

4 Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4 Summary

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

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

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

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

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

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

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

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

The following FA-oligosaccharides were identified from rye IDF:

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

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

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

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

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

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