Vergleich für den **B**-Ring der zu identifizierenden Substanz dar (vgl. Abb. 3.15 und 3.21). So wurden die Kohlenstoff-Resonanzen C9 von 167.71 und 167.59 ppm dem **B**-Ring zugeteilt, während die chemischen Verschiebungen von 163.79 und 163.73 dem C9 des **A**-Ringes entsprachen. Über die Kopplung der C9-Kohlenstoffatome des Ferulates mit den bereits zugeordneten H5-Protonen der Arabinose konnten so die Arabinose-Einheiten den jeweiligen Ringen zugewiesen werden. Des Weiteren wurden die Ringformen beider Arabinosen mit Hilfe des HMBC-Experimentes als furanosidisch bestimmt.

Spektrale Doppeldeutigkeiten bei der Zuordnung der Signale wurden durch den Einsatz der 3D NMR endgültig geklärt. Insbesondere das 3D TOCSY-HSQC-Experiment erwies sich als effiziente Zuordnungshilfe für die Kohlenhydratsignale.

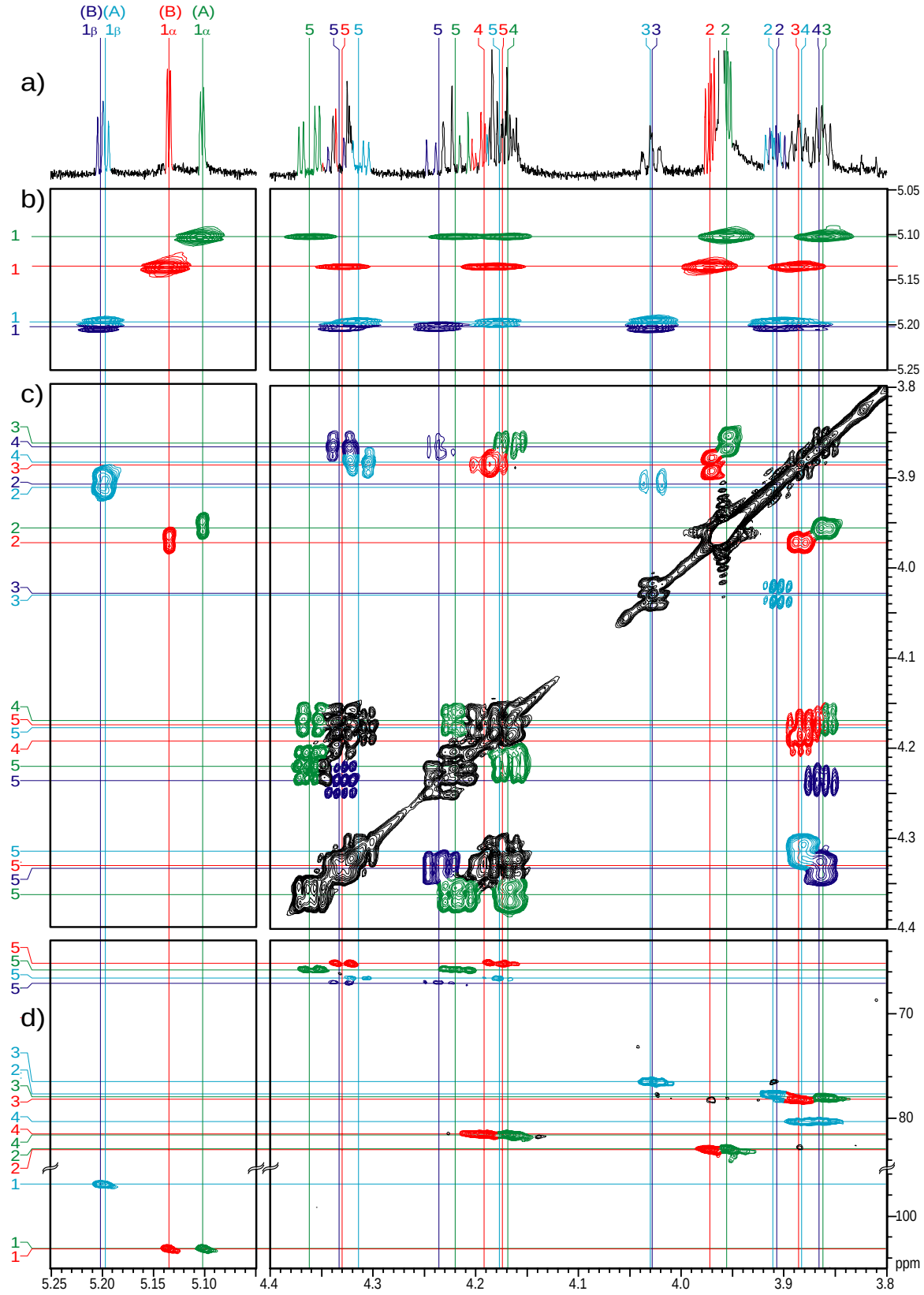


Abb. 3.23: Ausschnitte aus den Arabinose-Regionen der Fraktion F6b. a) ^{1}H NMR-Spektrum (4 Arabinose-Isomere wurden durch unterschiedliche farbige Markierungen kenntlich gemacht). b) TOCSY-Ausschnitt mit gezeigten Korrelationen zwischen zugeordneten anomeren Protonen und den anderen fünf Protonen der jeweiligen Arabinose-Einheit. c) Ausschnitt aus dem COSY-Experiment. d) Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum mit zugeordneten 5-Protonen und ^{13}C-NMR-Daten für jede Arabinose-Einheit

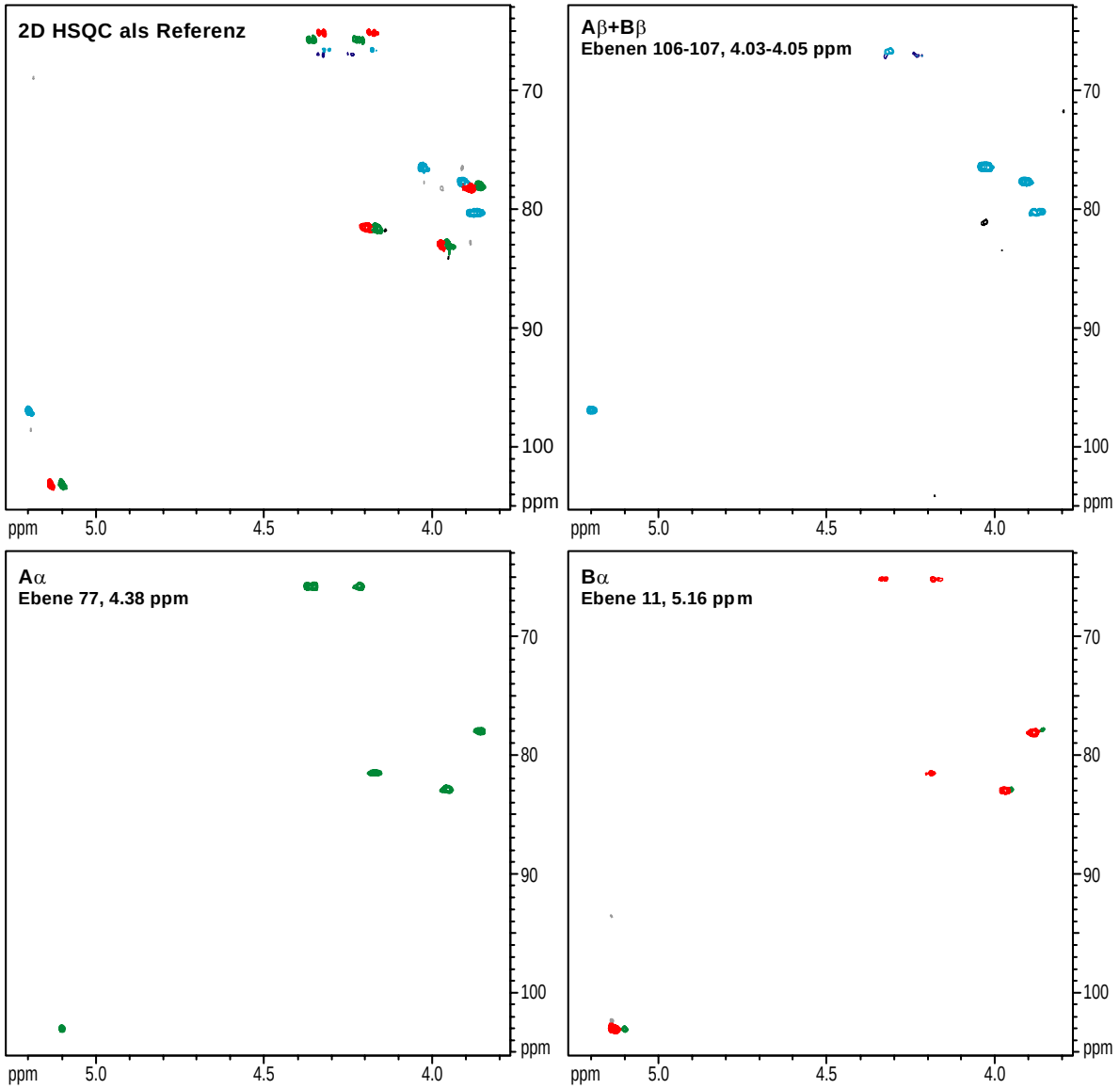


Abb. 3.24: ***Ein 2D HSQC-Spektrum als Referenz und drei Ausschnitte aus dem 3D TOCSY-HSQC-Spektrum der Fraktion F6b (drei ^{13}C-^{1}H-(f2-f3)-Ebenen bei definierten Protonenverschiebungen).*** *Es wurden HSQC-Spektren erhalten, die den α-Anomeren der Arabinose-Einheiten **A** und **B** zugeordnet werden können. Aufgrund der teilweise Überlappung der anomeren Protonensignale der β-Anomere der Einheiten **A** und **B** können keine getrennten HSQC-Spektren für diese Einheiten erhalten werden*

In Abb. 3.24 ist das 2D HSQC-Referenzspektrum abgebildet, welches alle Signale der Kohlenhydrat-Region aufweist. In einem 3D TOCSY-HSQC-Spektrum verteilen sich alle Signale in einem Würfel mit den drei Achsen f1 (^{1}H-Spektrum), f2 (^{13}C-Spektrum) und f3 (^{1}H-Spektrum). Schneidet man den Würfel bei einem definierten Wert auf der f1-Achse, erhält man ein 2D HSQC-Spektrum auf der f2-f3-Ebene. Die Besonderheit der so erhaltenen 2D Spektren ist, dass nur die Signale, die zu dem gleichen Spinsystem gehören wie der ausgewählte Messwert f1, im HSQC-Spektrum der f2-f3-Ebene erkennbar sind. So sind in Abb. 3.24 beim gewählten f1-Wert von 4.03 ppm die ^{1}H-^{13}C-Korrelationen der β-Anomere der Arabinose-Einheiten **A** und **B** (**A**β + **B**β) zu sehen. Bei f1=4.36 ppm ist das HSQC-Spektrum von nur einer anomeren Einheit **A**α sichtbar, während alle erkennbaren Signale

beim Schnitt f1=5.14 ppm ^{1}H-^{13}C-Korrelationen des **B**α-Anomers repräsentieren. So konnten alle ^{13}C-NMR-Signale sicher der jeweiligen Arabinose-Einheit zugeordnet werden.

Schnitte des 3D Spektrums bei einem konstanten Wert f3 ergeben 2D HSQC-TOCSY-Korrelationsspektren in der f1-f2-Ebene. In Abb. 3.25 a) sind die HSQC-TOCSY-Spektren bei definierten Protonenfrequenzen (entsprechend den anomeren Protonen jeder Arabinose-Einheit) abgebildet. So konnten z. B. die ^{1}H-NMR-Signale der jeweiligen β-Arabinose-Einheit im gesamten Spinsystem verfolgt werden. Dies war aufgrund der Komplexität der Spektren in den 2D NMR-Experimenten nicht vollständig möglich.

Die f1-f3-Ebenen bei gegebenen Kohlenstoffatomfrequenzen (Abb. 3.25 b) stellen gut aufgelöste TOCSY-Spektren der Arabinose-Einheiten **A**α, **B**α und **A**β+**B**β dar.

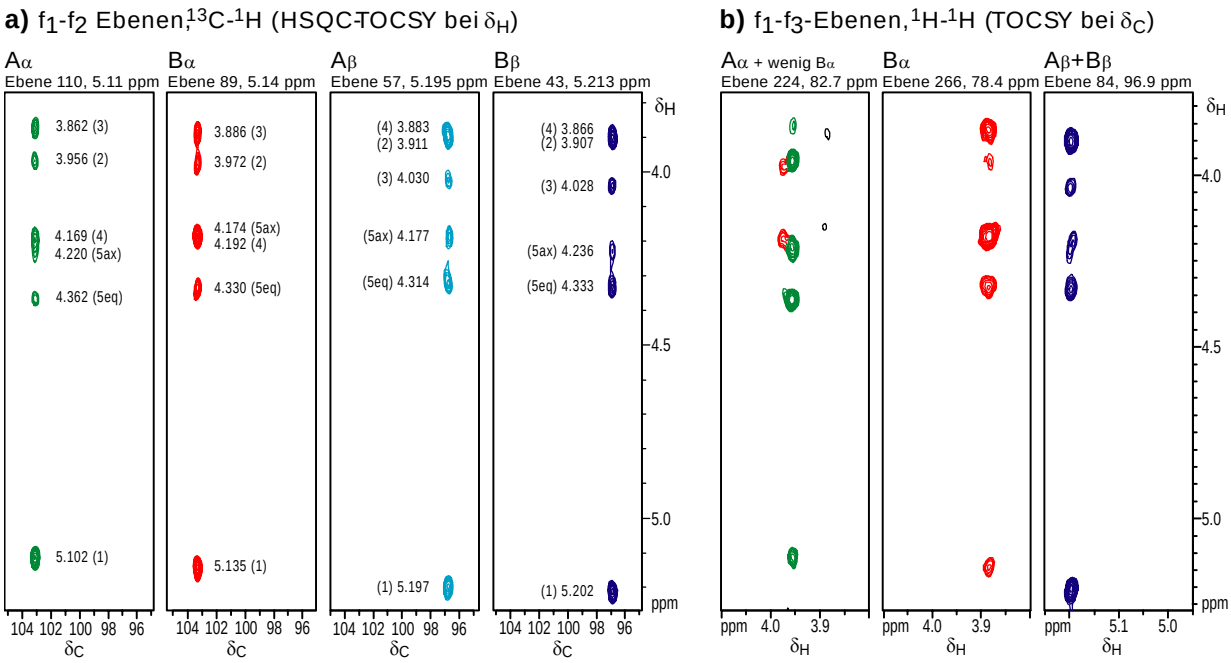


Abb. 3.25: ***Ausschnitte aus dem 3D TOCSY-HSQC-Spektrum der Fraktion F6b. a) vier ^{13}C-^{1}H-(f1-f2)-Ebenen (HSQC-TOCSY bei δ_H von anomeren Protonen) für jeweilige Arabinose-Einheit. b) Drei ausgewählte ^{1}H-^{1}H- (f1-f3) TOCSY-Ebenen (bei gegebenen δ_C) für jeweilige α-Arabinose-Einheit und für beide überlappten β-Arabinose-Einheiten (in Farbe der dominierenden Komponente gezeichnet).***

Die Kopplungskonstanten der Protonensignale wurden aus dem 1D ^{1}H-NMR-Spektrum bestimmt (Abb. 3.22 für die Ferulat-Region und Abb. 3.26 für die Kohlenhydrat-Region). Aufgrund der Komplexität des ^{1}H-NMR-Spektrums konnten nicht alle Kopplungskonstanten direkt abgelesen werden. In manchen Fällen, z. B. in der Ferulat-Region oder bei anomeren Protonen in der Kohlenhydrat-Region, war das Peakmuster deutlich zu erkennen, was die Bestimmung von Kopplungskonstanten ermöglichte. In anderen Fällen konnten die Kopplungskonstanten erst mit Hilfe der mathematischen Simulation des ^{1}H-NMR-Spektrums ermittelt werden. Die mathematische Simulation lieferte außerdem eine geeignete Lösung, um die zugeordneten chemischen Verschiebungen zu präzisieren. Das Spektrum für jedes Arabinose-Isomer wurde ausgehend von den sicher bestimmten Werten berechnet und Peaks

der berechneten Spektren dem gemessenen ^{1}H-NMR-Spektrum zugeordnet. Die chemischen Verschiebungen und die geschätzten Kopplungskonstanten wurden so lange variiert, bis die Signale der berechneten Spektren mit den Peaks des tatsächlichen NMR-Spektrums übereinstimmten. Die Gegenüberstellung der für jedes Arabinose–Isomer berechneten Spektren mit dem tatsächlichen Gesamtspektrum ist in Abb. 3.26 dargestellt. Die berechneten Kopplungskonstanten und die präzisierten chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wurde die Fraktion F**6b** als Di-5-*O*-L-arabinosyl-Ester der 8-*O*-4-DFS (Abb. 3.21) identifiziert. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der beiden Arabinosen wurde nicht vorgenommen, da bereits bewiesen wurde, dass Arabinose nur als L-Enantiomer in Seitenketten von Getreidearabinoxylanen vorliegt (Ishii, 1997). Der Di-5-*O*-L-arabinosyl-Ester der 8-*O*-4-DFS ist das erste aus pflanzlichem Material isolierte DFS-Saccharid, dessen DFS eine andere Kopplung als 5-5 aufweist.

Über die Fähigkeit von DFS, als intra-/ und intermolekulare Crosslinks in pflanzlichen Zellwänden zu agieren, wurde bereits viel diskutiert (Fry, 1986, Hatfield et al., 1999, Ishii, 1997, Ralph et al., 2004a, Ralph et al., 1998). Die Isolierung von 5-5-DFS-Sacchariden (Ishii, 1991, Saulnier et al., 1999) lieferte den ersten überzeugenden Beweis, dass DFS in der Lage sind, zwei Saccharid-Einheiten zu verbinden. Die „Molecular Modelling"-Experimente zeigten jedoch, dass 5-5-DFS die einzige DFS ist, die aufgrund ihrer Struktur die intramolekulare Ausbildung von Crosslinks der Arabinoxylane ermöglicht (Hatfield und Ralph, 1999). Demzufolge wurde durch die Isolierung von 5-5-DFS-Sacchariden kein unumstößlicher Beweis über die Beteiligung von 5-5-DFS am intermolekularen Crosslink-Prozess erbracht. Erst der im Rahmen dieser Arbeit isolierte Di-5-*O*-L-arabinosyl-Ester der 8-*O*-4-DFS liefert den ersten Hinweis über die intermolekulare Vernetzung der Zellwände durch eine DFS. Die Ausbildung von intermolekularen Crosslinks hat gravierende Auswirkungen auf die Struktur von pflanzlichen Zellwänden und einen großen Einfluss auf die physikochemischen und physiologischen Eigenschaften von Getreideballaststoffen. Allerdings wurden die oben erwähnten „Molecular Modelling"-Experimente mit einem inflexiblen Xylanstrang aus 16 Xylose-Einheiten durchgeführt (Hatfield und Ralph, 1999). Dieses Modell beschreibt gut starre bis semi-flexible Arabinoxylane (Dervilly-Pinel et al., 2001). Es wurde jedoch gezeigt, dass die Xylane eine Molekülmasse von 10^6 kDa und eine Kettenlänge von 2-3 µm aufweisen können (Kerr und Fry, 2003). Die Polysaccharide bzw. deren Vorstufen mit Ausnahme der Cellulose werden während der Entwicklung der Pflanzenzellwand im Golgi-Apparat synthetisiert (Carpita, 1990). Um den Transport von gebildeten Xylan-Molekülen mit einer Kettenlänge von 2-3 µm in abgeschnürten Golgi-Vesikeln mit einem Durchmesser von ca. 0.1 µm zu der Zellwand zu ermöglichen, müssen Xylane entweder eine gefaltete oder gewindelte Form aufweisen (Fry, 2004, Kerr und Fry, 2003). Es wurden bisher keine „Molecular Modelling"-Experimente mit den gefalteten bzw. gewindelten Arabinoxylanen durchgeführt. So kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass

auch andere als 5-5-gekoppelte DFS an der Ausbildung der intramolekularen Crosslinks beteiligt sind.

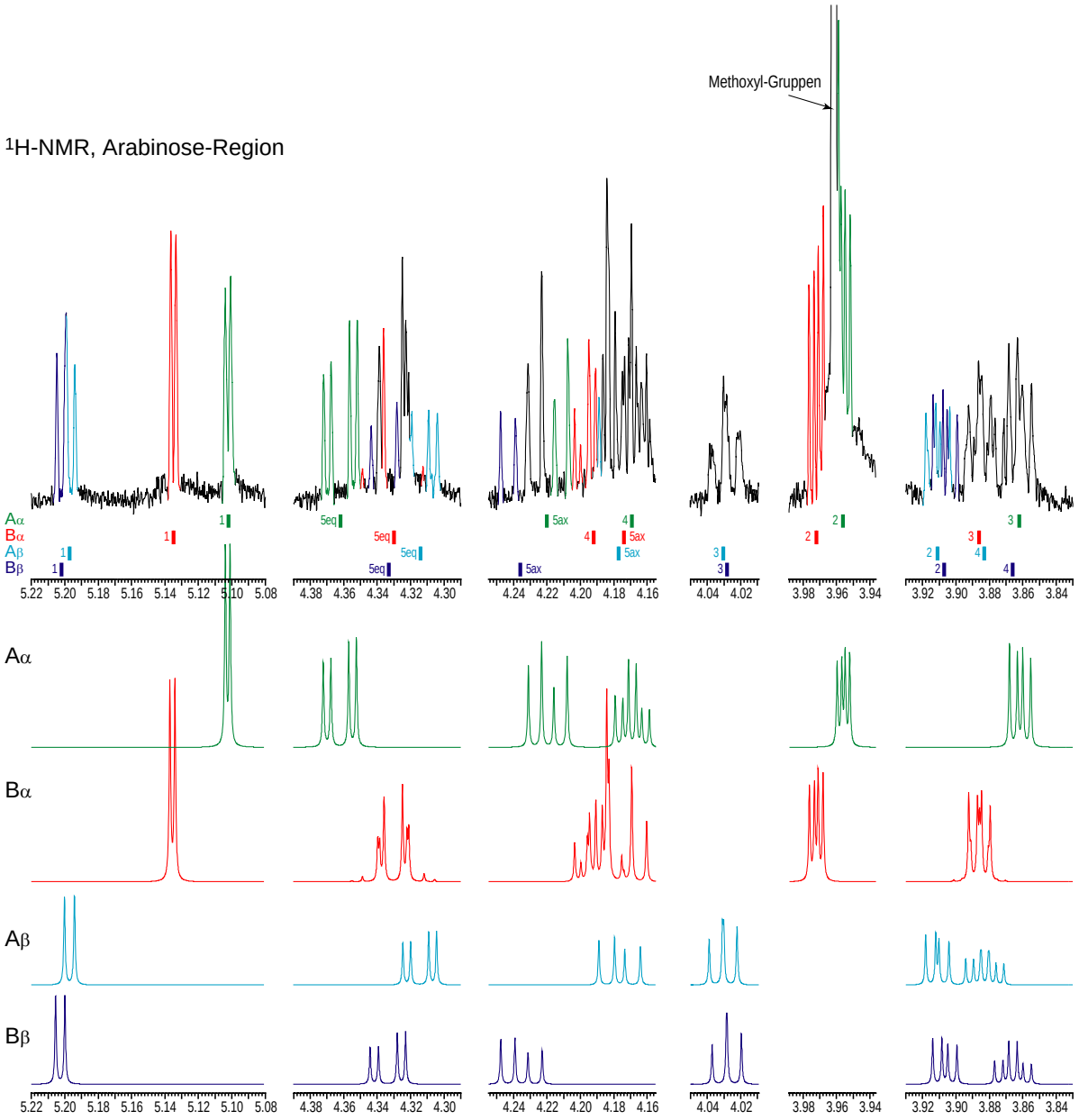


Abb. 3.26: ***Reales ^{1}H-NMR-Spektrum der Fraktion F6b (oben) und simulierte Protonen-Spektren für jede Arabinose-Einheit (farbig an die Signalzuordnung in Abb. 3.23 angepasst).*** *Im Gesamtspektrum schwarz dargestellte Signale können nicht eindeutig einem Arabinose-Isomer zugeordnet werden, da sie aus überlagerten Signalen zusammengesetzt sind. ax: axial, eq: äquatorial*

3.2.2 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Saccharidenmittels GPC an Bio-Gel® P-2 und Identifizierung von ausgewählten gereinigten Fraktionen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, war der Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie z. B. Ethanol oder Methanol zum wässrigen Eluenten notwendig, um DFS-Saccharide bei der Sephadex™ LH-20-Chromatographie zu eluieren. Obgleich DFS-Oligosaccharide nach der in Kapitel 3.2.1 angewendeten Methode isoliert werden konnten, zeigten diese Untersuchungen auch, dass der Zusatz von organischen Lösungsmitteln zu wenig reproduzierbaren Ergebnissen führte. Daher wurde zur Isolierung von weiteren DFS-Saccharidenine neue Strategie gewählt. Alle nach der Elution mit Wasser auf dem Sephadex™ LH-20-Material verbliebenen DFS-Saccharide wurden zusammen mit reinem Methanol von der Säule gespült und nach dem Entfernen des Lösungsmittels an Bio-Gel® P-2 mit Wasser als Eluent chromatographiert. Obwohl auch die Trennung an Bio-Gel® P-2-Material nicht zu vollständig reproduzierbaren Ergebnissen führte, war diese Methode zur Isolierung von DFS-Saccharidenbesser geeignet als die Trennung mittels Sephadex™ LH-20-Chromatographie mit teilweise organischen Eluenten. In Abb. 3.27 sind zwei GPC-Chromatogramme der Trennung an Bio-Gel® P-2-Material dargestellt. Die beiden Chromatogramme stimmen nicht komplett überein, da im Verlauf der Methodenentwicklung unterschiedliche Säulendimensionen verwendet wurden (Säulenlänge beim Lauf A betrug 1 m und beim Lauf B 50 cm), zeigen aber eine ähnliche Verteilung der Peaks. Jeweils fünf Fraktionen wurden pro Lauf gesammelt (F**1**-Bio–F**5**-Bio, Abb. 3.27 A) bzw. (F´**1**-Bio–F´**5**-Bio, Abb. 3.27 B). Die Untersuchung der Fraktionen F**1**-Bio–F**5**-Bio und F´**1**-Bio–F´**5**-Bio mittels HPLC-DAD-MS ergab, dass die Fraktionen aus dem Lauf in Abb. 3.27 B ähnliche Zusammensetzungen aufwiesen wie die Fraktionen aus dem Lauf 3.27 A.

Anhand der UV- und MS-Spektren wurde die Fraktion F**5** (bzw. F´**5**) als eine leicht verunreinigte Substanz bestehend aus einer 5-5-DFS und zwei Pentosen charakterisiert. Das ^{1}H-NMR-Spektrum wies auf eine Verbindung hin, die bereits von Saulnier et al. (1999) beschrieben und als Dis-*O*-L-arabinosyl-Ester der 5-5-DFS identifiziert wurde (siehe Kapitel 1.3.3, Abb. 1.8 Verbindung 3. F**4** (bzw. F´**4**) beinhaltete zwei Hauptkomponenten. Die erste Komponente setzte sich aus einer 5-5-DFS, zwei Arabinosen und einer Xylose zusammen. Die zweite Verbindung bestand aus einer 8-*O*-4-DFS und zwei Arabinosen. Diese beiden Komponenten wurden wie beschrieben bereits aus einem anderen Lauf mittels GPC an Sephadex™ LH-20 isoliert und identifiziert (siehe Kapitel 3.2.1, Abb. 3.20 und 3.21). F**3** (bzw. F´**3**) stellte ein Gemisch aus mehreren Verbindungen folgender Zusammensetzung dar, u.a.: a) 5-5-DFS, drei Pentosen und einer Hexose, b) 5-5-DFS und vier Pentosen, c) 8-*O*-4-DFS und drei Pentosen. F**2** (bzw. F´**2**) beinhaltete eine Verbindung aus 8-8 (Aryltetralin)-DFS und zwei Pentosen sowie eine Reihe weiterer Substanzen, die schwer zu charakterisieren waren. F**1** (bzw. F´**1**) enthielt unterschiedliche, aus einer DFS und einer Pentose bestehende Komponenten.

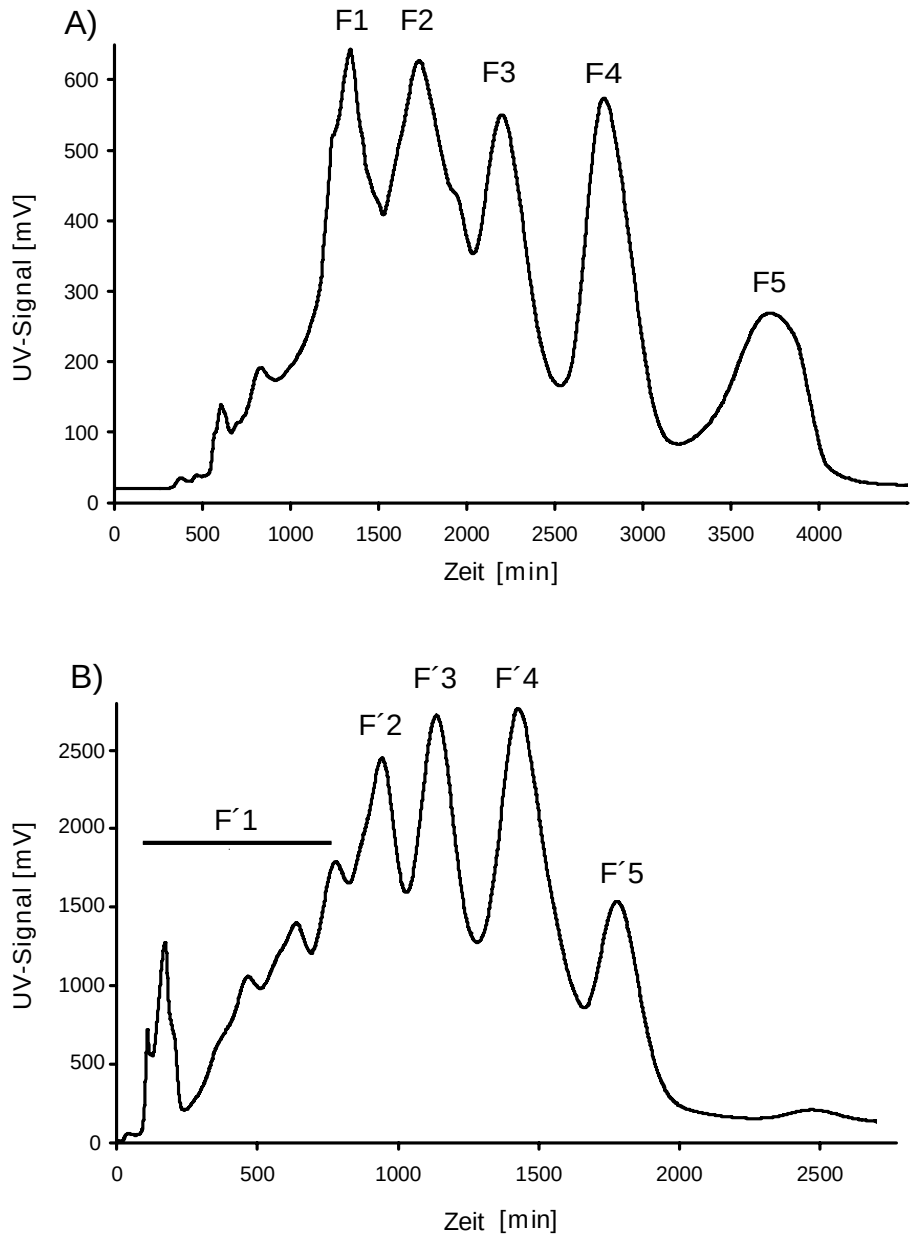


Abb. 3.27: GPC-Chromatogramme an Bio-Gel® P-2 (Eluent: H_2O) zur Fraktionierung von DFS-Oligosacchariden aus Maiskleie. *Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.2 zu entnehmen.*

Nach Untersuchung aller an Bio-Gel® P-2-Säule isolierten Fraktionen wurden die Fraktionen F**2** und F**3** zur weiteren Reinigung bzw. Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC ausgewählt. Die Fraktionierung der Fraktion F**2** mittels semipräparativer HPLC (Abb. 3.28) ergab eine Hauptfraktion F**2ger**-Bio. Aus der Fraktion F**3**-Bio wurden mittels semipräparativer HPLC (nicht abgebildet) neben einer Fraktion, die zwei Komponenten (F**3a**-Bio und F**3b**-Bio) enthielt, zwei weitere Verbindungen isoliert. Aufgrund der geringen Mengen und erheblicher Verunreinigungen konnten jedoch keine sicheren NMR-Daten dieser beiden Verbindungen ermittelt werden.

Aus 100 g unlöslichen Ballaststoffen wurden ca. 5 mg F**2ger**-Bio (Abb. 3.29) und ca. 4 mg einer Mischung aus den Komponenten F**3a**-Bio und F**3b**-Bio (Abb. 3.33) isoliert.

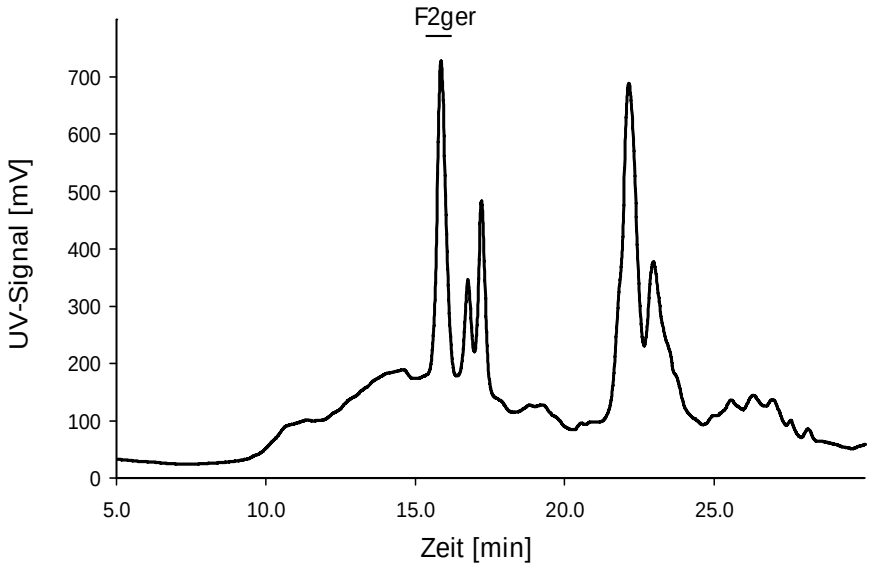


Abb. 3.28: Semipräparatives RP-HPLC-Chromatogramm der GPC-Fraktion F2-Bio. *Chromatographiebedingungen sind in Kapitel 5.2.2.3 dargestellt.*

3.2.2.1 Strukturcharakterisierung der gereinigten Fraktion F2ger-Bio

Durch Untersuchung der Fraktion F**2ger**-Bio mittels HPLC-MS im positiven Modus wurde die Molekülmasse zu 650 g/mol bestimmt (mit *m/z* 673 $[M+Na]^+$ und *m/z* 689 $[M+K]^+$), die einer Verbindung aus einer DFS und zwei Pentosen entsprach. Die Identifizierung der phenolischen Komponenten nach alkalischer Hydrolyse mittels HPLC-DAD ergab 8-8 (Aryltetralin)-DFS (ca. 90 %) neben einem geringen Anteil an 5-5-DFS (ca. 10 %) (Abb. 5.1 in Kapitel 5.3). Die Monosaccharid-Analyse der isolierten Fraktion nach saurer Hydrolyse zeigte, dass Arabinose als Hauptmonosaccharid (ca. 88 %) neben geringen Mengen an Xylose (ca. 12 %) vorlag. Nach Bestimmung des phenolischen Anteils und der Monosaccharide wurde die Reinheit der Fraktion F**2ger**-Bio auf ca. 85–90 % geschätzt. Als Verunreinigung der Fraktion wurde ein 5-5-DFS-Oligosaccharid vermutet.

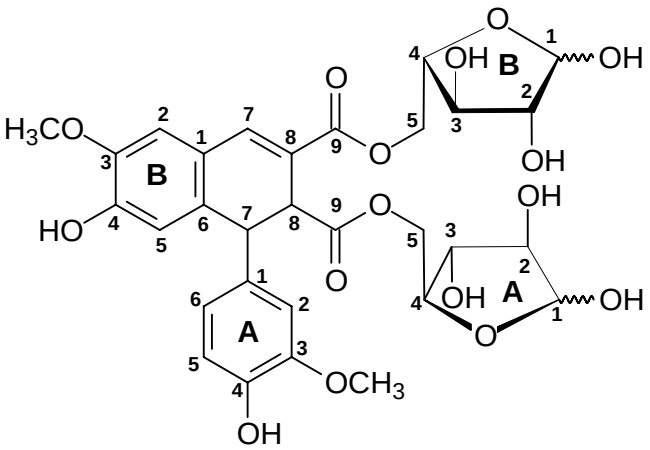


Abb. 3.29: Strukturformel der Hauptkomponente in Fraktion F2ger-Bio: Di-5-O-L-arabinosyl-Ester von 8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulasäure

Mit Hilfe unterschiedlicher 1D und 2D NMR-Experimente wurde die Struktur der Hauptkomponente der Fraktion F**2ger**-Bio (Abb. 3.29) aufgeklärt. Die zugeordneten ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten sind in den Tabellen 3.11 und 3.12 zusammengefasst. Zur Unterstützung der Zuordnung der Arabinose-Signale sind in den Tabellen 3.11 und 3.12 die ^{1}H- bzw. ^{13}C-NMR-Daten der α- und β-Arabinose als Bestandteile von FA (Bunzel et al., 2002a) als Referenz dargestellt. In Tabelle 3.12 sind des Weiteren neben den Daten der zu identifizierenden Substanz die ^{13}C-NMR-Daten von 8-8 (Aryltetralin)-DFS (Ralph et al., 1994) zum Vergleich aufgeführt.

Tabelle 3.11: ^{1}H-NMR-Daten für die Hauptkomponente der Fraktion F2ger-Bio (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz. *OMe: Methoxyl-Gruppe, ax: axial, eq: äquatorial*

	Arabinose-Einheit‡								**Arabinose-Ref. #**	
	a (α)	**b (α)**	**c (α)**	**d (α)**	**e (β)**	**f (β)**	**g (β)**	**h (β)**	**α**	**β**
H1	4.869*	5.068	5.204	5.223*	5.249	5.274	5.291	5.298	5.29	5.32
($J_{1,2}$)	(*3.7*)	(*3.0*)	(*2.0*)	(*2.5*)	(*4.5*)	(*4.5*)	(*4.9*)	(*5.0*)	(-)	(*4.4*)
H2	3.931	3.957	4.036	4.043	4.022	4.049	4.095	4.098	4.07	4.12
H3	3.724	3.745	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H4	4.090	4.063	4.278	4.278	n.d.	n.d.	n.d	n.d.	n.d.	n.d.
$H5_{ax}$	4.076	4.128	4.250	4.250	4.062	4.133	4.237	4.217	4.31	4.27
$H5_{eq}$	4.384	4.283	4.412	4.412	4.303	4.287(?)	4.386	4.423	4.45	4.46

8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulat§											
	H2	**H5**	**H6**	**H7**	**H8**	**OMe**		**H2**	**H5**	**H7**	**OMe**
Einheit A	6.777	6.739	6.482	4.524	4.036	3.742	**Einheit B**	7.067	6.665	7.797	3.856

‡ Eine sichere Zuordnung der chemischen Verschiebungen für 3- und 4-Protonen war aufgrund weitgehender Signal-Überlappungen häufig nicht möglich

Referenzdaten von Arabinose (in D_2O) als Bestandteil von 5-*O*-(*trans*-Feruloyl)-L-arabinofuranose (FA) (Bunzel et al., 2002a)

* Weitere Aufspaltung der Signale nicht dargestellt

§ Verbreiterte Signale, keine Kopplungskonstanten wurden berechnet

Die phenolische Region des ^{1}H-NMR-Spektrums (Abb. 3.30 A) wird von breiten, wenig aufgelösten Signalen dominiert, was, wie später beschrieben, auf die Anwesenheit von mehreren Isomeren der zu charakterisierenden Substanz zurückzuführen ist. Zwei weitere Protonensignale **A**H7 und **A**H8, die besonders charakteristisch für 8-8 (Aryltetralin)-DFS sind, liegen in der Kohlenhydrat-Region bei ungefähr 4.52 und 4.04 ppm (Abb. 3.30 B).

Im anomeren Kohlenhydrat-Bereich der Komponente F**2ger**-Bio (zwischen 4.8 und 5.4 ppm) sind acht Signale der anomeren Protonen der beiden Arabinose-Einheiten zu erkennen. Nach der Bestimmung der Kopplungskonstanten wurden vier Signale als α-Anomere (Signale a–d

in Abb. 3.30 und Tabellen 3.11 und 3.12) identifiziert. Vier weitere Signale (e–h in Abb. 3.30 und Tabellen 3.11 und 3.12) entsprechen den β-Anomeren. Zwei der Signale (a und d) sind zusätzlich aufgespalten, was bei der Zuordnung jedoch zunächst nicht weiter berücksichtigt wurde. Ausgehend von den Signalen der Anomeren erfolgte die Zuordnung der weiteren Protonensignale der jeweiligen Arabinose-Einheit. Insgesamt wurden acht Arabinose-Einheiten identifiziert. Bei einer ähnlichen Verbindung, dem Di-5-*O*-L-arabinosyl-Ester der 8-*O*-4-DFS (Abb. 3.21 in Kapitel 3.21), wurde nur zwischen vier Arabinose-Einheiten (jeweils α- und β-Form von zwei Arabinosen) unterschieden. Die Existenz zusätzlicher anomerer Signale kann durch mehrere Faktoren begründet werden. Die beiden Arabinose-Einheiten des 8-8 (Aryltetralin)-DFS-Diarabinosids sind lediglich durch vier Kohlenstoffatome der DFS voneinander getrennt (Abb. 3.29). Die Nähe der beiden Arabinose-Einheiten kann dazu führen, dass sie sich gegenseitig beeinflussen. So könnten für ein Isomer einer Arabinose-Einheit (z. B. für die α-Arabinose-Einheit am **A**-Ring) zwei Signale detektiert werden: 1) die Arabinose-Einheit am **B**-Ring liegt in α-Stellung vor und 2) die Arabinose-Einheit am **B**-Ring weist die β-Form auf. Ein anderer Grund für die außerordentliche Vielfältigkeit der Arabinose-Spinsysteme könnte das Stereozentrum in 7- und 8-Position der DFS-Einheit **A** sein. Die durch die radikalische Reaktion in ähnlichen

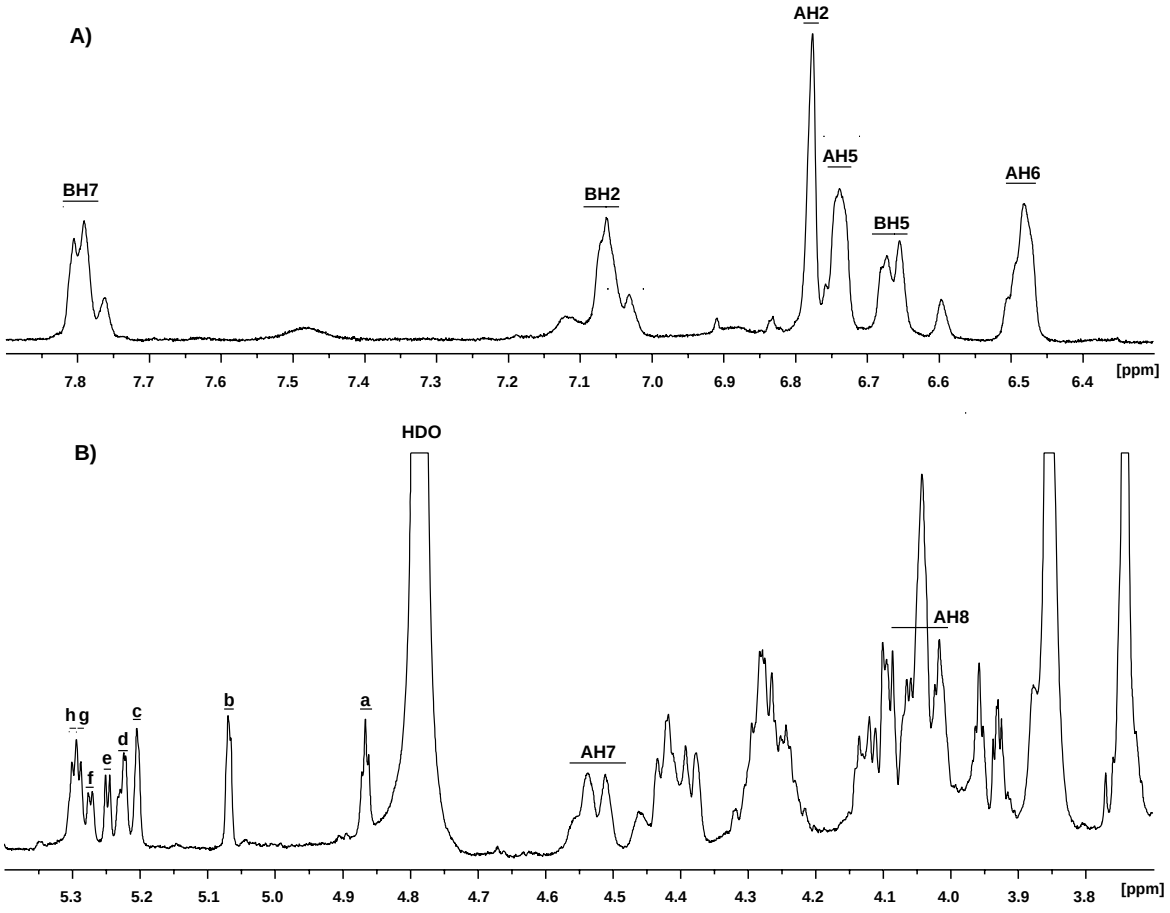


Abb. 3.30: ***^{1}H-NMR-Spektrum der Fraktion F2ger-Bio. A) Phenolische Region. B) Kohlenhydrat-Region.*** *Protonensignale des 8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulates sind entsprechend der Nummerierung in Abb. 3.29 beschriftet. Bezeichnungen a-h zeigen die Signale von anomeren Protonen (ausführlich beschrieben im Text).*

Verhältnissen entstandenen Stereoisomere könnten die zusätzliche Aufspaltung der Signale der anomeren Protonen der beiden Arabinosen verursachen. Mit Hilfe von 2D NMR-Experimenten konnten die acht Datensätze an Protonensignalen dem jeweiligen Ring (**A** oder **B**) zugewiesen werden. Der Schlüssel zur sicheren Differenzierung liegt in den unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der C9-Atome der beiden DFS-Einheiten (**A** und **B** in Abb. 3.29). Mit Hilfe des HMBC-Experimentes konnten die Kopplungen über drei Bindungen zwischen den C9-Kohlenstoffen der DFS-Einheiten und den H5-Protonen der Arabinose-Einheiten beobachtet werden. Anhand dieser Kopplungen konnten die Einheiten a, b, e und f dem **A**-Ring zugeordnet werden, während die Protonen-Daten der Einheiten c, d, g und h auf deren Zugehörigkeit zum **B**-Ring hindeuteten.

Tabelle 3.12: ***^{13}C-NMR-Daten für die Hauptkomponente der Fraktion F2ger-Bio (in D_2O); chemische Verschiebungen δ_C in ppm; Daten wurden den 2D HSQC-, HSQC-TOCSY- und HMBC-NMR-Spektren entnommen;*** *OMe: Methoxyl-Gruppe*

Arabinose-Einheit									**Arabinose-Ref.[#]**	
	a (α)	**b (α)**	**c (α)**	**d (α)**	**e (β)**	**f (β)**	**g (β)**	**h (β)**	**α**	**β**
C1	101.3	101.4	101.8	101.8	95.8	95.8	95.9	95.9	101.9	96.0
C2	81.6	81.5	81.8	81.8	76.4	76.5	76.5	76.5	81.9	76.6
C3	75.2	75.6	76.4	76.4	74.8	74.8 (?)	74.8	74.8	76.7	75.0
C4	80.1	80.3	81.1	81.1	79.0	79.0	79.2	79.2	81.4	79.3
C5	64.0	64.4	64.7	64.7	66.5	66.2	65.8	66.1	64.1	65.7
8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulat										
	C1	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**C8**	**C9**	**OMe**
Einheit A	134.6[§] 134.8[§]	112.6	148.0	144.4	116.0	121.1	45.7	48.0	174.9[§] 175.1[§] 175.4[§]	56.4
Einheit B	124.3	114.0	147.4	148.5	116.4	131.7	140.9	124.3	168.5	56.5
8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulasäure-Ref.[†]										
Einheit A	136.1	112.0	148.1	146.1	115.5	120.7	46.0	48.1	173.6	56.2
Einheit B	124.6	113.1	147.5	149.3	116.9	132.4	137.6	124.3	168.0	56.4

[#] Referenzdaten von Arabinose (in D_2O) als Bestandteil von 5-*O*-(*trans*-Feruloyl)-L-arabinofuranose (FA) (Bunzel et al., 2002a).

***** Weitere Aufspaltung der Signale nicht dargestellt

[§] Eine Aufspaltung von mehr als 0.1 ppm der ^{13}C-NMR-Signale in HMBC-Spektrum wurde beobachtet

[†] Referenzdaten von 8-8 (Aryltetralin)-DFS (in acetone-d_6) (Ralph et al., 1994)

Durch den Vergleich der ^{13}C-NMR-Daten der Hauptkomponente der Fraktion F**2ger**-Bio mit den veröffentlichten Daten von 8-8 (Aryltetralin)-DFS (Ralph et al., 1994) konnte die bereits nach der HPLC-DAD-Untersuchung vermutete 8-8 (Aryltetralin)-DFS als phenolische Komponente der zu identifizierenden Substanz bestätigt werden. Die ^{13}C-NMR-Daten für die Arabinose-Einheiten wurden den 2D Experimenten HSQC, HSQC-TOCSY und HMBS entnommen. Das HSQC-TOCSY-Experiment (die Kohlenhydrat-Region des Spektrums ist in Abb. 3.31 dargestellt) erwies sich als besonders hilfreich, vor allem bei der Zuordnung der Protonensignale, die aufgrund starker Überlappungen nicht den einzelnen Arabinose-Einheiten zugewiesen werden konnten. Wie in Tabelle 3.12 zu sehen ist, sind die zugeordneten ^{13}C-NMR-Daten mit den chemischen Verschiebungen von α- und β-Arabinofuranose aus FA vergleichbar.

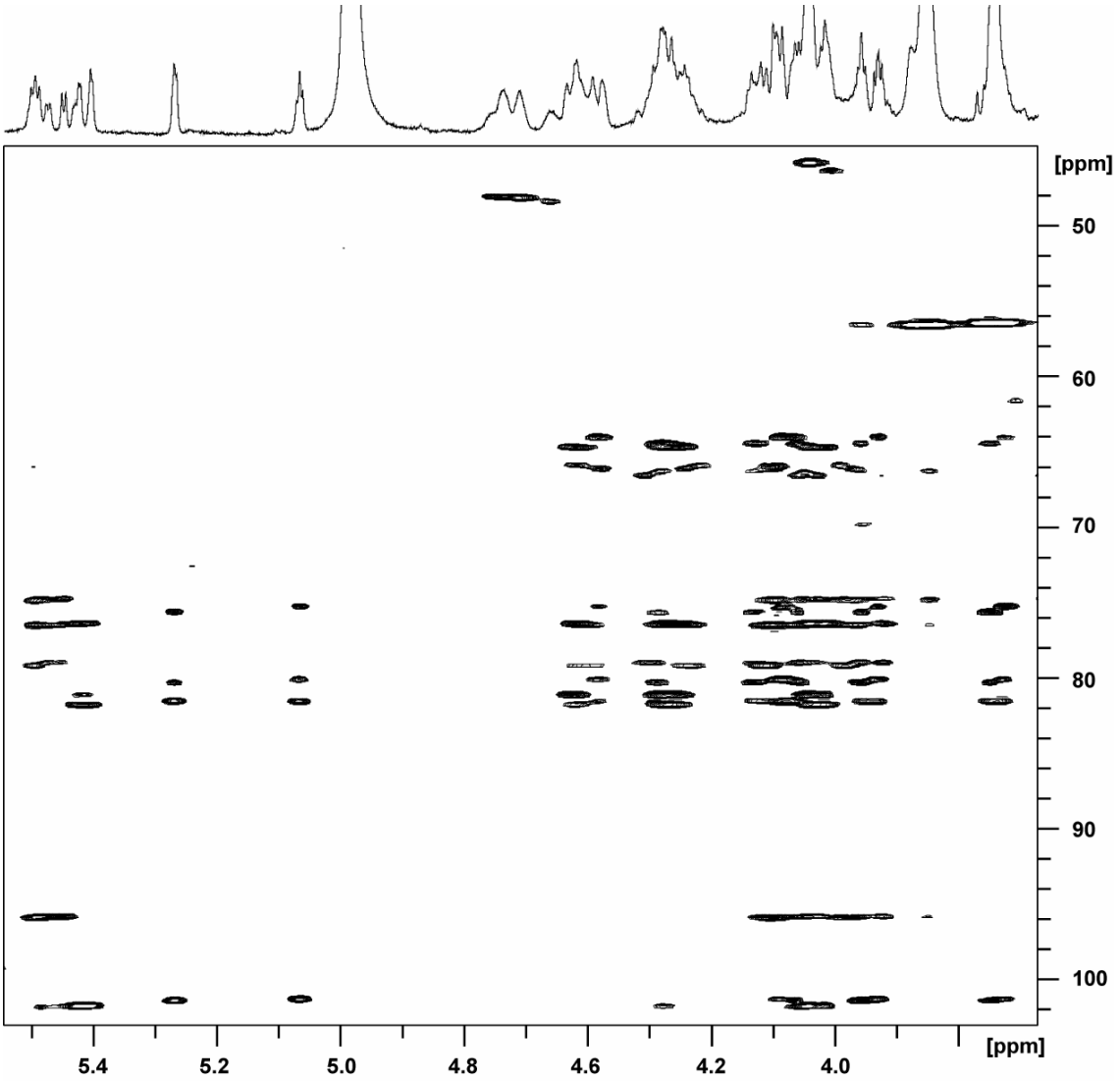


Abb. 3.31: HSQC-TOCSY-Spektrum der Fraktion F2ger-Bio

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums (Abb. 3.32) wurden Ester-Bindungen zwischen der 8-8 (Aryltetralin)-DFS und den beiden Arabinose-Einheiten, jeweils in deren *O*-5-Position, eindeutig nachgewiesen. Des Weiteren wurden die beiden Arabinosen als Furanosen identifiziert.

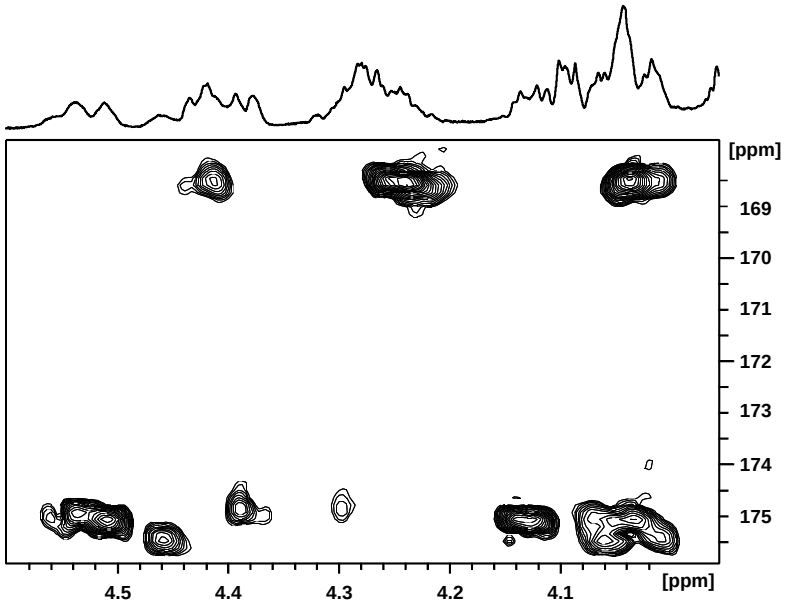


Abb. 3.32: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum der Fraktion F2ger-Bio: Korrelationen zwischen den C9-Kohlenstoffatomen der 8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulasäre-Einheit und den H5-Protonen der Arabinose-Einheiten

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse wurde die Fraktion F**2ger**–Bio als Di-5-*O*-L-arabinosyl-Ester der 8-8 (Aryltetralin)-DFS (Abb. 3.29) identifiziert.

Die Isolierung und Identifizierung des Di-5-*O*-L-arabinosyl-Esters der 8-8 (Aryltetralin)-DFS beweist die Bindung von 8-8 (Aryltetralin)-DFS an Arabinoxylane. Bisher lag diese Erkenntnis nur für 5-5- (Saulnier et al., 1999) und 8-*O*-4-DFS (Kapitel 3.2.1) vor. Der Nachweis einer Saccharid gebundenen 8-8 (Aryltetralin)-DFS dient zusammen mit dem Di-5-*O*-L-arabinosyl-Ester der 8-*O*-4-DFS zur Unterstützung der Hypothese, dass DFS an der Ausbildung von intermolekularen Polysaccharid-Crosslinks in pflanzlichen Zellwänden beteiligt sind. Interessant ist, dass die Aryltetralinform der 8-8-DFS nachgewiesen wurde. Dies deutet darauf hin, dass 8-8 (Aryltetralin)-DFS, eine von drei bekannten 8-8-DFS (Abb. 1.7 in Kapitel 1.3.3), tatsächlich als solche in pflanzlichen Zellwänden vorkommt und nicht nur ein Produkt der alkalischen Hydrolyse im Verlauf der DFS-Analytik (Schatz et al., 2006) darstellt. Durch den Nachweis der Bindung dieser phenolischen Komponente an ein Saccharid kann ausgeschlossen werden, dass die 8-8 (Aryltetralin)-DFS vollständig während der alkalischen Hydrolyse aus 8-8 (Tetrahydrofuran)-DFS oder einem unbekannten Vorläufer entsteht, da die Isolierung des 8-8 (Aryltetralin)-DFS-Disaccharids keinerlei Arbeitsschritte unter alkalischen Bedingungen beinhaltete. Die mögliche Entstehung des 8-8 (Aryltetralin)-Dehydrodiferulates unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse ist unwahrscheinlich, darf aber nicht außer Acht gelassen werden und bedarf in Zukunft weiterer Untersuchungen.

3.2.2.2 Strukturcharakterisierung der Komponenten F3a-Bio und F3b-Bio

Die Molekülmasse des aus zwei Komponenten F**3a**-Bio und F**3b**-Bio zusammengesetzten Gemisches wurde mittels HPLC-MS bestimmt. Das im positiven Modus aufgenommene MS-Spektrum deutete mit *m/z* 800 $[M+NH_4]^+$, 805 $[M+Na]^+$ und *m/z* 821 $[M+K]^+$ auf eine Molekülmasse von 782 g/mol hin; dies entspricht einer Verbindung bestehend aus einer DFS und drei Pentosen. 8-*O*-4-DFS wurde als einzige phenolische Komponente nach alkalischer Hydrolyse der Fraktion anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums (Abb. 5.1 in Kapitel 5.3) bestimmt. Arabinose und Xylose im Verhältnis 2:1 wurden als einzige Monosaccharide nach saurer Hydrolyse des Zweikomponenten-Gemisches nachgewiesen.

Die NMR-Daten der Fraktion zeigten, dass es sich dabei um ein Gemisch aus zwei Komponenten F**3a**-Bio und F**3b**-Bio (Abb. 3.33) im Verhältnis ca. 1:1 handelte. Bei beiden Komponenten handelte es sich um einen Ester von 8-*O*-4-DFS, wobei eine Carboxylgruppe der DFS an eine Arabinose gebunden ist und die andere an ein aus einer Xylose und einer Arabinose bestehendes Disaccharid. Da es sich bei der 8-*O*-4-DFS um ein asymmetrisches Molekül handelt, konnten anhand der NMR-Daten zwei unterschiedliche Substanzen in Abhängigkeit von der Bindung der Xylose erkannt werden. Bei der Komponente F**3b**-Bio ist die Xylose an die Arabinose einer **A**-Einheit gebunden und bei der Verbindung F**3a**-Bio befindet sich die Xylose an der Arabinose auf der Seite des **B**-Ringes. Die zugehörigen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten sind den Tabellen 3.13 und 3.14 zu entnehmen.

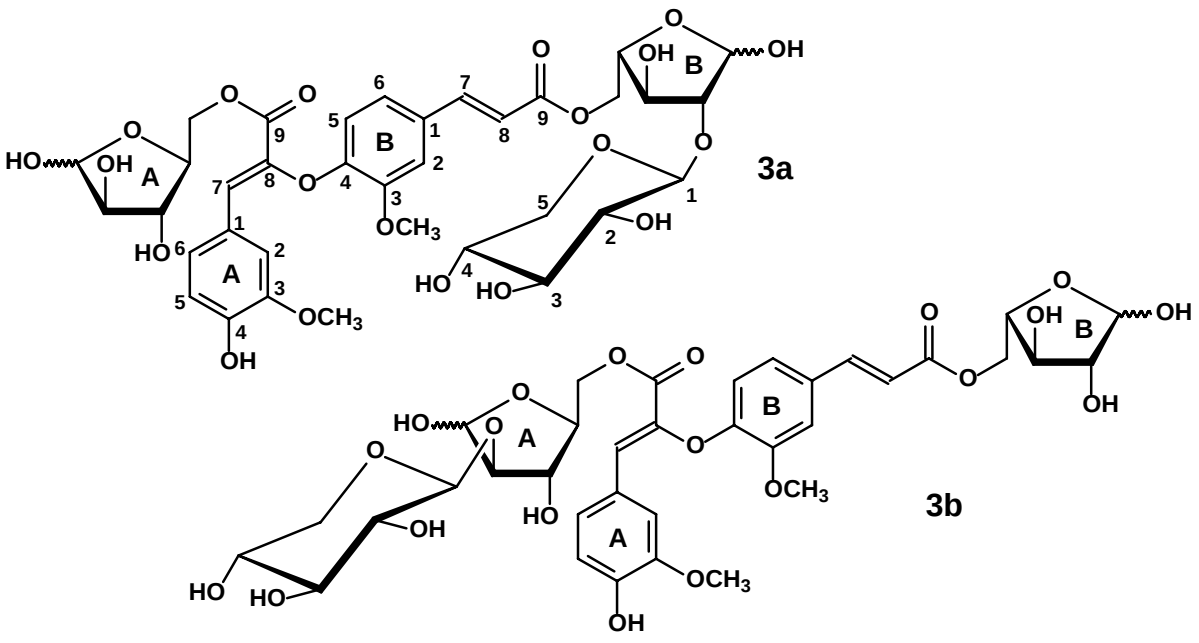


Abb. 3.33: Strukturformeln der isolierten Komponenten F3a-Bio und F3b-Bio, zwei 8-O-4-Dehydrodiferulasäure-Saccharide

Tabelle 3.13: ***^{1}H-NMR-Daten für die Fraktionen F3a-Bio und F3b-Bio (in Aceton-d6/D_2O 9:1); chemische Verschiebungen δ_H in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz.*** *A oder* ***B*** *beschreiben die in Abb. 3.33 zugewiesene Ferulat-Einheit der 8-O-4-Dehydrodiferulasäure (DFS), α oder β die Konfiguration der Arabinose bzw. Xylose und "α" oder "β" den Einfluss der Arabinose-Konfiguration auf die Signale der Xylose. OMe: Methoxyl-Gruppe, ax: axial, eq: äquatorial*

	Xyl(1→2)Ara(5→)-Diferulat						**Xyl(1→2)Ara(5→)-Diferulat-Ref.‡**			
	Arabinose#			**Xylose**			**Arabinose**		**Xylose**	
	Aα	**Bα**	**A/Bβ***	**Aβ("α")**	**Bβ("α")**	**A/Bβ("β")***	**α**	**β**	**β("α")**	**β("β")**
H1	5.172	5.279	5.224	4.407	4.448	4.552 (*7.4*)	5.285	5.229	4.454	4.570
($J_{1,2}$)	(*1.6*)	(*1.1*)	(*3.7*)	(*7.5*)	(*7.6*)	4.565 (*7.6*)	(-)	(*3.9*)	(*7.6*)	(*7.4*)
H2	4.009	4.076	4.034	3.198	3.184	3.278	4.081	4.045	3.209	3.289
H3	3.947	4.051	4.264	3.356	3.358	3.379	4.047	4.271	3.380	3.390
H4	4.140	4.200	3.909	3.485	3.485	3.495	4.212	3.926	3.489	3.511
$H5_{ax}$	4.200	4.180	4.248	3.178	3.178	3.206	4.164	4.177	3.204	3.222
$H5_{eq}$	4.399	4.368	4.346	3.806	3.806	3.842	4.365	4.336	3.814	3.843

	Ara(5→)-Diferulat#			**Ara(5→)-Diferulat-Ref. §**					**8-*O*-4-DFS†**		**8-*O*-4-DFS-Ref. §**	
	Aα	**Bα**	**A/Bβ***	**Aα**	**Bα**	**Aβ**	**Bβ**		**A**	**B**	**A**	**B**
H1	5.103	5.143	5.204	5.102	5.135	5.197	5.202	**H2**	7.432	7.424	~7.43	~7.43
($J_{1,2}$)	(*1.5*)	(*2.3*)	(*3.9*)	(*2.1*)	(*2.3*)	(*4.5*)	(*4.1*)					~7.41
H2	3.956	3.976	3.906	3.956	3.972	3.911	3.907	**H5**	6.778	6.795	~6.77	~6.79
								H6	7.180	7.111	~7.17	~7.11
H3	3.857	3.891	4.030	3.862	3.886	4.030	4.028	**H7**	7.490	7.618	~7.50	~7.61
									7.458	7.604	~7.46	
H4	4.160	n.d.	3.863	4.169	4.192	3.883	3.866		7.423			
								($J_{7,8}$)		(*16.0*)		(*16.0*)
$H5_{ax}$	4.220	n.d.	4.180	4.220	4.174	4.177	4.236	**H8**		6.469		~6.46
										6.459		~6.45
$H5_{eq}$	4.356	4.332	4.328	4.362	4.330	4.314	4.333	**OMe**	3.678	3.968	~3.67	~3.96

‡ Referenzdaten (Ref.) von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) in Aceton-*d6*/D_2O 9:1

\# Die Protonendaten wurden, wenn möglich, dem $^1H,^1H$-COSY-Spektrum entnommen. Wenn nicht, wurden die Daten aus den HSQC-TOCSY- und HMBC-Spektren abgelesen

* NMR-Signale des β-Anomers der Arabinose konnten nicht eindeutig dem **A** bzw. **B**-Ring zugeordnet werden. Die präsentierten Daten repräsentieren die Hauptsignale in den 2D Spektren, z. B. in den $^1H,^1H$-COSY und HSQC-TOCSY-Spektren

§ Referenzdaten (in Aceton-*d6*/D_2O 9:1) des Di-5-*O*-L-arabinosyl-Esters der 8-*O*-4-DFS (siehe Tabelle 3.9 in Kapitel 3.2.1)

† Aufgrund der Komplexität der Signale wurden nur deren Zentren abgelesen. Nur im Falle einer deutlichen Signalaufspaltung wurden mehrere chemische Verschiebungen angegeben. Sichere Ermittlung von Kopplungskonstanten war nur für die H7/H8-Kopplung möglich.

Tabelle 3.14: ***^{13}C-NMR-Daten für die Fraktionen F3a-Bio und F3b-Bio (in Aceton-d6/D_2O 9:1); chemische Verschiebungen δ_C in ppm; Daten wurden den 2D HSQC-, HSQC-TOCSY- und HMBC-NMR-Spektren entnommen***. *A oder B beschreiben die in Abb. 3.33 zugewiesene Ferulat-Einheit der 8-O-4-Dehydrodiferulasäure (DFS), α oder β die Konfiguration der Arabinose bzw. Xylose und "α" oder "β" den Einfluss der Arabinose-Konfiguration auf die Signale der Xylose. OMe: Methoxyl-Gruppe*

	Xyl(1→2)Ara(5→)-Diferulat						**Xyl(1→2)Ara(5→)-Diferulat-Ref.#**			
	Arabinose			**Xylose**			**Arabinose**		**Xylose**	
	Aα	**Bα**	**A/Bβ***	**Aβ("α")**	**Bβ("α")**	**A/Bβ("β")**	**α**	**β**	**β("α")**	**β("β")**
C1	101.39	101.63	96.54	104.06	103.83	103.76	101.64	96.54	103.93	103.79
C2	91.17	90.95	84.25	74.05	74.05	73.70	91.07	84.37	74.12	73.79
C3	76.50	76.98	74.42	77.08	77.08	76.46	77.08!	74.84	77.09!	76.52
			74.80							
C4	80.09	80.57	79.86	70.18	70.18	70.18	80.67	79.86	70.30	70.23
			79.44							
C5	65.03	64.67	66.96	66.21	66.21	66.01	64.68	66.69	66.26	66.08

	Ara(5→)-Diferulat			**Ara(5→)-Diferulat-Ref.§**					**8-*O*-4-DFS**		**8-*O*-4-DFS-Ref.§**	
	Aα	**Bα**	**A/Bβ***	**Aα**	**Bα**	**Aβ**	**Bβ**		**A**	**B**	**A**	**B**
C1	103.11	103.11	96.90	103.09	103.09	96.93	96.93	**C1**	124.70	129.83	~124.7	~129.8
								C2	113.82	112.26	~113.9	~112.2
C2	82.85	82.96	77.66	82.91	83.00	77.70	77.70	**C3**	148.26	149.87	~148.3	~149.9
								C4	149.50	148.53	~149.5	~148.6
C3	77.92	78.15	76.40	78.00	78.18	76.50	76.50	**C5**	115.90	114.27	~115.9	~114.3
								C6	126.04	123.05	~126.0	~123.0
C4	81.48	81.50	80.14	81.56	81.56	80.30	80.30	**C7**	~129.0∫	145.56	~129.0	~145.5
								C8	137.34	116.79	~137.3	~116.8
								C9	163.74	167.59	~163.8	~167.7
C5	65.67	65.13	66.49	65.70	65.16	66.60	67.00	**OMe**	55.63	56.34	~55.7	~56.4

Referenzdaten (Ref.) von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) in Aceton-*d6*/D_2O 9:1

* NMR-Signale des β-Anomers der Arabinose konnten nicht eindeutig dem **A** bzw. **B**-Ring zugeordnet werden. Die präsentierten Daten repräsentieren die Hauptsignale in den 2D NMR-Spektren

§ Referenzdaten (in Aceton-*d6*/D_2O 9:1) des Di-5-*O*-L-arabinosyl-Esters der 8-*O*-4-DFS (siehe Tabelle 3.10 in Kapitel 3.2.1)

∫ Der angegebene Wert repräsentiert das Zentrum der drei Signale bei 129.14, 129.03 und 128.97 ppm

Die PCS-Region im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 3.34 A) ähnelt der entsprechenden Region im Spektrum der Fraktion F**6b** (Abb. 3.21 und 3.22 in Kapitel 3.2.1), was die Existenz der bereits durch Vorversuche nachgewiesenen 8-*O*-4-DFS als einzige phenolische Komponente bestätigt. Das ^{1}H-NMR-Spektrum im Kohlenhydratbereich ist aufgrund der vier zu erwartenden Isomere (α- und β-Isomere der Arabinose-Einheiten) für beide Komponenten F**3a**-Bio und F**3b**-Bio sehr komplex (Abb. 3.34 B). Viele Daten konnten den 1D und 2D Spektren (v.a. ^{1}H,^{1}H-COSY, HSQC-TOCSY) entnommen werden. Trotzdem war es nicht möglich, alle Signale der jeweiligen Einheit zuzuordnen. So konnten die Signale der α-Arabinosen und der unter dem Einfluss der α-Arabinose stehenden Xylosen den jeweiligen Ringen **A** und **B** sicher zugeordnet werden, während die Daten der β-Arabinosen (**A-** oder **B**-Einheit) und der unter dem Einfluss der β-Arabinose stehenden Xylosen nicht differenziert werden konnten (**A/B**β bei Arabinosen bzw. **A/B**β("β") bei Xylosen in Tabellen 3.13 und 3.14).

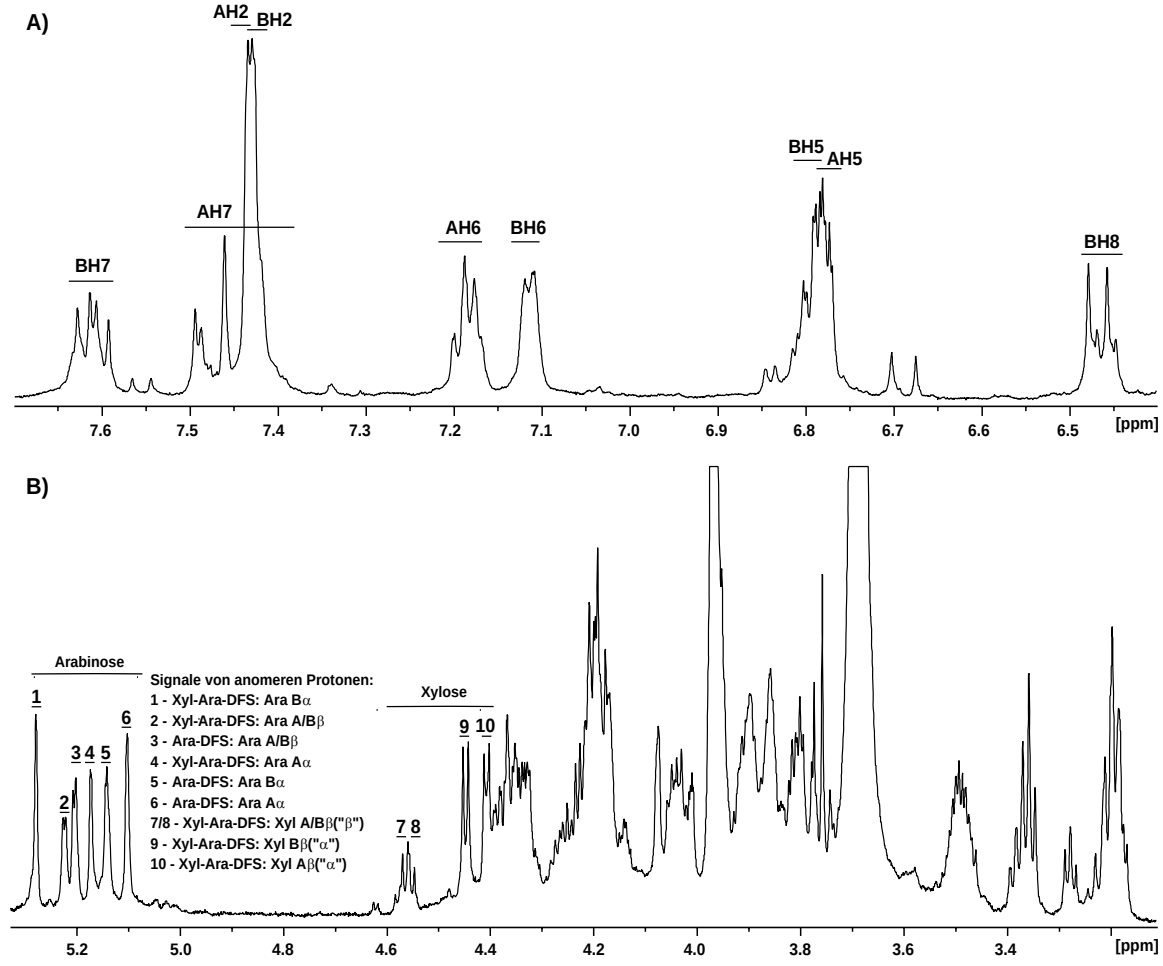


Abb. 3.34: ^{1}H-NMR-Spektrum des Zweikomponenten-Gemisches F3a-Bio und F3b-Bio. A) Phenolische Region. B) Kohlenhydrat-Region. *Protonensignale des 8-O-4-Dehydrodiferulates sind entsprechend der Nummerierung in Abb. 3.33 beschriftet. 1-10 repräsentieren Signale der anomeren Protonen der Arabinose und Xylose. Xyl-Ara-DFS steht für Xylose-(1→2)-Arabinose-(5→)-Dehydrodiferulat, Ara-DFS für Arabnose-(5→)-Dehydrodiferulat.*

Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome wurden den 2D Spektren (HSQC, HSQC-TOCSY und HMBC) entnommen.

Mit Hilfe des HMBC-Experimentes wurden anhand der C5/H1-Korrelation (Abb. 3.35 B) die Pyranoseform der Xylose und durch eine erkennbare Kopplung zwischen C4 und H1 (nicht abgebildet) die Furanoseform der Arabinose identifiziert. Für die Xylosen wurden Kopplungskonstanten $^{3}J_{1,2}$ von 7.4 bis 7.6 Hz bestimmt (Tabelle 3.13), die nach der Anwendung der Karplus-Beziehung (Karplus, 1959, 1963) auf die β-Konfiguration der Xylopyranosen hinweisen.

Aufgrund der Korrelationspeaks im HMBC-Spektrum (Abb. 3.35 A) konnten Esterbindungen zwischen den Arabinose-Einheiten (jeweils in *O*-5-Position) und der 8-*O*-4-DFS ermittelt werden. Außerdem wurden (1→2)-Bindungen zwischen den Xylosen und den Arabinosen nachgewiesen (Abb. 3.35 B und C).

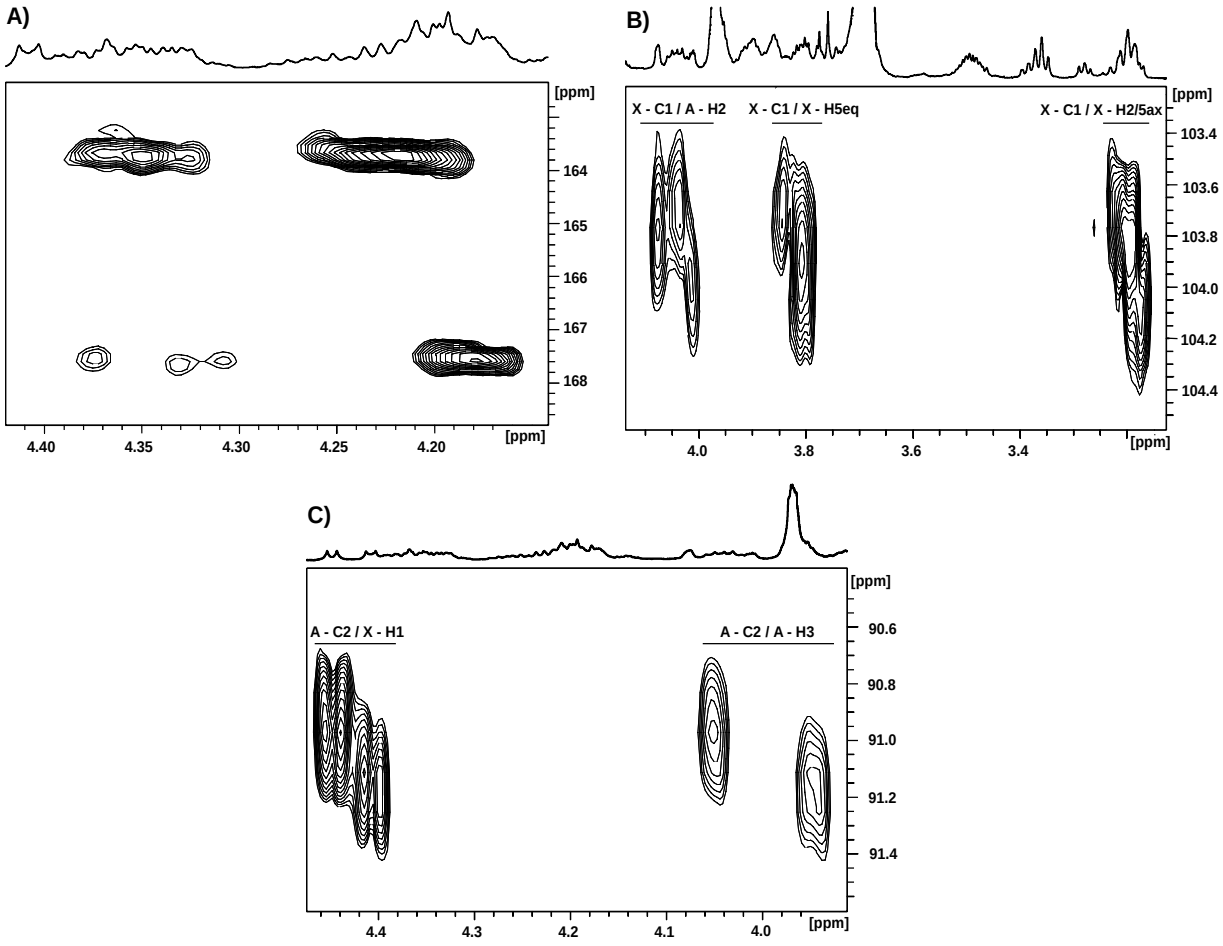


Abb. 3.35: ***Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum einer Mischung aus den Verbindungen F3a-Bio und F3b-Bio. A) Korrelationen zwischen den C9-Kohlenstoffen der 8-O-4-Dehydrodiferulasäure-Einheit und den H5-Protonen der Arabinose-Einheiten. B) und C) Xylose C1/Arabinose H2- und Arabinose C2/Xylose H1-Korrelationen als Beweis einer Xylose-(1→2)-Arabinose-Bindung und Xylose C1/Xylose H5-Kopplung als Hinweis auf die Pyranoseform der Xylose.*** *A: Arabinose, X: Xylose, ax: axial, eq: äquatorial*

Nach der vollständigen Interpretation aller Analysenergebnisse wurden in der isolierten Fraktion zwei Komponenten F**3a**-Bio und F**3b**-Bio nachgewiesen. Die beiden Verbindungen bestehen aus einem 8-*O*-4-Dehydrodiferulat, einer in *O*-5-Position gebundenen Arabinofuranose und einer in *O*-5-Position (Arabinose) gebundenen β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-L-arabinofuranose-Einheit (Abb. 3.33). Die Isolierung von F**3a**-Bio und F**3b**-Bio zeigt, dass auch Seitenketten, die komplexer als monomere Arabinose aufgebaut sind, an der Vernetzung der Arabinoxylane über 8-*O*-4-DFS-Crosslinks beteiligt sind. Eine zusätzliche Xylose-Einheit stellt offensichtlich keine sterische Hinderung für die Kopplung der Ferulat-Radikale über eine 8-*O*-4-Bindung dar. Dieses wurde zuvor für die radikalische Bildung von 5-5-Dehydrodiferulat durch die Isolierung und Identifizierung einer den F**3a**-Bio- und F**3b**-Bio-Verbindungen ähnlichen Substanz, jedoch mit 5-5-Dehydrodiferulat als phenolische Komponente, gezeigt (Saulnier et al., 1999).

3.3 Rückschlüsse aus den identifizierten Verbindungen auf die Struktur und Abbaubarkeit der Heteroxylane aus Maiskleie

Dass die unlöslichen Ballaststoffe aus Maiskleie resistenter gegenüber dem enzymatischen Abbau sind als die Ballaststoffe aus anderen Getreidearten, ist bereits bekannt (Faulds et al., 1995). In eigenen Untersuchungen zeigte die Behandlung von unlöslichen Maisballaststoffen mit Driselase (ein aus *Basidiomyceten* isoliertes Enzymgemisch aus unterschiedlichen Endo- und Exocarbohydrolasen, jedoch ohne Esterase-Aktivität), dass nur ca. 18 % der Ballaststoffe abgebaut wurden. Im Gegensatz dazu wurden die unlöslichen Ballaststoffe aus Roggen mit Driselase zu ca. 49 % hydrolysiert. Die Ballaststoffe der beiden Getreidearten bestehen aus linearen (1→4)-β-D-Xylanketten, die mit (1→2)- und/oder (1→3)-gebundener Arabinose substituiert sind. Die Isolierung der [5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranosyl]-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose aus Maiskleie (Ishii, 1997, McCallum et al., 1991), Maisschössling (Kato und Nevins, 1985) und Roggen (Bunzel et al., 2002b) deutet darauf hin, dass sowohl in Roggen- als auch in Maisballaststoffen die (1→3)-Monosubstitution am häufigsten auftritt. Von ihrer Grundstruktur (Hauptkette) sind die Ballaststoffe der beiden Getreidearten ähnlich aufgebaut. Trotzdem zeigen sie unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der enzymatischen Abbaubarkeit durch Driselase. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten und identifizierten Seitenketten der Heteroxylane von Maiskleie können einen Ansatz für die Erklärung über ihre schlechte enzymatische Abbaubarkeit liefern. Aus keinem anderen pflanzlichen Material wurden bisher derart komplexe mit Ferulasäure assoziierte Seitenketten wie FAXGG und FAXGX nachgewiesen. FAXGG beinhaltet aneinander gebundene L- und D-Galactosen. Die Verknüpfung von gleichen Monosaccharid-Bausteinen, die sich nur in ihrer absoluten Konfiguration unterscheiden, wurde bisher nur in wenigen Pflanzen nachgewiesen. Strukturell interessant ist auch die isolierte Verbindung FAXGX, da die terminale Xylose nicht die in Heteroxylanen aus Getreide dominierende β-Konfiguration aufweist, sondern in der α-Form vorliegt. Die Identifizierung von pCA gab definitive Hinweise, dass die Heteroxylane aus Maiskleie nicht nur mit *trans*-Ferulasäure assoziiert

vorliegen, sondern dass auch andere phenolische Komponenten an ihrem Aufbau beteiligt sind.

Der relativ hohe Anteil an di- und höheroligomeren Seitenketten sowie ihre komplexe Natur können aufgrund sterischer Hinderung den Angriff von Enzymen an den Xylanhauptstrang unterbinden, was eine schlechte Abbaubarkeit zur Folge hat. So wurde nach saurer Hydrolyse der besser enzymatisch abbaubaren Arabinoxylane aus Roggen unter vergleichbaren Bedingungen nur FA als die einzige mit *trans*-Ferulasäure assoziierte Seitenkette identifiziert (Bunzel et al., 2002b).

Ein weiterer möglicher Grund für die Resistenz der Maiskleie gegenüber dem enzymatischen Abbau ist ein hoher Gehalt an *trans*-Ferulasäure (24.8 mg/g unlösliche Ballaststoffe im Vergleich zu 6.3 mg/g in Roggen). Durch ihre Fähigkeit, Di- und Oligomere auszubilden, spielt die Ferulasäure eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von Crosslinks in pflanzlichen Zellwänden (Fry, 1986, Hatfield et al., 1999, Ishii, 1997, Ralph et al., 2004a, Ralph et al., 1998). Die intra- und intermolekulare Vernetzung von Heteroxylanen der Maisballaststoffe kann dazu führen, dass durch sterische Hinderung und möglicherweise entstehende hydrophobe Bereiche die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Maisballaststoffe herabgesetzt wird. Eine Reduktion des Abbaus von Polysacchariden aus Maiszellwänden in Abhängigkeit von ihrem Substitutionsgrad mit Ferulasäure-Dimeren wurde bereits beschrieben (Grabber et al., 1998). In diesen Versuchen wurden zur Hydrolyse der Maiszellwände jedoch nur Carbohydrolasen eingesetzt. Neuere Versuche, in denen Maiszellwände mit unterschiedlichen Gehalten an Ferulasäure-Dimeren mittels humanen Fäzesproben abgebaut wurden, zeigten, dass moderate DFS-Gehalte keinen Einfluss auf die Abbaubarkeit der Maiszellwände haben (Funk et al., 2007). Unterschiedliche Ergebnisse zwischen den beiden Versuchsansätzen können dadurch erklärt werden, dass menschliche Fäzesproben Esterasen aufweisen können, die in der Lage sind, Ferulasäure- und eventuell DFS-Ester zu spalten und somit sterische Restriktionen aufzuheben. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass in Mais(kleie)ballaststoffen deutlich höhere Gehalte (ca. 13 mg/g) (Bunzel, 2001) an DFS enthalten sind als in dem von Funk et al. (2007) gewählten Modell (2.6 mg/g).

Durch Isolierung von zwei 5-5-DFS-Oligosacchariden (Ishii, 1991, Saulnier et al., 1999) wurden erste Beweise für die Bindung von DFS an Saccharid-Einheiten erbracht. Die bereits häufig erwähnten „Molecular Modelling"-Experimente von Hatfield und Ralph (1999) offenbarten, dass durch die Isolierung von 5-5-DFS-Sacchariden nicht zugleich der Beweis erbracht wurde, dass DFS als intermolekulare Crosslinks für Polysaccharide dienen (siehe Kapitel 1.3.3). Durch Isolierung der 8-*O*-4-DFS- und 8-8 (Aryltetralin)-DFS-Saccharide wurde bewiesen, dass auch andere als 5-5-gekoppelte DFS am Crosslink-Prozess der Maisheteroxylane beteiligt sind. In Abbildung 3.6 ist ein Ausschnitt aus einer Heteroxylankette der Maiskleie mit den bereits identifizierten Verbindungen schematisch dargestellt.

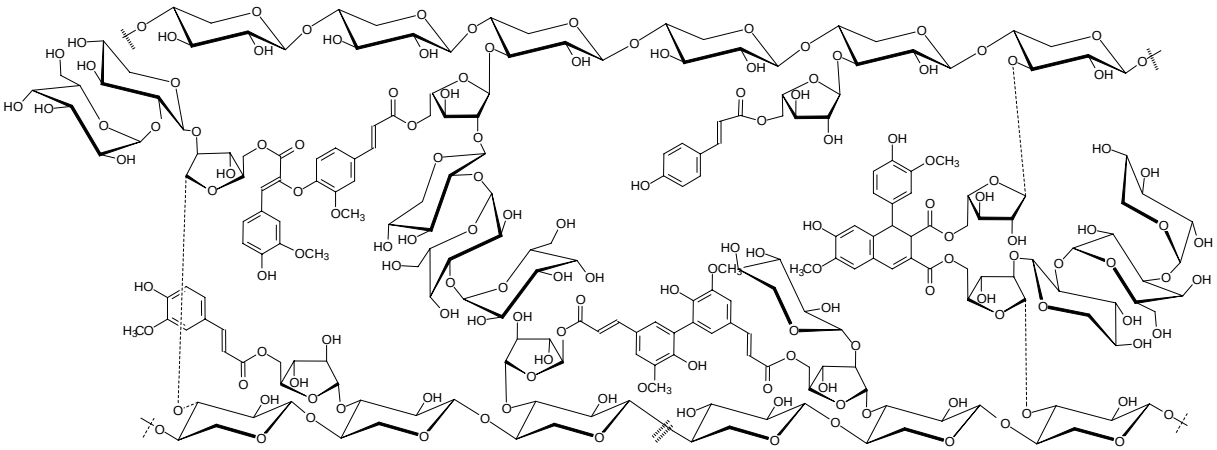


Abb. 3.36: Schematische Darstellung eines Ausschnittes von Heteroxylanen aus den unlöslichen Ballaststoffen der Maiskleie

Die Rolle von Ferulasäure bzw. DFS als wichtige Komponenten der Getreideballaststoffe steht aufgrund der eindeutig belegten Crosslink-Funktion außer Frage. Die ihnen zugesprochene Bedeutung bei der Kontrolle der Zellwandausdehnung und ihr Einfluss auf die enzymatische Hydrolysierbarkeit muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden, da die Ergebnisse derzeit noch teilweise widersprüchlich sind.

3.4 *In vitro* Fermentation von 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose und β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose mit einzelnen Bakterienstämmen

Mit den aus der Maiskleie isolierten Verbindungen FA (Abb. 3.15 in Kapitel 3.1.4) und FAX (Abb. 3.14 in Kapitel 3.1.3) wurden im Rahmen dieser Arbeit mikrobiologische *in vitro* Untersuchungen mit ausgewählten Bakterienstämmen durchgeführt. Um optimale Fermentationsprozesse und ein uneingeschränktes Wachstum der Bakterien zu gewährleisten, mussten analog zu den Verhältnissen im menschlichen Dickdarm auch im *in vitro* System anaerobe Bedingungen herrschen. Die Kontrolle der anaeroben Bedingungen erfolgte über den Redoxindikator Resazurin. Bei allen durchgeführten Untersuchungen wurden anaerobe Bedingungen eingehalten.

Unmittelbar nach der 48-stündigen Fermentation wurde die Keimzahlbestimmung durchgeführt (Tabellen 5.1 und 5.2 in Kapitel 5.3). In allen Testansätzen, in denen die Suspension mit lebenden Mikroorganismen versetzt wurde, wurde ein gutes Bakterienwachstum beobachtet. Die Thioglycolat-Bouillon kann daher als geeignetes Medium zur Durchführung von *in vitro* Untersuchungen betrachtet werden. Die zur Gattung *Bacteroides* gehörigen Stämme *B. ovatus* und *B. thetaiotaomicron* wiesen in einer zuckerfreien Bouillon (ohne zusätzliche Kohlenhydratquelle) ein vergleichbares Wachstum auf (Wachstum von 2-3 Zehnerpotenzen) wie in den Fermentationsansätzen, denen Glucose, Arabinose bzw. Arabinose/Xylose zugesetzt wurde. Diese Tatsache kann durch die Fähigkeit von beiden Bakterienstämmen, Pepton abzubauen, erklärt werden. *B. adolescentis* und *B. longum* (zwei saccharolytische Stämme der Gattung *Bifidobacterium*) sowie *B. vulgatus*

(gehört zur Gattung *Bacteroides*) zeigten in den Ansätzen mit zusätzlicher Kohlenhydratquelle ein um mindestens eine Zehnerpotenz stärkeres Wachstum (Wachstum von insgesamt 2-3 Zehnerpotenzen beobachtet) als in einer zuckerfreien Thioglycolat-Bouillon (Wachstum um eine Zehnerpotenz). In den mit autoklavierten Mikroorganismen versetzten Medien, die zur Kontrolle der sterilen Bedingungen in die Untersuchung miteingeschlossen wurden, wurde keine mikrobielle Kontamination festgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. überprüft werden, ob Ferulasäure eine wachstumshemmende Wirkung bei ausgewählten Bakterienstämmen aufweist. Dieser Effekt wurde z. B. bei *in vitro* Untersuchungen beobachtet, in denen der Einfluss von Ferulasäure bzw. *p*-Cumarsäure auf das Wachstum von Pansenmikroorganismen untersucht wurde (Borneman et al., 1986). Bei keinem der untersuchten Bakterien wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Einschränkung des Wachstums in Anwesenheit von freier *trans*-Ferulasäure (0,015 %-ig) festgestellt. Ein vermuteter toxischer Einfluss von freier Ferulasäure konnte somit in den eingesetzten Ferulasäure-Konzentrationen auf die hier untersuchten Bakterien nicht bestätigt werden (Tabellen 5.1 und 5.2 in Kapitel 5.3).

Die nach der Fermentation von FA bzw. FAX (einschließlich aller Vergleichslösungen) gemessenen pH-Werte sind in den Tabellen 3.15 (FA) und 3.16 (FAX) dargestellt.

Tabelle 3.15: ***pH-Werte des Mediums vor und nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und den eingesetzten Vergleichslösungen durch ausgewählte Bakterienstämme.*** *MO: Mikroorganismensuspension, Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Ansätze*	*B. adolescentis*	*B. longum*	*B. ovatus*	*B. vulgatus*	*B. thetaiotaomicron*
FA+MO	6.47 ± 0.02	6.34 ± 0.08	6.17 ± 0.05	6.40 ± 0.05	6.49 ± 0.03
Ara+MO	6.20 ± 0.02	6.17 ± 0.07	6.10 ± 0.04	6.29 ± 0.03	6.40 ± 0.04
F+Ara+MO	6.45 ± 0.04	6.23 ± 0.03	6.25 ± 0.03	6.25 ± 0.03	6.55 ± 0.04
FA+autokl. MO	6.49 ± 0.02	6.43 ± 0.03	6.51 ± 0.04	6.54 ± 0.05	6.63 ± 0.06
H_2O+MO	6.46 ± 0.02	6.36 ± 0.02	6.36 ± 0.04	6.41 ± 0.02	6.48 ± 0.03
Glc+MO	6.18 ± 0.03	6.10 ± 0.03	6.08 ± 0.03	6.20 ± 0.05	6.40 ± 0.02
FA+Glc+MO	6.19 ± 0.03	6.27 ± 0.02	6.09 ± 0.03	6.22 ± 0.04	6.39 ± 0.02
Glc+autokl. MO	6.50 ± 0.02	6.47 ± 0.05	6.51 ± 0.06	6.55 ± 0.05	6.53 ± 0.02
Alle Ansätze vor der Fermentation[#]	7.02	6.92	6.97	6.98	6.92
Ansatz mit F+Ara+MO vor der Fermentation[#]	7.30	7.21	7.02	7.04	6.98

* Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.1.5.2 und 5.1.5.3 dargestellt

[#] Alle Ansätze (bis auf F+Ara+MO) wiesen vor der Fermentation einen analogen pH-Wert auf. Die pH-Werte der Ansätze mit F+Ara+MO vor der Fermentation zeigten einen erhöhten pH-Wert aufgrund der leicht alkalischen Stammlösung von *trans*-Ferulasäure (siehe Kapitel 5.1.5.2).

Tabelle 3.16: ***pH-Werte des Mediums vor und nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) und den eingesetzten Vergleichslösungen durch ausgewählte Bakterienstämme.*** *MO: Mikroorganismensuspension, Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Ansätze*	***B. adolescentis***	***B. longum***	***B. ovatus***	***B. vulgatus***	***B. thetaiotaomicron***
FAX+MO	6.31 ± 0.03	6.37 ± 0.03	6.15 ± 0.05	6.44 ± 0.02	6.51 ± 0.03
Ara+Xyl+MO	6.04 ± 0.02	6.20 ± 0.06	6.09 ± 0.04	6.22 ± 0.05	6.35 ± 0.01
F+Ara+Xyl+MO	6.22 ± 0.04	6.33 ± 0.02	6.16 ± 0.01	6.25 ± 0.03	6.42 ± 0.03
FAX+autokl. MO	6.33 ± 0.01	6.43 ± 0.03	6.53 ± 0.04	6.56 ± 0.02	6.63 ± 0.01
H_2O+MO	6.30 ± 0.01	6.36 ± 0.02	6.30 ± 0.04	6.41 ± 0.02	6.53 ± 0.02
Glc+MO	6.02 ± 0.03	6.10 ± 0.03	6.11 ± 0.03	6.20 ± 0.05	6.41 ± 0.05
FAX+Glc+MO	6.09 ± 0.02	6.18 ± 0.04	6.20 ± 0.03	6.26 ± 0.02	6.41 ± 0.02
Glc+autokl. MO	6.30 ± 0.02	6.47 ± 0.05	6.47 ± 0.07	6.55 ± 0.05	6.57 ± 0.05
Alle Ansätze vor der Fermentation[#]	6.90	6.92	6.90	6.98	6.90
Ansatz mit F+Ara+Xyl+MO vor der Fermentation[#]	7.08	7.21	6.96	7.04	6.98

* Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.1.5.2 und 5.1.5.3 dargestellt

[#] Alle Ansätze (bis auf F+Ara+Xyl+MO) wiesen vor der Fermentation einen analogen pH-Wert auf. Die pH-Werte der Ansätze mit F+Ara+Xyl+MO (vor der Fermentation) zeigten einen geringfügig erhöhten pH-Wert aufgrund der leicht alkalischen Stammlösung von *trans*-Ferulasäure (siehe Kapitel 5.1.5.2).

Eine deutliche Absenkung des pH-Wertes wurde nach der Fermentation von FA mit *B. ovatus* beobachtet. Der pH-Wert des Mediums mit FA als Substrat betrug nach 48-stündiger Inkubation 6.17, während in den Kontrollproben (H_2O anstatt des Substrates) ein durchschnittlicher pH-Wert von 6.36 gemessen wurde. Bei den Untersuchungen mit allen anderen Mikroorganismen wurden bei den Ansätzen mit FA zu den Blindwerten vergleichbare pH-Werte ermittelt. Die Fermentation von FAX hatte weder bei *B. adolescentis*, noch bei *B. longum*, *B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron* einen Effekt auf die gemessenen pH-Werte. Im Gegensatz dazu wurde bei der Fermentation mit *B. ovatus* eine pH-Wert-Änderung (6.15 bei den Ansätzen mit FAX und 6.30 in den Blindproben) festgestellt.

In den Medien, die Arabinose, Arabinose und Xylose, Glucose, FA und Glucose oder FAX und Glucose (Tabellen 3.15 und 3.16) als Kohlenhydratquelle enthielten, sanken die pH-Werte nach der Fermentation mit Mikroorganismen deutlich im Vergleich zu den Kontrollproben (ohne Substratzufuhr). Die Absenkung des pH-Wertes, die durch Bildung von SCFA und organischen Säuren verursacht wurde, gab erste Hinweise, dass die zugesetzten Kohlenhydrate vollständig oder teilweise fermentiert wurden. Die Untersuchung der Fermentationsansätze auf freie Monosaccharide nach Reduktion und Derivatisierung zu den

Alditolacetaten mittels GC-FID bestätigte diese Vermutung. In keinem mit lebenden Mikroorganismen versetzten Medium wurden nicht abgebaute, freie Monosaccharide nachgewiesen.

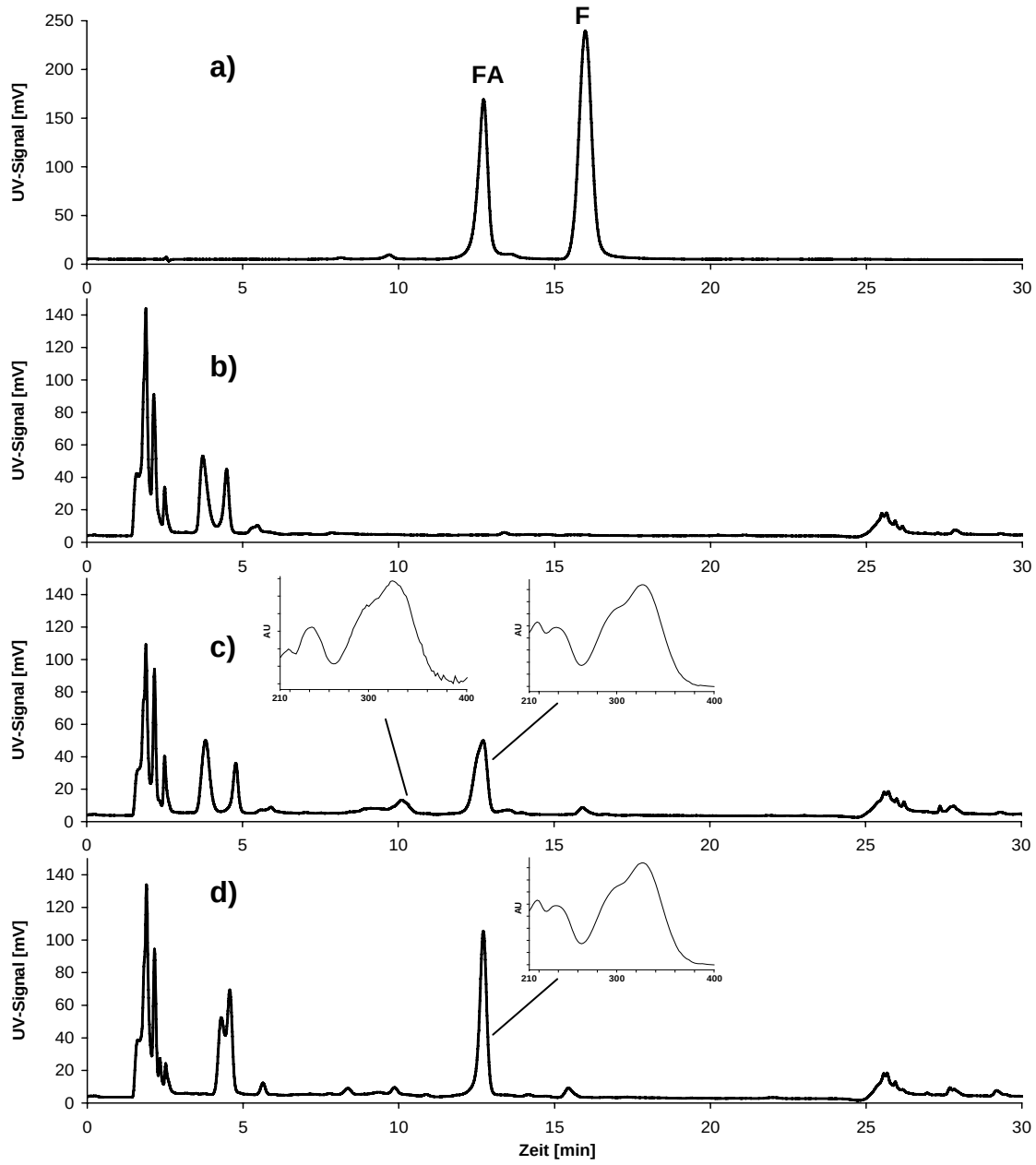


Abb. 3.37: ***RP-HPLC-DAD-Chromatogramme (Wellenlänge 280 nm) und ausgewählte UV-Spektren. a) Standard-Chromatogramm von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und trans-Ferulasäure. b) Thioglycolat-Bouillon nach der Fermentation mit B. ovatus. c) FA in Thioglycolat-Bouillon nach der Fermentation mit B. ovatus. d) FA in Thioglycolat-Bouillon nach der Inkubation mit autoklaviertem B. ovatus als Blindwert.*** *Chromatographie-Bedingungen sind in Kapitel 5.2.2.5 beschrieben. F: trans-Ferulasäure*

Die Bestimmung der Gehalte an nicht umgesetztem Substrat (FA, FAX und Ferulasäure) erfolgte mittels HPLC-DAD. In Abb. 3.37 a ist ein Standard-Chromatogramm von FA neben *trans*-Ferulasäure, das mit einem zuvor entwickelten HPLC-Gradienten-Programm aufgenommen wurde, abgebildet. In Abb. 5.3 in Kapitel 5.3 ist ein Standard-Chromatogramm zur Trennung von FAX neben *trans*-Ferulasäure dargestellt. Die Bestimmung der Gehalte an den während der Inkubation gebildeten SCFA erfolgte mittels HPLC-UV (Detektion bei 210 nm) nach der Vakuumdestillation. Das zugehörige Standard-Chromatogramm ist in Abb. 3.38 zu sehen.

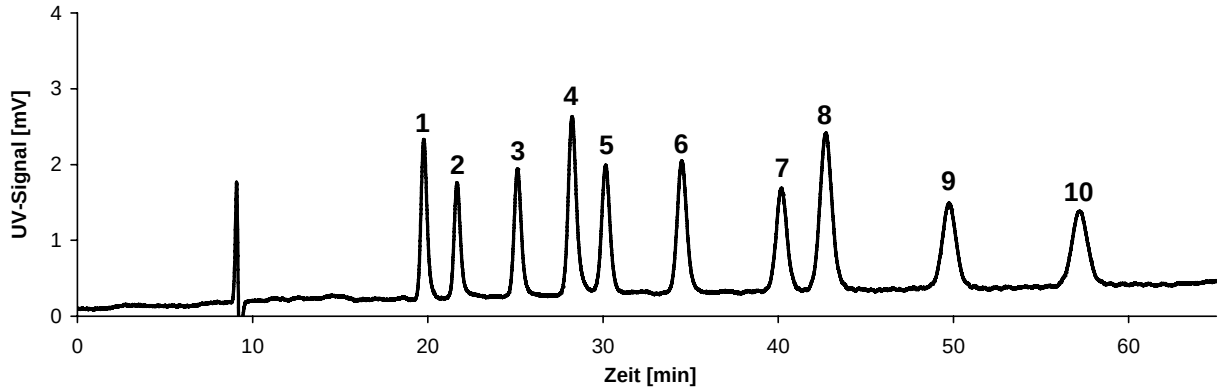


Abb. 3.38: HPLC-UV-Chromatogramm eines Standardgemisches von kurzkettigen Fettsäuren. 1: Ameisensäure, 2: Essigsäure, 3: Propionsäure, 4: Isobuttersäure, 5: Buttersäure, 6: Isovaleriansäure, 7: Valeriansäure, 8: 2-Ethylbuttersäure (interner Standard), 9: Isohexansäure, 10: Hexansäure. *Chromatographie-Bedingungen sind in Kapitel 5.2.2.6 beschrieben.*

In Abb. 3.39 ist ein Säulendiagramm mit den analysierten Gehalten an FA und in Abb. 3.40 mit den Gehalten an FAX nach der Fermentation mit lebenden Mikroorganismen (blau: FA und lebende Mikroorganismen bzw. FAX und lebende Mikroorganismen) und nach der Inkubation mit autoklavierten Bakterien (Kontrolle) (rot: FA und autoklavierte Mikroorganismen bzw. FAX und autoklavierte Mikroorganismen) dargestellt. Die drei ausgewählten *Bacteroides*-Stämme waren in der Lage, FA und FAX teilweise abzubauen. Die Abnahme an FA bzw. FAX war signifikant ($p < 0.05$). Die beiden Vertreter der Gattung *Bifidobacterium B. adolescentis* und *B. longum* besaßen nicht die Fähigkeit, unter den gewählten Bedingungen FA und FAX zu verstoffwechseln (kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) im Vergleich zu den Kontrollwerten).

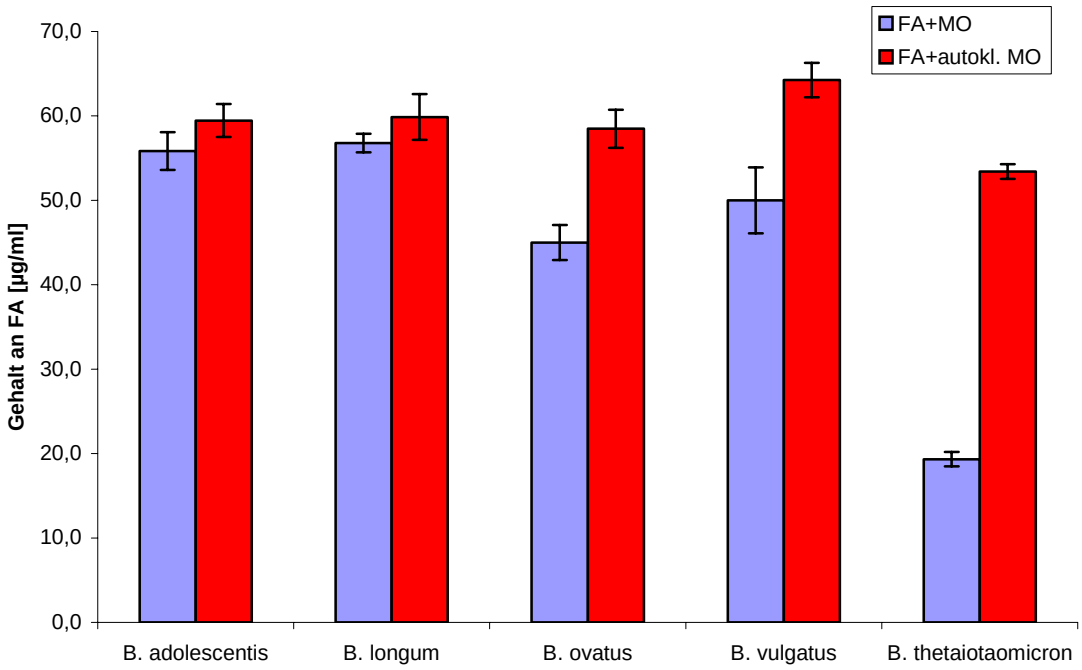


Abb. 3.39: ***Gehalte an 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) nach der Inkubation mit Mikroorganismen in einer Thioglycolat-Bouillon (blau: vitale Bakterien, rot: autoklavierte Mikroorganismen).*** *MO: Mikroorganismensuspension*

Durch *B. ovatus* wurden im Durchschnitt 23 % FA fermentiert. Die zugehörigen RP-HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 3.37 b bis d dargestellt. Nach der Inkubation von FA mit *B. ovatus* wurde ein leicht verbreiteter Peak bei ca. 13 min detektiert, der das UV-Spektrum von *trans*-Ferulasäure und die Molekülmasse von 326 g/mol (*m/z* 349 für Na-Addukt und 365 für K-Addukt) aufwies, was auf die nicht abgebaute FA hindeutet (Chromatogramm in Abb. 3.37 c). Ein Abbauprodukt wurde bei der Retentionszeit von ca. 10 min sowohl bei 280 nm (Abb. 3.37 c) als auch bei 325 nm (nicht abgebildet) mit einem Absorptionsmaximum bei 325 nm detektiert. Das von der Substanz aufgenommene Spektrum weist eine große Ähnlichkeit mit dem Spektrum von *trans*-Ferulasäure auf, unterscheidet sich jedoch im Bereich zwischen 200-260 nm. Es konnte kein geeignetes Massenspektrum von dem gebildeten Produkt aufgenommen werden, so dass keine weiteren Strukturvorschläge gemacht werden können. Bei den mit Retentionszeiten zwischen 1 und 5 min detektierten Komponenten handelt es sich um aus der Thioglycolat-Bouillon stammende phenolische Verbindungen, die teilweise nach der Fermentation mit *B. ovatus* entstanden sind (vgl. Chromatogramme in Abb. 3.37 b und c). Es wurde keine freie Ferulasäure als Abbauprodukt detektiert.

Der Abbau von FA durch *B. ovatus* wurde durch den Zusatz von Glucose als weitere Kohlenstoffquelle (zur Anregung des Bakteriumwachstums) signifikant ($p < 0.05$) erhöht. In Abb. 5.4 (Kapitel 5.3) ist ein Säulendiagramm mit den Gehalten an FA nach der Fermentation mit und ohne Glucose-Zusatz dargestellt. In Gegenwart von Glucose wurden durch *B. ovatus* 32 % FA verstoffwechselt.

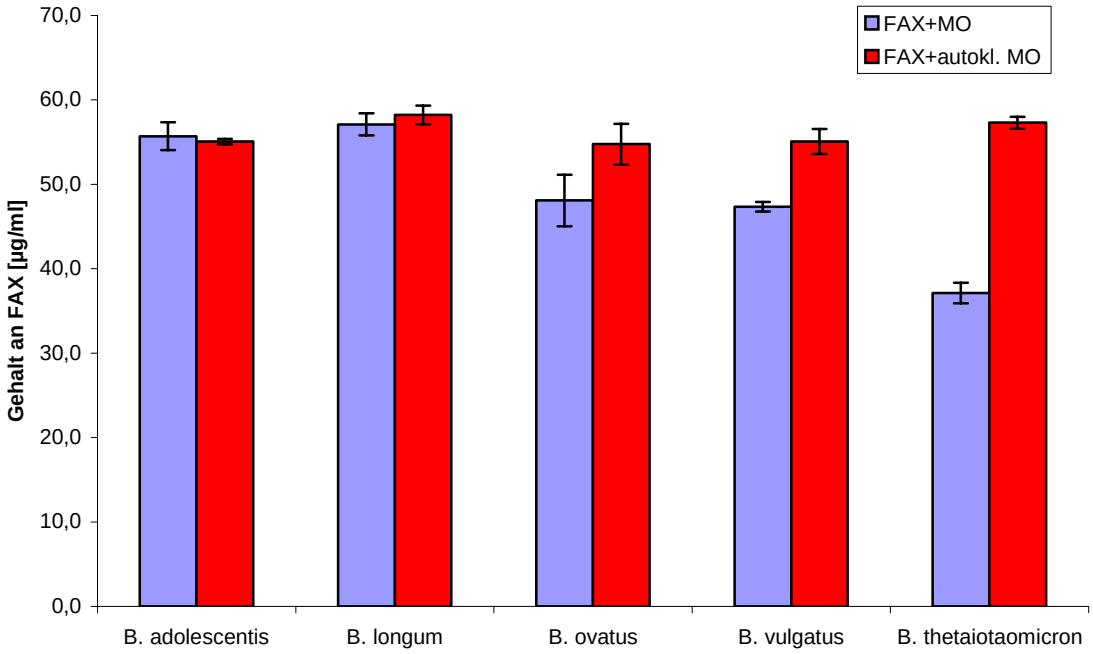


Abb. 3.40: ***Gehalte an β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) nach der Inkubation mit Mikroorganismen in einer Thioglycolat-Bouillon (blau: vitale Bakterien, rot: autoklavierte Mikroorganismen).*** *MO: Mikroorganismensuspension*

Die SCFA stellen die wichtigsten Endprodukte des Kohlenhydrat-Abbaus der meisten Bakterien dar; Milchsäure tritt ebenso wie Bernsteinsäure häufig als Intermediat im Kohlenhydrat-Stoffwechsel auf. Zur Überprüfung, welche Stoffwechselprodukte aus FA bei der Fermentation mit *B. ovatus* entstehen, wurden die Gehalte an Milch-, Bernsteinsäure und den einzelnen SCFA bestimmt. In Tabelle 5.3 in Kapitel 5.3 sind die Gehalte an allen nachgewiesenen SCFA sowie Milch- und Bernsteinsäure nach der Fermentation von FA und den Vergleichslösungen mit *B. ovatus* zusammengefasst. In Abb. 3.41 sind die Säuregehalte der Fermentationsansätze mit FA und der Kontrollproben (ohne Substratzufuhr) als Balkendiagramm abgebildet. In den Proben mit FA als Substrat wurden tendenziell mehr Säuren gebildet als in den Proben ohne Substratzufuhr. Es wurde aber kein signifikanter Unterschied ($p > 0.05$) im Gesamtsäuregehalt festgestellt. Die Gegenüberstellung von jeder einzeln gebildeten Säure im Vergleich zu den Kontrollwerten ergab, dass bei den Proben mit FA signifikant mehr Bernsteinsäure gebildet wurde ($p < 0.05$) als in den Kontrollansätzen.

In allen Medien mit zugesetzten Monosacchariden (Arabinose oder Glucose) wurde eine signifikante Steigerung des Gesamtsäuregehaltes im Vergleich zu den Kontrollwerten beobachtet. Diese Resultate korrelieren gut mit den Ergebnissen der pH-Wert-Messung.

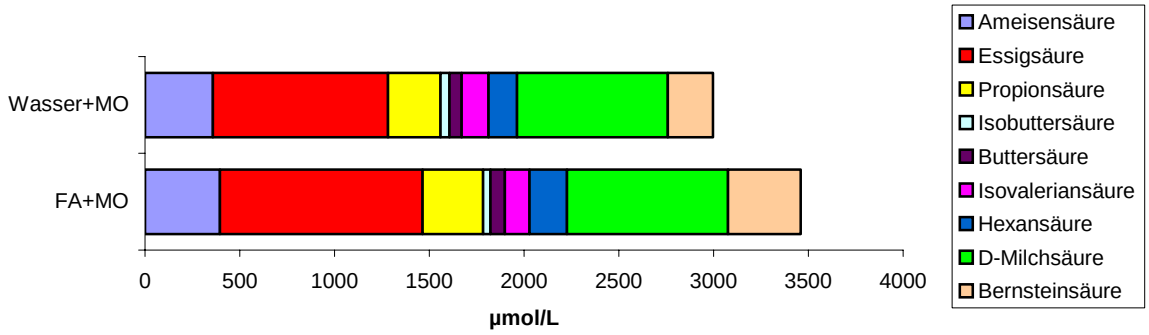


Abb. 3.41: ***Gehalte (in µmol/L) an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren, Milch- und Bernsteinsäure nach der Inkubation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) (unten) und von Kontrollansätzen (oben) mit B. ovatus.*** *MO: Mikroorganismensuspension*

FAX wurde zu einem geringeren Anteil durch *B. ovatus* abgebaut (im Durchschnitt 12 %) als FA (Abb. 3.40, Chromatogramme nicht abgebildet). In Gegenwart von Glucose wurde FAX nicht signifikant stärker abgebaut als ohne Glucose-Zusatz (Abb. 5.5 in Kapitel 5.3). Die Untersuchung der Medien nach Inkubation mit *B. ovatus* mittels HPLC-DAD ergab, dass neben FAX und aus der Bouillon stammenden Verbindungen keine weiteren bei 280 bzw. 325 nm detektierbaren Stoffe in den Fermentationsansätzen vorhanden waren. Es wurden weder FA noch freie Ferulasäure nach der Fermentation von FAX mit *B. ovatus* nachgewiesen.

Die nach der Fermentation von FAX mit *B. ovatus* entstandenen Säuren (SCFA und organische Säuren) und ihre Gehalte sind in Tabelle 5.8 in Kapitel 5.3 dargestellt. Die Säuregehalte nach der Inkubation von FAX mit *B. ovatus* sind in Abb. 3.42 den Gehalten nach der Inkubation der Kontrollansätze gegenübergestellt. Es wurden signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Gesamtsäuregehalt und im Ameisensäuregehalt zwischen den beiden Ansätzen festgestellt.

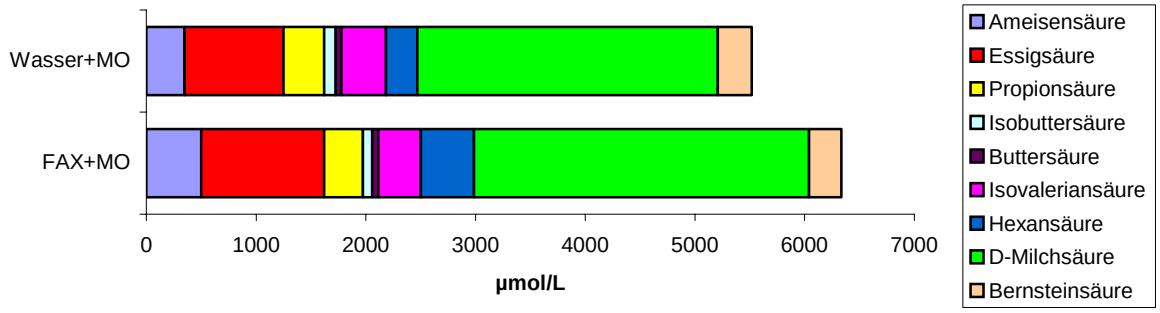


Abb. 3.42: ***Gehalte (in µmol/L) an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren, Milch- und Bernsteinsäure nach der Inkubation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) (unten) und von Kontrollansätzen (oben) mit B. ovatus.*** *MO: Mikroorganismensuspension*

Alle Proben, die Arabinose, Xylose und Glucose als Kohlenhydratquelle enthielten, wiesen eine signifikant größere Menge an Gesamtsäure ($p < 0.05$) als die Kontrollansätze auf (nicht abgebildet). Dies korreliert mit den Ergebnissen der pH-Wert-Messung.

Ein wichtiger Faktor für den Abbau von mit Ferulasäure vernetzten Arabinoxylanen ist die Anwesenheit der Feruloyl-Esterase. Die Esterase-Aktivität von Bakterien wurde in der Vergangenheit oft nicht beachtet, da die Arabinoxylane, die für mikrobiologische Untersuchungen eingesetzt wurden, häufig durch alkalische Extraktion isoliert wurden, was zur Abspaltung von Ferulasäure führte. In den wenigen Studien, in denen Augenmerk auf die Exterase-Aktivität gelegt wurde, wurde dennoch sowohl in der Darmflora von Ratten (Wende et al., 1997) als auch in der menschlichen Darmflora (Andreasen et al., 2001, Kroon et al., 1997b) Feruloyl-Esterase-Aktivität nachgewiesen. Es ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt, welche Darmbakterien in der Lage sind, Feruloyl-Esterasen zu produzieren. So wurden Feruloyl-Esterasen bisher nur aus wenigen Dickdarmbakterien, wie z. B. aus *Lactobacillus acidophilus,* charakterisiert (Wang et al., 2004). Die Ergebnisse der dargestellten Untersuchung von FA bzw. FAX als Substrat gaben keinen Hinweis darauf, dass *B. ovatus* in der Lage ist, extrazelluläre Feruloyl-Esterase zu produzieren, da keine freie Ferulasäure nach dem partiellen Abbau von FA bzw. FAX nachgewiesen wurde. Es wurde außerdem keine Inhibition des Abbaus von Arabinose und Xylose durch anwesende freie Ferulasäure beobachtet. Des Weiteren wurde freie Ferulasäure nicht metabolisiert (zu 100 % nach der Inkubation wiedergefunden), d. h. *B. ovatus* verfügt über keine extrazellulären Enzyme, die in der Lage sind, Ferulasäure abzubauen.

Um die Auswirkung der Ester- bzw. glykosidischen Bindung auf die Fermentierbarkeit durch *B. ovatus* zu überprüfen, wurden Ansätze von Ferulasäure und Arabinose (in äquivalenten Mengen zu FA) und von Ferulasäure, Arabinose und Xylose (in äquivalenten Mengen zu FAX) parallel untersucht. Die ungebundenen freien Kohlenhydrate (Arabinose bzw. Arabinose und Xylose) wurden im Gegensatz zu FA und FAX vollständig fermentiert. Dies weist auf eine eingeschränkte Verfügbarkeit von Arabinose und Xylose im gebundenen Zustand für mikrobielle Fermentationsprozesse hin. Die Tatsache, dass die beiden Verbindungen zum Teil abgebaut wurden, kann dadurch erklärt werden, dass *B. ovatus* in der Lage ist, FA und FAX aufzunehmen und intrazellulär zu verstoffwechseln. Für diese Annahme spricht, dass zwar eine Abnahme des Substrates zu verzeichnen war, im Medium jedoch keine phenolischen Verbindungen gefunden wurden (z. B. Ferulasäure), die darauf hinweisen, dass die Substrate vor der Aufnahme in die Bakterien durch extrazelluläre Enzyme gespalten wurden. Die Tatsache, dass in dem Inkubationsansatz von FAX auch keine FA gefunden wurde, lässt ebenfalls vermuten, dass extrazelluläre Xylosidasen nicht zunächst Xylose abspalten, sondern dass FAX als solches von dem Bakterium aufgenommen wird. Nimmt das Bakterium FA und FAX auf, so ist davon auszugehen, dass diese Substrate intrazellulär verstoffwechselt werden, d.h. dass die benötigten Enzyme von den Bakterien gebildet werden können, jedoch nicht als extrazelluläre Enzyme. Zum endgültigen Beweis dieser Annahme müsste zukünftig z. B. radioaktiv markiertes FA verwendet und überprüft

werden, ob die radioaktive Markierung in Polymeren der Bakterienzellen wiederzufinden ist, ein Ansatz, der z. B. von Wende et al. (1997) gewählt wurde.

Die Fähigkeit von *B. ovatus,* unterschiedliche Polysaccharide (u.a. auch Arabinoxylane) zu fermentieren, d. h. dass *B. ovatus* über extrazelluläre Xylanasen / Xylosidasen verfügt, wurde bereits in der Literatur häufig erwähnt (MacFarlane et al., 1990, Martin et al., 1998, Salyers et al., 1982, Salyers et al., 1981, Van Laere et al., 2000, Whitehead und Hespell, 1990). Zwei codierende Gene für die Enzyme Xylanase und bifunktionelle β-Xylopyranosidase / α-Arabinofuranosidase wurden für *B. ovatus* charakterisiert (Whitehead und Hespell, 1990). Eine hohe Xylanase-, Xylosidase- und Arabinosidase-Aktivität wurde u.a. beim Wachstum von *B. ovatus* auf einem Xylan (Weaver et al., 1992) und einem Heteroxylan (Reddy et al., 1984) beobachtet. Ein kompletter Abbau von Arabinoxylan-Polysacchariden aus Weizenmehl, Glucuronoarabinoxylan-Polysacchariden aus Hirse und Xylooligosacchariden wurde in *in vitro* Untersuchungen mit *B. ovatus* von Van Laere et al. (2000) nachgewiesen. Arabinoxylooligosaccharide wurden in der gleichen Untersuchung jedoch nur teilweise fermentiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass trotz der nachgewiesenen Glycosidasen *B. ovatus* keine oder nur geringe Xylopyranosidase-Aktivität besitzt, die zu einer raschen Abspaltung der in (1→2)-Stellung an die Arabinose gebundenen Xylose unter den gewählten *in vitro* Bedingungen führen würde. Es kann ferner nicht ausgeschlossen werden, dass *B. ovatus* Xylopyranosidase produziert, die in der Lage ist, eine (1→2)-Bindung zwischen Xylose und Arabinose zu spalten, die aber aufgrund der Bindung der Ferulasäure an die Arabinose die beiden Monosaccharide in (1→2)-Stellung nicht zu spalten vermag. So wurde berichtet, dass der Abbau von Ferulasäure-Oligosacchariden durch Carbohydrasen ohne vorherige Abspaltung von Ferulasäure nur schwer möglich ist, da die Ferulasäure-Oligosaccharide aufgrund des phenolischen Anteils weitgehend resistent gegenüber Carbohydrasen sind (Hespell und O'Bryan, 1992, Kroon et al., 1997b).

Die Untersuchungen mit *B. vulgatus* ergaben, dass im Durchschnitt 22 % FA (Abb. 3.39) abgebaut wurden. Die zugehörigen Chromatogramme sind in Abb. 3.43 dargestellt. Der Abbau von FA wurde durch die Anwesenheit von Glucose bei den Fermentationsversuchen nicht signifikant ($p > 0.05$) beeinflusst (Abb. 5.4 in Kapitel 5.3). Ähnlich wie bei *B. ovatus*, wurde nach der Fermentation mit *B. vulgatus* neben dem nicht abgebauten Substrat ein Abbauprodukt (bei ca. 9.5 min) mit dem Absorptionsmaximum bei 325 nm (Abb. 3.43 b) detektiert. Es konnte kein auswertbares Massenspektrum von dem gebildeten Produkt erhalten werden. Das dem Abbauprodukt zugehörige UV-Spektrum besitzt eine große Ähnlichkeit mit dem Spektrum von *cis*-Ferulasäure (vgl. Abb. 3.43 b und Abb. 5.2 in Kapitel 5.3). Das UV-Spektrum weist neben der Retentionszeit darauf hin, dass es sich bei dieser Verbindung nicht um das nach Fermentation mit *B. ovatus* erhaltene unbekannte Abbauprodukt (Abb. 3.37 c) handelt. Ähnlich wie bei *B. ovatus* wurde nach der Fermentation mit *B. vulgatus* keine freie Ferulasäure nachgewiesen.

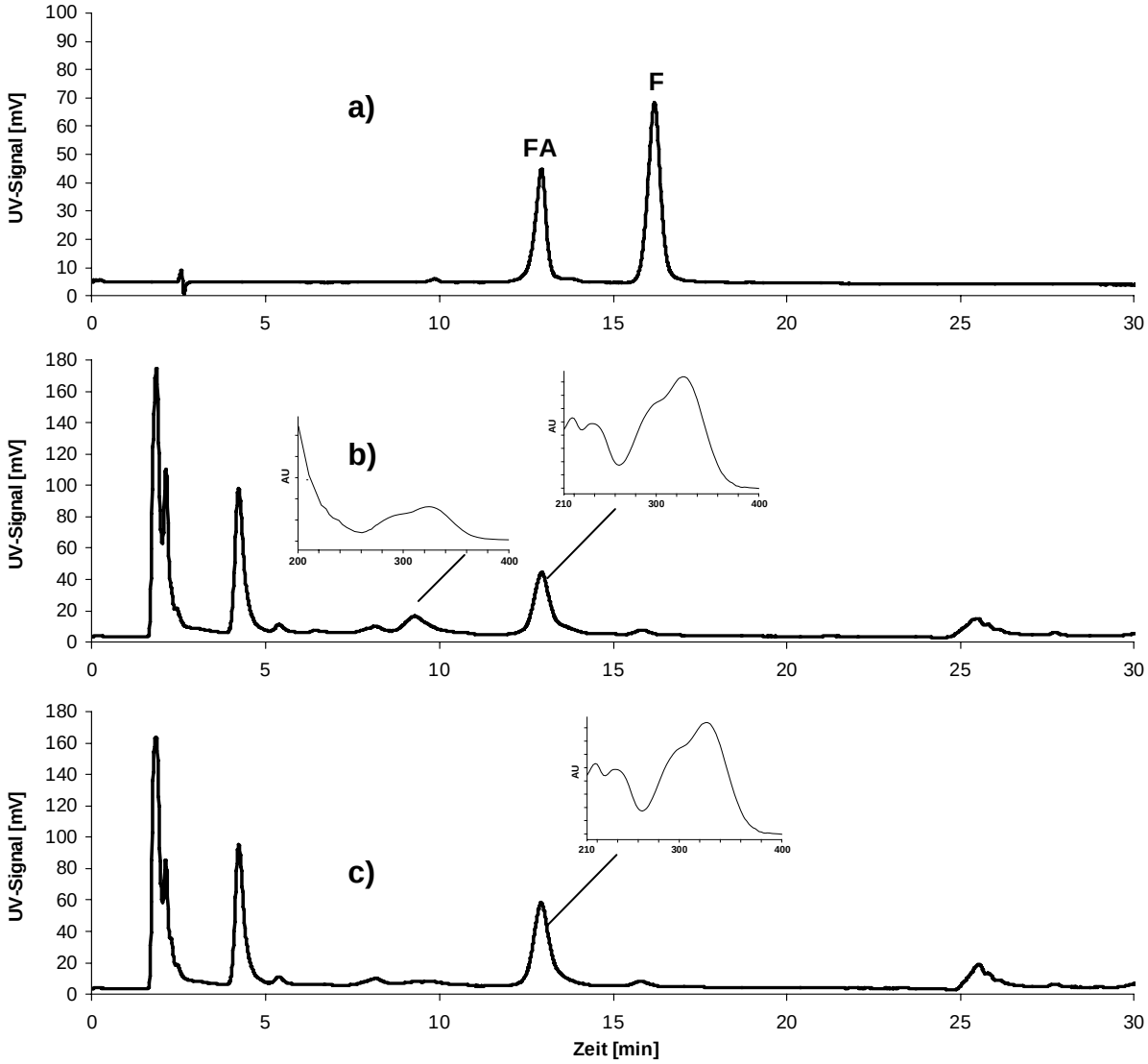


Abb. 3.43: ***RP-HPLC-DAD-Chromatogramme (Wellenlänge 280 nm) und ausgewählte UV-Spektren. a) Standard-Chromatogramm von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und trans-Ferulasäure. b) FA in Thioglycolat-Bouillon nach der Fermentation mit B. vulgatus. c) FA in Thioglycolat-Bouillon nach der Inkubation mit autoklaviertem B. vulgatus als Blindwert.*** *Chromatographie-Bedingungen sind in Kapitel 5.2.2.5 beschrieben. F: trans-Ferulasäure*

Die Abbaurate von FAX durch *B. vulgatus* betrug 14 % (Abb. 3.40, Chromatogramme nicht abgebildet) und wurde durch die Anwesenheit von Glucose in den Fermentationsversuchen nicht beeinflusst (Abb. 5.5 in Kapitel 5.3). Weder FA noch Ferulasäure konnten mittels HPLC-DAD-MS am Ende der Fermentation von FAX mit *B. vulgatus* nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der SCFA sowie der Milch- und Bernsteinsäure ergab keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) in den Gesamtsäuregehalten bei Gegenüberstellung der Fermentationsansätze von FA und Kontrollproben ohne Substratzufuhr (Tabelle 5.4 in Kapitel 5.3). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus pH-Wert-Messungen (Tabellen 3.15 und 3.16). Ähnlich wie bei *B. ovatus* wurde bei Inkubation von FA mit *B. vulgatus*

signifikant ($p < 0.05$) mehr Bernsteinsäure gebildet als in den Kontrollproben. Eine ähnliche Verteilung der Säuren wurde nach der Fermentation von FAX beobachtet (Tabelle 5.9 in Kapitel 5.3).

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von FA und FAX zeigen, dass *B. vulgatus* keine extrazelluläre Esterase produzieren kann, die die Esterbindung zwischen *trans*-Ferulasäure und der Arabinose spalten könnte. Vergleichbar zu *B. ovatus* besitzt *B. vulgatus* nicht die Fähigkeit, freie *trans*-Ferulasäure zu verstoffwechseln. Sollte eine extrazelluläre Esterase-Aktivität vorhanden sein, hätte man freigesetzte Ferulasäure nachweisen können. Ferner wurde der Abbau von Arabinose bzw. einer Mischung aus Arabinose und Xylose durch die Anwesenheit von freier *trans*-Ferulasäure nicht beeinträchtigt. Die Tatsache, dass FA in größeren Mengen abgebaut wurde als FAX (vorausgesetzt der gesamte Substratverlust ist mit einer vollständigen Metabolisierung gleichzusetzen), deutet darauf hin, dass FA effektiver von den Bakterien aufgenommen wird als FAX.

B. vulgatus ist eine der am meisten vorkommenden Spezies im menschlichen Dickdarm und macht circa 10 bis 12 % der Bakterienmasse aus (McCarthy et al., 1988). Im Vergleich zu den anderen *Bacteroides*-Spezies ist *B. vulgatus* relativ unwirksam beim Abbau von Zellwandpolysacchariden, ein Hinweis darauf, dass keine bzw. nur wenige extrazelluläre Glycosidasen gebildet werden. So zeigten Van Laere et al. (2000), dass *B. vulgatus* Arabinoxylooligosaccharide und Xylooligosaccharide komplett abbauen kann, während die Arabinoxylan-Polysaccharide aus Weizenmehl überhaupt nicht und Glucuronoarabinoxylan-Polysaccharide nur zum Teil verstoffwechselt wurden, ein Hinweis auf das Fehlen extrazellulärer Xylanasen / Xylosidasen. Amylose und Amylopektin sind zwei der wenigen Polysaccharide, auf denen ein gutes Wachstum von *B. vulgatus* beobachtet wurde (McCarthy et al., 1988). Aufgrund der Tatsache, dass *B. vulgatus* geringfügig an dem Abbau von FAX beteiligt ist, wird vermutet, dass dieses Bakterium intrazelluläre Xylopyranosidasen produzieren kann, die in der Lage sind, die (1→2)-Bindung zwischen Arabinose und Xylose zu spalten. Ebenso wird vermutet, dass *B. vulgatus* über eine intrazelluläre Feruloyl-Esterase verfügt, so dass potentiell aufgenommene FA und FAX tatsächlich verstoffwechselt werden können; die Metabolisierung der Kohlenhydratanteile ohne vorherige Abspaltung des phenolischen Restes erscheint nicht möglich.

Im Verlauf der Inkubation von FA mit *B. thetaiotaomicron* wurden im Durchschnitt 64 % FA (Abb. 3.39) abgebaut. Die zugehörigen Chromatogramme sind in Abb. 3.44 dargestellt. Nach 48-stündiger Fermentation wurden neben dem nicht abgebauten Substrat mehrere Abbauprodukte bei 325 bzw. 280 nm detektiert (Abb. 3.44 b), die in der mit autoklavierten Bakterien versetzten Bouillon (Abb. 3.44 c) nicht nachgewiesen wurden. Es konnten jedoch keine interpretierbaren Massenspektren der entstandenen Produkten erhalten werden. Die bei ca. 15.5 min eluierte Substanz besitzt die gleiche Retentionszeit wie *trans*-Ferulasäure. Zwar hat das UV-Spektrum dieser Verbindung eine große Ähnlichkeit mit dem Spektrum der *cis*-Ferulasäure (vgl. Abb. 3.44 b und Abb. 5.2 in Kapitel 5.3), es wurde jedoch durch Kalibrierungsversuche mit *trans*-Ferulasäure belegt, dass *trans*-Ferulasäure in geringen

Konzentration ein der *cis*-Ferulasäure zum Verwechseln ähnliches Spektrum aufweist. Auch andere Abbauprodukte deuteten auf von FA abgeleitete Strukturen hin. Die Abbaurate von FA wurde in den Nährmedien mit zugesetzter Glucose zusätzlich erhöht. In diesen Proben wurde signifikant ($p < 0.05$) mehr FA verstoffwechselt (73 %) als in den Ansätzen ohne Glucose (Abb. 5.4 in Kapitel 5.3).

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von Arabinose und *trans*-Ferulasäure in äquivalenten Mengen zu FA zeigen, dass *B. thetaiotaomicron* die Fähigkeit besitzt, *trans*-Ferulasäure zu metabolisieren. In Abb. 3.44 d ist ein RP-HPLC-Chromatogramm nach der Inkubation von Arabinose und *trans*-Ferulasäure mit *B. thetaiotaomicron* dargestellt. Nach 48-stündiger Fermentation wurde neben Arabinose auch die *trans*-Ferulasäure vollständig umgesetzt. Das Abbauprodukt eluierte erst im Spülschritt, was auf eine größere Hydrophobie der Substanz im Vergleich zur Ferulasäure hinweist. Das von diesem Produkt aufgenommene UV-Spektrum besitzt Absorptionsmaxima bei ca. 220, 260 und 300 nm. Die Abwesenheit des Absorptionsmaximums bei 325 nm deutet darauf hin, dass das entstandene Produkt einen aromatischen Ring, aber keine Acryl-Gruppe (CH_2=CH-COR) besitzt. Die Hydrierung der Propenylseitenkette von Ferulasäure durch Mikroorganismen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Chesson et al., 1999). Da aufgrund einer unzureichenden Ionisierbarkeit kein geeignetes Massenspektrum von der Substanz aufgenommen werden konnte, erfolgte keine eindeutige Identifizierung.

Es ist bereits bekannt, dass die meisten monomeren aromatischen Säuren durch im Pansen vorhandene Mikroorganismen aus dem Abwasserschlamm komplett in CO_2, CH_4, aliphatische Säuren und SCFA abgebaut werden können (Besle et al., 1995, Grbic-Galic, 1985, 1986, Grbic-Galic und Young, 1985). Dabei wurden u. a. folgende Reaktionen beschrieben: O-Demethoxylierung von Ferulasäure zu Kaffeesäure, Dehydroxylierung von Kaffeesäure zu Zimtsäure, Umwandlung von Zimtsäure durch Reduktion der Doppelbindung zu Phenylpropionsäure, weitere Reaktion zu Phenylessigsäure usw. (Grbic-Galic und Young, 1985). Es ist aber bisher unklar, ob der Abbau im menschlichen Dickdarm nach ähnlichen Schemata abläuft. Es wird nur vermutet, dass *trans*-Ferulasäure durch die Mikroflora des menschlichen Dickdarmes schnell in eine andere phenolische Form transformiert bzw. komplett abgebaut wird (Kroon et al., 1997b). Nach Untersuchungen in einem Modell-Dickdarm haben die Autoren festgestellt, dass mehr Ferulasäure durch mikrobielle Esterase abgespalten als im Medium nach der Abspaltung nachgewiesen wurde, was auf einen raschen Abbau hindeutet.

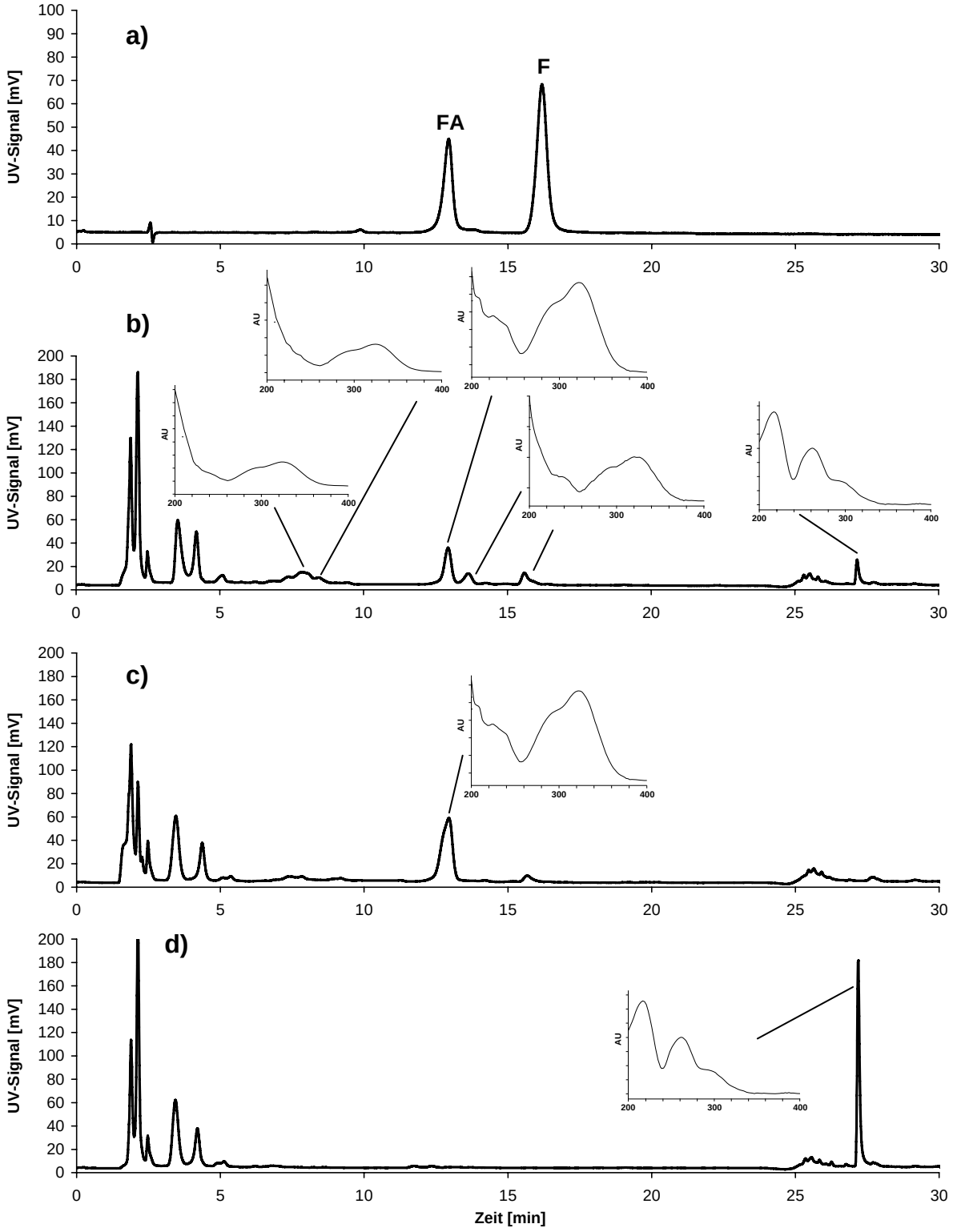


Abb. 3.44: ***RP-HPLC-DAD-Chromatogramme (Wellenlänge 280 nm) und ausgewählte UV-Spektren. a) Standard-Chromatogramm von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und trans-Ferulasäure. b) FA in Thioglycolat-Bouillon nach der Fermentation mit B. thetaiotaomicron. c) FA in Thioglycolat-Bouillon nach der Inkubation mit autoklaviertem B. thetaiotaomicron als Blindwert. d) trans-Ferulasäure und Arabinose in äquivalenten Mengen zu FA nach der Fermentation mit B. thetaiotaomicron.*** *Chromatographie-Bedingungen sind in Kapitel 5.2.2.5 beschrieben. F: trans-Ferulasäure*

Nach der Inkubation von FA mit *B. thetaiotaomicron* wurde neben *trans*-Ferulasäure eine weitere Substanz nachgewiesen, die wie das Abbauprodukt der *trans*-Ferulasäure erst im Spülschritt eluierte und die das gleiche UV-Spektrum aufwies (vgl. Abb. 3.44 b und d). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass *B. thetaiotaomicron* eine Esterase produzieren kann, die die Esterbindung zwischen der *trans*-Ferulasäure und der Arabinose in FA zu spalten vermag. Zwei Mechanismen des Abbaus von FA durch *B. thetaiotaomicron* sind denkbar: 1) das FA-Molekül wird zuerst durch Ferulasäure-Esterase in *trans*-Ferulasäure und Arabinose gespalten, wobei Arabinose vollständig fermentiert wird und *trans*-Ferulasäure in ein unbekanntes phenolisches Abbauprodukt transformiert wird; 2) das FA-Molekül wird durch *B. thetaiotaomicron* in mehrere andere Moleküle (Metabolisierung der phenolischen Einheit) umgeformt, ohne dass die Esterbindung gespalten wird. Für den 1. Mechanismus sprechen die Abbauprodukte, die später als FA bzw. im Spülschritt eluieren (z. B. *trans*-Ferulasäure und das Abbauprodukt im Spülschritt Abb.3.44 b). Auf den 2. Mechanismus deuten die Produkte mit den Retentionszeiten zwischen 7 und 9 min hin (Abb. 3.44 b). Produkte mit ähnlichen Retentionszeiten wurden nach der Inkubation mit *B. vulgatus* und *B. ovatus* detektiert, wo keine Esterase-Aktivität nachgewiesen wurde. Sicherlich ist es auch denkbar, dass beide Mechanismen nebeneinander ablaufen.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von FA im Vergleich zu der Untersuchung von äquivalenten Mengen an Ferulasäure und Arabinose zeigten, dass der Abbau von FA trotz der nachgewiesenen Esterase-Aktivität langsamer abläuft als der der ungebundenen Arabinose. Im gebundenen Zustand steht die Arabinose nur eingeschränkt dem Fermentationsprozess von *B. thetaiotaomicron* zur Verfügung.

Die nach der Inkubation von FA mit *B. thetaiotaomicron* entstandenen Säuren und ihre Gehalte sind in Tabelle 5.5 in Kapitel 5.3 dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) im Gehalt an der Gesamtsäure zwischen den Proben mit FA als Substrat und den Kontrollproben (ohne Substrat) festgestellt. Es wurde aber eine signifikant ($p < 0.05$) größere Menge an L-Milchsäure in den Ansätzen mit FA nachgewiesen.

Im Vergleich zu FA wurde FAX durch *B. thetaiotaomicron* zu einem geringeren Anteil abgebaut (35 %) (Abb. 3.40, Chromatogramme nicht abgebildet). In Gegenwart von Glucose wurden 42 % FAX metabolisiert, signifikant ($p < 0.05$) mehr als in den Ansätzen ohne zugesetzte Glucose (Abb. 5.5 in Kapitel 5.3). Die Untersuchung der Bouillon nach der Fermentation mit *B. thetaiotaomicron* mittels HPLC-DAD-MS ergab, dass neben FAX (siehe Standard-Chromatogramm in Abb. 5.3 in Kapitel 5.3) mehrere Abbauprodukte detektiert wurden. Die UV-Spektren und die Retentionszeiten der Abbauprodukte entsprachen weitgehend der Verteilung nach der Fermentation von FA. Nur das nach dem Abbau von FA im Spülschritt zu erkennende Produkt (Abb. 3.44 b) war nach der Fermentation von FAX nicht nachweisbar. Kein FA als Abbauprodukt war nach der Fermentation von FAX mit *B. thetaiotaomicron* detektierbar.

Die Abwesenheit des Abbauproduktes von *trans*-Ferulasäure, welches im Spülschritt eluiert (beobachtet nach der Fermentation von FA sowie *trans*-Ferulasäure mit Arabinose bzw. mit

Arabinose und Xylose), und die Tatsache, dass FA in größeren Mengen abgebaut wurde als FAX, deuten darauf hin, dass die Verstoffwechslung von FAX durch *B. thetaiotaomicron* langsamer abläuft als von FA. Ein möglicher Grund ist die glykosidische Bindung zwischen Xylose und Arabinose, die das Molekül gegenüber dem enzymatischen Angriff von Esterasen stabilisiert. Es wurde bereits berichtet, dass die Freisetzung der Ferulasäure aus Ferulasäure-Sacchariden von der Kohlenhydrat-Komponente abhängig ist (Faulds et al., 1995). So konnten die Autoren zeigen, dass mittels Feruloyl-Esterase aus *Aspergillus niger* die Ferulasäure aus der Seitenkette FAX deutlich langsamer freigesetzt wird als z. B. aus [5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranosyl]-(1→3)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose.

Die nach der Fermentation von FAX mit *B. thetaiotaomicron* nachgewiesenen Gehalte an Säuren sind in Tabelle 5.11 in Kapitel 5.3 dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) in den Gesamtsäuregehalten zwischen den Ansätzen mit FAX und ohne Substrat festgestellt.

Über die Eignung von *B. thetaiotaomicron*, unterschiedliche Poly- und Oligosaccharide, wie Pektine, Stärke, Arabinogalactane, Raffinose usw. abzubauen, wurde bereits berichtet (Dongowski et al., 2000, Salyers und Pajeau, 1989). Ein Wachstum von *B. thetaiotaomicron* wurde auch auf β-Glucanen, Arabinoxylanen und einer Mischung aus Xylooligosacchariden festgestellt (Crittenden et al., 2002). Van Laere et al. (2000) beobachteten dagegen bei ihren *in vitro* Untersuchungen keinen Abbau von Arabinoxylo- und Xylooligosacchariden. Augrund der erhöhten Mutationsfrequenz von *B. thetaiotaomicron* (Salyers und Pajeau, 1989), können die Ergebnisse der Untersuchungen voneinander abweichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *B. thetaiotaomicron* eine Esterase-Aktivität besitzt, die eine Esterbindung zwischen der Ferulasäure und der Arabinose zu spalten vermag. Da in der Nährbouillon nach Fermentation von FAX weder Arabinose noch FA als Abbauprodukte nachgewiesen wurden, deutet dies darauf hin, dass keine extrazelluläre Xylopyranosidase von *B. thetaiotaomicron* gebildet wird.

Nach der Inkubation von FA und FAX mit den *Bifidobacterium*-Stämmen *B. adolescentis* und *B. longum* wurde unter den gewählten *in vitro* Bedingungen weder FA (Abb. 3.39) noch FAX (Abb. 3.40) abgebaut. Auch in den Ansätzen, die neben FA bzw. FAX Glucose enthielten, fand kein Abbau der beiden Ferulasäure-Saccharide durch *B. longum* und *B. adolescentis* statt (Abb. 5.4 und 5.5 in Kapitel 5.3). Die Untersuchung der SCFA und der organischen Säuren ergab bei der Gegenüberstellung der Ansätze mit Ferulasäure-Sacchariden als Substrat und den Kontrollproben (ohne Substrat) keine signifikanten Unterschiede in den Gehalten an Gesamtsäure bzw. an den einzeln gebildeten Säuren (Tabellen 5.6, 5.7, 5.10. und 5.12 in Kapitel 5.3). Im Gegensatz dazu wurde in allen Fermentationsansätzen mit zugesetzten Monosacchariden (Arabinose, Xylose oder Glucose) eine signifikante Steigerung des Gesamtsäuregehaltes im Vergleich zu den Kontrollwerten beobachtet.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von FA und FAX zeigen, dass weder *B. adolescentis* noch *B. longum* in der Lage sind, die Esterbindung zwischen der *trans*-Ferulasäure und der Arabinose zu spalten. Des Weiteren scheinen diese Bakterien auch nicht

die Möglichkeit zu haben, die unveränderten Substrate aufzunehmen und durch die entsprechenden intrazellulären Enzyme zu verstoffwechseln. Es wurde keine inhibierende Wirkung von freier *trans*-Ferulasäure bei der Fermentation von Arabinose bzw. von einem Gemisch aus Arabinose und Xylose festgestellt. *B. longum* und *B. adolescentis* waren auch nicht in der Lage, freie Ferulasäure zu metabolisieren.

B. adolescentis und *B. longum* sind zwei wichtige Vertreter der Gattung *Bifidobacterium*, die neben den Bakterien der Gattung *Bacteroides* zu den weit verbreiteten Mikroorganismen des menschlichen Dickdarmes gezählt werden (Sharp et al., 2001). In den bisherigen Studien wurde das Wachstum von *B. longum* und *B. adolescentis*-Stämmen auf Arabinoxylanen aus Roggen gezeigt (Crittenden et al., 2002). Ein gutes Wachstum von *B. longum* wurde auch auf Arabinoxylanen aus Weizen beobachtet (Van Laere et al., 2000). Es wurde festgestellt, dass *B. longum* und *B. adolescentis* in der Lage sind, α-L-Arabinofuranosidase zur Hydrolyse von Arabinose-Resten des Arabinoxylans zu produzieren und Arabinose zu fermentieren (Crittenden et al., 2002, Margolles und de los Reyes-Gavilan, 2003, Van Laere et al., 1997). Es wurde dagegen gezeigt, dass die beiden *Bifidobacterium*-Stämme kaum β-D-Xylanase-Aktivität zur Hydrolyse der Xylanhauptkette aufweisen (Crittenden et al., 2002, Hopkins et al., 2003). Im Gegensatz zu dem sehr schlechten Wachstum der beiden Bakterien auf unsubstituierten Xylanen, wurde große Effizienz bei der Fermentation von unterschiedlichen Xylooligosacchariden durch die beiden Bakterien beobachtet. Es wurde festgestellt, dass die beiden Mikroorganismen in der Lage sind, u.a. Arabinoxylooligosaccharide und Xylooligosaccharide teilweise oder vollständig abzubauen (Van Laere et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten *Bifidobacterium*-Stämme zwar intrazelluläre Xylanasen bilden können, jedoch keine extrazelluläre Xylanase produzieren.

Die Fermentationsversuche mit fünf wichtigen Vertretern der menschlichen Dickdarmflora haben gezeigt, dass die Bindung von *trans*-Ferulasäure an Arabinose bzw. an ein Arabinose-Xylose-Disaccharid die Abbaurate der Kohlenhydrate reduziert bzw. gänzlich verhindert. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass hier einzelne Bakterienstämme untersucht wurden. In der komplexen Darmflora stehen die Enzyme der gesamten Bakterienflora zur Metabolisierung der Substrate zur Verfügung. Inwieweit der hier an isolierten Bakterien festgestellte Einfluss auch Gültigkeit für die komplexe Darmflora hat, bleibt im Detail in folgenden Studien zu untersuchen.

4 Zusammenfassung / Summary

Ballaststoffe sind wichtige Lebensmittelbestandteile, die bei ausreichendem Verzehr die Gesundheit des menschlichen Organismus positiv beeinflussen können. Die physiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen stehen im engen Zusammenhang mit ihrer chemischen Struktur. Besonderes Interesse bei der Erforschung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Ballaststoffen gilt den phenolischen Strukturmerkmalen, die aufgrund ihrer Eigenschaft, Crosslinks auszubilden, einen großen Einfluss auf die physikochemischen und somit auf die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffkomponenten haben können. Viele physiologische Eigenschaften der Ballaststoffe hängen eng mit ihrer enzymatischen Abbaubarkeit und speziell mit der Fermentation durch Mikroorganismen im Dickdarm zusammen.

In dieser Arbeit wurde durch die Isolierung und Identifizierung von unterschiedlichen Phenolcarbonsäure- (PCS) bzw. Dehydrodiferulasäure (DFS)-Sacchariden ein Beitrag zum Verständnis der Strukturen von Maisballaststoffen (Heteroxylanen) geleistet. Dies ist eine Voraussetzung, um die Zusammenhänge zwischen Ballaststofffermentierbarkeit und den chemischen Strukturen der Ballaststoffkomponenten besser zu verstehen. Die anschließenden *in vitro* Untersuchungen zur Fermentierbarkeit von isolierten Heteroxylanseitenketten aus Maiskleie mit wichtigen Vertretern der menschlichen Dickdarmflora lieferten erste Erkenntnisse über den Einfluss einer Ferulasäureassoziation von Arabinoxylanseitenketten auf den Fermentationsprozess.

Die Isolierung von PCS- bzw. DFS-Sacchariden erfolgte nach saurer Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe aus Maiskleie mittels GPC (Sephadex™ LH-20, Bio-Gel® P-2) und semipräparativer RP-HPLC. Die Strukturidentifizierung der isolierten Komponenten wurde durch 1D, 2D und 3D NMR-Spektroskopie und HPLC-MS in Kombination mit der Bestimmung des phenolischen Anteils (HPLC-DAD), Bestimmung des Kohlenhydrat-Anteils (GC-FID der Alditolacetate) und Bestimmung der glykosidischen Bindungen (Methylierungsanalyse) durchgeführt. Die absolute Konfiguration der Kohlenhydrat-Monomere wurde mittels chiraler GC nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung zu Trifluoracetaten bestimmt. Folgende PCS-Saccharide wurden als Seitenketten der Maiskleie-Heteroxylane identifiziert:

- FA: 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose
- FAX: β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAXG: α-L-Galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAXGG: α-D-Galactopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAXGX: α-D-Xylopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- pCA: 5-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-L-arabinofuranose

Die Ferulasäure-Tetrasaccharide FAXGX und FAXGG sind die komplexesten Heteroxylanseitenketten, die bisher aus pflanzlichem Material isoliert wurden. Die in größeren Anteilen nachgewiesene Substanz FAXG trägt zur Komplexität der Seitenketten bei, und pCA stellt die erste isolierte, mit *p*-Cumarsäure assoziierte Heteroxylanseitenkette aus Getreidekaryopsen dar. Die komplexen, mit Ferulasäure assoziierten Heteroxylanseitenketten sind möglicherweise einer der Faktoren, die den begrenzten enzymatischen Abbau der Maiskleie verursachen.

DFS werden als wichtige Arabinoxylan-Crosslinks in Getreideballaststoffen diskutiert. Die Bindung von DFS an Arabinoxylane wurde bisher nur für die 5-5-DFS nachgewiesen. Die Isolierung des Di-5-*O*-L-arabinosyl-Esters von 8-*O*-4-DFS und des Di-5-*O*-L-arabinosyl-Esters von 8-8(Aryltetralin)-DFS zeigte, dass auch andere als 5-5-gebundene DFS an der Vernetzung der Heteroxylane beteiligt sind. Die Isolierung von zwei Verbindungen, die aus einer 8-*O*-4-DFS-Einheit, einer in *O*-5-Position estergebundenen Arabinofuranose und einer in *O*-5-Position estergebundenen β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-L-arabinofuranose-Einheit aufgebaut sind, wies darauf hin, dass auch komplexere Seitenketten als FA (in diesem Fall FAX) an der Ausbildung von 8-*O*-4-DFS-Crosslinks mitwirken. Die Charakterisierung einer Heteroxylankomponente, die aus einer 5-5-DFS, drei Pentosen und einer Hexose besteht, lässt vermuten, dass die radikalische Kopplung auch durch noch komplexere Seitenketten nicht negativ beeinflusst wird.

Der mikrobielle Abbau von FA und FAX durch fünf wichtige Vertreter der menschlichen Dickdarmflora wurde *in vitro* unter anaeroben Bedingungen analysiert. Alle fünf ausgewählten Mikroorganismen besaßen die Fähigkeit, freie Arabinose und Xylose zu verstoffwechseln. Es wurde dagegen nur bei drei Bakterien (*B. ovatus, B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron*) ein partieller Abbau von FA (22–64 %) und somit die Ausnutzung von FA als Kohlenhydratquelle beobachtet. Die Fermentationsversuche mit FAX zeigten, dass die an die Arabinose gebundene Xylose ein zusätzliches Hindernis für die Verwertbarkeit der Kohlenhydratkomponenten darstellt. So wurde FAX verglichen mit FA zu einem geringeren Anteil (12–35 %) durch *B. ovatus, B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron* abgebaut. Ferner wurde bis auf *B. thetaiotaomicron* bei keinem anderen untersuchten Mikroorganismus eine extrazelluläre Esterase-Aktivität festgestellt. Das gleiche Bakterium besaß auch die Fähigkeit, *trans*-Ferulasäure zu metabolisieren. Die Untersuchung der mikrobiell gebildeten kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach Fermentation der eingesetzten Substrate (FA und FAX) führte zu dem Ergebnis, dass es lediglich Unterschiede im Gehalt der gebildeten Bernsteinsäure (*B. ovatus* und *B. vulgatus*) gab, die jedoch nur ein Intermediat im bakteriellen Stoffwechsel darstellt. Die mikrobiologischen *in vitro* Untersuchungen haben die Vermutung bestätigt, dass die Bindung von *trans*-Ferulasäure an Heteroxylane und die Komplexität der Heteroxylanseitenketten den enzymatischen Abbau von Ballaststoffen negativ beeinflussen können. Inwieweit der hier an isolierten Bakterien festgestellte Einfluss auch Gültigkeit für die komplexe Darmflora hat, bleibt im Detail zu untersuchen.

Summary

Dietary fibre is an important part of the diet. A high dietary fibre intake is often related to positive effects on human health. The physiological properties of dietary fibre are based on their chemical structure. Due to their ability to cross-link plant cell wall polymers, phenolic compounds as part of the dietary fibre complex may influence the physico-chemical characteristics of dietary fibre and its physiological effects. This is of special interest in research focused on structure-function-relationships of dietary fibre. Several physiological effects of dietary fibre are discussed to be based on its enzymatic degradation and especially on its fermentation in the human colon by intestinal bacteria.

This study led to a closer understanding of the heteroxylan structures of maize bran by isolation and identification of several *p*-coumaric acid-, ferulic acid- and dehydrodiferulic acid (DFA)-saccharides. This is a basic requirement for a better understanding of the relationship between dietary fibre fermentation and the chemical structures of its components. The subsequent *in vitro* study examining the fermentation of isolated heteroxylan side-chains from maize bran by important species of the human intestinal flora revealed first hints on the impact of a ferulate-arabinoxylan association on the fermentation process.

The isolation of monomeric hydroxycinnamic acid- and DFA-saccharides was carried out by acid hydrolysis of maize bran insoluble fibre and fractionation of the purified hydrolysate by GPC (Sephadex™ LH-20, Bio-Gel® P-2) and semi-preparative RP-HPLC. The structural elucidation of the isolated compounds was achieved by 1D, 2D and 3D NMR spectroscopy and HPLC-MS in combination with the following methods: determination of phenolic compounds (HPLC-DAD), determination of neutral carbohydrate monomers (GC-FID of the alditol acetates) and determination of glycosidic linkages (methylation analysis). The absolute configuration of the carbohydrate constituents was determined by chiral GC after acidic hydrolysis and trifluoroacetylation. The following heteroxylan side-chains were identified from maize bran insoluble fibre:

- FA: 5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAX: β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAXG: α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAXGG: α-D-galactopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- FAXGX: α-D-xylopyranosyl-(1→3)-α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose
- pCA: 5-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl-L-arabinofuranose

The feruloylated tetrasaccharides FAXGX and FAXGG are the most complex heteroxylan side-chains that have been isolated from plant material to date. The isolated trisaccharide FAXG contributes to the complexity of heteroxylan side-chains from maize bran and pCA represents the first *p*-coumaroylated heteroxylan side-chain isolated from cereal grains. Complex feruloylated heteroxylan side-chains are possibly a factor contributing to limited enzymatic degradation of fibre, especially insoluble maize bran fibre.

The capability of DFA to be important cross-linking agents for arabinoxylans of cereal dietary fibre has been long discussed. By the time starting this study, the isolation of a DFA linked to an arabinoxylan fragment was only reported for the 5-5-DFA. The isolation of the di-5-*O*-L-arabinosyl ester of 8-*O*-4-DFA and of the di-5-*O*-L-arabinosyl ester of 8-8(aryltetralin)-DFA showed that DFA other than the 5-5-DFA act as cross-linking agents for heteroxylans. The isolation of two compounds that are built of 8-*O*-4-DFA, *O*-5-linked arabinofuranose and *O*-5-linked β-D-xylopyranosyl-(1→2)-L-arabinofuranose indicated that also more complex side-chains than FA (in this case FAX) are involved in 8-*O*-4-DFA cross-linking. The characterisation of a 5-5-DFA coupled with three pentoses and one hexose is also a first indication that radical coupling of ferulates is not negatively influenced by more complex side-chains.

The microbiological *in vitro* degradation of FA and FAX by five relevant species of gut bacteria under anaerobic conditions was studied. All five chosen bacteria were able to ferment arabinose and xylose. Contrary, only three species tested (*B. ovatus, B. vulgatus* and *B. thetaiotaomicron*) were able to degrade FA (22–64 %) and to use it as a carbohydrate source. The results from the fermentation of FAX showed that the linkage of xylose to arabinose has a negative effect on the utilisation of the carbohydrates. In comparison to FA, less FAX (12–35 %) was fermented by *B. ovatus, B. vulgatus* and *B. thetaiotaomicron*. In addition, *B. thetaiotaomicron* was the sole bacterium tested in this study showing an extracellular esterase activity. The same bacterium was able to metabolise *trans*-ferulic acid. Short-chain fatty acids and organic acids were determined after the fermentation of FA and FAX. The only difference demonstrated was in the amounts of formed succinic acid (after fermentation with *B. ovatus* and *B. vulgatus*). However, succinic acid is known as an intermediate of the metabolic pathway. Therefore, the relevance of this finding remains questionable. This microbiological *in vitro* study confirmed the assumption that the linkage of *trans*-ferulic acid to heteroxylans and complex side-chains of heteroxylans may limit enzymatic degradation of dietary fibre by specific bacteria. Whether or not this impact is also valid considering the whole, complex intestinal flora has to be examined in more detail in future studies.

5 Anhang

5.1 Arbeitsvorschriften

5.1.1 Gewinnung unlöslicher Ballaststoffe

- Maiskleie zweimal mit n-Hexan extrahieren und n-Hexan anschließend abdekantieren
- Maiskleie offen über Nacht an der Luft trocknen
- getrocknete Maiskleie mit der Schlagmessermühle unter Wasserkühlung auf Partikelgröße < 0.5 mm mahlen
- 20 g gemahlene Maiskleie in 500 mL-Jodzahlkolben einwiegen
- 300 mL 0.08 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) hinzufügen
- Suspension mit 1500 µL Termamyl (hitzestabile α-Amylase) versetzen
- 40 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzen, dabei alle 5 min umschwenken
- abgekühlte Suspension 10 min zentrifugieren, Überstand abdekantieren
- Rückstand zweimal mit 70 °C heißem Wasser waschen, nach jedem Waschschritt 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsrückstand einmal mit Ethanol waschen, 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsrückstand einmal mit Aceton waschen, 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsrückstand an der Luft und letztlich über Nacht bei 40 °C und 30 mbar im Vakuumtrockenschrank trocknen

Dieser Ablauf wurde mehrmals wiederholt.

5.1.2 Saure Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe

- 40-55 g der unlöslichen Ballaststoffe in 2 L-Rundkolben mit 1-1.2 L einer 50 mM TFA versetzen
- Suspension 3 h bei 100 °C im Wasserbad unter Rückfluss erhitzen
- abgekühlte Suspension 20 min zentrifugieren, Überstand durch Faltenfilter filtrieren
- Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf ca. 200 mL einengen
- mit 0.1 M Natronlauge auf pH 5 einstellen
- 10 min zentrifugieren und den Rückstand nach dem Filtrieren entfernen
- Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf ca. 100 mL einengen

Dieser Ablauf wurde mehrmals wiederholt.

5.1.3 Isolierung von Phenolcarbonsäure- und Dehydrodiferulasäure-Saccharіden

5.1.3.1 Reinigung des sauren Hydrolysates an Amberlite® XAD-2

- Chromatographie-Säule (40 x 5 cm) mit in Wasser aufgeschlämmtem Amberlite® XAD-2-Material füllen
- nach Kapitel 5.1.2 erhaltenes Hydrolysat mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen pro Sekunde auf die Säule bringen
- Säule mit 1.5 L Wasser bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 2 Tropfen pro Sekunde waschen, Waschwasser verwerfen
- PCS- und DFS-Saccharide mit 2 L Methanol/Wasser 50:50 (v/v) bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen / Sekunde eluieren
- Säule mit 1.5 L Methanol waschen, Methanol-Fraktion verwerfen
- Methanol/Wasser-Fraktion am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf 25.5 mL einengen

Dieser Ablauf wurde mehrmals wiederholt (die Spülmenge an Wasser, Methanol/Wasser und Methanol wurde in Abhängigkeit von der aufgegebenen Menge an Hydrolysat angepasst).

5.1.3.2 Fraktionierung von Phenolcarbonsäure-Saccharіden mittels GPC an Sephadex™ LH-20

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.1 zu entnehmen)

- Mit Sephadex™ LH-20 gefüllte Säule mit mindestens 2 L bidestilliertem (bidest.) Wasser konditionieren, Flussrate: 1 mL/min, Säule mit Aluminiumfolie umwickeln
- 25.5 mL des Methanol/Wasser-Eluates injizieren
- mit bidest. Wasser eluieren
- nach ca. 3 h Vorlaufzeit (Totvolumen) 18-Minutenfraktionen sammeln
- nach 70-73 h Laufzeit den Lauf stoppen
- Fraktionen gemäß den Chromatogrammen den Peaks zuordnen und vereinigen
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf 5 mL einengen und gefriertrocknen

Dieser Ablauf wurde mehrmals wiederholt.

5.1.3.3 Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Sacchariden

1) mittels GPC an Sephadex™ LH-20

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.1 zu entnehmen)

- die nach Abtrennung von monomeren PCS-Sacchariden auf der Sephadex™ LH-20-Säule verbliebenen DFS-Oligosaccharide mit Methanol/bidest. Wasser-Gemisch 20/80 (v/v) eluieren, Flussrate 1 mL/min
- jeweils 18-Minutenfraktionen sammeln
- Fraktionen gemäß den Chromatogrammen den Peaks zuordnen und vereinigen
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf 5 mL einengen und gefriertrocknen
- GPC-Säule mit mindestens 2 L Methanol spülen, Flussrate: 1.0 mL/min

2) mittels GPC an Bio-Gel® P-2

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.2 zu entnehmen)

- die nach Abtrennung von monomeren PCS-Sacchariden auf der Sephadex™ LH-20-Säule verbliebenen DFS-Oligosaccharide mit Methanol eluieren, Flussrate 1 mL/min
- das Eluat am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf 25.5 mL einengen
- mit Bio-Gel® P-2 gefüllte GPC-Säule mit mindestens 2 L bidest. Wasser konditionieren, Flussrate: 0.5 mL/min, Säule mit Aluminiumfolie umwickeln
- 25.5 mL des eingeengten Methanol-Eluates (nach Sephadex™ LH-20) injizieren
- 6-Minutenfraktionen sammeln
- Fraktionen gemäß den Chromatogrammen den Peaks zuordnen und vereinigen
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf 5 mL einengen und gefriertrocknen
- GPC-Säule mit 2 L bidest. Wasser/Ethanol-Gemisch 85/15 (v/v) spülen

5.1.3.4 Charakterisierung der isolierten GPC-Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.1 zu entnehmen)

- ca. 1 mg der isolierten getrockneten GPC-Fraktionen in 1 mL bidest. Wasser (bei monomeren PCS-Verbindungen) bzw. in 1 mL Acetonitril/bidest. Wasser-Gemisch 1/1 (v/v) (bei DFS-Oligosacchariden) lösen
- die Lösungen direkt zur Analyse mittels HPLC-DAD-MS einsetzen

5.1.3.5 Reinigung bzw. weitere Fraktionierung von monomeren Phenolcarbonsäure-Saccharіden

1) Reinigung der Fraktionen an Bio-Gel® P-2 mittels GPC

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.1.2 zu entnehmen)

- mit Bio-Gel® P-2 gefüllte Säule mit mindestens 2 L bidest. Wasser konditionieren, Flussrate: 0.5 mL/min, Säule mit Aluminiumfolie umwickeln
- 5 mL der ausgewählten, an Sephadex™ LH-20 isolierten Fraktion injizieren
- 12-Minutenfraktionen sammeln
- Fraktionen gemäß den Chromatogrammen den Peaks zuordnen und vereinigen
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf unter 5 mL einengen und gefriertrocknen
- GPC-Säule mit 2 L bidest. Wasser/Ethanol-Gemisch 85/15 (v/v) spülen

2) Reinigung bzw. Fraktionierung der ausgewählten Fraktionen mittels semipräparativer HPLC

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.2 zu entnehmen)

- die gefriergetrockneten GPC-Fraktionen in bidest. Wasser aufnehmen
- 50 µL der ausgewählten Fraktion (soll maximal 2 mg der getrockneten GPC-Fraktion enthalten) in die 100 µL Probenschleife injizieren
- gemäß den Chromatogrammen per Hand fraktionieren und sammeln
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf Volumen unter 10 mL einengen und gefriertrocknen

5.1.3.6 Reinigung bzw. weitere Fraktionierung von Dehydrodiferulasäure-Saccharіden mittels semipräparativer HPLC

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.3 zu entnehmen)

- die gefriergetrockneten GPC-Fraktionen in Acetonitril/bidest. Wasser 50/50 (v/v) aufnehmen
- 50 µL der Lösung (soll maximal 2 mg der getrockneten GPC-Fraktion enthalten) in die 100 µL Probenschleife injizieren
- gemäß den Chromatogrammen per Hand fraktionieren und sammeln
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C und 50 mbar auf Volumen unter 10 mL einengen und gefriertrocknen

5.1.4 Identifizierung der isolierten Phenolcarbonsäure-/Dehydrodiferulasäure-Saccharide

5.1.4.1 Identifizierung mittels MS

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.1 (HPLC-DAD-MS) und 5.2.4 (hochauflösende MS) zu entnehmen

- ca. 0.1 %-ige Lösungen (gelöst in bidest. Wasser bei PCS-Mono-/Oligosacchariden und in Acetonitril/bidest. Wasser 50/50 (v/v) bei DFS-Oligosacchariden) direkt zur massensspektrometrischen Untersuchung einsetzen

5.1.4.2 Identifizierung von Monosacchariden als Alditolacetate mittels GC

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.3.1 (PCS-Oligosaccharide) und 5.2.3.2 (DFS-Oligosaccharide) zu entnehmen)

Hydrolyse

- 100 µL der gereinigten Fraktionen in ein Pyrexglas pipettieren (jeweils 0.1 %-ige Lösungen, gelöst in bidest. Wasser bei PCS-Mono-/Oligosacchariden und in Acetonitril/bidest. Wasser 50/50 (v/v) bei DFS-Oligosacchariden)
- Wasser bzw. Acetonitril/Wasser-Gemisch im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C und 50 mbar entfernen
- 500 µL 2 M TFA hinzufügen und Pyrexglas verschließen
- 60 min bei 120 °C im Trockenschrank erhitzen, alle 10 min leicht schütteln
- Lösung bei 40 °C in einem Stickstoffstrom zur Trockne bringen

Reduktion

- zum Rückstand 100 µL 1 M Ammoniaklösung hinzufügen
- nach Zugabe des Miniaturrührstäbchens mit 1 mL 2 %-iger Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid (frisch angesetzt) versetzen
- verschlossene Pyrexgläser 60 min bei 60 °C im Wasserbad rühren
- nach dem Abkühlen 100 µL 80 %-iger Essigsäure, die die internen Standardsubstanzen *meso*-Erythrit und *myo*-Inosit (0.4 mg/L) enthält, hinzufügen

Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate

- essigsaure Lösung mit 2 mL Acetanhydrid und 200 µL 1-Methylimidazol versetzen
- 10 min bei Raumtemperatur rühren lassen
- im Eisbad 5 mL Wasser hinzufügen
- nach dem Abkühlen Alditolacetate mit 2 mL Chloroform extrahieren, wässrige Phase verwerfen
- organische Phase zweimal mit Wasser waschen
- Wasserreste bei –18 °C ausfrieren
- 100 µL Chloroformphase mit 200 µL Chloroform verdünnen und zur gaschromatographischen Bestimmung einsetzen

Behandlung der Standardsubstanzen

- 100 µL einer Lösung, die ca. 0.5 mg/mL L (+)-Arabinose, D (+)-Xylose, D (+)-Galactose und D (+)-Glucose enthält, in ein Pyrexglas pipettieren
- Wasser im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C und 50 mbar entfernen
- 100 µL 0.1 M Ammoniaklösung hinzufügen
- Reduktion, Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate wie oben beschrieben durchführen

5.1.4.3 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Monosacchariden durch eine GC-Analyse an einer chiralen stationären Phase

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.3.3 zu entnehmen)

Hydrolyse

- die ausgewählten Fraktionen gemäß der Vorschrift in Kapitel 5.1.4.2 hydrolysieren

Derivatisierung zu Trifluoracetaten

- den Rückstand in 2 mL Dichlormethan aufnehmen
- nach Zugabe des Miniaturrührstäbchens mit 100 µL Trifluoressigsäureanhydrid versetzen und über Nacht bei Raumtemperatur rühren
- Lösung evtl. membranfiltrieren und im Stickstoffstrom bei 30 °C zur Trockne eindampfen
- Rückstand in 2 mL Dichlormethan aufnehmen und zur gaschromatographischen Bestimmung einsetzen

Behandlung der Standardsubstanzen

- ca. 1 mg der Standardsubstanz (L (+)-Arabinose, D (-)-Arabinose, D (+)-Xylose, L (-)-Xylose), D (+)-Galactose und L (-)-Galactose) jeweils in ein Pyrexglas einwiegen
- 2 mL Dichlormethan hinzufügen und wie oben beschrieben zu Trifluoracetaten derivatisieren

5.1.4.4 Identifizierung von Dehydrodiferulasäuren mittels HPLC

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.4 zu entnehmen)

- 100 µL der gereinigten Fraktionen (gelöst in Acetonitril/bidest. Wasser 50/50 (v/v)) in Braunglasgefäße pipettieren und unter Stickstoffstrom trocknen
- mit 100 µL bidest. Wasser und 100 µL einer mit Stickstoff entgasten 2 M NaOH versetzen
- nach Zugabe des Miniaturrührstäbchens den Kopfraum der Gefäße mit Stickstoff begasen
- Gläschen verschließen und 2 h rühren
- Hydrolyse durch Zugabe von 300 µL 2 M Phosphorsäure/Methanol-Gemisch 1/1 (v/v) stoppen
- Lösungen direkt zur HPLC-Bestimmung einsetzen

5.1.4.5 Identifizierung mittels NMR

- die gereinigten gefriergetrockneten Fraktionen in D_2O aufnehmen und erneut gefriertrocknen, den Vorgang zweimal wiederholen
    - 2 – 4 mg des 8-O-4-DFS- bzw. des 5-5-DFS-Oligosaccharids in 0.7 mL Aceton-d6/D_2O-Gemisch 9:1 (v/v) lösen
    - 3 – 15 mg der isolierten PCS-Mono-/Oligosaccharide bzw. 4 mg des 8-8-DFS-Oligosaccharids in 0.7 mL D_2O lösen, 10 µL interne Standardlösung aus 25 µL Aceton und 1500 µL D_2O zufügen
- Lösung in NMR-Röhrchen überführen und zur Messung (Kapitel 5.2.5) einsetzten

5.1.4.6 Identifizierung mittels Methylierungsanalyse

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.3.4 zu entnehmen)

Methylierung und Extraktion

- 1-2 mg der gereinigten Fraktion in 2 mL Dimethylsulfoxid lösen
- ca. 100 mg unter Stickstoff gepulverten NaOH-Plätzchen zufügen
- 90 min im Ultraschalbad reagieren lassen und weitere 90 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 1 mL Methyliodid zu der eisgekühlten Lösung hinzugeben
- 30 min im Ultraschalbad reagieren lassen und für weitere 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 3 mL Wasser zufügen und methyliertes Material in 1 mL Chloroform extrahieren
- organische Phase 5 mal mit 5 mL Wasser waschen und unter Stickstoff bei 40 °C zur Trockne eindampfen

Hydrolyse

- 1 mL 2 M TFA hinzufügen und Pyrexglas verschließen
- 60 min bei 120 °C im Trockenschrank erhitzen, alle 10 min leicht schütteln
- Lösung bei 40 °C in einem Stickstoffstrom zur Trockne bringen

Reduktion

- zum Rückstand frisch hergestellte Lösung aus 20 mg Natriumbordeuterid in 0.3 mL wässriger Ammoniaklösung (2 M) hinzufügen
- verschlossene Pyrexgläser 60 min bei Raumtemperatur rühren
- die Reaktion durch Zugabe von 0.1 mL Eisessig stoppen

Acetylierung und Extraktion der teilweise methylierten Alditolacetate

- unter Eiskühlung 0.45 mL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid hinzugeben
- 30 min bei Raumtemperatur rühren lassen
- im Eisbad 3 mL Wasser hinzufügen
- nach dem Abkühlen teilweise methylierte Alditolacetate in 2 mL Dichlormethan extrahieren, wässrige Phase verwerfen
- organische Phase dreimal mit Wasser waschen

- Wasserreste bei –18 °C ausfrieren und Dichlormethan-Phase zur gaschromatographischen Bestimmung einsetzen

5.1.5 Mikrobiologische Untersuchungen

5.1.5.1 Kultivierung und Lagerung von Einzelbakterienstämmen

Kultivierung

Soweit nicht anders angegeben, werden alle für die mikrobiologischen Untersuchungen angesetzten Nährmedien und Lösungen vor dem Gebrauch bei 121 °C für 15 min autoklaviert.

Alle Untersuchungen mit autoklavierten Nähmedien werden unter dem sterilen Abzug durchgeführt.

Die gefriergetrockneten Starterstämme werden nach der Einleitung zuerst in flüssigem Bifidobacterium-Medium bzw. Kochfleisch-Medium bebrütet und zur weiteren Kultivierung auf festes Thioglycolat-Medium überführt.

Flüssiges Nähmedium zur Erstkultivierung von gefriergetrockneten Bifidobakterien

- Zusammensetzung von flüssigem Bifidobacterium-Medium (selbsthergestellt nach der Rezeptur von Medium 58, DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland)

Substanz	**Konzentration [g/L H_2O]**
Pepton aus Casein	10
Fleischextrakt	5
Hefeextrakt	5
Glucose	10
K_2HPO_4	3
Tween 80	1

- auf pH 6.8 einstellen
- jeweils 9 mL der Bouillon mit dem Dispenser in Reagenzgläser abfüllen
- nach dem Autoklavieren eine Lösung aus Natriumascorbat und Cystein-HCl (steril membranfiltriert) zur Endkonzentration von 1 bzw. 0.05 % zusetzen

Flüssiges Nähmedium zur Erstkultivierung von gefriergetrockneten Bacteroides-Stämmen

- Zusammensetzung von flüssigem Kochfleisch-Medium (z.T. selbsthergestellt nach der Rezeptur von Medium 78, DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland)

Substanz	Konzentration [g/L H_2O]
Kochfleisch-Medium	57
Hefeextrakt	5
K_2HPO_4	5
Cystein-HCl	0.5
Resazurin	0.001

- auf pH-7 einstellen
- jeweils 9 mL der Bouillon mit dem Dispenser in Reagenzgläser abfüllen und autoklavieren

Festes Nähmedium zur Kultivierung von Bifidobakterien und Bacteroides-Stämmen

- Zusammensetzung von Thioglycolat-Medium (fertiges Medium zur Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen, erworben bei Merck, Darmstadt, Deutschland)

Substanz	Konzentration [g/L H_2O]
Pepton aus Casein	15
Hefeextrakt	5
Glucose-Monohydrat	5.5
L-Cystin	0.5
Natriumchlorid	2.5
Natriumthioglycolat	0.5
Resazurin	0.001

- das Medium nach der Einleitung aus einer Thioglycolat-Nährboden-Mischung unter Zusatz von 15 g Agar-Agar herstellen
- pH-Wert auf pH 7.1 ± .0.2 einstellen
- autoklavieren und in sterile Petrischalen gießen
- im Kühlschrank bei 4 °C maximal 2 Wochen lagern
- 0.1 mL der ersten Mikroorganismensuspension auf Thioglycolat-Agarplatten steril ausspateln bzw. die Kulturen von einer kultivierten Platte auf eine neue mit einer sterilen Impföse überimpfen
- die Platten in einem Plattenkorb in einen Anaerobiertopf setzen
- einen halben Streifen Anaerocult® mit Wasser befeuchten und seitlich in den Anaerobiertopf stellen
- den Topf sofort dicht verschließen
- in einem Inkubationsschrank bei 37 °C für 3 Tage bebrüten
- nach der Inkubation die kultivierten Platten vor einer erneuten Überimpfung 1-2 Wochen bei 4 °C lagern

Langfristige Lagerung

- eine sterile 86 %-ige Glycerinlösung ansetzen
- 0.7 mL der Lösung in sterile Cryo-Röhrchen pipettieren
- ca. drei Impfösen der frisch kultivierten Stämme in die Cryo-Röhrchen unter sterilen Bedingungen überführen
- die Röhrchen bei –80°C lagern.

5.1.5.2 Fermentation von 5-*O*-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose bzw. β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O*-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose mit Einzelbakterienstämmen (der Gattung *Bifidobakterium* und *Bacteroides*)

Alle mikrobiologischen Untersuchungen werden unter dem sterilen Abzug durchgeführt.

Nähmedium für die Fermentations-Versuche

- Thioglycolat-Bouillon ohne Zusatz von Glucose nach Rezeptur 1 Tag vor dem Fermentationsversuch frisch herstellen

Substanz	Konzentration [g/L H_2O]
Pepton aus Casein	15
Hefeextrakt	5
L-Cystin	0.5
Natriumchlorid	2.5
Natriumthioglycolat	0.5
Resazurin	0.001

- pH-Wert auf pH 7.1 ± .0.2 einstellen
- jeweils 9 mL der Bouillon in Schraubverschlussgläser abpipettieren und mit locker draufgelegten Deckeln autoklavieren
- nach dem leichten Abkühlen die Gläser fest zuschrauben
- pH-Wert der Bouillon nach dem Autoklavieren notieren

Herstellung der zur Untersuchung benötigten Lösungen

- 0.5 %-ige wässrige FA- bzw. FAX-Lösung einsetzen
- für die Fermentationsversuche mit FA jeweils zwei wässrige Arabinose- und Glucose-Lösungen sowie eine *trans*-Ferulasäure-Lösung in zu FA äquivalenten molaren Konzentrationen ansetzen:
    - Arabinose 1-Lösung: 0.23 %, Arabinose 2-Lösung: 0.46 %
    - Glucose 1-Lösung: 0.28 %, Glucose 2-Lösung: 0.56 %
    - *trans*-Ferulasäure-Lösung 0.6 % (aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit wässrige Suspension von *trans*-Ferulasäure mit ein paar Tropfen 1 M NaOH in Lösung bringen und den Messkolben bis zur Marke auffüllen)

- für die Fermentationsversuche mit FAX jeweils zwei wässrige Arabinose-, Xylose- und Glucose-Lösungen sowie eine *trans*-Ferulasäure-Lösung in zu FAX äquivalenten molaren Konzentrationen ansetzen:
    - Arabinose 1-Lösung: 0.32 %, Arabinose 2-Lösung: 0.46 %
    - Xylose 1-Lösung: 0.32 %, Xylose-2-Lösung: 0.46 %
    - Glucose 1-Lösung: 0.39 %, Glucose 2-Lösung: 0.78 %
    - *trans*-Ferulasäure-Lösung 0.8 % (aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit wässrige Suspension von *trans*-Ferulasäure mit ein paar Tropfen 1 M NaOH in Lösung bringen und den Messkolben bis zur Marke auffüllen)
- FA-, FAX- und Ferulasäure-Lösungen mit Hilfe eines sterilen Membranfilters in jeweils ein steriles Gefäß filtrieren
- Alle Zucker-Lösungen sowie ein Behälter mit bidest. Wasser autoklavieren

Herstellung von Bakteriensuspensionen

- die 3 Tage lang inkubierten Mikroorganismen mit der Impföse vorsichtig vom Nährmedium lösen und in zuckerfreie Thioglycolat-Bouillon bringen
- das Gemisch mit dem Vortex rühren bis eine homogene Suspension vorliegt
- den Vorgang wiederholen, bis eine ausreichende Trübung der Suspension erreicht wird (entspricht ca. 10^6 bis 10^8 KBE/mL)
- 1 mL der Suspension entnehmen und zu 9 mL der sterilen zuckerfreien Thioglycolat-Bouillon geben (4 Reagenzgläser), aus einem Glas Keimzahlbestimmung nach Kapitel 5.1.5.3 durchführen
- 0.5 mL der verdünnten Suspension zur Fermentation einsetzen (= Mikroorganismen (MO) in den folgenden Tabellen)
- 1 Reagenzglas mit verdünnter Suspension autoklavieren (= autokl. MO in den folgenden Tabellen)

Durchführung der Fermentationsversuche mit FA

- die Schraubverschlussgläser mit 9 mL Thioglycolat-Bouillon nach folgendem Schema auf 10 mL auffüllen (dreifache Bestimmung von jedem Ansatz)

Gläser Nr.	**MO [µL]**	**FA [µL]**	**Ara 1 [µL]**	**Ara 2 [µL]**	**F [µL]**	**Glc 1 [µL]**	**Glc 2 [µL]**	**H_2O [µL]**	**autokl. MO [µL]**
1-3	500	500							
4-6	500		500						
7-9	500			250	250				
10-12		500							500
13-15	500							500	
16-18	500					500			
19-21	500	250					250		
22-24						500			500

- pH-Wert in den Gläser 7-9 (in einem Extraglas, aber entsprechend angesetzt) notieren
- Schraubverschlussgläser mit locker draufgelegten Deckeln in den Anaerobiertopf stellen
- einen Streifen Anaerocult® A mit Wasser befeuchten und seitlich in den Anaerobiertopf stellen
- den Topf sofort dicht verschließen
- in einem Inkubationsschrank lichtgeschützt bei 37 °C für 2 Tage bebrüten

Durchführung der Fermentationsversuche mit FAX

- die Schraubverschlussgläser mit 9 mL Thioglycolat-Bouillon nach folgendem Schema auf 10 mL auffüllen (dreifache Bestimmung von jedem Ansatz) und weiter wie bei den Versuchen mit FA verfahren

Gläser Nr.	MO [µL]	FAX [µL]	Ara 1 [µL]	Ara 2 [µL]	Xyl 1 [µL]	Xyl 2 [µL]	F [µL]	Glc 1 [µL]	Glc 2 [µL]	H_2O [µL]	autokl. MO [µL]
1-3	500	500									
4-6	500		250		250						
7-9	500			180		180	140				
10-12		500									500
13-15	500									500	
16-18	500							500			
19-21	500	250							250		
22-24								500			500

5.1.5.3 Bestimmungen nach der Fermentation

- Nach der Inkubation alle Schraubverschlussgläser verschließen und die Suspensionen am Vortex gut durchmischen
- pH-Wert in jedem Schraubverschlussglas messen

Keimzahlbestimmung

- aus der zur Fermentation angesetzten Bakteriensuspension (vor der Fermentation) und aus jeder Suspension nach der Fermentation Dezimalverdünnungen bis 1:1000000 (10^{-6}) in Thioglycolat-Bouillon herstellen
- 0.1 mL jeder Verdünnungsstufe in die Mitte der nach Kapitel 5.1.5.1 fertig gegossenen Thioglycolat-Platte geben und ausspateln
- Platten in den Anaerobiertopf stellen
- einen Streifen Anaerocult® A mit Wasser befeuchten und seitlich in den Anaerobiertopf platzieren
- den Topf sofort dicht verschließen
- in einem Inkubationsschrank bei 37 °C für 2 Tage bebrüten
- alle optisch erkennbaren Kolonien auszählen und unter Berücksichtigung der inokulierten Menge mit dem gewogenen arithmetischen Mittel die Keimzahl pro mL

Reinkultur errechnen, diejenigen Verdünnungsstufen wählen, bei denen sich zwischen 10 und 300 KBE auf den Platten befinden

Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes (Pichardt, 1998):

$$\bar{x}_{gew} = \frac{\sum x}{n_1 \cdot w_1 + n_2 \cdot w_2 + \ldots} \cdot x \cdot d$$

Legende:

$\bar{x}_{gew}$: gewogenes arithmetisches Mittel

$\sum x$: Summe aller KBE aller Platten

n_1: Plattenanzahl der niedrigsten Verdünnung

n_2: Plattenanzahl der nächsthöheren Verdünnung

w_1: Gewicht der niedrigsten Verdünnung

w_2: Gewicht der nächsthöheren Verdünnung

d: Faktor der niedrigsten Verdünnung

Bestimmung des FA-, FAX- und Ferulasäure-Gehaltes mittel HPLC

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.5 zu entnehmen)

- 0.5 mL der Bouillon mit 0.5 mL bidest. Wasser und 0.5 mL einer Acetonitril/ bidest. Wasser-Lösung 70:30 (v/v) versetzen
- die Lösungen steril membranfiltrieren und direkt zur HPLC-Untersuchung einsetzen
- zur quantitativen Bestimmung der Gehalte an FA, FAX und *trans*-Ferulasäure 4 Eichlösungen mit 15–92 µg/mL FA und 9–55 µg/mL *trans*-Ferulasäure (gelöst in Acetonitril/ bidest. Wasser 70:30 (v/v)) bzw. 5 Eichlösungen mit 15–121 µg/mL FAX und 6–51 µg/mL *trans*-Ferulasäure (gelöst in Acetonitril/ bidest. Wasser 70:30 (v/v)) ansetzen (lichtgeschützt halten)
- die Eichlösungen in HPLC injizieren und eine Kalibrierung durchführen
- über die Peakflächen anhand der Regressionsgeraden der Eichlösungen auswerten
- zur sicheren Zuordnung des Substrates bzw. zur Charakterisierung der entstandenen Verbindungen eine Untersuchung mittels HPLC-DAD-MS nach Kapitel 5.2.2.6 durchführen.

Bestimmung der Kohlenhydrate

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.3.2 zu entnehmen)

- 300 µL der steril filtrierten Bouillon nach der Fermentation aus allen Gläser in je ein Pyrexglas pipettieren
- Wasser bzw. Lösungsmittel im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C und 50 mbar entfernen
- Reduktion, Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate wie bereits in Kapitel 5.1.4.2 beschrieben durchführen
- Chloroformphase unverdünnt zur gaschromatographischen Bestimmung einsetzen

Behandlung der Standardsubstanzen

- 50 µL einer Lösung nach Kapitel , die ca. 0.5 mg/mL L (+)-Arabinose, D (+)-Xylose, D (+)-Galactose, D (+)-Mannose und D (+)-Glucose enthält, in ein Pyrexglas pipettieren
- Wasser im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C und 50 mbar entfernen
- 100 µL 0.1 M Ammoniaklösung hinzufügen
- Reduktion, Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate wie oben beschrieben durchführen

Bestimmung von SCFA

(Chromatographiebedingungen sind Kapitel 5.2.2.6 zu entnehmen)

- 5 mL der steril filtrierten Bouillon nach der Fermentation in je ein 100 mL Rundkolben pipettieren
- nach der Zugabe von Siedesteinen 1 mL interne Standardlösung (IS-Lösung) (2-Ethylbuttersäure, c=239 µg/mL H_2O) zufügen
- mit 100 µL 20 % Schwefelsäure ansäuern
- mit 3 Tropfen Siliconöl gegen Schäumen versetzen
- den Kolben an die Vakuumdestillationsapparatur einschließen und sofort mit dem flüssigen Stickstoff einfrieren
- die Destillationsvorlage ebenso mit flüssigem Stickstoff kühlen
- mit einer Membranpumpe Vakuum von 10 mbar anlegen
- nach dem Erreichen des Vakuums die Stickstoffkühlung entfernen und die Apparatur verschließen
- den Kolben in 50 °C warmes Wasser tauchen und bis zur Trockne destillieren
- nach dem Beenden der Destillation das Wasserbad sowie die Stickstoffkühlung an der Vorlage entfernen und das Vakuum lösen
- nach dem Auftauen wird das Destillat sofort in die HPLC injiziert
- zur quantitativen Bestimmung der Gehalte an SCFA eine Standardlösung folgender Zusammensetzung herstellen:

Substanz	Konzentration [µg/mL H_2O]
Ameisensäure	19.9
Essigsäure	25.9
Propionsäure	21.9
Isobuttersäure	38.0
Buttersäure	38.1
Isovaleriansäure	43.9
Valeriansäure	44.6
Isohexansäure	49.3
Hexansäure	49.2
2-Ethylbuttersäure als IS	49.8

- die Standardlösungen in HPLC injizieren und die Korrekturfaktoren bestimmen

Bestimmung von Milchsäure und Bernsteinsäure

Aufarbeitung von Proben mit zugesetzten phenolischen Substanzen

- 1 mL der steril filtrierten Bouillon mit einer Spatelspitze von Polyvinylpolypyrrolidon versetzen und 15 min lang rühren (Magnetrührer und Miniaturrührstäbchen benutzen)
- durch eine mit entfetteter Watte gestopfte Einwegpipette filtrieren

Aufarbeitung von Proben ohne zugesetzte phenolische Substanzen

- die Proben direkt zur enzymatischen Bestimmung einsetzten
- 100–300 µL der steril filtrierten Bouillon bzw. 100–200 µL der mit Polyvinylpolypyrrolidon behandelten Proben in je eine Einwegküvette pipettieren
- den Test nach der Einleitung des D-/L-Milchsäure- bzw. des Bernsteinsäure-Enzymsatzes durchführen
- bei 365 nm am Spektralphotometer messen

5.2 Chromatographiebedingungen, Geräte- und Messparameter

5.2.1 GPC

5.2.1.1 GPC an Sephadex™ LH-20

Säule:	GPC Glassäule (Kronlab, Sinsheim), ID 32 mm, Länge 1000 mm
Säulenfüllung:	Sephadex™ LH-20 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
Pumpe:	L-6000 A Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
Eluent:	1) für 70 - 73 h bidest. Wasser, Raumtemperatur
	2) Methanol/Wasser-Gemisch 20/80 (v/v) oder Methanol
Fluss :	Eluent 1 1.0 mL/min
	Eluent 2 1.0 mL/min
Probenaufgabe:	6-Wege-Ventil, 25 mL Probenschleife

Detektor: L-7400 mit einer präparativen Flusszelle (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland), Messwellenlänge: 325 nm

Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Fraktionensammler: Serva Linear II (Serva Technik GmbH & Co KG, Heidelberg, Deutschland)

5.2.1.2 GPC an Bio-Gel® P-2

Säule:
1) GPC Glassäule (Kronlab, Sinsheim), ID 25 mm, Länge 1 m (Isolierung von Fraktionen F**1**-Bio bis F**5**-Bio)
2) GPC-Glassäule (Kronlab, Sinsheim), ID 20 mm, Länge 50 cm (Isolierung von Fraktionen F´**1**-Bio bis F´**5**-Bio)

Säulenfüllung: Bio-Gel® P-2, Porengröße: 45–90 µm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Pumpe: L-6000 A Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Eluent:
1) bidest. Wasser, Raumtemperatur
2) bidest. Wasser/Ethanol-Gemisch 85/15 (v/v)

Fluss :
Eluent 1) 0.5 mL/min
Eluent 2) 0.5 mL/min

Probenaufgabe: 6-Wege-Ventil
1) 25 mL Probenschleife (bei der Isolierung von DFS-Sacchariden)
2) 5 mL Probenschleife (bei der Reinigung von monomeren PCS-Sacchariden)

Detektor: L-7400 mit einer präparativen Flusszelle (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland), Messwellenlänge: 325 nm

Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Fraktionensammler: L-7655 Fraktionensammler (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

5.2.2 HPLC

5.2.2.1 Charakterisierung der isolierten GPC-Fraktionen mittels HPLC-DAD-MS

Säule: Nucleosil® 100 C18 HD (5 µm), Länge 250 mm, ID 4 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Vorsäule: Nucleosil® 100-5 C18 HD, Länge 8 mm, ID 4 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Pumpe: HP-Series 1100: G1312A Bin Pump (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)

Degasser: HP-Series: G1322A

Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 20 µL Probenschleife

DAD: HP 1100 Series, G1315B (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)
Messwellenlänge: 280 nm und 325 nm

MS: HP 1100 Series, G1946A (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)

Ionisationsbedingungen:	AP-ESI
Modus:	positiv
Dry gas flow:	12 L/min
Nebulizer pressure:	60 psig
Dry gas temperature:	350 °C
Capillary voltage:	3000 V
Fragmentorspannung:	60 V und 80 V

Auswerteeinheit: PC mit Chem Station Software, Version A06.01 (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)

Fluss: 1 mL/min bzw. 0.7 mL/min

Temperatur: 40 °C

Gradientenprogramm für Screening von GPC-Fraktionen mit monomeren PCS-Komponenten:

Zeit [min]	Acetonitril	Ammoniumformiatpuffer (1 mM, pH = 3)
0	12	88
30	15	85
32	50	50
34	50	50

Gradientenprogramm für Screening von GPC-Fraktionen mit DFS-Komponenten:

Zeit [min]	Acetonitril	Ammoniumformiatpuffer (1 mM, pH = 3)
0	10	90
30	30	70
32	60	40
37	60	40
40	50	50

Schnelles Gradientenprogramm zur Untersuchung der gereinigten Fraktionen mit monomeren PCS- und DFS-Sacchariden:

Zeit [min]	Acetonitril	Ammoniumformiatpuffer (1 mM, pH = 3)
0	15	85
2	15	85
7	50	50
12	50	50

5.2.2.2 Reinigung bzw. Fraktionierung von ausgewählten monomeren Phenolcarbonsäure-Sacchariden mittels semipräparativer HPLC

Säule: Nucleosil® 100 C18 HD (5 µm), Länge 250 mm, ID 10 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Vorsäule: Nucleosil® 100-5 C18 HD, Länge 50 mm, ID 10 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 100 µL Probenschleife

Detektor: L-7400 mit einer präparativen Flusszelle (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland), Messwellenlänge: 325 nm

Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Fluss: 4.0 mL/min

Temperatur: Raumtemperatur

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	Acetonitril	Wasser
0	12	88
25	12	88
30	40	60
40	40	60

5.2.2.3 Reinigung bzw. Fraktionierung von ausgewählten Dehydrodiferulasäure-Sacchariden mittels semipräparativer HPLC

Säule: Nucleosil® 100 C18 HD (5 µm), Länge 250 mm, ID 10 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Vorsäule: Nucleosil® 100-5 C18 HD, Länge 50 mm, ID 10 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Pumpe: 1) L-7150 Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland) → bei Fraktion F**2**-Bio
2) L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland) → bei Fraktionen F**5**, F**6** und F**3**-Bio

Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 100 µL Probenschleife

Detektor: L-7400 mit einer präparativen Flusszelle (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland), Messwellenlänge: 325 nm

Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Fluss: 1) 2.5 mL/min → bei Fraktion F**2**-Bio
2) 4.0 mL/min → bei Fraktionen F**5**, F**6** und F**3**-Bio

Temperatur: 1) 40 °C → bei Fraktion F**2**-Bio
2) Raumtemperatur → bei Fraktionen F**5**, F**6** und F**3**-Bio

Gradientenprogramm für Fraktion F**2**-Bio*:*

Zeit [min]	Acetonitril	Wasser
0	10	90
30	30	70
40	30	70

Gradientenprogramm für Fraktion F**3**-Bio*:*

Zeit [min]	Acetonitril	Wasser
0	10	90
35	20	80
42	20	80

Gradientenprogramm für Fraktionen F**5** und F**6***:*

Zeit [min]	Acetonitril	Wasser
0	20	80
30	40	60
40	40	60

5.2.2.4 Identifizierung von Dehydrodiferulasäuren

Säule: Luna® Phenyl-Hexyl 100A (5 µm), Länge 250 mm, ID 4.6 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)

Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Säulenofen: T-6300 Column Thermostat (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA),
20 µL Probenschleife

Detektor: Waters 994 Programmable Photodiode Array Detector (Waters, Eschborn, Deutschland)
Messwellenlängen: 280 nm und 325 nm

Auswerteeinheit: PC mit ChromStar Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Fluss: 1 mL/min

Temperatur: 45 °C

Gradientenprogramm:

Zeit [min]	Methanol/TFA (1 mM) 90/10 (v/v)	Acetonitril	TFA (1 mM)
0	5	10	85
20	10	25	65
30	10	25	65
35	20	30	50

5.2.2.5 Quantifizierung von 5-*O-trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose bzw. β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-*O-trans*-feruloyl-L-arabinofuranose neben *trans*-Ferulasäure nach mikrobiologischen Untersuchungen

Säule: Nucleosil® 100 C18 HD (5 µm), Länge 250 mm, ID 4 mm
(Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Vorsäule: Nucleosil® 100-5 C18 HD, Länge 50 mm, ID 4 mm
(Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Säulenofen: T-6300 Column Thermostat (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA),
20 µL Probenschleife

Detektor: Waters 994 Programmable Photodiode Array Detector (Waters, Eschborn, Deutschland)
Messwellenlängen: 280 und 325 nm

Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Fluss: 1.0 mL/min

Temperatur: 40 °C

Gradientenprogramm für FA und *trans*-Ferulasäure*:*

Zeit [min]	Acetonitril	TFA (1 mM)
0	10	90
20	15	85
23	60	40
28	60	40

Gradientenprogramm für FAX und *trans*-Ferulasäure*:*

Zeit [min]	Acetonitril	TFA (1 mM)
0	10	90
10	25	75
20	30	70
23	60	40
28	60	40

5.2.2.6 Charakterisierung der Verbindungen nach mikrobiologischen Untersuchungen mittels HPLC-DAD-MS

Säule: Nucleosil® 100 C18 HD (5 µm), Länge 250 mm, ID 4 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Vorsäule: Nucleosil® 100-5 C18 HD, Länge 8 mm, ID 4 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

Pumpe: HP-Series 1100: G1312A Bin Pump (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)

Degasser: HP-Series: G1322A

Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 20 µL Probenschleife

DAD: HP 1100 Series, G1315B (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)
Messwellenlänge: 280 nm und 325 nm

MS: HP 1100 Series, G1946A (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)

Ionisationsbedingungen:	AP-ESI
Modus:	positiv
Dry gas flow:	12 L/min
Nebulizer pressure:	60 psig
Dry gas temperature:	350 °C
Capillary voltage:	3000 V
Fragmentorspannung:	60 V und 80 V

Auswerteeinheit: PC mit Chem Station Software, Version A06.01 (Hewlett Packard, Walsbronn, Deutschland)

Fluss: 1 mL/min
Temperatur: 40 °C

Gradientenprogramm für FA und *trans*-Ferulasäure:

Zeit [min]	Acetonitril	Ammoniumformiatpuffer (1 mM, pH = 3)
0	10	90
20	15	85
23	60	40
28	60	40

Gradientenprogramm für FAX und *trans*-Ferulasäure*:*

Zeit [min]	Acetonitril	Ammoniumformiatpuffer (1 mM, pH = 3)
0	10	90
10	25	75
20	30	70
23	60	40
28	60	40

5.2.2.7 Quantifizierung von kurzkettigen Fettsäuren nach mikrobiologischen Untersuchungen

Säule: Rezex™ RHM Monosaccharide 8µ, Länge 300 mm, ID 7.8 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Vorsäule: Rezex™ RHM Monosaccharide 8µ, Länge 50 mm, ID 7.8 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Pumpe: L-6220 Intelligent Pump (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
Injektion: Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA), 20 µL Probenschleife
Säulenofen: LKB Bromma (LKB, Uppsala, Schweden)
Detektor: L-7400 (Merck/Hitachi, Darmstadt, Deutschland), Messwellenlänge: 210 nm
Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)
Fluss: 0.5 mL/min
Temperatur: 60 °C
Elutionsmittel: 0.005 N Schwefelsäure

5.2.3 GC

5.2.3.1 Identifizierung von Monosacchariden als Alditolacetate aus isolierten monomeren Phenolcarbonsäure-Sacchariden

Gaschromatograph: HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)
Säule: HP-5MS-Fused-Silica-Kapillarsäule (Methylpolysiloxan mit 5 % Phenylgruppen), Länge 30 m, ID 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)
Vorsäule: Fused-Silica-Kapillarsäule, Methyl-Silyl-desaktiviert, Länge 1m, ID 0.32 mm (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)
Injektion: on-column
Injektionsvolumen: 1 µL
Detektor: FID, 300 °C
Trägergas: Helium, 1.5 mL/min
Make-up-Gas: Helium
Brenngase: Luft, Wasserstoff
Auswerteeinheit: PC mit HP 3365 Series II Chem Station-Software, Version A.03 (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)

Temperaturprogramm:

	Aufheizrate [°C/min]	**Endtemperatur [°C]**	**Haltezeit [min]**
	Anfangstemperatur: 45 °C, Anfangszeit: 1 min		
Level 1	40	165	12
Level 2	10	220	3
Level 3	20	240	3

5.2.3.2 Identifizierung von Monosacchariden als Alditolacetate aus isolierten Dehydrodiferulasäure-Verbindungen und nach mikrobiologischen Untersuchungen

Gaschromatograph: Focus GC (Thermo Electron Corporation Finnigan, Dreieich, Deutschland)
Säule: DB-5-Fused-Silica-Kapillarsäule, Länge 30 m, ID 0.32 mm, Filmdicke 0.25 µm (J & W Scientific, Albany, NY, USA)
Injektion: AI 3000 Autosampler, Split 1:6, Splitflow: 10 mL/min, T = 250 °C
Injektionsvolumen: 1 µL
Detektor: FID, 300 °C
Trägergas: Helium, 1.6 mL/min
Brenngase: Luft, Wasserstoff

Auswerteeinheit: PC mit Chromstar Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Temperaturprogramm:

	Aufheizrate [°C/min]	**Endtemperatur [°C]**	**Haltezeit [min]**
	Anfangstemperatur: 150 °C, Anfangszeit: 3 min		
Level 1	5	200	1
Level 2	2,5	220	5
Level 3	20	300	10

5.2.3.3 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Monosacchariden aus isolierten Phenolcarbonsäure-Sacchariden

Gaschromatograph: SatoChrom GC
Säule: Hydrodex-β-TBDM chirale Kapillarsäule, Länge 25 m, ID 0.25 mm, (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)
Säulenspezifikation: Heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-t-butyldimethyl-silyl)-β-Cyclodextrin
Injektion: Split 1:5, T = 250 °C
Injektionsvolumen: 1 µL
Detektor: FID, 250 °C
Trägergas: Wasserstoff
Brenngase: Luft, Wasserstoff
Auswerteeinheit: PC mit Chromstar-Software, Version 5.03 (SCPA GmbH, Stuhr, Deutschland)

Temperaturprogramm:

Aufheizrate [°C/min]	**Endtemperatur [°C]**	**Haltezeit [min]**
Anfangstemperatur: 100 °C, Anfangszeit: 5 min		
10	220	10

5.2.3.4 Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Oligosacchariden mittels Methylierungsanalyse / GC-MS

Gaschromatograph: HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)
Säule: DB-5MS-Kapillarsäule, Länge 30 m, ID 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)
Injektion: Splitless time 0.75 min. 210 °C
Injektionsvolumen: 1 µL
Detektor: HP 5972 Series Massenselektiver Detektor (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland), Quadrupol-MS
Trägergas: Helium, 1 mL/min

Ionisation: EI, 70 eV
Brenngase: Luft, Wasserstoff
Auswerteeinheit: PC mit HP 3365 Series II ChemStation-Software, Version A.03 (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)

Temperaturprogramm:

	Aufheizrate [°C/min]	**Endtemperatur [°C]**	**Haltezeit [min]**
	Anfangstemperatur: 45 °C, Anfangszeit: 1 min		
Level 1	45	140	1
Level 2	1	180	5

5.2.4 Hochauflösende MS

Gerät: Sektorfeld-Ionenfallen-MS-MS-Kopplung MAT 95 XL (Thermo Finnigan, Dreieich, Deutschland)
Ionisation: ESI
Kapillar-Potential: 3.3 kV
Quellentemperatur: 230 °C
Modus: positiv
Injektion: mittels einer Spritzenpumpe mit der Flussrate von 10 µL/min
Lösungsmittel: Methanol/Wasser-Gemisch 50/50 (v/v)
Standard: Polyethylenglykol

5.2.5 NMR

NMR-Gerät: - 1D und 2D Experimente → Brucker DMX-750 und oder DRX-500-Instrument, AMX400 (Brucker, Karlruhe, Deutschland)
- 3D Experiment → Brucker DMX-600 (Brucker, Karlsruhe, Deutschland)

Kalibrierung: - in D_2O gelöste Fraktionen mit Aceton als IS (δ_H=2.22, δ_C=30.89) (Gottlieb et al., 1997)
- in Aceton-d6/D_2O gelöste Fraktionen mit zentralem Aceton-d6-Peak (δ_H=2.04, δ_C=29.80)

Experimente: 1D Experimente: ^1H, ^{13}C
2D Experimente: ^1H,^1H-COSY, TOCSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC
3D Experimente: TOCSY-HSQC

Spektrale Simulation: gNMR 3.6 für MacOS (Cherwell Scientific Publishing, Oxford, UK)

5.2.6 Sonstige Geräte und Hilfsmittel

Anaerobiertöpfe:	(Merck, Darmstadt, Deutschland) Anaerocult® System mit Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Autoklav:	Tuttnauer 5075 ELV (Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland)
Ethanolbad:	FOC-1 K40 (Christ, Osterode, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage:	LOC-2 Beta 1-16 (Christ, Osterode, Deutschland)
Inkubationsschrank:	Typ 5090E (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Magnetrührer:	Ikamag RCT (IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland)
Membranpumpe:	PC 520 (Vacuumbrand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland)
pH-Meter:	pH-Digi 520 (WTW, Weilheim, Deutschland) pH-Elektrode HI 1332 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland)
Schlagmessermühle:	Typ A10S (Janke & Kunkel/IKA, Staufen, Deutschland)
Spektralphotometer:	Lambda 2 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland)
Trockenschrank:	(Heraeus, Hanau, Deutschland)
Ultraschallbad:	Bransonic 12 (Elma, Singen, Deutschland)
Vakuumrotationsverdampfer:	VV 2000 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Vakuumtrockenschrank:	RVT 6030 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Vortex:	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Waagen:	Typ 2842 (Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland) BP 211 D (Sartorius-Werke GmbH, Göttingen, Deutschland) P1210 (Mettler, Gießen, Deutschland)
Wasserbäder:	Typ 1012 (GFL, Hannover, Deutschland) (Köttermann, Hänigsen, Deutschland)
Zentrifuge:	UJ III (Heraeus, Hanau, Deutschland)

5.3 Spektren, Diagramme, Chromatogramme und Tabellen

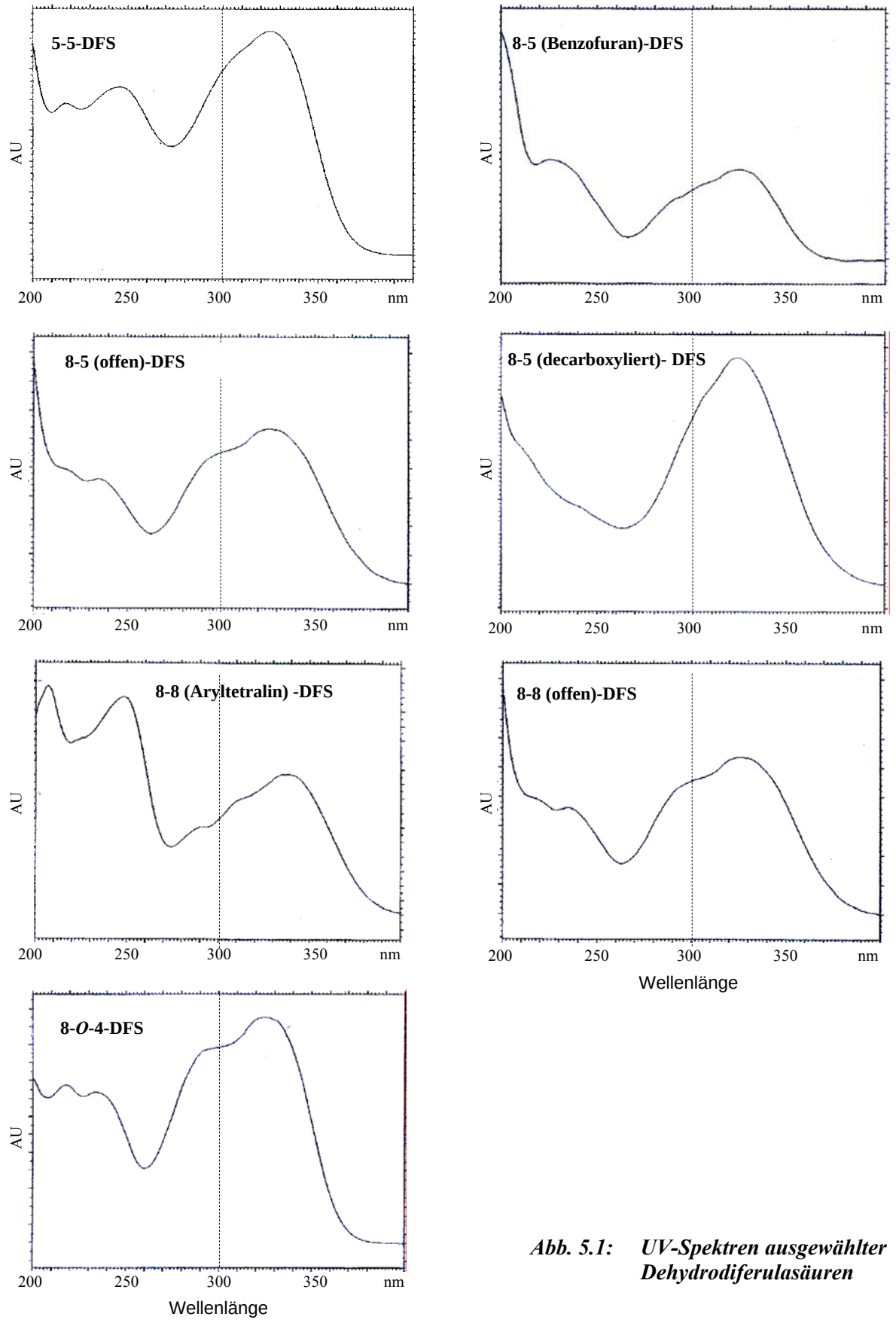


Abb. 5.1: ***UV-Spektren ausgewählter Dehydrodiferulasäuren***

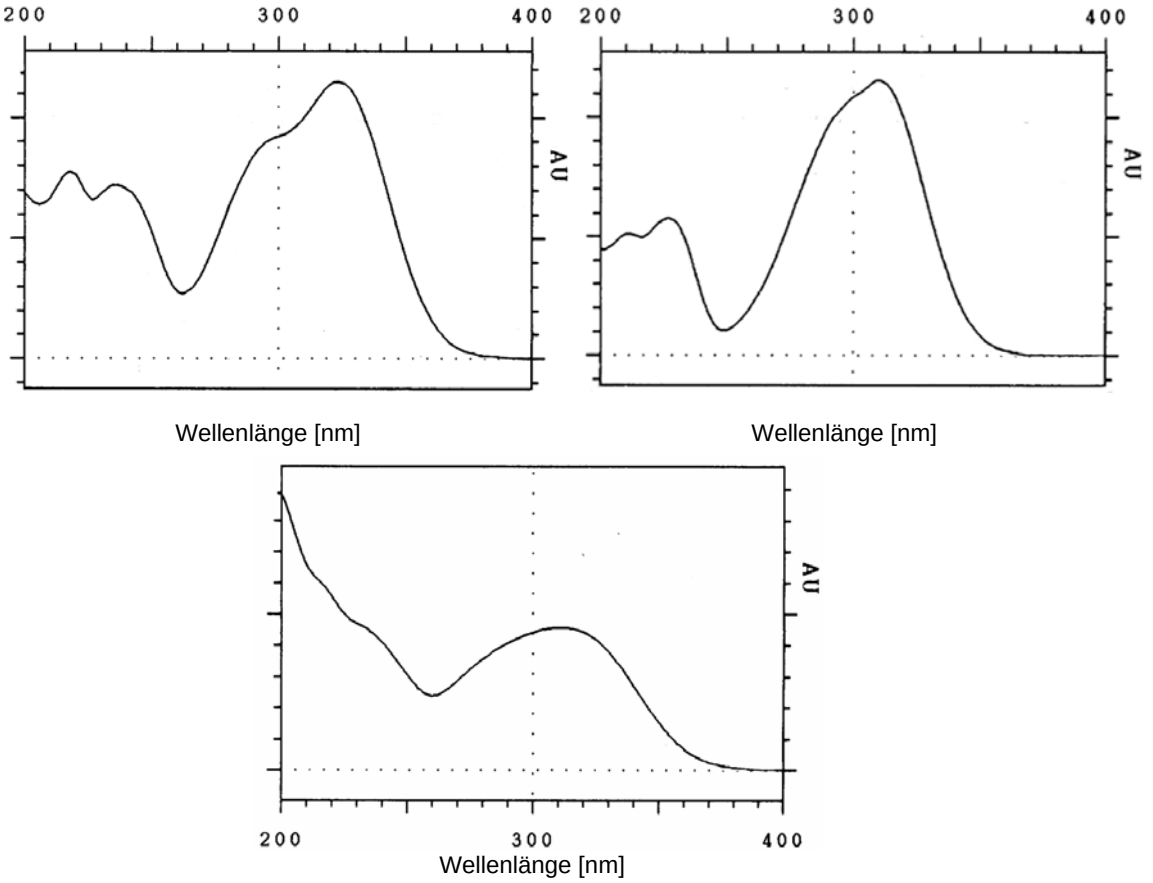


Abb. 5.2: ***UV-Spektren von trans-Ferulasäure (oben links), p-Cumarsäure (oben rechts) und cis-Ferulasäure (unten)***

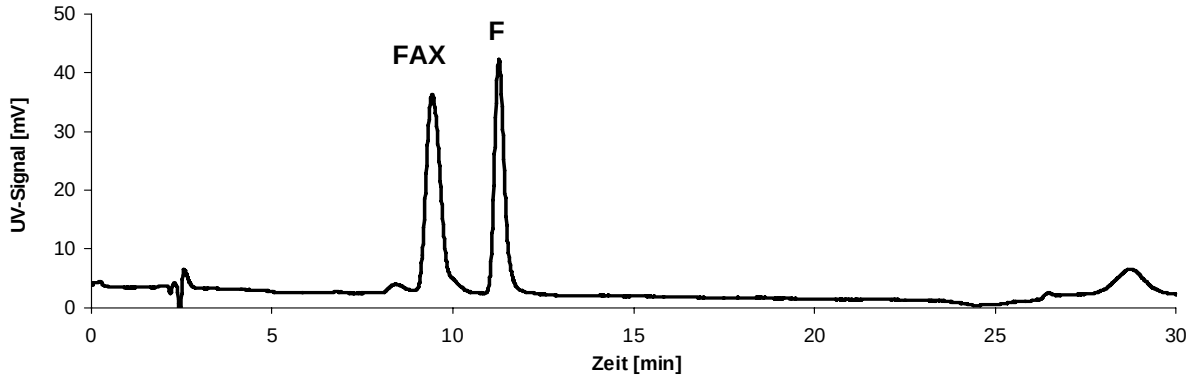


Abb. 5.3: ***RP-HPLC-DAD-Standard-Chromatogramm (Wellenlänge 280 nm) von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) und trans-Ferulasäure (F).*** *Chromatographie-Bedingungen sind in Kapitel 5.2.2.5 beschrieben.*

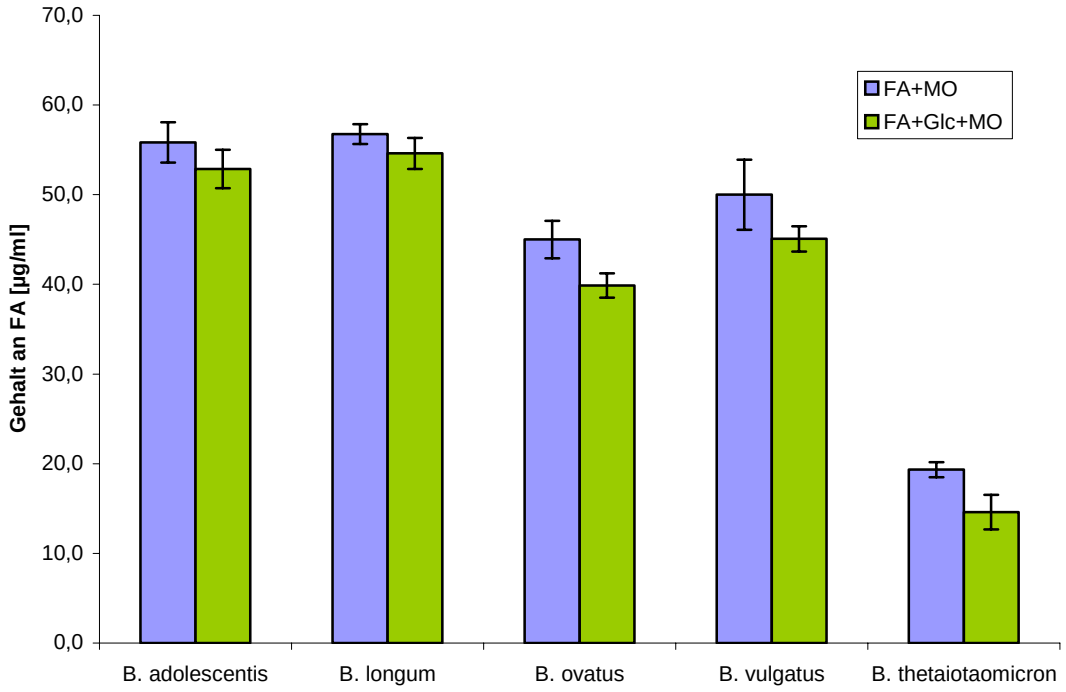


Abb. 5.4: ***Säulendiagramme mit den Gehalten an 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) nach der Inkubation mit Mikroorganismen (MO) in Thioglycolat-Bouillon (blau: ohne Glucose (Glc), grün: mit Glc)***

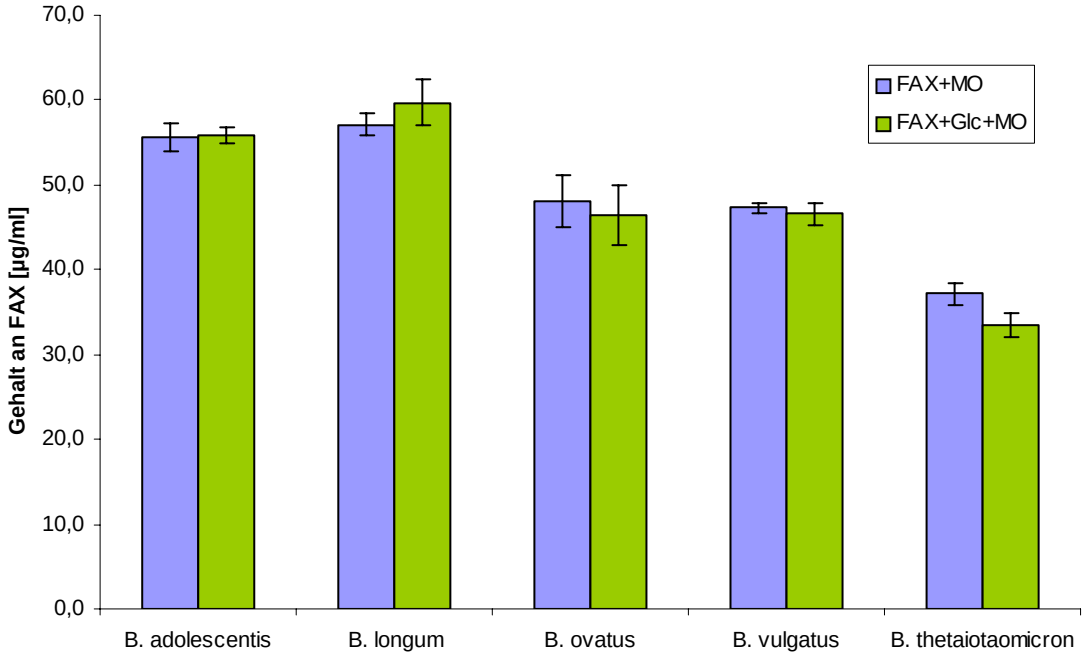


Abb. 5.5: ***Säulendiagramm mit den Gehalten an β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) nach der Inkubation mit Mikroorganismen (MO) in Thioglycolat-Bouillon (blau: ohne Glucose (Glc), grün: mit Glc)***

Tabelle 5.1: ***Keimzahlen (in KBE/mL) vor und nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) und den eingesetzten Vergleichslösungen durch ausgewählte Bakterienstämme.*** *MO: Mikroorganismensuspension, Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Ansätze*	***B. adolescentis***	***B. longum***	***B. ovatus***	***B. vulgatus***	***B. thetaiotaomicron***
FA+MO	$7.0 \cdot 10^6$	$5.2 \cdot 10^6$	$9.3 \cdot 10^7$	$1.6 \cdot 10^6$	$3.0 \cdot 10^6$
Ara+MO	$4.0 \cdot 10^7$	$6.0 \cdot 10^7$	$9.0 \cdot 10^7$	$1.7 \cdot 10^7$	$2.1 \cdot 10^6$
F+Ara+MO	$2.3 \cdot 10^7$	$2.1 \cdot 10^8$	$3.0 \cdot 10^7$	$8.8 \cdot 10^7$	$2.0 \cdot 10^6$
FA+autokl. MO	-	-	-	-	-
H_2O+MO	$6.0 \cdot 10^6$	$5.5 \cdot 10^6$	$3.7 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$
Glc+MO	$2.6 \cdot 10^7$	$2.2 \cdot 10^8$	$5.3 \cdot 10^7$	$2.0 \cdot 10^7$	$1.7 \cdot 10^6$
FA+Glc+MO	$1.5 \cdot 10^7$	$1.0 \cdot 10^8$	$4.9 \cdot 10^7$	$1.6 \cdot 10^7$	$1.9 \cdot 10^6$
Glc+autokl. MO	-	-	-	-	-
Alle Ansätze vor der Fermentation	$1.1 \cdot 10^5$	$5.1 \cdot 10^5$	$3.4 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$2.0 \cdot 10^4$

* Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.1.5.2 und 5.1.5.3 dargestellt

Tabelle 5.2: ***Keimzahlen (in KBE/mL) vor und nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) und den eingesetzten Vergleichslösungen durch ausgewählte Bakterienstämme.*** *MO: Mikroorganismensuspension, Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Ansätze*	***B. adolescentis***	***B. longum***	***B. ovatus***	***B. vulgatus***	***B. thetaiotaomicron***
FAX+MO	$8.5 \cdot 10^6$	$6.1 \cdot 10^6$	$1.2 \cdot 10^8$	$3.2 \cdot 10^6$	$7.0 \cdot 10^6$
Ara+Xyl+MO	$6.0 \cdot 10^7$	$5.0 \cdot 10^7$	$7.3 \cdot 10^7$	$8.5 \cdot 10^7$	$2.0 \cdot 10^7$
F+Ara+Xyl+MO	$4.1 \cdot 10^7$	$2.0 \cdot 10^8$	$8.0 \cdot 10^7$	$2.8 \cdot 10^8$	$1.1 \cdot 10^7$
FAX+autokl. MO	-	-	-	-	-
H_2O+MO	$6.4 \cdot 10^6$	$5.5 \cdot 10^6$	$5.6 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^6$	$2.0 \cdot 10^6$
Glc+MO	$2.9 \cdot 10^7$	$2.2 \cdot 10^8$	$1.1 \cdot 10^8$	$2.0 \cdot 10^7$	$8.2 \cdot 10^6$
FAX+Glc+MO	$3.5 \cdot 10^7$	$6.9 \cdot 10^7$	$4.6 \cdot 10^7$	$1.6 \cdot 10^8$	$9.0 \cdot 10^6$
Glc+autokl. MO	-	-	-	-	-
Alle Ansätze vor der Fermentation	$2.1 \cdot 10^5$	$5.1 \cdot 10^5$	$1.7 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$	$2.8 \cdot 10^4$

* Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.1.5.2 und 5.1.5.3 dargestellt

Tabelle 5.3: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. ovatus.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FA	H_2O	FA+Glc	Ara	F+Ara	Glc
Ameisensäure	395 ± 50	358 ± 83	680 ± 28	558 ± 22	413 ± 28	687 ± 89
Essigsäure	1069 ± 103	924 ± 165	1249 ± 8	1089 ± 22	1011 ± 42	1282 ± 118
Propionsäure	320 ± 34	277 ± 11	246 ± 12	251 ± 26	274 ± 16	254 ± 24
Isobuttersäure	39 ± 8	48 ± 1	48 ± 9	43 ± 3	54 ± 2	54 ± 11
Buttersäure	75 ± 12	64 ± 5	60 ± 3	65 ± 14	64 ± 1	70 ± 1
Isovaleriansäure	130 ± 20	142 ± 27	192 ± 8	168 ± 23	154 ± 20	208 ± 12
Hexansäure	198 ± 104	151 ± 79	201 ± 32	225 ± 15	162 ± 14	299 ± 74
D-Milchsäure	850 ± 98	796 ± 114	1617 ± 208	1715 ± 67	1580 ± 101	1865 ± 9
Bernsteinsäure*	383 ± 42	237 ± 33	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Gesamtgehalt[#]	3459 ± 249	2994 ± 257	4294 ± 139[§]	4115 ± 36[§]	3708 ± 59[§]	4716 ± 296[§]

* Bernsteinsäure wurde bei den mit „n. b.“ gekennzeichneten Ansätzen nicht bestimmt.

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

[§] Bei der Berechnung des Gesamtgehaltes wurde aufgrund der fehlenden Daten die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.4: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. vulgatus.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FA	H_2O	FA+Glc	Ara	F+Ara	Glc
Ameisensäure	278 ± 59	243 ± 2	289 ± 50	343 ± 26	250 ± 39	341 ± 7
Essigsäure	1284 ± 295	1555 ± 233	1517 ± 150	1297 ± 123	1532 ± 200	1579 ± 177
Propionsäure	413 ± 63	450 ± 51	436 ± 28	358 ± 47	391 ± 67	420 ± 19
Isobuttersäure	69 ± 14	51 ± 19	65 ± 10	66 ± 10	62 ± 3	64 ± 6
Buttersäure	67 ± 9	67 ± 8	67 ± 6	64 ± 2	51 ± 8	69 ± 9
Isovaleriansäure	66 ± 11	96 ± 9	84 ± 6	50 ± 1	57 ± 7	90 ± 9
D-Milchsäure	214 ± 71	473 ± 108	1060 ± 21	782 ± 93	1105 ± 57	1017 ± 21
Bernsteinsäure*	474 ± 52	246 ± 31	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Gesamtgehalt[#]	2865 ± 474	3184 ± 380	3519 ± 219[§]	2961 ± 85[§]	3448 ± 296[§]	3581 ± 228[§]

* Bernsteinsäure wurde bei den mit „n. b.“ gekennzeichneten Ansätzen nicht bestimmt.

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

[§] Bei der Berechnung des Gesamtgehaltes wurde aufgrund der fehlenden Daten die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.5: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. thetaiotaomicron.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	**FA**	**H_2O**	**FA+Glc**	**Ara**	**F+Ara**	**Glc**
Ameisensäure	391 ± 80	356 ± 35	308 ± 56	426 ± 24	315 ± 63	308 ± 30
Essigsäure	2157 ± 68	2138 ± 336	2266 ± 468	2563 ± 333	2355 ± 373	1962 ± 273
Propionsäure	684 ± 13	686 ± 63	710 ± 123	697 ± 65	678 ± 16	607 ± 51
Isobuttersäure	47 ± 5	60 ± 9	69 ± 14	62 ± 5	64 ± 8	62 ± 10
Buttersäure	73 ± 3	73 ± 14	69 ± 1	76 ± 3	64 ± 8	67 ± 6
Isovaleriansäure	352 ± 33	412 ± 31	408 ± 42	419 ± 37	403 ± 40	358 ± 38
Hexansäure	1222 ± 204	1259 ± 369	495 ± 56	1012 ± 130	1536 ± 68	625 ± 106
D-Milchsäure	464 ± 56	656 ± 110	734 ± 68	1028 ± 172	970 ± 189	715 ± 20
L-Milchsäure	2965 ± 133	2373 ± 155	3758 ± 220	2764 ± 442	3273 ± 56	3398 ± 152
Bernsteinsäure*	1158 ± 102	1158 ± 95	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Gesamtgehalt[#]	9512 ± 451	9159 ± 669	8769 ± 562[§]	9048 ± 456[§]	9552 ± 397[§]	8104 ± 636[§]

* Bernsteinsäure wurde bei den mit „n. b.“ gekennzeichneten Ansätzen nicht bestimmt.

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

[§] Bei der Berechnung des Gesamtgehaltes wurde aufgrund der fehlenden Daten die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.6: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. adolescentis.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	**FA**	**H_2O**	**FA+Glc**	**Ara**	**F+Ara**	**Glc**
Ameisensäure	265 ± 70	237 ± 33	454 ± 33	382 ± 48	404 ± 43	408 ± 24
Essigsäure	741 ± 28	801 ± 92	1800 ± 75	1497 ± 45	1341 ± 165	1522 ± 100
Isobuttersäure	39 ± 9	43 ± 5	27 ± 6	24 ± 3	31 ± 7	43 ± 5
Buttersäure	75 ± 9	74 ± 3	78 ± 1	81 ± 5	84 ± 15	69 ± 2
L-Milchsäure	78 ± 20	110 ± 9	463 ± 63	530 ± 60	495 ± 61	369 ± 1
Gesamtgehalt[#]	1199 ± 100	1266 ± 113	2821 ± 105	2514 ± 63	2354 ± 172	2413 ± 119

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

Tabelle 5.7: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von 5-O-trans-Feruloyl-L-arabinofuranose (FA) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. longum.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FA	H_2O	FA+Glc	Ara	F+Ara	Glc
Ameisensäure	263 ± 54	235 ± 37	413 ± 139	232 ± 24	315 ± 37	308 ± 15
Essigsäure	691 ± 122	668 ± 28	1932 ± 135	1489 ± 97	1582 ± 75	2075 ± 35
Isobuttersäure	36 ± 5	47 ± 7	41 ± 1	44 ± 5	49 ± 6	39 ± 1
Buttersäure	72 ± 4	79 ± 3	59 ± 5	75 ± 6	60 ± 5	74 ± 5
L-Milchsäure	230 ± 14	239 ± 7	835 ± 99	980 ± 4	1077 ± 14	996 ± 7
Gesamtgehalt[#]	1277 ± 159	1295 ± 89	3277 ± 205	2833 ± 113	3083 ± 107	3491 ± 56

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

Tabelle 5.8: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. ovatus.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FAX	H_2O	FAX+Glc	Ara+Xyl	F+Ara+Xyl	Glc
Ameisensäure	500 ± 48	348 ± 65	513 ± 76	665 ± 159	361 ± 37	537 ± 17
Essigsäure	1119 ± 85	901 ± 193	998 ± 162	1057 ± 145	696 ± 208	1002 ± 90
Propionsäure	354 ± 18	373 ± 40	328 ± 55	296 ± 26	258 ± 16	321 ± 19
Isobuttersäure	86 ± 8	103 ± 6	93 ± 7	89 ± 7	74 ± 22	86 ± 8
Buttersäure	56 ± 8	53 ± 2	66 ± 15	58 ± 5	54 ± 9	58 ± 5
Isovaleriansäure	388 ± 38	406 ± 51	433 ± 41	411 ± 10	348 ± 70	413 ± 24
Hexansäure	484 ± 28	285 ± 134	350 ± 139	442 ± 113	306 ± 34	394 ± 109
D-Milchsäure	3055 ± 196	2739 ± 155	3857 ± 298	3439 ± 248	3945 ± 243	3835 ± 10
Bernsteinsäure*	292 ± 32	310 ± 27	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Gesamtgehalt[#]	6333 ± 95	5519 ± 343	6637 ± 623[§]	6456 ± 654[§]	6041 ± 219[§]	6648 ± 229[§]

***** Bernsteinsäure wurde bei den mit „n. b.“ gekennzeichneten Ansätzen nicht bestimmt.

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

[§] Bei der Berechnung des Gesamtgehaltes wurde aufgrund der fehlenden Daten die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.9: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. vulgatus.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FAX	H_2O	FAX+Glc	Ara+Xyl	F+Ara+Xyl	Glc
Ameisensäure	259 ± 13	243 ± 2	302 ± 35	293 ± 33	243 ± 48	341 ± 7
Essigsäure	1367 ± 97	1555 ± 233	1794 ± 280	1454 ± 163	1462 ± 235	1579 ± 177
Propionsäure	382 ± 1	450 ± 51	504 ± 96	400 ± 49	437 ± 84	420 ± 19
Isobuttersäure	44 ± 1	51 ± 19	72 ± 8	43 ± 3	54 ± 2	64 ± 6
Buttersäure	65 ± 9	67 ± 8	73 ± 6	69 ± 8	52 ± 9	69 ± 9
Isovaleriansäure	77 ± 9	96 ± 9	92 ± 5	74 ± 7	59 ± 7	90 ± 9
D-Milchsäure	349 ± 67	473 ± 108	1188 ± 26	1141 ± 68	1210 ± 53	1017 ± 21
Bernsteinsäure*	411 ± 42	246 ± 31	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Gesamtgehalt[#]	2955 ± 175	3184 ± 380	4022 ± 424[§]	3476 ± 276[§]	3555 ± 331[§]	3581 ± 228[§]

***** Bernsteinsäure wurde bei den mit „n. b." gekennzeichneten Ansätzen nicht bestimmt.

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

[§] Bei der Berechnung des Gesamtgehaltes wurde aufgrund der fehlenden Daten die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.10: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. adolescentis.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FAX	H_2O	FAX+Glc	Ara+Xyl	F+Ara+Xyl	Glc
Ameisensäure	387 ± 52	367 ± 39	576 ± 50	925 ± 130	949 ± 122	704 ± 33
Essigsäure	878 ± 122	771 ± 58	1887 ± 50	2110 ± 253	2178 ± 218	2270 ± 62
Isobuttersäure	28 ± 7	35 ± 7	0 ± 0	50 ± 11	30 ± 9	28 ± 22
Buttersäure	62 ± 9	70 ± 8	62 ± 8	65 ± 11	60 ± 18	59 ± 0
L-Milchsäure	130 ± 8	122 ± 2	618 ± 33	574 ± 42	537 ± 61	707 ± 7
Gesamtgehalt[#]	1484 ± 160	1366 ± 101	3147 ± 59	3728 ± 391	3754 ± 395	3767 ± 14

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

Tabelle 5.11: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. thetaiotaomicron.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FAX	H_2O	FAX+Glc	Ara+Xyl	F+Ara+Xyl	Glc
Ameisensäure	441 ± 65	491 ± 20	400 ± 28	565 ± 24	465 ± 30	430 ± 30
Essigsäure	1207 ± 85	1361 ± 132	1046 ± 123	1324 ± 42	1286 ± 82	1159 ± 8
Propionsäure	487 ± 4	483 ± 13	428 ± 13	393 ± 27	552 ± 23	412 ± 8
Isobuttersäure	51 ± 11	36 ± 8	48 ± 6	45 ± 2	66 ± 8	39 ± 1
Buttersäure	64 ± 7	59 ± 1	64 ± 7	60 ± 2	64 ± 2	57 ± 2
Isovaleriansäure	198 ± 14	212 ± 12	182 ± 20	224 ± 30	187 ± 15	176 ± 12
Hexansäure	197 ± 9	275 ± 16	257 ± 9	296 ± 22	325 ± 89	290 ± 40
D-Milchsäure	1190 ± 20	1229 ± 37	1291 ± 20	1980 ± 14	1988 ± 58	1284 ± 30
L-Milchsäure	2311 ± 40	2284 ± 39	2975 ± 51	2246 ± 18	2333 ± 40	3277 ± 117
Bernsteinsäure*	529 ± 52	465 ± 39	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Gesamtgehalt[#]	6676 ± 244	6894 ± 115	6690 ± 174[§]	7132 ± 33[§]	7266 ± 346[§]	7113 ± 266[§]

* Bernsteinsäure wurde bei den mit „n. b." gekennzeichneten Ansätzen nicht bestimmt.

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

[§] Bei der Berechnung des Gesamtgehaltes wurde aufgrund der fehlenden Daten die Bernsteinsäure nicht berücksichtigt.

Tabelle 5.12: ***Gehalte an nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren nach der Fermentation von β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX) bzw. von den eingesetzten Vergleichslösungen mit B. longum.*** *Glc: Glucose, Ara: Arabinose, Xyl: Xylose, F: trans-Ferulasäure*

Gehalt in [µmol/L]	FAX	H_2O	FAX+Glc	Ara+Xyl	F+Ara+Xyl	Glc
Ameisensäure	263 ± 11	235 ± 37	295 ± 22	226 ± 35	287 ± 28	308 ± 15
Essigsäure	733 ± 55	668 ± 28	1762 ± 60	1299 ± 115	1739 ± 63	2075 ± 35
Isobuttersäure	56 ± 19	47 ± 7	44 ± 7	47 ± 5	50 ± 7	39 ± 1
Buttersäure	74 ± 3	79 ± 3	64 ± 6	51 ± 3	62 ± 3	74 ± 5
L-Milchsäure	223 ± 33	239 ± 7	868 ± 74	1117 ± 84	1087 ± 9	996 ± 7
Gesamtgehalt[#]	1336 ± 79	1295 ± 89	3034 ± 97	2738 ± 198	3224 ± 89	3491 ± 56

[#] Zur Berechnung des Gesamtgehalte wurden die molekularen Gehalte von allen nachgewiesenen kurzkettigen Fettsäuren und organischen Säuren berücksichtigt.

5.4 Verwendete Enzyme, Nährmedien und Chemikalien

Substanz	Gefahren-symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26	Merck
Aceton-d6	F	11-36-66-67	9-16-26	Isotec
Acetonitril (HPLC-Grade)	F, T	11-23/24/25	16-27-45	Acros
Agar-Agar	-	-	-	Merck
Amberlite® XAD-2	-	-	-	Serva
Ameisensäure p.a. 98- 100 %	C	35	23-26-45	Merck
Ammoniaklösung 25 %ig Suprapur®	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61	Merck
D (-)-Arabinose	-	-	-	Sigma
L (+)-Arabinose	-	-	-	Sigma
Bernsteinsäure-Enzymsatz	-	-	-	R-Biopharm
Bio-Gel® P-2	-	-	-	Bio-Rad
Buttersäure	C	34	26-36-45	Merck
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37	Merck
L-Cystein, Hydrochlorid	-	-	-	Merck
L-Cystin	-	-	-	Merck
Deuteriumoxid	-	-	-	Sigma
Dichlormethan	Xn	40	22-24/25-36/37	Merck
Dimethylsulfoxid	Xn	36/37/38	26-36	Fluka
meso-Erythrit	-	-	-	Merck
Essigsäure 100 %	C	10-35	23-26-45	Merck
Essigsäureanhydrid	C	10-34	26-45	Acros
Ethanol	F	11	7-16	Merck
2-Ethylbuttersäure	Xn	21-36/38	26-36/37	Merck
trans-Ferulasäure	Xi	36/37/38	26-36	Sigma
Fleischextrakt	-	-	-	Merck
D (+)-Galactose	-	-	-	Acros
L (-)-Galactose	-	-	-	Acros
D (+)-Glucose (wasserfrei)	-	-	-	Merck
D (+)-Glucose-Monohydrrat	-	-	-	Merck
Glycerin	-	-	-	Merck
Hefeextrakt	-	-	-	Merck
n-Hexan	F, Xn	11 –48/20	9-16-24/25	Merck
Hexansäure	C	21-34	25-36/37/39-45	Acros
myo-Inosit	-	-	-	Merck
Isobuttersäure	Xn	21/22	-	Merck

Substanz	Gefahren-symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Isohexansäure	C	21-34	25-36/37/39-45	Acros
Isovaleriansäure	C	34	26-36/37/39-45	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	-	-	-	Merck
Kochfleischmedium	-	-	-	Fluka
D (+)-Mannose	-	-	-	Merck
Methanol	T, F	11-23/25	16-24-45-7	Baker
1-Methylimidazol	C	21/22-34	26-36	Acros
Methyliodid	T	21-23/25-37/38-40	36/37-38-45	Aldrich
D-/L-Milchsäure-Enzymsatz	-	-	-	R-Biopharm
Natrium-L(+)-ascorbat	-	-	-	Merck
Natriumbordeuterid	T, F	11-15-23/24/25-34	16-36-43	Acros
Natriumborhydrid	T, F+	15-25-34	14.2-26-36/37/39-43.6-45	Fluka
Natriumchlorid	-	-	-	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	-	-	-	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	-	-	-	Merck
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45	Merck
Natriumthioglycolat	T	25-36/37/38-43	24-26-37-45	Merck
Pepton aus Casein	-	-	-	Merck
Phosphorsäure 85 %	C	34	26-36/37/38-45	Merck
Propionsäure	C	34	23.2-36-45	Merck
Polyvinylpolypyrrolidon Divergan® RS 1	-	-	-	Merck
Resazurin	-	-	-	Merck
Sephadex™ LH-20	-	-	-	Pharmacia
Schwefelsäure 95-98 %	C	35	26-30-45	Merck
Siliconöl	-	-	24/25-26	Merck
Termamyl (α-Amylase) 120 KNU/g	-	-	-	Novo Nordisk
Thioglycolat-Nährboden	Xi	43	24-37	Merck
Trifluoressigsäure	C	20-36-52/53	9-26-27-28-45-61	Merck
Trifluoressigsäureanhydrid	C	20-35-52/53	9-26-36/37/39-45-61	Merck
Tween® 80	-	-	-	Merck
Valeriansäure	C	34-52/53	26-36-45-61	Merck
D (+)-Xylose	-	-	-	Acros
L (-)-Xylose	-	-	-	Acros

6 Literatur

AACC-Report, The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46, 112-126 (2001).

Amado, R., In *Physiological effects of dietary fibre*, Macromolecules and their degradation products in food - Physiological, analytical and technological aspects, Hamburg, 2005, Eklund, T., Schwarz, M., Steinhart, H., Thier, H.-P., Winterhalter, P., Eds. Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.: Hamburg, 297-304 (2005).

Andersson, R. and Aman, P., Cereal arabinoxylan: Occurence, structure and properties. In *Advanced dietary fibre technology*, McCleary, B. and Prosky, L., Blackwell Science: Oxford, 301-314 (2001).

Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S. and Hansen, A., Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2837-2842 (2000).

Andreasen, M. F., Kroon, P. A., Williamson, G. and Garcia-Conesa, M.-T., Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5679-5684 (2001).

Besle, J. M., Jouany, J.-P. and Cornu, A., Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 33-52 (1995).

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. and 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*, 361, 1496-1501 (2003).

Björndal, H., Lindberg, B., Pilotti, A. and Svensson, S., Mass spectra of partially methylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.*, 15, 339-349 (1970).

Björndal, H., Lindberg, B. and Svensson, S., Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. *Acta Chem. Scand.*, 21, 1801-1804 (1967).

Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J. and Stone, B. A., A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.*, 113, 291-299 (1983).

Blaut, M., Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr.*, 41 [Suppl1], I/11-I/16 (2002).

Borneman, W. S., Akin, D. E. and VanEseltine, W. P., Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1331-1339 (1986).

Borneman, W. S., Hartley, R. D., Himmelsbach, D. S. and Ljungdahl, L., Assay for trans-p-coumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. *Anal. Biochem.*, 190, 129-133 (1990).

Bunzel, M., Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. *Dissertation.* Hamburg, (2001).

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.*, 214, 482-488 (2002a).

Bunzel, M., Funk, C. and Steinhart, H., Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *J. Sep. Sci.*, 27, 1080-1086 (2004).

Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P. and Steinhart, H., Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from isoluble meize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6409-6418 (2006).

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.*, 217, 128-133 (2003).

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.*, 46, 5845-5850 (2005).

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.*, 48, 3166-3169 (2000).

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.*, 81, 653-660 (2001).

Bunzel, M., Steinhart, H. and Ralph, J., Strukturbildende phenolische Verbindungen in Getreideballaststoffen am Beispiel löslicher und unlöslicher Roggenballaststoffe. In *Getreide, Mehl und Brot*, 281-286 (2002b).

Burkitt, D. P., Walker, A. R. P. and Painter, N. S., Effect of dietary fibre on stools and transit times and its role in the causation of disease. *Lancet*, II, 1408-1411 (1972).

Carlier, J.-P. and Sellier, N., Gas chromatographic-mass spectral studies after methylation of metabolites produced by some anaerobic bacteria in spent media. *J. Chromatogr.*, 493, 257-273 (1989).

Carpita, N. C., The chemical structure of the cell walls of higher plants. In *Dietary fiber: Chemistry, physiology and health effects*, Kritchevsky, D., Bonfield, C. and Anderson, J. W., Plenum Press: New York, 15-30 (1990).

Chesson, A., Provan, G. J., Russell, W. R., Scobbie, L., Richardson, A. J. and Stewart, C., Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 373-378 (1999).

Ciucanu, I. and Kerek, F., A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 131, 209-217 (1984).

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.*, 263, 243-256 (1994).

Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerström, R., Mättö, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K., *In vitro* fermentation of cereal dietary

fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *J. Sci. Food Agr.*, 82, 781-789 (2002).

Cummings, J. H. and MacFarlane, G. T., Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J. Parenter. Enteral Nutr.*, 21, 357-365 (1997).

Dervilly-Pinel, G., Thibault, J. F. and Saulnier, L., Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydr. Res.*, 330, 365-372 (2001).

Dongowski, G., Lorenz, A. and Anger, H., Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1321-1327 (2000).

Faulds, C. B., Kroon, P. A., Saulnier, L., Thibault, J. F. and Williamson, G., Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydr. Polym.*, 27, 187-190 (1995).

Faulds, C. B. and Williamson, G., The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 393-395 (1999).

Ford, C. W., A feruloylated arabinoxylan liberated from cell-walls of *Digitaria decumbens* (Pangola Grass) by treatment with borohydride. *Carbohydr. Res.*, 190, 137-144 (1989).

Fry, S. C., Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37, 165-186 (1986).

Fry, S. C., Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochem. Rev.*, 3, 97-111 (2004).

Fuller, R., Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378 (1989).

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

Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H. and 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, 363-371 (2005).

Fussell, R. J. and McCalley, D. V., Determination of volatile fatty acids (C_2-C_5) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst*, 112, 1213-1216 (1987).

Gibson, G. R., In *COST Action 92, Dietary fibre and fermentation in the colon*, An overview of the composition and activities of the human colonic microbiota, Espoo, Finland, Luxembourg: Office for official publications of the European Communities, Eds. Mälkki, Y. and Cummings, J. H., 11-23 (1996).

Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. and Nudelmann, A., NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.*, 62, 7512-7515 (1997).

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.*, 77, 193-200 (1998).

Grabber, J. H., Hatfield, R. D., Ralph, J., Zon, J. and Amrhein, N., Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions. *Phytochemistry*, 40, 1077-1082 (1995).

Grbic-Galic, D., Fermentative and oxidative transformation of ferulate by a facultatively anaerobic bacterium isolated from sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1052-1057 (1985).

Grbic-Galic, D., O-Demethylation, dehydroxylation, ring-reduction and cleavage of aromatic substrates by Enterobacteriaceae under anaerobic conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, 61, 491-497 (1986).

Grbic-Galic, D. and Young, L. Y., Methane fermentation of ferulate and benzoate: anaerobic degradation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 292-297 (1985).

Haenel, H. and Grütte, F.-K., Stoffwechselprozesse der Darmflora. *Die Nahrung*, 6/7, 647-657 (1984).

Hantus, S., Pauly, M., Darvill, A. G., Albersheim, P. and York, W. S., Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. *Carbohydr. Res.*, 304, 11-20 (1997).

Harris, P. J. and Ferguson, L. R., Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Mutation Res.*, 443, 95-110 (1999).

Hartley, R. D., Morrison, W. H., Himmelsbach, D. S. and Borneman, W. S., Cross-linking of cell-wall phenolic arabinoxylans in gramineous plants. *Phytochemistry*, 29, 3705-3709 (1990).

Hatfield, R. D. and Ralph, J., Modelling the feasibilty of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 425-427 (1999).

Hatfield, R. D., Ralph, J. and Grabber, J. H., Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 403-407 (1999).

He, L. and Terashima, N., Formation and structure of lignin in monocotyledons. II. Deposition and distribution of phenolic acids and their association with cell wall polymers in rice plants *(Oryza sativa)*. *Mokuzai Gakkaishi*, 35, 123-129 (1989).

Hespell, R. B. and O'Bryan, P. J., Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 58, 1082-1088 (1992).

Hipsley, E. H., Dietary "fibre" and pregnancy toxaemia. *Brit. Med.*, 42, 420-422 (1953).

Holdeman, L. V., Kelley, R. W. and Moore, W. E. C., Family I. Bacteroidaceae Pribram 1933. In *Bergey's manual of systematic bacteriology,*, Krieg, N. R. and Holt, J. G., Springer: New York, 602-615 (1984).

Hopkins, M. J., Englyst, H. N., MacFarlane, S., Furrie, E., MacFarlane, G. T. and McBain, A. J., Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6354-6360 (2003).

Ishii, T., Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydr. Res.*, 219, 15-22 (1991).

Ishii, T., Isolation and characterization of *p*-coumaroyl arabinoxylan tetrasaccharide from bamboo shoot cell. *Mokuzai Gakkaishi*, 42, 515-519 (1996).

Ishii, T., Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.*, 127, 111-127 (1997).

Ishii, T., Hiroi, T. and Thomas, J. R., Feruloylated xyloglucan and para-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 29, 1999-2003 (1990).

Ishii, T. and Tobita, T., Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach-leaf cell-walls. *Carbohydr. Res.*, 248, 179-190 (1993).

Izydorczyk, M. S. and Biliaderis, C. G., Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.*, 28, 33-48 (1995).

Jansson, P.-E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B. and Lönngren, J., A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. In *Chem. Commun.*, Stockholm, 1-74 (1976).

Karplus, M., Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.*, 30, 11-15 (1959).

Karplus, M., Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 2870-2871 (1963).

Kato, A., Azuma, J. and Koshijima, T., Isolation and identification of a new feruloylated tetrasaccharide from bagasse lignin-carbohydrate complex containing phenolic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1691-1693 (1987).

Kato, Y. and Nevins, D. J., Isolation and identification of O-(5-*O*-feruloyl-α-L-arabinofuranosyl)-(1→3)-β–D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. *Carbohydr. Res.*, 137, 139-150 (1985).

Kerr, E. M. and Fry, S. C., Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture. *Planta*, 217, 327-339 (2003).

Krausse, R. and Ullmann, U., A modified procedure for the identification of anerobic bacteria be hygh performance liquid chromatography - quantitative analysis of short-chain faty acids. *Zbl. Bakt.*, 276, 1-8 (1991).

Kroon, P. A., Conesa, M. T. G., Colquhoun, I. J. and Williamson, G., Process for the isolation of preparative quantities of [2-O-(trans-feruloyl)-alpha-L-arabinofuranosyl]-(1->5)-L-arabinofuranose from sugarbeet. *Carbohydr. Res.*, 300, 351-354 (1997a).

Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A. and Williamson, G., Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 661-667 (1997b).

Lequart, C., Nuzillard, J. M., Kurek, B. and Debeire, P., Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 319, 102-111 (1999).

Lindberg, B., Methylation analysis of polysacchrides. In *Methods in Enzymology*, Ginsburg, V., Academic Press: New York, London, 178-195 (1972).

MacFarlane, G. T., Hay, S., MacFarlane, S. and Gibson, G. R., Effect of different carbohydrates on growth, polysaccharidase and glucosidase production by Bacteroides ovatus, in batch and continuous culture. *1990*, 68, 179-187 (1990).

MacFarlane, G. T. and MacFarlane, S., Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol. - Suppl.*, 222, 3-9 (1997).

Margolles, A. and de los Reyes-Gavilan, C. G., Purification and functional characterization of a novel alpha-L-arabinoduranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *69*, 9, 5096-5103 (2003).

Martin, S. A., Morrison, W. H. and Akin, D. E., Fermentation of maize bran, oat bran, and wheat bran by Bacteroides ovatus V975. *Curr. Microbiol.*, 36, 90-95 (1998).

McCallum, J. A., Taylor, I. E. P. and Towers, G. H. N., Spectrophotometric assay and electrophoretic detection of trans-feruloyl esterase activity. *Anal. Biochem.*, 196, 360-366 (1991).

McCarthy, R. E., Pajeau, M. and Salyers, A. A., Role of starch as a substrate for *Bacteroides vulgatus* growing in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1911-1916 (1988).

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.*, 70, 133-150 (1996).

Micard, V., Grabber, J. H., Ralph, J., Renard, C. M. G. C. and Thibault, J. F., Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry*, 44, 1365-1368 (1997).

Mueller-Harvey, I., Hartley, R. D., Harris, P. J. and Curzon, E. H., Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.*, 148, 71-85 (1986).

Ng, A., Greenshields, R. N. and Waldron, K. W., Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: Formation of ferulic acid dehydrodimers. *Carbohydr. Res.*, 303, 459-462 (1997).

Nunes, F. M. and Coimbra, M. A., Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted arabica coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1773-1782 (2001).

Nunn, J. R., Parolis, H. and Russell, I., Sulfated polysaccharides of the Solieriaceae family. I. Polysaccharide from *Anatheca dentata*. *Carbohydr. Res.*, 20, 205-215 (1974).

Ohta, T., Yamasaki, S., Egashira, Y. and Sanada, H., Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 653-656 (1994).

Packert, M., Analytik und Bedeutung gebundener aromatischer Carbonsäuren der Nahrungsfaser aus Getreide und anderen Nutzpflanzen. *Dissertation.* Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Hamburg (1993).

Parr, A. J., Ng, A. and Waldron, K. W., Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2468-2471 (1997).

Parr, A. J., Waldron, K. W., Ng, A. and Parker, M. L., The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J. Sci. Food Agric.*, 71, 501-507 (1996).

Pena, M. J., Vergara, C. E. and Carpita, N. C., The structure and architectures of plant cell walls define dietary fibre composition and the textures of food. In *Advanced dietary fibre technology*, McCleary, B. and Prosky, L., Blanckwell Science: Oxford, (2001).

Pichardt, K., Lebensmittelmikrobiologie: Grundlagen für die Praxis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 42-43 (1998).

Plaami, S. P., Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev. Int.*, 13, 29-76 (1997).

Pomare, E. W., Branch, W. J. and Cummings, J. H., Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J. Clin. Invest.*, 75, 1448-1454 (1985).

Priebe, M. G., Vonk, R. J., Sun, X., He, T., Harmsen, H. J. M. and Welling, G. W., The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *Eur. J. Nutr.*, 41 [Suppl 1], I/2-I/10 (2002).

Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., deVries, J. W. and Furda, I., Determination of soluble and insoluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 75, 360-367 (1992).

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*, 2351-2358 (1997).

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.*, 263, 227-241 (1994).

Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Lu, F., Kim, H., Grabber, J. H., Ralph, S. A., Jimenez-Monteon, G. and Steinhart, H., Diferulates analysis: new diferulates and disinapates in insoluble cereal fibre. *Polyphénols Actualités*, 13-17 (2000).

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.*, 3, 79-96 (2004a).

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.*, 275, 167-178 (1995).

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*, Lewis, N. G. and Sarkanen, S., American Chemical Society: Washington, DC, 209-236 (1998).

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.*, 3, 29-60 (2004b).

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*, 3485-3498 (1994).

Rasic, J. L. and Kurmann, J. A., Bifidobacteria and their role : microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography / Jeremija Lj. Rašic; Joseph A. Kurmann. - Bifidobacteria and their role : microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography., Birkhäuser, Basel [u.a.], (1983).

Reddy, N. R., Palmer, J. K., Pierson, M. D. and Bothast, R. J., Intracellular glycosidases of human colon *Bacteroides ovatus* B4-11. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 890-892 (1984).

Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R. and Rastall, R. A., A comparative on vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 878-887 (2001).

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M. and Rowland, I., Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.*, 80, Suppl.1, 174-171 (1998).

Salyers, A. A., Balascio, J. R. and Palmer, J. K., Breakdown of xylan by enzymes from human colonic bacteria. *Food Biochem.*, 6, 39-55 (1982).

Salyers, A. A., Gherardini, F. and O'Brien, M., Utilization of xylan by two species of human colonic Bacteroides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 1065-1068 (1981).

Salyers, A. A. and Pajeau, M., Competitiveness of different polysaccharide utilization mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron* in the intestinal tracts of germfree mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2572-2578 (1989).

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.*, 320, 82-92 (1999).

Saulnier, L., Vigouroux, J. and Thibault, J. F., Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydr. Res.*, 272, 241-253 (1995).

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.*, 54, 5142-5148 (2006).

Schatz, P. F., Ralph, J., Lu, F., Guzei, I. A. and Bunzel, M., Synthesis and identification of 2,5-di(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).

Scheppach, W., Ernährungsmedizinische Bedeutung von komplexen Kohlenhydraten. In *Kohlenhydrate in der Ernährungsmedizin unter besonderer Berücksichtigung des Zuckers*, Kluthe, R. and Kasper, H., Georg Thieme Verlag: Stuttgart, (1996).

Scheppach, W. M., Fabian, C. E. and Kasper, H. W., Fecal short-chain fatty acid (SCFA) analysis by capillary gas-liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.*, 46, 641-646 (1987).

Sharp, R., Fishbain, S. and MacFarlane, G. T., Effect of short-chain carbohydrates on human intestinal bifidobacteria and Escherichia coli in vitro. *J. Med. Microbiol.*, 50, 152-160 (2001).

Sölter, S., Identifizierung und Synthese von Naturstoffen aus borealen Schwämmen. *Dissertation.* Hamburg, (2004).

Stein, J., Kulemeier, J., Lembcke, B. and Caspary, W. F., Simple and rapid method for the determination of short-chain fatty acids in biological materials by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.*, 576, 53-61 (1992).

Takano, R., Shiomoto, K., Kamei, K., Hara, S. and Hirase, S., Occurence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Dugenea simplex* (Wulfen) C. Agardt (Rhodemelaceae, Geramiales) with a short review of carrageenan-agarcolloid hybrid in the Florid-eophycidae. *Bot. Marina*, 46, 142-150 (2003).

Tangermann, A. and Nagengast, F. M., A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. *Anal. Biochem.*, 236, 1-8 (1996).

Theander, O., Westerlund, E. and Aman, P., Structure and components of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 38, 135-138 (1993).

Trowell, H. C., Crude fibre, dietary fibre, and artherosclerosis. *Artherosclerosis*, 16, 138 (1972a).

Trowell, H. C., Ischemic heart disease and dietary fibre. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25, 926-932 (1972b).

Trowell, H. C., Definition of dietary fibre. *Lancet*, I, 503 (1974).

Van Laere, K. M. J., Beldman, G. and Voragen, A. G. J., A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 231-235 (1997).

Van Laere, K. M. J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A. and Voragen, A. G. J., Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1644-1652 (2000).

Waldron, K. W., Ng, A., Parker, M. L. and Parr, A. J., Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of Beta vulgaris and their possible role in texture. *J. Sci. Food Agric.*, 74, 221-228 (1997).

Waldron, K. W., Parr, A. J., Ng, A. and Ralph, J., Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem. Anal.*, 7, 305-312 (1996).

Wang, X., Geng, X., Egashira, Y. and Sanada, H., Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2367-2372 (2004).

Watzl, B. and Rechkemmer, G., Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau*, 48, 413-416 (2001).

Weaver, J., Whitehead, T. R., Cotta, M. A., Valentine, P. C. and Salyers, A. A., Genetic analysis of a locus on the *Bacteroides ovatus* Chromowsome which contains xylan utilization genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2764-2770 (1992).

Wende, G., Buchanan, C. J. and Fry, S. C., Hydrolysis and fermentation by rat gut microorganisms of 2-*O*-β-D-xylopyranosyl-(5-*O*-feruloyl)-L-arabinose derived from grass cell wall arabinoxylan. *J. Sci. Food Agric.*, 73, 296-300 (1997).

Wende, G. and Fry, S. C., 2-O-beta-D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry*, 44, 1019-1030 (1997).

Whitehead, T. R. and Hespell, R. B., The genes for three xylan-degrading activities from *Bacteroides ovatus* are clustered in a 3.8-kilobase region. *J. Bacteriol.*, 172, 2408-2412 (1990).

Wood, P. J., Cereal β-glucans: Structure, properties and health claims. In *Advanced dietary fibre technology*, McCleary, B. and Prosky, L., Blackwell Science: Oxford, (2001).

Zanger, M., The determination of aromatic substitution patterns by nuclear magnetic resonance. *Org. Magn. Reson.*, 4, 1-25 (1972).

Lebenslauf

Name:	Ella Allerdings, geb. Müller
Geburtsdatum:	11.06.1974
Geburtsort:	Naltschik (Rußland)

Schulbildung

09.1981 – 06.1991	Mittelschule, Naltschik, Russland
12.1991 – 07.1992	GFBA e.V., Hamburg, Intensivsprachkurs Deutsch
09.1992 – 07.1996	Emil-Krause-Gymnasium, Hamburg
07.1996	Abitur

Hochschulstudium

10.1996 – 03.2001	Studiengang Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
03.2001	Erste lebensmittelchemische Staatsprüfung
	Diplom in Lebensmittelchemie

Promotion

05.2001	Beginn der Promotion
	Abteilung Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
10.2004	Ende der praktischen Arbeiten
2007	Disputation

Praktika

11.2004 – 04.2005	Praktikum bei der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg
07.2005	Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung

Berufstätigkeit

seit 02.2006	SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH, Taunusstein
	Projektleiter Kosmetik

Vorträge, Poster und Veröffentlichungen

Poster 09/2004:	33. Deutscher Lebensmittelchemikertag der GDCh in Bonn: Freisetzung von Ferulasäure-Oligosacchariden aus Maisballaststoffen, Abstract veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie*, 2005, 59, 9-10.
Vortrag 03/2004:	Regionalverbandstagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft Nord und Nord-Ost, Hannover: Beeinflussen phenolische Komponenten den enzymatischen Abbau von Ballaststoffen aus Mais?
Veröffentlichung:	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* 66, 113-124, 2005
Veröffentlichung:	Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H., Bunzel, M.: Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran, *Phytochemistry* 67, 1276-1286, 2006
Veröffentlichung:	Bunzel, M., Allerdings, E., Ralph, J., Steinhart, H.: Cross-linking of arabinoxylans via 8-8-coupled diferulates as demonstrated by isolation and identification of diarabinosyl 8-8(cyclic)-dehydrodiferulate from maize bran, *J. Cereal Sci.* 47, 29-40, 2008

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.