
**Charakterisierung der
Zellwandstrukturkomponenten von Maisrestpflanzen
als mögliche Einflussfaktoren der ruminale
Zellwandabbaubarkeit**

Dissertation

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

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie

- Abteilung für Lebensmittelchemie -

vorgelegt von

Diane Dobberstein

aus Hamburg

Hamburg 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis Oktober 2007 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der Disputation: 28.07.2009

Begutachtende der Disputaion:

Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

Prof. Dr. E. Stahl-Biskup

Dr. A. Paschke

DANKSAGUNGEN

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

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

Neben den Mitarbeitern der Abteilung Lebensmittelchemie, möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel sowie allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. Carola Funk, Frau Dr. Diana Bunzel und Herrn Heinze, für die stete Unterstützung und vor allem auch für die schöne Zeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Christian Gillot, Frau Sabrina Ment, Frau Caroline Indorf, Frau Anne Freudenstein und Herrn Tim Lubinus, die mit ihrer tatkräftigen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Diana Bunzel und Herrn Dr. Michael Wigotzki danke ich für die Durchsicht des Skriptes.

Bei Herrn Prof. F.J. Schwarz und Frau Dr. F. Zeller von der Abteilung für Tierernährung der Technischen Universität München, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Untersuchungsmaterialien und die vielen angeregten Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. John Ralph danke ich für die Aufnahme zum Teil zeitaufwendiger NMR-Spektren.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Carola Göldnitz für eine wunderbare Freundschaft und meinen Eltern, deren Rückhalt und Unterstützung ich mir stets sicher sein durfte.

Diese Arbeit wurde von der Monsanto Agrar Deutschland GmbH sowie von der H. Wilhelm Schaumann Stiftung finanziell gefördert.

Meinen Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

0 h	0 h Material, wasserunlöslicher Pflanzenrückstand
24 h	Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation
AA	Alditolacetate
AACC	Association of American Cereal Chemists
ABSL	Acetylbromidlösliches Lignin (acetyl bromide soluble lignin)
ACN	Acetonitril
ADF	acid detergent fiber
ADL	acid detergent lignin
AM	Ausgangsmaterial
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ara	Arabinose (in Abbildungen)
Araf	Arabinofuranose
2-Araf	in O-2-Position glykosidisch verknüpfte Arabinofuranose
T-Araf	terminale Arabinofuranose
AX	neutrale Arabinoxylane
A/X	Arabinose/Xylose-Verhältnis
BG	Bestimmungsgrenze
BSTFA	<i>N,O</i> - Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid
c	cyclisch
C3H	<i>p</i> - Cumarsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase (Cinnamic acid-4-hydroxylase)
CAD	Zimtalkohol-Dehydrogenase (Cinnamic alcohol dehydrogenase)
CAld-5H	Coniferaldehyd-5-Hydroxylase
CAld-OMT	5-Hydroxyconiferaldehyd- O-Methyltransferase
CCoAOMT	Kaffeoyl-CoA- <i>O</i> -Methyltransferase (Caffeoyl-CoA-O-methyltransferase)
CC	<i>p</i> - Cumarsäure- p-Cumarsäure-Cyclobutandimer (in Abbildungen und Tabellen)
CCR	Cinnamoyl-CoA-Reduktase
CCRC	Complex Carbohydrate Research Center
CF	<i>p</i> - Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimer (in Abbildungen und Tabellen)
4CL	4-Cumarsäure:CoA-Ligase
COMT	Kaffeesäure- <i>O</i> -Methyltransferase (Caffeic acid-O-methyltransferase)
COSY	correlated spectroscopy
CV	Verfahrensvariationskoeffizient (coefficient of variation)
<i>d</i>	Dublett (in Tabellen)
DAD	Diodenarraydetektion
dc	decarboxyliert

<i>dd</i>	Dublett vom Dublett (in Tabellen)
DFRC	derivatization followed by reductive cleavage
DFS	Dehydrodiferulasäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DWD	Deutscher Wetterdienst
E.C.R.	effective carbon response
EI	Elektronenstoß-Ionisierung
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
EZP bzw.E	Erntezeitpunkt (Abbildungen und Tabellen)
F5H	Ferulat-5-Hydroxylase
FAX	O-β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-[5-O-(trans-feruloyl)-L-arabinofuranose]
FF	Ferulasäure-Ferulasäure-Cyclobutandimer (in Abbildungen und Tabellen)
FID	Flammenionisationsdetektor
FID ^{NMR}	freier Induktionsabfall (Free Induction Decay) - NMR-Spektroskopie
FS	Ferulasäure
FS _{est}	estergebundene Ferulasäure (in Abbildungen)
FS _{eth}	ethergebundene Ferulasäure (in Abbildungen)
FS-CA	FS-Coniferylalkohol-Kreuzprodukt
G	Guaiacyl-Einheit
5-OH-G	5-Hydroxyguaiacyleinheit
Gal	Galactose (in Abbildungen)
T-Galp	terminale Galactopyranose
GalpA	Galactopyranuronsäure (Galactopyranuronic acid) (in Abbildungen)
GAX	Glucuronoarabinoxylane
GC	Gaschromatographie
GK	Grundkalibrierung
Glc	Glucose (in Abbildungen)
Glcp	Glucopyranose (in Abbildungen)
4-Glcp	1→4 glykosidisch verknüpfte Glucopyranose
T-Glcp	terminale Glucopyranose
GlcpA	Glucopyranuronsäure (glucopyranuronic acid)
H	p-Hydroxyphenyl-Einheit
4-HBA	4-Hydroxybenzaldehyd
4-HBS	4-Hydroxybenzoesäure
HCT	p-Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase
hh	head-to-head
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
4-HPES	4-Hydroxyphenyllessigsäure

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
4-HPPS	4-Hydroxyphenylpropionsäure
HSD	tatsächliche/wahre signifikante Abweichung (honestly significant difference)
ht	head-to-tail
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
K	Körner (in Tabellen)
KF	Korrekturfaktor (in Tabellen)
KL	Klason-Lignin
KS	Kaffeesäure
LSD	geringste signifikante Abweichung (least significant difference)
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
Man	Mannose (in Abbildungen)
Mel	Methyliodid
MEL	Monoepoxylignanole ($8\text{-}\beta$ -gekoppelte Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukte mit Pinoresinolstruktur)
MeOH	Methanol
Mio.	Millionen
MK	Matrixkalibrierung
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nc	nicht cyclisch
NDF	neutral detergent fiber
NIRS	near infrared spectroscopy
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (nuclear overhauser enhancement)
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NWG	Nachweisgrenze
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
pCS	p-Cumarsäure
pCS _{est}	estergebundene p-Cumarsäure (in Abbildungen)
PCS	Phenolcarbonsäuren
Ph	Phenolische Einheit (in Abbildungen)
PMAA	permethylierte Alditolacetate
Rhap	Rhamnopyranose (in Abbildungen)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
RPf	Restpflanze (in Tabellen)
RRT	Relative Retentionszeit (relative retention time)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett

S	S yringyl-Einheit
SAD	S inapylalkohol- D ehydrogenase
SD	Standardabweichung (s tandard d evelopment)
SMA	S tandard m ethylierungs a nalyse
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (s ignal-to- n oise)
SPE	Festphasenextraktion (s olid p hase e xtraction)
SRZ	S iloreifezahl (in Tabellen)
SS	S inapinsäure
SyA	S yringaldehyd
SyS	S yringasäure
TetraFS	Dehydrotetraferulasäure
TFA	Trifluoressigsäure (t rifluor a ctic a cid)
THF	T etrahydrofuran
TFS	Dehydrotriferulasäure
TIC	t otal ion c hromatogram
TMS	T rimethylsilan
TS	T rockensubstanz
TUM	T echnische U niversität M ünchen
U/min	U mdrehung pro M inute
UBS	u nlösliche B allaststoffe
USDA	U nited S tates D epartment of A griculture
UV	U ltraviolett
VN	V anillin
VS	V anillinsäure
WFR	W iederfindungsrate
Xyl	X ylose (in Abbildungen)
Xylp	X ylopyranose (in Abbildungen)
4-Xylp	1→4 glykosidisch verknüpfte X ylopyranose
T-Xylp	t erminale X ylopyranose
3,4-Xylp	1→4 und 3→ glykosidisch verknüpfte X ylopyranose
2,4-Xylp	1→4 und 2→ glykosidisch verknüpfte X ylopyranose
2,3,4-Xylp	1→4 , 2→ und 3→ glykosidisch verknüpfte X ylopyranose

Symbole

t_1	Evolutionenphase/-zeit
t_2	Detektionsphase/-zeit
δ	chemische Verschiebung
I	Spinquantenzahl
J	Kopplungskonstante
λ	Detektionswellenlänge

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Allgemeiner Teil	1
<hr/>		
1.1	Allgemeiner Aufbau von Pflanzenzellwänden	2
1.1.1	Zellwandpolysaccharide	2
1.1.1.1	Cellulose	3
1.1.1.2	Hemicellulosen	3
1.1.1.3	Pektine	5
1.1.2	Zellwandgebundene Phenolcarbonsäuren	6
1.1.2.1	Monomere Phenolcarbonsäuren	7
1.1.2.2	Dimere und höhere Oligomere der Phenolcarbonsäuren	8
1.1.2.3	Cross-Linking von Zellwandpolymeren durch Phenolcarbonsäuren	12
1.1.3	Lignin	14
1.2	Grundlagen zum ruminalen Verdau von Futtermitteln	17
1.2.1	Allgemeiner Aufbau des Magenssystems des Wiederkäuers	17
1.2.2	Einfluss der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Futtermittelverdaubarkeit	18
1.3	Problemstellung	21
<hr/>		
2	Material und Methoden	23
<hr/>		
2.1	Material	23
2.1.1	Ausgangsmaterial	24
2.1.2	Wasserunlösliche Faserbestandteile - 0 h-Material	24
2.1.3	24 h ruminal inkubiertes Material	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Methoden zur Bestimmung der ruminalen Abbaubarkeit, des Auswaschverlustes, des Rohproteins und der Rohasche	25
2.2.1.1	Bestimmung der ruminalen Abbaubarkeit	25
2.2.1.2	Bestimmung des Auswaschverlustes	26
2.2.1.3	Bestimmung des Rohproteins und der Rohasche in den Rohmaterialien	27
2.2.2	Methoden zur Bestimmung der Kohlenhydrate	27
2.2.2.1	Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte	27
2.2.2.2	Bestimmung der Gehalte an freier Glucose in den Ausgangsmaterialien	28

2.2.2.3	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide	28
2.2.2.4	Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide	30
2.2.3	Analytik der Phenolcarbonsäuren	35
2.2.3.1	Methodenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung monomerer Phenolcarbonsäuren sowie di- und trimerer Ferulasäuren	36
2.2.3.2	Identifizierung und Quantifizierung von estergebundenen monomeren Phenolcarbonsäuren und Diferulasäuren	46
2.2.3.3	Identifizierung und Quantifizierung monomerer ethergebundener Phenolcarbonsäuren	47
2.2.3.4	Identifizierung estergebundener oligomerer Phenolcarbonsäuren durch präparative Isolierung und Anwendung spektroskopischer Methoden	48
2.2.3.5	Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte mittels Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion	52
2.2.4	Ligninanalytik	53
2.2.4.1	Bestimmung des Klason-Lignins	54
2.2.4.2	Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignins	55
2.2.4.3	Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung	55
2.2.4.4	Abschätzung des Ligningehaltes über <i>p</i> -Cumarsäure	57
2.2.5	Statistische Auswertung	58
3	Ergebnisse und Diskussion	60
<hr/>		
3.1	Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten	60
3.1.1	Unterscheidung der untersuchten Ausgangs- und 0 h-Materialien	60
3.1.2	Protein- und Aschegehalt	63
3.1.3	Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide	63
3.1.3.1	Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte in den unverdauten Untersuchungsmaterialien	63
3.1.3.2	Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide	66
3.1.3.3	Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen	67
3.1.4	Charakterisierung zellwandgebundener Phenolcarbonsäuren	71
3.1.4.1	Identifizierung und Quantifizierung estergebundener, monomerer Phenolcarbonsäuren	71
3.1.4.2	Identifizierung und Quantifizierung estergebundener Dehydrodiferulasäuren	73

3.1.4.3	Identifizierung und Quantifizierung ethergebundener, monomerer Phenolcarbonsäuren	77
3.1.4.4	Ferulasäure-Substitutionsgrad der Glucuronoarabinoxylane	78
3.1.4.5	Präparative Isolierung und Identifizierung von estergebundenen Dehydrotriferulasäuren	79
3.1.4.6	Identifizierung und semiquantitative Abschätzung von Cyclobutandimeren und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten	89
3.1.5	Charakterisierung des Ligningehaltes und der Monolignolzusammensetzung der Maisrestpflanze	99
3.1.5.1	Bestimmung des Ligningehaltes über zwei Methoden	99
3.1.5.2	Bestimmung der Monolignolzusammensetzung	101
3.1.5.3	Abschätzung des Ligningehaltes über <i>p</i> -Cumarsäure	105
3.2	Charakterisierung des unverdauten Pflanzenmaterials - Einfluss der Sorte, der Reife sowie des Anbaujahres	106
3.2.1	Zellwandpolysaccharide	107
3.2.2	Zellwandgebundene Ferulasäuren	112
3.2.3	Ligninassoziierte Zellwandstrukturkomponenten	120
3.2.4	Abschließende Diskussion zum Einfluss der Reife, des Genotyps und der Witterungsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten	123
3.3	Charakterisierung des ruminal inkubierten Materials – Einfluss der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Abbaubarkeit	127
3.3.1	Abbau der Zellwandtrockensubstanz nach 24 h ruminalem Verdau	127
3.3.2	Charakterisierung und Abbau der Zellwandpolysaccharide nach 24 h ruminalem Verdau	130
3.3.3	Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die ruminale Abbaubarkeit	135
3.3.4	Einfluss der zellwandgebundenen Ferulasäuren auf die ruminale Abbaubarkeit	136
3.3.5	Einfluss der ligninassoziierten Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Abbaubarkeit	140
3.3.6	Abschließende Diskussion zum Einfluss der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Abbaubarkeit	142
4	Zusammenfassung	143
5	Anhang	147

5.1	Geräte- und Messparameter	147
5.1.1	Gaschromatographie	147
5.1.1.1	Bestimmung der neutralen Monosaccharide in den Polysacchariden als deren Alditolacetate mittels Gaschromatographie	147
5.1.1.2	Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide - Methylierungsanalyse	147
5.1.1.3	Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung – DFRC-Methode (derivatisation followed by reductive cleavage)	148
5.1.1.4	Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte	148
5.1.2	Gelpermeationschromatographie	149
5.1.2.1	Fraktionierung oligomerer Hydroxyzimtsäuren mittels Gelpermeationschromatographie an Bio-Beads S-X3	149
5.1.2.2	Fraktionierung/Aufreinigung mittels Sephadex LH-20 Chromatographie	149
5.1.3	Hochleistungsflüssigchromatographie	150
5.1.3.1	Fraktionierung/Aufreinigung mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und UV-spektroskopischer Detektion	150
5.1.3.2	Identifizierung und Quantifizierung monomerer Phenolcarbonsäuren	153
5.1.3.3	Identifizierung und Quantifizierung von Diferulasäuren	153
5.1.3.4	Charakterisierung der isolierten Verbindungen	154
5.1.4	Kernresonanzspektroskopie	155
5.1.5	Sonstige Geräte	155
5.2	Chemikalienverzeichnis	156
5.3	Arbeitsvorschriften	158
5.3.1	Kohlenhydratanalytik	158
5.3.1.1	Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte	158
5.3.1.2	Bestimmung der Gehalte an freier Glucose in den Ausgangsmaterialien	159
5.3.1.3	Bestimmung der neutralen Monosaccharide in den Polysacchariden mittels Gaschromatographie als deren Alditolacetate	159
5.3.1.4	Bestimmung der Uronsäuren	160
5.3.1.5	Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide - Methylierungsanalyse	161
5.3.2	Analytik der Phenolcarbonsäuren	162
5.3.2.1	Präparative Isolierung und Aufreinigung von Di- und Triferulasäure-Standard-substanzen aus unlöslichen Maiskleie-Ballaststoffen	162
5.3.2.2	Isolierung von 8-8'(THF)-DFS aus einer veresterten Vorstufe	164

5.3.2.3	Identifizierung und Quantifizierung von estergebundenen, monomeren Phenolcarbonsäuren, Dehydrodimeren (und Dehydrotrimeren)	164
5.3.2.4	Identifizierung und Quantifizierung ethergebundener monomerer Phenolcarbonsäuren	165
5.3.2.5	Präparative Isolierung und Identifizierung von estergebundenen oligomeren Phenolcarbonsäuren aus Maisstroh	165
5.3.2.6	Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte mittels Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion	167
5.3.3	Ligninanalytik	168
5.3.3.1	Bestimmung des Klason-Lignin Gehaltes	168
5.3.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes im Klason-Lignin	168
5.3.3.3	Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignin Gehaltes	169
5.3.3.4	Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung - DFRC-Methode	169
5.3.3.5	Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Phenolcarbonsäuren	170
5.4	Tabellen	172
5.5	Chromatogramme	188
5.6	Spektren	190
6	Literatur	207

1 Einleitung und Allgemeiner Teil

Mais ist nach Angaben des UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA, 2008) mit einer Weltjahresproduktion von 704 Mio. Tonnen im Wirtschaftsjahr 2006/2007, gefolgt von Weizen und Reis mit 593 bzw. 418 Mio. Tonnen, die quantitativ bedeutendste Getreideart der Welt. Während in vielen Regionen der Welt Körnermais eine der Hauptnahrungsquellen der Bevölkerung darstellt, hat Mais in Deutschland vorrangig als Futtermittel (Silomais) wirtschaftliche Bedeutung. Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 85 % der Gesamtmaisbaufläche von 1,75 Mio. Hektar für den Anbau von Silomais genutzt (1,48 Mio. ha). Dies entspricht 89 % der Futtermittelanbaufläche bzw. 15 % der gesamten Ackerfläche (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2008).

Mit steigender Bedeutung von Mais in der Tierernährung und vor allem mit den stetig wachsenden Anforderungen der heutigen Hochleistungslandwirtschaft steigt auch die Notwendigkeit, den Futterwert von Silomais beurteilen zu können, der sich in gleichem Maße aus dem stärkereichen Kolben sowie aus der Verdaubarkeit der Restpflanze ergibt (RALPH et al., 2004b). Während der Energiegehalt des Kolbens mit der Reife der Pflanze durch die Stärkeeinlagerung zunimmt, sinkt die Verdaubarkeit der Maisrestpflanze durch eine verminderte Angreifbarkeit der Zellwandpolysaccharide durch die Enzyme der Pansenmikroorganismen erheblich. Einer hohen Stärkeeinlagerung im Kolben steht somit als vorrangiges züchterisches Ziel eine möglichst hohe Verdaubarkeit der Restpflanze über einen weiten Reifezeitraum gegenüber (MÉCHIN et al., 2001). Neben dem Genotyp, d.h. der Sorte, haben wie erwähnt die Reife, aber auch die Witterungsbedingungen, unter denen die Pflanzen gewachsen sind, einen erheblichen Einfluss auf die Abbaubarkeit der Maisrestpflanze (IRLBECK et al., 1993, ETTLE et al., 2001, ETTLE et al., 2002).

Die Abnahme der Abbaubarkeit der Restpflanze über die Abreife der Pflanze ist vor allem durch die fortschreitende Lignifizierung der Zellwand sowie durch die Ausbildung von Cross-Links zwischen Polysacchariden untereinander und zwischen Polysacchariden und Lignin über Phenolcarbonsäuren, insbesondere Ferulasäure und deren Di- bzw. Oligomere, begründet (HATFIELD et al., 1999, GRABBER et al., 2004b, GRABBER, 2005). Diskutiert werden des Weiteren mögliche Einflüsse der Ligninzusammensetzung (GRABBER et al., 1997) und des Verzweigungsgrades der Arabinoxylane (GLITSØ et al., 1999, GLITSØ et al., 2000). Detaillierte Kenntnisse über die chemischen Strukturen pflanzlicher Gerüstsubstanzen sind daher für die Betrachtung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, unter anderem bei der Beurteilung der Futtermittelqualität, unverzichtbar.

1.1 Allgemeiner Aufbau von Pflanzenzellwänden

Die Pflanzenzellwände bilden das strukturelle Grundgerüst der Pflanze. Sie definieren Form und Struktur der Pflanzenzellen bzw. -gewebe und sind für die Funktionalität der Pflanze von wesentlicher Bedeutung. Neben verschiedenen Schutzfunktionen der Zellwand, wie dem Schutz vor Austrocknung und mechanischer Beanspruchung sowie der Barrierefunktion gegenüber Mikroorganismen, stellen Pflanzenzellwände, insbesondere für Wiederkäuer, eine Hauptnahrungsquelle dar.

Im Allgemeinen bestehen pflanzliche Zellwände neben Wasser aus Strukturpolysacchariden, Strukturproteinen, Ligninen, polymergebundenen Phenolcarbonsäuren und anderen integrierten oder aufgelagerten aliphatischen bzw. phenolischen Substanzen, wie Cutin oder Suberin. Da der Aufbau sowie die Zusammensetzung der Pflanzenzellwand nicht nur zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen sowie zwischen verschiedenen Pflanzenteilen und -geweben variiert, sondern zudem während der Entwicklung der Pflanze auch einer dynamischen Veränderung unterliegt, wird im Folgenden nur ein grundlegender Überblick über den Aufbau monokotyler Pflanzenzellwände gegeben.

Die hauptsächlich aus Pektinen aufgebaute Mittellamelle wird zu Beginn der Zellteilung aus der Zellplatte gebildet und stellt die Grenze zwischen benachbarten Zellen dar. Der Mittellamelle ist die primäre Zellwand aufgelagert, die das Zellwachstum reguliert und die strukturelle Grundlage der entstehenden Pflanze bildet. Die primäre Zellwand besteht aus einer Matrix aus Pektinen, Hemicellulosen und Strukturproteinen, wie z.B. dem hydroxyprolinreichen Extensin, in die nicht ausgerichtete Cellulosemikrofibrillen eingelagert sind. Nach Abschluss des Zellwachstums kann je nach Funktion der Zelle eine Sekundärwand ausgebildet werden, die aus drei mikroskopisch differenzierbaren Schichten besteht. Diese Schichten unterscheiden sich in der parallelen Ausrichtung ihrer Cellulosemikrofibrillen. Die sekundäre Zellwand enthält im Gegensatz zur Primärwand mit bis zu 94 % wesentlich mehr Cellulose, die in eine Matrix aus Hemicellulosen eingelagert ist. Sekundäre Pflanzenzellwände können verholzen, wodurch die mechanische Festigkeit der Pflanze zusätzlich erhöht wird und die Ausbildung von Wasserleitungsbahnen möglich ist. Die Lignifizierung beginnt von der Mittellamelle aus und erreicht in der sekundären Zellwand das höchste Ausmaß (CARPITA, 1990, HEREDIA et al., 1995, CARPITA & MCCANN, 2000).

1.1.1 Zellwandpolysaccharide

Die wichtigsten Polysaccharide der Zellwand (Abb. 1.2), Cellulose, Hemicellulosen und Pektine, sind überwiegend aus nur zehn von etwa hundert in der Natur vorkommenden Monosacchariden aufgebaut, den Pentosen L-Arabinose und D-Xylose, den Hexosen D-Glucose, D-Galactose, L-Rhamnose und L-Fucose sowie den Uronsäuren D-Glucuronsäure, 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure und D-Galacturonsäure (Abb. 1.1) (THEANDER et al., 1993, BUNZEL & STEINHART, 2003).

Die Biosynthese der Zellwandpolysaccharide bzw. derer Vorstufen erfolgt mit Ausnahme der Cellulose im Golgi-Apparat. Durch abgeschnürte Golgi-Vesikel werden sie durch das Cytoplasma zum Plasmalemma transportiert, wo sie ausgeschleust und in die Zellwand inkorporiert werden. Die Biosynthese der Cellulose verläuft hingegen an einem membrangebundenen Multienzymkomplex am Plasmalemma (CARPITA, 1990, GIBEAUT & CARPITA, 1994).

Während in den Zellwänden der Maiskaryopse Hemicellulosen die Hauptpolysaccharide darstellen, ist Cellulose das dominierende Polysaccharid in der Maisrestpflanze.

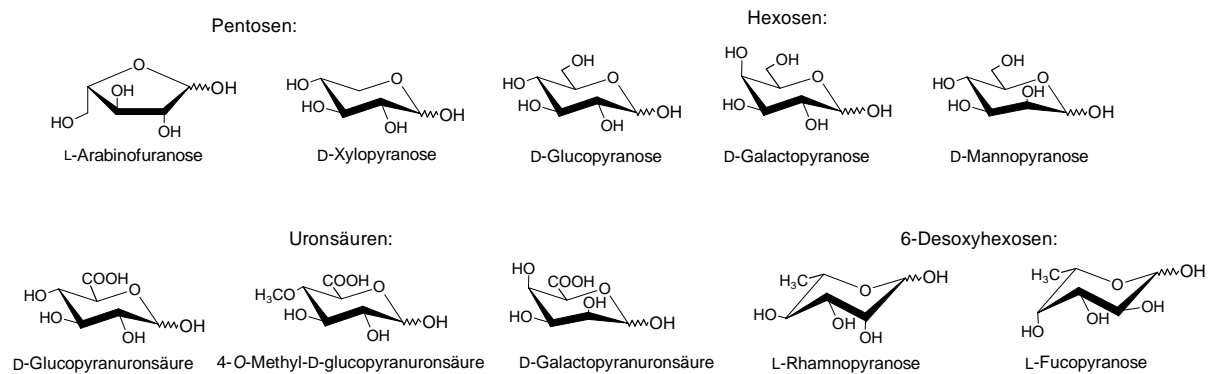


Abb. 1.1: Übersicht der Hauptmonosaccharideinheiten von Polysacchariden der pflanzlichen Zellwand

1.1.1.1 Cellulose

Cellulose ist ein aus (1→4)-glykosidisch verknüpften β -D-Glucopyranose-Einheiten bestehendes lineares Polysaccharid. Je nach Lokalisation der Cellulose in der Zellwand werden Polymerisationsgrade von 5000 Einheiten in der Primärwand und bis zu 15000 Einheiten in der Sekundärwand erreicht. Die Einbettung der Cellulose erfolgt sowohl in der Primärwand als auch in der Sekundärwand in Form kristalliner Mikrofibrillen, die über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus 30 bis 100 Polymersträngen der Cellulose gebildet werden. Während diese Cellulosemikrofibrillen in der primären Zellwand nicht ausgerichtet vorliegen, sind sie in der Sekundärwand parallel zueinander ausgerichtet (THEANDER et al., 1993, HEREDIA et al., 1995, MCDUGALL et al., 1996, BUNZEL & STEINHART, 2003).

1.1.1.2 Hemicellulosen

Hemicellulosen liegen in der Zellwand eng an Cellulose gebunden vor und bilden zusammen mit Pektinen und Proteinen die Zellwandmatrix, in welche die Cellulose eingebettet ist. Über Wasserstoffbrückenbindungen können sie sowohl mit Cellulose als auch mit Pektinen wechselwirken. Hemicellulosen sind ein heterogenes Gemisch verschiedener Polysaccharide, die aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und physikalischen Eigenschaften zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Die Hemicellulosenfraktion der monokotylen Gräserfamilie *Gramineae*

(*Poaceae*), zu der auch Mais (*Zea mays* L.) gehört, setzt sich vorwiegend aus Heteroxylenen (neutrale Arabinoxylane und saure Glucuronoarabinoxylane) und mixed-linked- β -Glucanen zusammen. Die in dikotylen Pflanzen dominierenden Xyloglucane kommen mit Ausnahme von Reiszellwänden, die denen der dikotylen Pflanzen ähneln, in Gräsern nur in sehr geringen Mengen vor (BUNZEL & STEINHART, 2003).

Heteroxylane

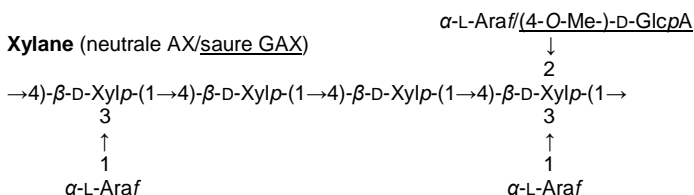
Neutrale Arabinoxylane bestehen aus einer Hauptkette (1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpfter β -D-Xylopyranose-Einheiten, die entweder unsubstituiert oder in O-2-Stellung und/oder O-3-Stellung mit L-Arabinofuranose mono- oder disubstituiert vorliegen können (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). In O-2-Position mit Arabinose monosubstituierte Xylose-Einheiten sind dabei in der Regel in Getreidearabinoxylanen, mit Ausnahme von Gerste, von untergeordneter Bedeutung.

Während die neutralen Arabinoxylane (AX) im Endospermgewebe der Karyopse dominieren, stellen die sauren Glucuronoarabinoxylane (GAX) den dominierenden Anteil der Hemicellulosen sowohl in den äußeren Schichten von Getreidekaryopsen als auch in den vegetativen Pflanzenteilen dar. Die Xylose-Einheiten der Hauptkette saurer GAX können zusätzlich zu den L-Arabinofuranoseeinheiten in O-3-Stellung mit D-Glucopyranuronsäure bzw. 4-O-Methyl-D-glucopyranuronsäure in O-2-Stellung glykosidisch substituiert sein (HEREDIA et al., 1995). An die Arabinosesubstituenten der Heteroxylane können darüber hinaus teilweise Xylose- und/oder Galactoseeinheiten gebunden sein. In geringem Maße können auch Arabinoseoligomere, die (1 \rightarrow 2)-, (1 \rightarrow 3)- oder (1 \rightarrow 5)-verknüpft sind, Seitenketten der Heteroxylane bilden (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). Die Arabinoxylane weisen auf Grund der Variabilität bei der Verteilung der Substituenten, sowie dem Substitutions- und Polymerisationsgrad eine strukturelle

Cellulose



Xylane (neutrale AX/saure GAX)

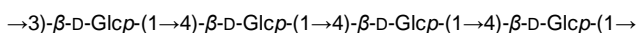


Mixed-linked- β -Glucane

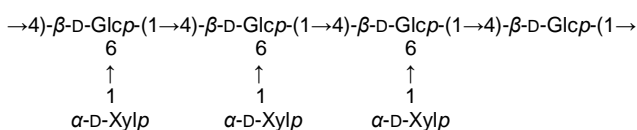
Cellotriosyl-Einheit:



Cellotetraosyl-Einheit:

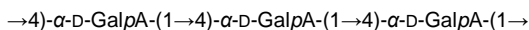


Xyloglucane



Pektine

Homogalacturonan:



Rhamnogalacturan I (Hauptkette):

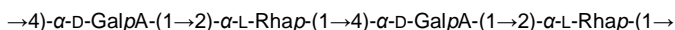


Abb. 1.2: Strukturmerkmale verschiedener Polysaccharide (Glcp = Glucopyranose, Xylp = Xylopyranose, Araf = Arabinofuranose, GlcpA = Glucopyranuronsäure, GalpA = Galactopyranuronsäure, Rhap = Rhamnopyranose)

Heterogenität und differierende physikalische sowie funktionelle Eigenschaften auf. So ist die Löslichkeit der Heteroxylane von dem Arabinosesubstitutionsgrad abhängig und steigt mit zunehmender Substitution an (BUNZEL & STEINHART, 2003).

Mixed-linked- β -Glucane

Mixed-linked- β -Glucane sind unverzweigte Polysaccharide, deren Kette zu ca. 70 % aus (1 \rightarrow 4)-verknüpften β -D-Glucopyranose-Einheiten besteht. Die Regelmäßigkeit des Polysaccharidstranges wird durch (1 \rightarrow 3)-Verknüpfungen unterbrochen, wobei die (1 \rightarrow 4)-verknüpften β -D-Glucopyranose-Einheiten hauptsächlich Cellotriosyl- bzw. Cellotetraosylstrukturen bilden. Aufgrund der durch die (1 \rightarrow 3)-Bindungen verursachten Unregelmäßigkeit des Polymerstrangs sind die mixed-linked- β -Glucane hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht mit der Cellulose zu vergleichen (THEANDER et al., 1993). Während unter den Gräsern insbesondere die Zellwände von Hafer- und Gerstekaryopsen dominierende Anteile an mixed-linked- β -Glucanen enthalten, sind die Gehalte in den vegetativen Pflanzenteilen von geringer Bedeutung (CARPITA et al., 2001).

Xyloglucane

Xyloglucane sind hochpolymere Heteropolysaccharide, die analog zur Cellulose aus einem linearen Polysaccharidstrang von (1 \rightarrow 4)-verknüpften β -D-Glucopyranose-Einheiten bestehen. Die Glucose-Einheiten sind in regelmäßigen Abständen in O-6-Position mit α -D-Xylopyranose-Einheiten substituiert, wodurch als Grundstruktur eine wiederkehrende Heptasaccharid-Einheit aus vier β -D-Glucopyranose-Einheiten (Cellotetraose) und drei α -D-Xylopyranose-Einheiten entsteht. Einige Glucose-Einheiten können zusätzlich α -L-Fucosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-xyloseseitenketten in O-6-Stellung enthalten. Darüber hinaus können sowohl die Galactoseeinheiten der Seitenketten als auch die Glucose-Einheiten der Hauptkette acetyliert vorliegen. Xyloglucane bilden zusammen mit den nachfolgend beschriebenen Pektinen den Hauptteil der Polysaccharide in den Zellwänden dikotyle Pflanzen und sind in Gräsern von untergeordneter Bedeutung (HEREDIA et al., 1995, ISHII, 1997, BUNZEL & STEINHART, 2003).

1.1.1.3 Pektine

Pektine sind vorwiegend in der Mittellamelle und der Primärwand lokalisiert und Bestandteil der Zellwandmatrix. Dominierende Struktureinheiten der heterogenen Gruppe der Pektine sind die Homogalacturonane und Rhamnogalacturonane I. Die linearen Homogalacturonane bestehen aus (1 \rightarrow 4)-verknüpften α -D-Galacturonsäure-Einheiten, deren Säuregruppen in variierenden Abständen methyliert oder acetyliert vorliegen. Die Hauptkette der Rhamnogalacturonane I besteht aus alternierenden (1 \rightarrow 2)-gebundenen α -L-Rhamnose- und (1 \rightarrow 4)-gebundenen α -D-Galacturonsäure-Einheiten. Die (1 \rightarrow 2)-gebundenen α -L-Rhamnose-Einheiten können zudem in

O-4-Position mit Seitenketten substituiert sein, die aus bis zu 50 D-Galactose-, L-Arabinose- und L-Fucose-Einheiten bestehen (BUNZEL & STEINHART, 2003).

1.1.2 Zellwandgebundene Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren (PCS) stellen unter quantitativer Betrachtung zwar nur Minorkomponenten der Pflanzenzellwand dar, sie haben allerdings aufgrund der Fähigkeit, Cross-Links zwischen den Makromolekülen der Zellwand ausbilden zu können, einen bedeutenden Einfluss auf die Zellwandstruktur und somit auf die physikochemischen Eigenschaften der Zellwände (FAULDS & WILLIAMSON, 1999, KROON & WILLIAMSON, 1999).

Die wichtigsten PCS, welche in den Pflanzen über Ester- und Etherbindungen an Zellwandpolymere gebunden vorliegen, sind Ferulasäure (FS) und *p*-Cumarsäure (*p*CS), gefolgt von Sinapinsäure (SS) (ISHII, 1997). Innerhalb der monokotylen Pflanzen zeichnen sich vor allem die *Gramineen* durch hohe Gehalte an Hydroxyzimtsäuren aus, wohingegen dikotyle Pflanzen in der Regel kaum zellwandgebundene PCS enthalten. Eine Ausnahme innerhalb der dikotylen Pflanzen bilden die inzwischen vereinigten Familien *Amaranthaceae* und *Chenopodiaceae*, zu denen z.B. Amaranth, Zuckerrübe und Spinat gehören. In genannten Pflanzen wurden an Pektine gebundene FS nachgewiesen (SAULNIER & THIBAUT, 1999, BUNZEL et al., 2005b).

Die Biosynthese der PCS erfolgt über den Phenylpropanstoffwechsel, wobei über den Shikimisäureweg gebildetes Phenylalanin als Ausgangsprodukt dient. Abb. 1.3 zeigt eine vereinfachte Darstellung des enzymatisch katalysierten Bildungsweges. Zentraler Schritt ist die

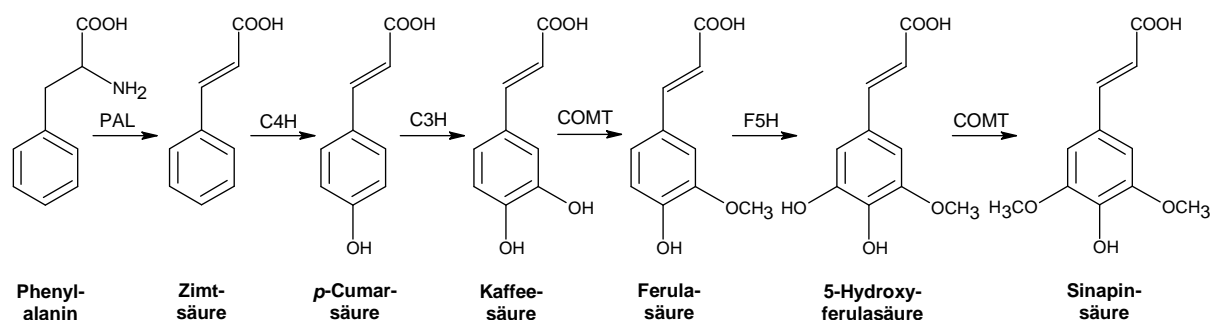


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung der Biosynthese von *p*-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure aus Phenylalanin (PAL = Phenylalanin-Ammonium-Lyase, C4H = Zimtsäure-4-Hydroxylase, C3H = *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, COMT = Kaffeesäure-O-Methyltransferase, F5H = Ferulasäure-5-Hydroxylase)

Desaminierung von Phenylalanin zu Zimtsäure mittels Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), die anschließend zu *p*CS hydroxyliert wird. In geringem Maße kann *p*CS auch direkt aus Tyrosin synthetisiert werden. Die hierzu notwendige Tyrosin-Ammonium-Lyase ist jedoch auf bestimmte Pflanzen, darunter die *Gramineen*, begrenzt. Aus *p*CS werden im Weiteren über Hydroxylasen und Kaffeesäure-O-Methyltransferase (COMT) FS und SS gebildet. Aufgrund ihres

Bildungsweges über die Zimtsäure werden die PCS häufig auch als Hydroxyzimtsäuren bezeichnet.

1.1.2.1 Monomere Phenolcarbonsäuren

Während sich insbesondere Getreidekleien durch hohe FS-Gehalte auszeichnen, stellt *p*CS die in den Pflanzenstängeln von *Gramineen* dominierende PCS dar (FAULDS & WILLIAMSON, 1999). SS wurde in signifikanten Mengen bisher nur in Zellwänden von Wildreis nachgewiesen (BUNZEL, 2001, BUNZEL et al., 2002a).

Ferulasäure

FS liegt in den Pflanzenzellwänden monokotyler Pflanzen ausschließlich über die O-5-Position der L-Arabinoseseitenkette der Heteroxylane estergebunden vor (Abb. 1.4) (HATFIELD et al., 1999a, SAULNIER & THIBAUT, 1999).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die FS-tragende Arabinofuranose-Einheit stets in O-

3-Stellung an die Xylose-Einheiten des Polysaccharidstranges gebunden vorliegt, nicht aber in O-2-Stellung (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). Hinsichtlich der Bindung der FS an die Arabinoxylane wird angenommen, dass diese bereits interzellulär im Golgi-Apparat erfolgt (FRY et al., 2000, OBEL et al., 2003).

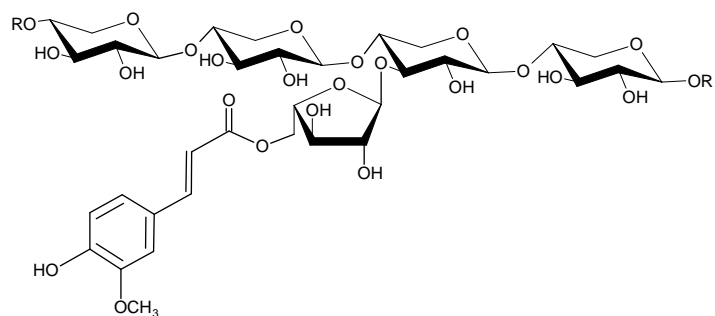


Abb. 1.4: Bindung von Ferulasäure an die L-Arabinoseseitenkette eines Heteroxylans

***p*-Cumarsäure**

In der pflanzlichen Zellwand ist *p*CS im Gegensatz zur FS überwiegend an Lignin estergebunden. Zwar wird *p*CS zu Beginn der Zellwandentwicklung in geringem Maße analog zu Ferulasäure als Ester an Arabinoxylane in der Primärwand gebunden, im Rahmen der fortschreitenden Zellwandentwicklung erfolgt die Einlagerung allerdings zusammen mit Lignin, weshalb *p*CS häufig als Indikator der Lignifizierung angesehen wird (GRABBER et al., 2004). *p*CS liegt ausschließlich über die γ -Position der Monolignoleinheiten, hauptsächlich der Syringyleinheiten, des Lignins

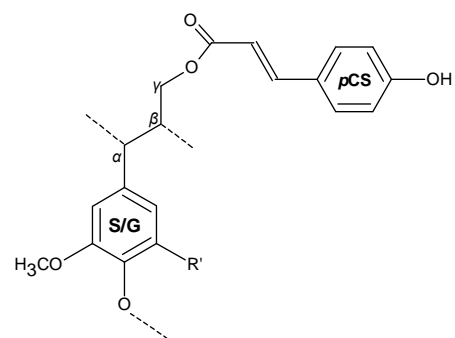


Abb. 1.5: Esterbindung von *p*CS an die γ -Position einer Syringyl- (S) oder Guaiacyleinheit (G) im Ligninpolymer (R' = H (G); OCH₃ (S))

estergebunden vor (Abb. 1.5).

*p*CS-Ester, die in α -Position der Syringyl- bzw. Guaiacyleinheiten gebunden sind, konnten nicht in signifikanten Mengen nachgewiesen werden (RALPH et al., 1994a). Es wird daher angenommen, dass *p*CS nicht in ein bereits bestehendes Ligninoligomer bzw. -polymer eingebunden wird, sondern dass die Veresterung von Sinapylalkohol, in geringen Mengen auch von Coniferylalkohol, mit *p*CS enzymatisch vor dem Einbau der Monolignole in das Ligninpolymer erfolgt (RALPH et al., 1994a, LU & RALPH, 1999). Bekräftigt wird diese Annahme durch die Arbeiten von LU & RALPH (2002), die in Kenaf-Lignin eine analoge Acetylierung von Sinapylalkohol vor dem Einbau in Lignin nachweisen konnten.

Sinapinsäure

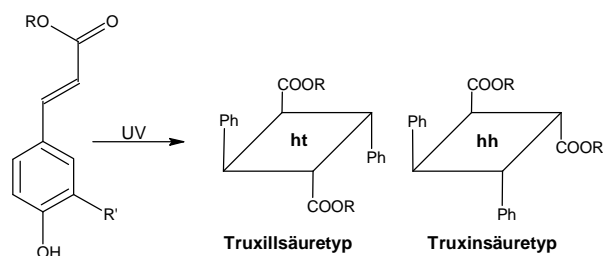
Über die Bindungsverhältnisse der SS ist bislang nur wenig bekannt. Es wird angenommen, dass die Bindung analog zur FS an Polysaccharide, vor allem Arabinoxylane, erfolgt, was bislang allerdings noch nicht durch den Nachweis von SS-Oligosacchariden bestätigt werden konnte (BUNZEL et al., 2002a, BUNZEL et al., 2003b).

1.1.2.2 Dimere und höhere Oligomere der Phenolcarbonsäuren

Zellwandgebundene, monomere PCS können über zwei verschiedene Mechanismen, die photochemische sowie die radikalische Kopplung, dimerisieren. Dabei wird die radikalische Kopplung, über die auch die Bildung höherer Oligomere möglich ist, als der bevorzugte Mechanismus angesehen (RALPH et al., 1994b, BUNZEL et al., 2004c).

Photochemische Kopplung: Bildung von Cyclobutanderivaten

Unter Einwirkung von UV-Licht können PCS bzw. deren Ester im Rahmen einer [2+2]-Cycloaddition zu Verbindungen vom Truxillsäuretyp (2,4-Diphenylcyclobutan-1,3-dicarbonsäure) oder



Truxinsäuretyp (3,4-Diphenylcyclobutan-1,2-dicarbonsäure) dimerisieren (Abb. 1.6).

Die Truxillsäuren werden dabei durch die so genannte head-to-tail-Dimerisierung gebildet, während bei den Truxinsäuren eine head-to-head-Dimerisierung erfolgt (HARTLEY et al., 1990a).

Abb. 1.6: Vereinfachte Darstellung der photochemischen [2+2]-Cycloaddition von Phenolcarbonsäureestern zu Cyclobutanderivaten (Truxillsäuretyp: ht = head-to-tail, Truxinsäuretyp: hh = head-to-head; R = Zellwandpolymer, R' = H (*p*CS) oder OCH₃ (FS), Ph = phenolische Einheit)

Aus einer Mischung von *p*CS und FS können sowohl Homo- als auch Heterodimere in beiden Bindungstypen gebildet

werden, so dass eine Vielzahl stereoisomerer Cyclobutanderivate (je 11 Stereoisomere der Homodimere, 14 Stereoisomere der Heterodimere) entstehen kann (HARTLEY et al., 1990b). Es wurden sowohl Homodimere der *p*CS sowie der FS als auch Heterodimere von *p*CS und FS in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen, u. a. in tropischen Gräsern (FORD & HARTLEY, 1990), in Gerstenstroh, Gerstenblättern und Weizenblättern (TURNER et al., 1993) sowie in den unlöslichen Ballaststoffen einiger Getreidekaryopsen (PACKERT, 1993).

Radikalische Kopplung: Bildung von Dehydrodimeren bzw. -oligomeren

Der radikalischen Kopplung liegt die Bildung von resonanzstabilisierten Phenoxyradikalen, die durch ein System aus zellwandgebundener Peroxidase und H_2O_2 initiiert wird, zugrunde. Aufgrund der Resonanzstabilisierung können über die formal möglichen mesomeren Grenzformeln verschiedene Kopplungsmuster entstehen (Abb. 1.7).

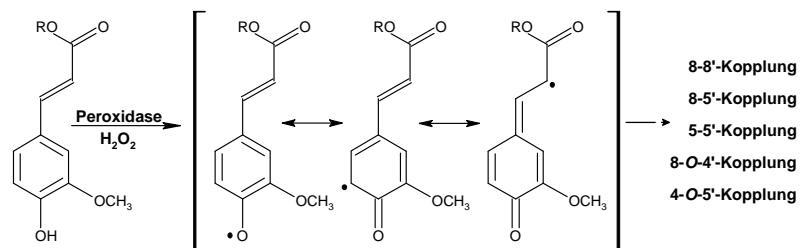


Abb. 1.7: Vereinfachte Darstellung der enzymkatalysierten Oxidation eines Ferulasäureesters zu elektronendelokalisiertem Phenoxyradikal und der daraus resultierenden möglichen Kopplungsmuster (R = z.B. Arabinoxylan)

Ferulasäuredehydrodimere und -oligomere

Die Kopplung polysaccharidgebundener FS unter oxidativen Bedingungen (Peroxidase/ H_2O_2) wurde erstmals durch GEISSMANN & NEUKOM (1971) beschrieben. Sie führten die Kopplung auf eine 5-5'-gebundene Dehydrodiferulasäure, kurz Diferulasäure (DFS), (**1**, Abb. 1.8) zurück, die wenig später aus Weizenkeimen isoliert und identifiziert werden konnte (MARKWALDER & NEUKOM, 1976). Erst zwei Jahrzehnte später konnten mit Hilfe synthetisierter Standardsubstanzen 8-8'-, 8-5'- sowie 8-O-4'-gekoppelte DFS (**2-7**, Abb. 1.8) in verschiedenen Pflanzen nach alkalischer Hydrolyse mittels GC-MS identifiziert werden (RALPH et al., 1994b). Später gelang es dann, unter vergleichbaren Versuchsbedingungen auch die 4-O-5'-Diferulasäure (**9**, Abb. 1.8) in verschiedenen Getreiden, u. a. Mais und Weizen, zu identifizieren (BUNZEL et al., 2000). Innerhalb der 8-5'-gekoppelten DFS werden drei Formen unterschieden. Es wird angenommen, dass lediglich die cyclische Form (8-5'-c-DFS) nativ in der Pflanze vorliegt, während die nicht cyclische (8-5'-nc-DFS) sowie die decarboxylierte Form (8-5'-dc-DFS) vermutlich erst bei der alkalischen Hydrolyse aus der cyclischen Form gebildet werden (RALPH et al., 2004a). Bei den drei bekannten Formen der 8-8'-gekoppelten DFS, der cyclischen (8-8'-c-DFS) und der offenen Form (8-8'-nc-DFS) sowie der erst kürzlich nachgewiesenen Tetrahydrofuranform (8-8'(THF)-DFS, **8**, Abb. 1.8) (SCHATZ et al., 2006) ist hingegen bislang unklar, welche der Isomere nativ in der

Pflanze vorliegen (RALPH et al., 1994b, BUNZEL et al., 2001). Lediglich die Bindung der 8-8'-DFS an wurde Arabinoxylane wurde bislang demonstriert (BUNZEL et al., 2008).

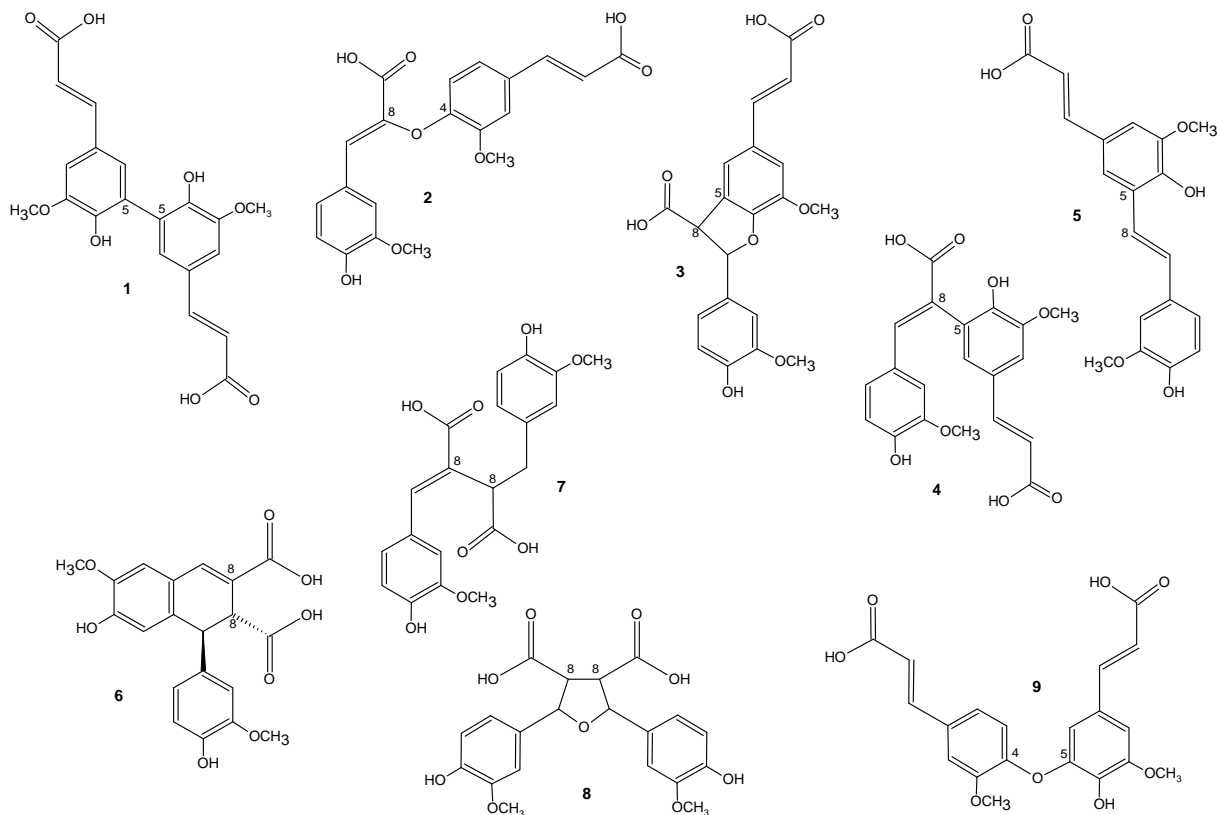


Abb. 1.8: Strukturen und Kopplungsmuster der in verschiedenen Pflanzenmaterialien identifizierten Dehydrodiferulasäuren (DFS): 5-5'-Kopplung (1); 8-O-4'-Kopplung (2); 8-5'-Kopplung: cyclische Form (3), offene Form (4), decarboxylierte Form (5); 8-8'-Kopplung: cyclische Form (6), offene Form (7), THF Form (8); 4-O-5'-Kopplung (9)

Die Bildung höherer Oligomere, wie trimerer oder tetramerer Ferulasäuren, wurde lange Zeit als unwahrscheinlich betrachtet, da die Möglichkeit des Aufeinandertreffens dreier an Polysaccharidstränge gebundener Ferulasäuren aus sterischen Gründen unrealistisch erschien. In 2003 gelang es erstmals, eine Triferulasäure, deren Ferulasäureeinheiten über eine 5-5'- und eine 8-O-4'-Kopplung verknüpft sind, aus Maiskleie zu isolieren und zu identifizieren (**10**, Abb. 1.9) (BUNZEL et al., 2003a, ROUAU et al., 2003). In den darauf folgenden Jahren konnten insgesamt sieben Triferulasäuren sowie zwei Tetraferulasäuren aus Maiskleie isoliert und identifiziert werden. Zunächst wurden im Jahre 2005 die 8-O-4',8'-O-4''-, 8-O-4',8'-8''c-, 5-5',8'-O-4''(H₂O)- und 8-5'nc,8'-O-4''-gekoppelten Triferulasäuren (**11-14**, Abb. 1.9) (BUNZEL et al., 2005a, FUNK et al., 2005) aus Maiskleie isoliert und identifiziert. In 2006 gelang dann erstmals, neben der Isolierung und Identifizierung zwei weiterer Triferulasäuren, der 5-5',8'-5''nc- und der 8-8'(THF),5'-5''-gekoppelten Form (**15-16**, Abb. 1.9), auch die Isolierung von zwei Tetraferulasäuren, die als 4-O-8',5'-5'',8''-O-4'''- und 4-O-8',5'-5'',8''-5'''nc-gekoppelte Tetraferulasäuren identifiziert wurden (**17-18**, Abb. 1.10) (BUNZEL et al., 2006).

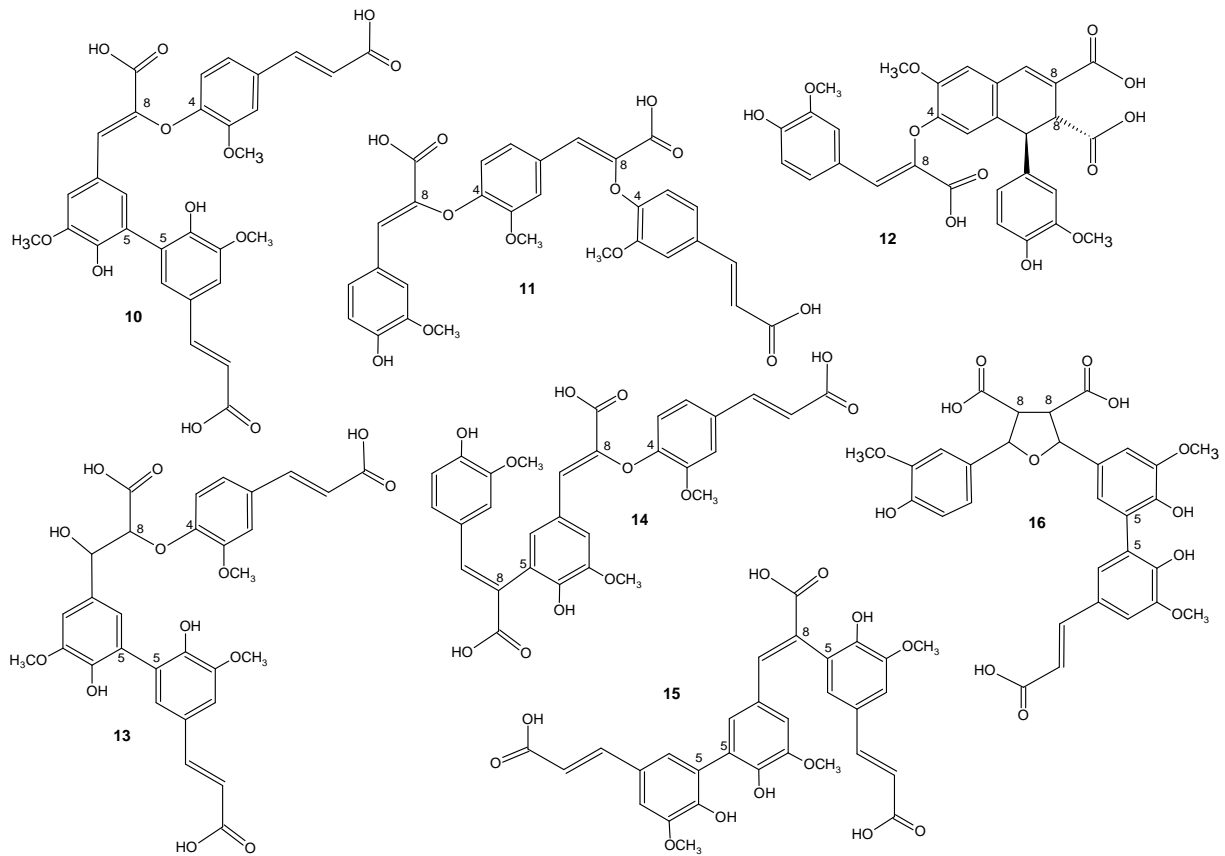


Abb. 1.9: Strukturen der aus Maiskleie isolierten und identifizierten Triferulasäuren (TFS) mit 5-5',8'-O-4''-Kopplung (10), 8-O-4',8'-O-4''-Kopplung (11), 8-O-4',8'-8''c-Kopplung (12), 5-5',8'-O-4''(H₂O)-Kopplung (13), 8-5'nc,8'-O-4''-Kopplung (14), 5-5',8'-5''nc-Kopplung (15), 8-8'(THF),5'-5''-Kopplung (16)

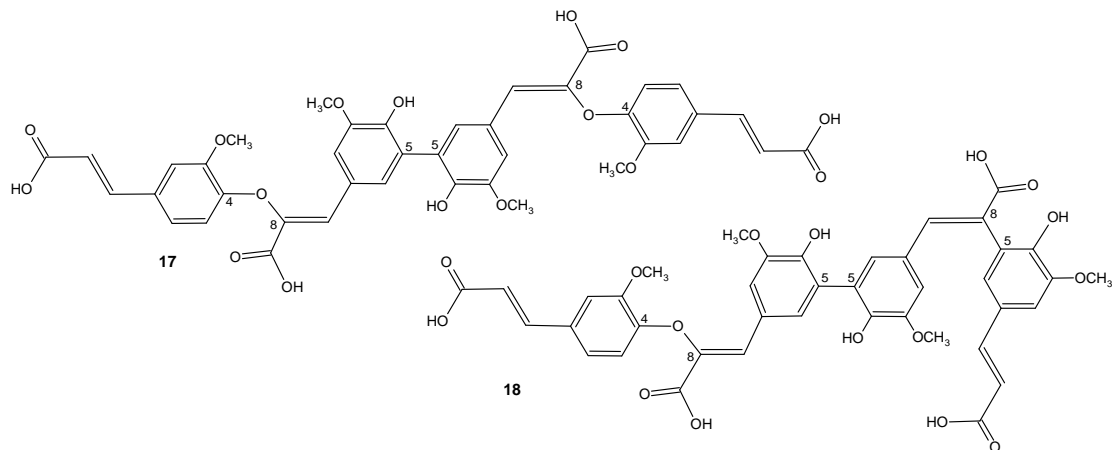


Abb. 1.10: Strukturen der aus Maiskleie isolierten und identifizierten Tetraferulasäuren (TetraFS) mit 4-O-8',5'-5'',8''-O-4'''nc-Kopplung (17) und 4-O-8',5'-5'',8''-5'''nc-Kopplung (18)

***p*-Cumarsäure-Dimere**

Während für FS sowohl Dimerisierungen nach dem photochemischen Mechanismus als auch nach dem enzymatisch katalysierten Radikalmechanismus beschrieben wurden, konnten von *p*CS bisher nur photochemisch gebildete Cyclobutandimere nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass *p*CS unter *in vitro* Bedingungen radikalisch koppelt. In der komplexen Pflanzenzellwand, in der *p*CS vorwiegend estergebunden an Sinapylalkohol bzw. die Syringyl-Einheiten des Lignins vorliegt, ist dieser Mechanismus jedoch aufgrund der geringen Radikalstabilität der entstehenden *p*CS-Phenoxyradikale wohl nur von untergeordneter Bedeutung. Es wird vielmehr angenommen, dass die durch Peroxidase/H₂O₂ aus *p*CS gebildeten Phenoxyradikale auf andere phenolische Verbindungen, insbesondere Sinapylalkohol oder andere freie phenolische Gruppen innerhalb des Lignins, übertragen werden (Radikal-Transfer-Reaktion). Da *p*CS unter oxidativen Bedingungen deutlich schneller umgesetzt wird als z.B. Sinapylalkohol, fungieren die entstehenden *p*CS-Radikale somit ihrerseits als „Oxidationskatalysator“ für die Sinapylalkohol-Dehydrodimerisierung (RALPH et al., 2004a, HATFIELD et al., 2008).

Sinapinsäure-Dimere

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2.1 beschrieben, ist über die Bindungsverhältnisse der SS in der pflanzlichen Zellwand noch wenig bekannt. SS enthält eine weitere Methoxygruppe in C-5-Position, weshalb dieses C-Atom für Kopplungsreaktionen blockiert ist. Für die radikalische Bildung von Homodehydrodimeren der SS stehen daher im Vergleich zur FS nur zwei primäre Kopplungsmöglichkeiten in C-8- und O-4-Position zur Verfügung. In 2003 konnten erstmals zwei SS-Homodimere und drei SS-FS-Heterodimere, die gemäß dem radikalischen Mechanismus gebildet wurden, identifiziert werden (BUNZEL et al., 2003b). Über den photochemischen Mechanismus gebildete Cyclobutanderivate der Sinapinsäure wurden bislang nicht beschrieben.

1.1.2.3 Cross-Linking von Zellwandpolymeren durch Phenolcarbonsäuren

PCS sind aufgrund ihrer Fähigkeit, Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren auszubilden, für die physikochemischen Eigenschaften und die Abbaubarkeit pflanzlicher Zellwände, worauf in Abschnitt 1.2.2 gesondert eingegangen wird, von besonderer Bedeutung. Neben den im Folgenden näher beschriebenen Cross-Links zwischen Polysacchariden untereinander und zwischen Polysacchariden und Lignin, konnte kürzlich erstmals auch die Kopplung von Polysacchariden und Proteinen über Ferulasäure-Tyrosin-Cross-Links gezeigt werden (PIBER & KOEHLER, 2005).

Polysaccharid-Polysaccharid-Cross-Links

Durch die Dimerisierung (siehe Abschnitt 1.1.2.2) von polysaccharidgebundener FS kommt es zu einer Quervernetzung (Cross-Linking) der Polysaccharide, insbesondere der Arabinoxylane. Während in verschiedenen Studien durch die Isolierung und Identifizierung von DFS-Oligosacchariden gezeigt werden konnte, dass die radikalisch gekoppelten DFS als Cross-Links zwischen Polysacchariden fungieren (ISHII, 1991a, SAULNIER et al., 1999, ALLERDINGS et al., 2005, BUNZEL et al., 2008), konnten entsprechende TFS- und/oder TetraFS-Oligosaccharide bislang nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren ist bislang ungeklärt, ob Tri- und Tetraferulasäuren tatsächlich intermolekulare Cross-Links zwischen drei bzw. vier Polysaccharidstränge ausbilden können oder ob diese zum Teil intramolekular gebildet werden (RALPH et al., 2004a, BUNZEL et al., 2006).

Polysaccharid-Lignin-Cross-Links

Es werden zwei Mechanismen zur Ausbildung von Polysaccharid-Lignin-Cross-Links diskutiert (RALPH et al., 1998). Beim „passiven“ Mechanismus wird davon ausgegangen, dass der FS-Polysaccharid-Ester mit der phenolischen OH-Gruppe nucleophil an das α -C-Atom eines Chinonmethids addiert, wodurch α -Etherbindungen entstehen. In Modellstudien konnte dieser Mechanismus zwar bestätigt werden (SCALBERT et al., 1986), da FS bei der Reaktion aber sowohl mit anderen Phenolen als auch mit Wasser um die bei der radikalischen Kopplung von Monolignolen an das Ligninpolymer als Zwischenstufe entstehenden Chinonmethide konkurriert, wird dieser Mechanismus als wenig wahrscheinlich angenommen (BUNZEL et al., 2004b, RALPH et al., 2004a). Der von der Arbeitsgruppe von RALPH erstmals beschriebene und anhand von Kernresonanzspektroskopie (NMR)-Studien *in vivo* und *in vitro* nachgewiesene „aktive“ Mechanismus berücksichtigt hingegen, dass neben den Monolignolen auch die FS-Polysaccharid-Ester resonanzstabilisierte Phenoxyradikale bilden. Diese können analog zur radikalischen Kopplung von FS mit Monolignolradikalen (Abschnitt 1.1.2.2 bzw. 1.1.3) Kreuzkopplungsprodukte (8- β -, 5- β - oder 4-O- β -Kopplungen) bilden (RALPH et al., 1992a, RALPH et al., 1992b, RALPH et al., 1995, QUIDEAU & RALPH, 1997). Bestätigt wurde der „aktive“ Mechanismus durch die Isolierung und Identifizierung von FS-Monolignol-Kreuzprodukten, vorwiegend FS-Coniferylalkohol-Kreuzprodukte aus Gräsern und Getreideballaststoffen sowie aus künstlich lignifizierten primären Maiszellwänden (JACQUET et al., 1995, GRABBER et al., 2002, BUNZEL et al., 2004b). Da auch radikalisch gekoppelte DFS immer mindestens eine freie phenolische OH-Gruppe beinhalten, können auch diese als Polysaccharid-Lignin-Cross-Links fungieren (RALPH et al., 1998, RALPH et al., 2004a). Hierbei konnten GRABBER et al. (2000) zeigen, dass die 5-5'-DFS gegenüber den anderen DFS-Isomeren bevorzugt reagiert. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die beschriebenen Cross-Links nur zwischen FS/DFS und Monolignolen, nicht aber zwischen FS/DFS und Lignin-Oligomeren ausgebildet werden.

Polysaccharidgebundene FS und DFS gelten daher als Initiationsstellen der Lignifizierung (RALPH et al., 1995).

Cross-Links über photochemisch gekoppelte Cyclobutandimere

Über die Bedeutung photochemisch gekoppelter Cyclobutandimere von FS und *p*CS für die Ausbildung von Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren ist bislang nur wenig bekannt. Ausgehend von den dominierenden Bindungsverhältnissen von FS und *p*CS in der pflanzlichen Zellwand (FS Polysaccharid, *p*CS Lignin assoziiert) ist aber sowohl die Ausbildung von Polysaccharid-Polysaccharid-Cross-Links durch FS-Homodimere als auch die Ausbildung von Polysaccharid-Lignin-Cross-Links über FS-*p*CS-Heterodimere denkbar. Darüber hinaus könnten über die Bildung von *p*CS-Homodimeren auch Quervernetzungen innerhalb des Ligninpolymers entstehen (GRABBER et al., 2004, GRABBER, 2005).

1.1.3 Lignin

Lignin ist nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer der Welt. Es ist eine der Hauptstrukturkomponenten der sekundären Pflanzenzellwand, der das Lignin in erster Linie als Gerüstsubstanz Festigkeit und Stabilität verleiht. Nur auf dieser Grundlage ist es den Pflanzen möglich, stabile Sprossachsen (Stämme, Stängel etc.) auszubilden. Die Hydrophobizität des Lignins ermöglicht darüber hinaus die Ausbildung von Wasserleitungsbahnen innerhalb der Pflanze. Des Weiteren dient Lignin der Pflanze als Schutz vor dem Eindringen pathogener Keime. Definiert ist Lignin als polymeres Naturprodukt, das durch enzymatisch initiierte Dehydrogenierungs-Polymerisation dreier primärer Vorstufen, Coniferyl-, Sinapyl- und *p*-Cumarylalkohol entsteht (SARKANEN & LUDWIG, 1971).

Die Biosynthese dieser Monolignole erfolgt, wie die Synthese der Phenolcarbonsäuren (Abschnitt 1.1.2), über den Phenylpropanstoffwechsel. Dabei verläuft der Hauptbildungsweg, wie in Abb. 1.11 vereinfacht dargestellt, über die aktivierte Form der *p*CS (BOERJAN et al., 2003, RALPH et al., 2004c). *p*-Cumarylalkohol wird über mehrere Reduktionsschritte direkt aus der aktivierten *p*CS gebildet. Die Bildung von Coniferylalkohol und Sinapylalkohol verläuft über die aktivierte Form der Kaffeesäure sowie der FS und der anschließenden Reduktion zu Coniferylaldehyd. Während Coniferylalkohol direkt aus Coniferylaldehyd gebildet wird, erfolgt die Bildung von Sinapylalkohol über die Zwischenstufen 5-Hydroxyconiferylaldehyd und Sinapaldehyd. Sinapylalkohol kann aber auch direkt aus Coniferylalkohol gebildet werden (DIXON et al., 2001). Die im Protoplasten gebildeten Monolignole werden in Form der Glucoside in die Zellwand transportiert, wo sie im Anschluss an die Glycosidspaltung der Ligninbiosynthese zur Verfügung stehen.

Die Lignifizierung der pflanzlichen Zellwand beginnt in der Mittellamelle und den Zellecken der Primärwand von so genannten „nucleation sites“ ausgehend, wobei neben den bereits in

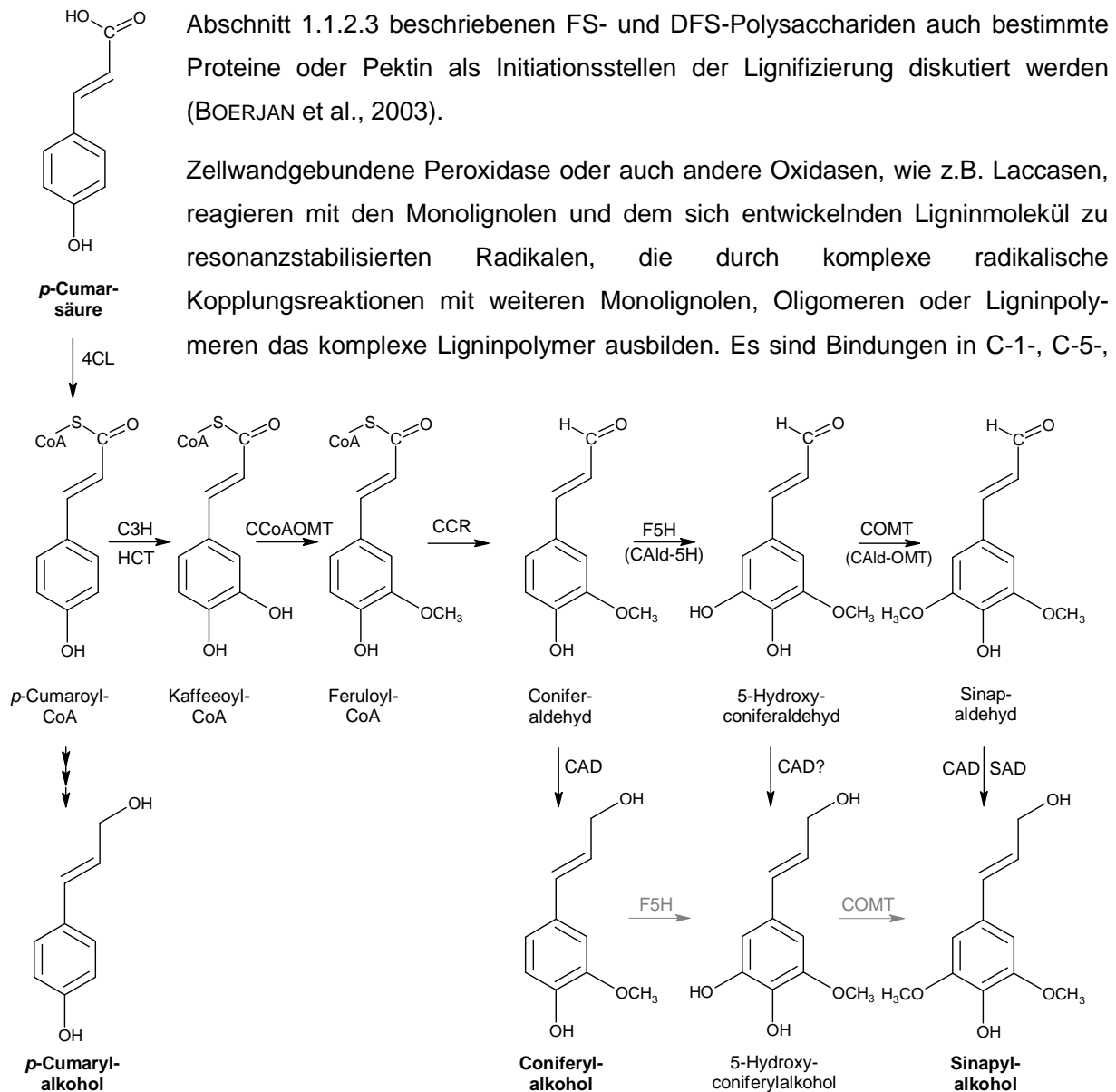


Abb. 1.11: Vereinfachte Darstellung der Monolignolbiosynthese aus *p*-Cumarsäure (4CL = 4-Cumarsäure:CoA-Ligase, C3H = *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, HCT = *p*-Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimisäure Hydroxycinnamoyltransferase, CCoAOMT = Kaffeeoyl-CoA-O-Methyltransferase, CCR = Cinnamoyl-CoA-Reduktase, F5H = Ferulat-5-Hydroxylase, CAld-5H = Coniferaldehyd-5-Hydroxylase, COMT = Kaffeesäure-O-Methyltransferase, CAld-OMT = 5-Hydroxyconiferaldehyd-O-Methyltransferase, CAD = Zimtalkohol-Dehydrogenase, SAD = Sinapylalkohol-Dehydrogenase)

4-O- und C- β -Position möglich (Abb. 1.12), wobei sowohl Ether- (Alkyl-O-Aryl, Aryl-O-Aryl) als auch C-C-Bindungen gebildet werden (ADLER, 1977, BOERJAN et al., 2003, RALPH et al., 2004c). In Abb. 1.13 sind die möglichen Bindungen zwischen den Phenylpropaneinheiten im Ligninpolymer dargestellt. Der vorherrschende Bindungstyp hängt dabei sowohl vom Entwicklungsstadium des Lignins in der Zellwand ab als auch von der Monolignolzusammensetzung. So ist Sinapylalkohol aufgrund der weiteren Methoxygruppe in C 5-Position nicht in der Lage, β -5, 5-5 und 5-O-4-Kopplungen auszubilden.

Die Bindungen im Ligninpolymer entstehen bevorzugt durch Kopplungen zwischen Monolignolen mit Oligomeren oder zwischen Oligomeren. Die Kopplung nur zwischen Monolignolen, bei der bevorzugt β - β -Bindungen (**26**, Abb. 1.13) gebildet werden, scheint hingegen lediglich zu Beginn der Lignifizierung von Bedeutung zu sein (BOERJAN et al., 2003). In den späteren Entwicklungsstadien des Lignifizierungsprozesses stellt die β -O-4-Bindung (**19**, Abb. 1.13) mit über 50 % den dominierenden Bindungstyp dar (GRABBER et al., 2003). Die β -5-Kopplung bzw. die daraus resultierende β -5(α -O-4)-Kopplung (**23**, Abb. 1.13) sowie 5-O-4- und 5-5-Kopplungen (**20**, **21**, Abb. 1.13) sind nur in geringerem Maße vertreten, wobei letztere aber als Verzweigungspunkte innerhalb des Ligninpolymers von Bedeutung sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der 5-5-gekoppelten Lignin-Einheiten in einer achtgliedrigen Ringstruktur, der Dibenzodioxocin-Form, vorliegen (**22**, Abb. 1.13). Diese wird durch Addition eines weiteren Monolignols in β -Position und einer anschließenden intramolekularen Umlagerung gebildet. *In vitro* Studien zeigten, dass einfache β -1-Kopplungen (**24**, Abb. 1.13) vermutlich aus Spirodienoneinheiten (**25**, Abb. 1.13) gebildet werden (SETÄLÄ et al., 1999).

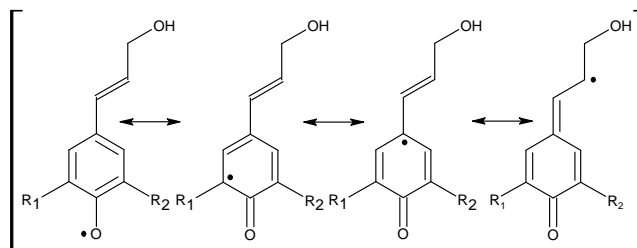


Abb. 1.12: Resonanzstabilisierte Phenoxyradikale der Monolignole ($R_1/R_2 = H$ oder OCH_3)

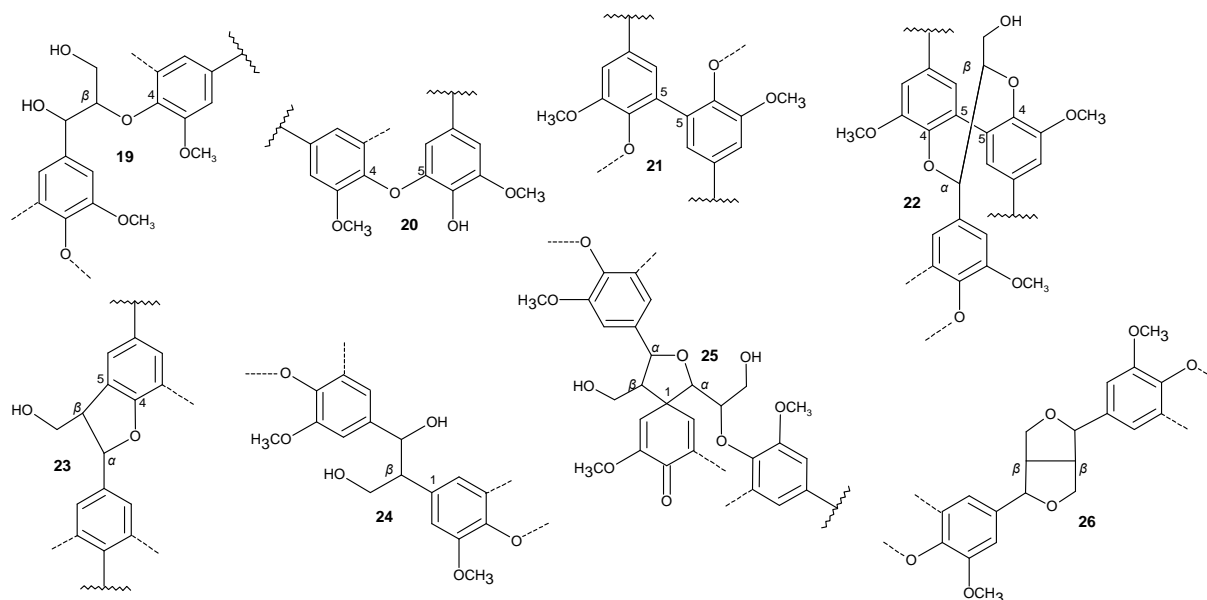


Abb. 1.13: Vorherrschende Bindungstypen zwischen den Phenylpropaneinheiten im Ligninpolymer: β -O-4-Kopplung (β -Arylether) (**19**), 5-O-4-Kopplung (Biphenylether) (**20**), 5-5-Kopplung (Biphenyl) (**21**), 5-5/ β -O-4(α -O-4)-Kopplung (Dibenzodioxocin) (**22**), β -5(α -O-4)-Kopplung (Phenylcumarin) (**23**), β -1-Kopplung (**24**), β -1(α -O- α)-Kopplung (Spirodienon) (**25**), β - β (γ -O- α)-Kopplung (Resinol) (**26**)

Die Monolignolzusammensetzung sowie die vorherrschenden Bindungstypen im Ligninpolymer variieren sowohl innerhalb der Entwicklungsstadien der Pflanze als auch nach deren botanischer

Herkunft und dem untersuchten Gewebetyp. Lignine monokotyler Gräser bestehen vorwiegend aus Guaiacyl- (G) und Syringyleinheiten (S) (Abb. 1.14), die sich von den Monolignolen Coniferyl- und Sinapylalkohol ableiten. *p*-Hydroxyphenyleinheiten (H), abgeleitet von *p*-Cumarylalkohol, sind hingegen nur als Minorkomponenten enthalten (GRABBER et al., 2004).

Neben den drei genannten Monolignolen sowie der bereits in Abschnitt 1.1.2.1 beschriebenen Einlagerung von *p*CS-Monolignol-Estern konnte auch eine Vielzahl anderer Monomere in Ligninen identifiziert werden. Hierzu zählen zum einen Nebenprodukte der Monolignolbiosynthese, wie z.B. 5-Hydroxyconiferylalkohol, aber auch andere phenolische Verbindungen, wie z.B. Hydroxybenzaldehyde oder Dihydrozimtalkohole (BOERJAN et al., 2003, RALPH et al., 2004c). Insbesondere bei genetisch veränderten Pflanzen, wie z.B. dem brown midrib Mais, werden vermehrt ungewöhnliche Monolignole eingebaut (MARITA et al., 2003).

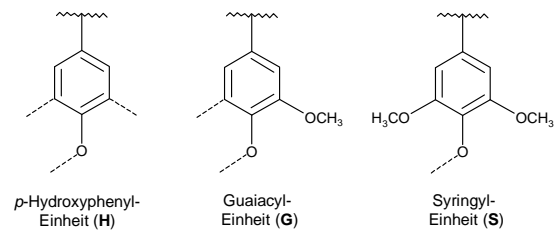


Abb. 1.14: Struktureinheiten im Ligninpolymer

1.2 Grundlagen zum ruminalen Verdau von Futtermitteln

1.2.1 Allgemeiner Aufbau des Magensystems des Wiederkäuers

Das in Abb. 1.15 schematisch dargestellte Verdauungssystem des Wiederkäuers besteht aus drei Vormägen, dem voluminösen Pansen (Rumen), dem Netzmagen (Reticulum) und dem Blättermagen (Omasum), denen der mit Drüsen körpereigener Verdauungsssekrete ausgestattete Labmagen folgt.

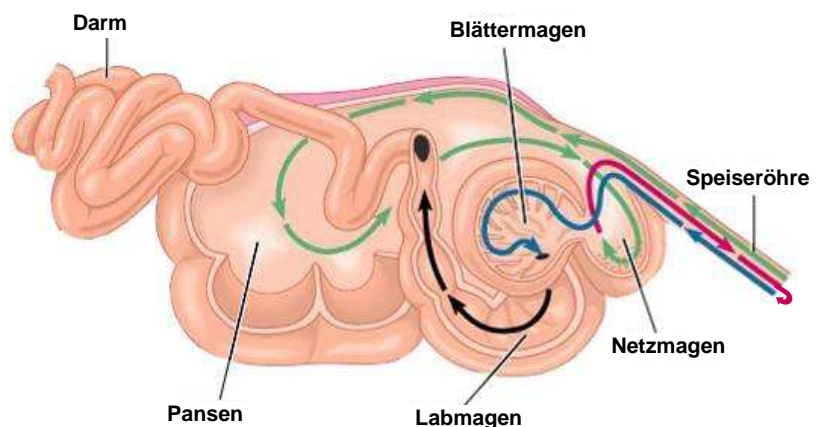


Abb. 1.15: Schematische Darstellung des Verdauungstraktes des Wiederkäuers (Rindes)

Der Pansen macht den

größten Anteil der Vormägen aus und ist für den Aufschluss der pflanzlichen Nahrung von essentieller Bedeutung. Er beherbergt eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, ca. 10^9 - 10^{10} Bakterien, 10^5 - 10^6 Protozoen und 10^3 - 10^4 Pilze pro mL Pansensaft, die in einem symbiotischen Verhältnis zum Tier stehen und einen Großteil der pflanzlichen Strukturpolysaccharide in verwertbare Nährstoffe umsetzen (MCALLISTER & CHENG, 1996, JUNG, 1997, SPANN, 1999). Die Mikroorganismenzusammensetzung im Pansen ist äußerst mannigfaltig.

Bisher konnten rund 200 Bakterienarten, 100 Protozoenarten und 8 Pilzarten identifiziert werden (MCALLISTER & CHENG, 1996). 99,5 % der Bakterien sind Anaerobier und können aufgrund ihrer Enzymausstattung Cellulose, Hemicellulosen und Pektine in die für den Wiederkäuer energetisch nutzbaren Endprodukte, kurzkettige Fettsäuren, spalten. Die drei vorherrschenden Spezies innerhalb der cellulolytischen Bakterien sind *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* und *Ruminococcus albus* (MCALLISTER et al., 1994, WEIMER, 1996).

Während die Enzymaktivität im Pansensaft relativ gering ist, erfolgt der größte Teil der Abbauvorgänge innerhalb fest an die Faserpartikel anhaftender Biofilme. Die Primärflora, vorwiegend cellulolytische Bakterien, lagert sich schon nach wenigen Minuten an die Partikeloberfläche an und beginnt mit der Ausbildung eines Biofilms. Die Benetzung der Futterpartikel durch die Biofilme ermöglicht eine direkte Bindung der freigesetzten Enzyme an das Substrat. Zudem stellen sie einen Schutz vor enzymverwertenden, panseneigenen Proteasen dar. Aufgrund der Fähigkeit ihrer Hyphen, Zellwandstrukturen zu durchwachsen, diese damit aufzubrechen und somit der restlichen Mikroorganismenflora zugänglich zu machen, kommt den Pilzen eine besondere Bedeutung beim Verdau von Pflanzenfasern zu. Pilze machen jedoch nur ca. 8 % der mikrobiellen Masse aus.

Der Netzmagen hat die Aufgabe, bereits im Pansen befindliche Nahrung für die Wiederkautätigkeit zurück in das Maul zu befördern. Während des Wiederkäuens produziert ein Rind pro Tag mehr als 100 L Speichel. Neben der Benetzung des Pflanzenmaterials liegt die Aufgabe des Speichels vor allem in der Neutralisierung des stark sauren pH-Wertes im Pansen, der durch die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren bedingt ist. Nicht ausreichende Wiederkautätigkeit bedingt durch zu geringen Fasergehalt in der Nahrung, kann daher zu einer Übersäuerung (Acidose) des Tieres führen.

Ist die Nahrung ausreichend zersetzt, wird sie nach ca. 24 h bis zu max. 96 h portionsweise in den Blättermagen transportiert, wo ihr Wasser, Nährstoffe und Mineralstoffe entzogen werden. Im Labmagen werden noch vorhandene Nährstoffe schließlich sauer und enzymatisch aufgeschlossen. Enthaltene Mikroorganismen werden abgetötet und als hochwertige Proteinquelle verwertet (SPANN, 1999).

1.2.2 Einfluss der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Futtermittelverdaubarkeit

Es konnte in verschiedenen *in vitro* Studien gezeigt werden, dass isolierte Strukturpolysaccharide, sowohl Cellulose als auch Hemicellulosen, durch Pansenmikroorganismen vollständig abgebaut werden (MOORE & HATFIELD, 1994, WEIMER et al., 2000). In der komplexen pflanzlichen Zellwand wird deren Abbaubarkeit allerdings durch die Zugänglichkeit der Polysaccharidstrukturen für die Enzyme der Pansenmikroorganismen begrenzt. Als limitierende Faktoren der Zellwandabbaubarkeit sind sowohl die Lignifizierung der Zellwand als auch das

Ausmaß an Polysaccharid-Polysaccharid- sowie Polysaccharid-Lignin-Cross-Links durch PCS in der Literatur beschrieben (HATFIELD et al., 1999, GRABBER et al., 2004, GRABBER, 2005).

Ein Zusammenhang zwischen der Lignifizierung der Zellwand und deren Abbaubarkeit wird seit langem vermutet. Negative Korrelationen zwischen dem Ligningehalt und der Abbaubarkeit der Zellwand konnten in zahlreichen Studien sowohl an normalen Maisgenotypen als auch an gezielt genetisch veränderten Pflanzen, insbesondere den brown midrib Mutanten von Mais, nachgewiesen werden (BUXTON & RUSSELL, 1988, DEINUM & STRUIK, 1989, LUNDVALL et al., 1994, ARGILLIER et al., 1996, JUNG et al., 1998, MÉCHIN et al., 2000, BARRIÈRE et al., 2003, JUNG & CASLER, 2006b). Während die meisten dieser Studien über ein breites Spektrum von Reifestadien angelegt waren, konnten bei Untersuchungen unterschiedlicher Sorten zu gleichen Reifestadien hingegen nur schwache Korrelationen zwischen der Zellwandabbaubarkeit und dem Ligningehalt festgestellt werden (JUNG & CASLER, 1991, JUNG & VOGEL, 1992, JUNG & BUXTON, 1994). Der Ligningehalt allein ist somit nicht geeignet, die komplexen Abbauvorgänge innerhalb der Zellwand zu beschreiben. Es wurde daher angenommen, dass neben dem Ligningehalt weitere Faktoren, wie z.B. die Ligninzusammensetzung und -struktur oder das Ausmaß an über PCS ausgebildeten Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren, einen Einfluss auf die Abbaubarkeit der Zellwandpolysaccharide haben. Darüber hinaus konnte aber auch gezeigt werden, dass auch die Pflanzenanatomie sowie die durch die Partikelgröße des Futtermittels limitierte Zugänglichkeit der Verdauungsenzyme zur Zellwand unabhängig von der chemischen Struktur der Pflanzenzellwände einen bedeutenden Einfluss auf die Abbaubarkeit hat (WILSON & MERTENS, 1995, WILSON & KENNEDY, 1996, WILSON & HATFIELD, 1997, JUNG et al., 2000).

Hinsichtlich des Einflusses der Ligninzusammensetzung und -struktur auf die Abbaubarkeit wurden widersprüchliche Ergebnisse beobachtet. Während die Abbaubarkeit in einigen Studien negativ zum S/G-Verhältnis korreliert war, konnten in anderen Studien positive oder keine Korrelationen beobachtet werden (BUXTON & RUSSELL, 1988, JUNG & CASLER, 1991, JUNG & VOGEL, 1992, JUNG & BUXTON, 1994, JUNG et al., 1994, JUNG et al., 1999, MÉCHIN et al., 2000). In Studien an künstlich lignifizierten, primären Maiszellwänden, bei denen gezielt nur das S/G-Verhältnis variiert wurde, konnte kein Einfluss der Ligninzusammensetzung auf die Abbaubarkeit festgestellt werden (GRABBER et al., 1997, GRABBER et al., 2003).

FS haben durch die Ausbildung von Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren erheblichen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften der pflanzlichen Zellwand. So wird durch die Ausbildung von Quervernetzungen zwischen Polysacchariden, insbesondere den Heteroxylenen, die Löslichkeit dieser Kohlenhydrate beeinflusst. Darüber hinaus konnte für AX gezeigt werden, dass durch einen höheren Vernetzungsgrad die Angreifbarkeit durch Xylanasen vermindert wird (GRABBER et al., 1998a, GRABBER et al., 1998b, BUNZEL et al., 2002b, BEAUGRAND et al., 2004).

Während die genannten DFS-Cross-Links zwischen Polysacchariden den Abbau durch mikrobielle Enzyme wahrscheinlich nur verlangsamen, scheint der Ausbildung von Polysaccharid-

Lignin-Komplexen eine größere Rolle bei der Inhibierung des mikrobiellen Abbaus von Pflanzenzellwänden und damit der Futtermittelverwertbarkeit zuzukommen. Wie bereits in Abschnitt 1.1.2.3 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass an AX gebundene FS und DFS über radikalische Kopplungen kovalent an Monolignole gebunden werden, wobei sowohl Ether- als auch C-C-Bindungen entstehen. Dabei sind die α -O-4- sowie die β -O-4-Etherbindungen die einzigen entstehenden Bindungstypen, die mit den derzeitigen analytischen Methoden routinemäßig bestimmt werden können (GRABBER et al., 2004, JUNG & CASLER, 2006b). Negative Korrelationen zwischen dem Gehalt ethergebundener FS und der Abbaubarkeit konnten in verschiedenen Studien über einen weiten Reifezeitraum analog zur Korrelation zwischen Ligningehalt und Abbaubarkeit nachgewiesen werden (ARGILLIER et al., 1996, CASLER & JUNG, 1999, MÉCHIN et al., 2000, LAM et al., 2003). Bei gleichen Reifestadien waren diese Korrelationen wiederum nur schwach (JUNG & BUXTON, 1994).

*p*CS liegt in der Zellwand überwiegend estergebunden an die γ -Position der S-Einheiten im Lignin vor. Die Einlagerung von *p*CS erfolgt daher zeitgleich mit der Lignifizierung der Zellwand, weshalb der *p*CS-Gehalt im Allgemeinen als Indikator für den Ligningehalt angesehen wird (MORRISON et al., 1998, VAILHÉ et al., 2000). Negative Korrelationen zur Zellwandabbaubarkeit konnten analog zum Lignin in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (HARTLEY, 1972, GABRIELSEN et al., 1990, GRABBER et al., 1992). Da die *p*CS-Ester allerdings im Gegensatz zur FS in der Regel nicht kovalent an andere Zellwandkomponenten gebunden sind, sollten diese keinen direkten Einfluss auf die Abbaubarkeit haben (JUNG & DEETZ, 1993). Allerdings deuteten Zellwandmodellstudien an, dass *p*CS eventuell die Ausbildung von FS-Lignin-Cross-Links verringern könnten, wodurch *p*CS einen indirekten Einfluss auf die Abbaubarkeit hätte. Darüber hinaus ist die Bedeutung photochemischer Dimerisierungen der *p*CS, die zu Quervernetzungen innerhalb des Ligninpolymers führen, bislang unerforscht (GRABBER et al., 2004).

Die wohl größte Hürde zur züchterischen oder transgenen Verbesserung der Zellwandabbaubarkeit liegt in der Vielzahl und insbesondere in der Komplexität der chemischen und anatomischen Einflussfaktoren. So führen Veränderungen eines Parameters, wie z.B. des Cross-Linkings durch FS, meist auch zu Veränderungen anderer Einflussparameter, wie z.B. dem Ligningehalt. Die Veränderungen können sowohl einen synergetischen Einfluss auf die Abbaubarkeit haben, aber auch einander entgegenwirken. In Tabak konnte z.B. gezeigt werden, dass eine genetisch bedingte, drastische Verminderung des Ligningehaltes durch ein gesteigertes Zellwand-Cross-Linking kompensiert werden konnte, so dass die Abbaubarkeit unverändert blieb (CHABANNES et al., 2001). Darüber hinaus muss bei starken züchterischen oder genetischen Veränderungen auch immer die wirtschaftliche Nutzbarkeit Berücksichtigung finden. So kann es bei Züchtungen ausschließlich in Richtung eines geringen Ligningehalts zu Problemen mit der Standfestigkeit der Pflanzen kommen.

1.3 Problemstellung

Die Beurteilung des Futterwertes der Maisrestpflanze ist sowohl aus Sicht der Pflanzenzüchtung als auch aus Sicht der Tierernährung von enormer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die Verdaubarkeit der pflanzlichen Zellwand auf komplexe Weise durch die physikochemischen Eigenschaften ihrer Strukturkomponenten beeinflusst wird (HATFIELD et al., 1999, GRABBER et al., 2004, GRABBER, 2005). Detaillierte Kenntnisse über die chemischen Strukturen pflanzlicher Gerüstsubstanzen sind daher für die Betrachtung der Futtermittelqualität, unverzichtbar. Dabei werden neben dem Ligningehalt die über Phenolcarbonsäuren gebildeten Cross-Links zwischen den Zellwandstrukturkomponenten als Haupteinflussfaktoren für die Inhibierung der Abbaubarkeit der Zellwandpolysaccharide angenommen. Andere Faktoren wie Ligninzusammensetzung und Polysaccharidstrukturen können die Abbaubarkeit theoretisch beeinflussen, wurden bislang jedoch eher kontrovers diskutiert.

In den meisten Studien an dem Futtermittel Mais, in denen abbauinhibierende Einflüsse von Lignin und Phenolcarbonsäure-Cross-Links nachgewiesen werden konnten, wurden entweder Maispflanzen deutlich unterschiedlicher Reifestadien oder Maispflanzen, die aufgrund züchterischer oder gentechnischer Veränderungen stark unterschiedliche Zellwandzusammensetzungen aufwiesen, untersucht. Inwieweit diese Einflussparameter auch auf tatsächlich in der Landwirtschaft verwendete Sorten und realistische Erntezeitpunkte zu übertragen sind, ist fraglich. Zudem beschränkten sich die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss der Phenolcarbonsäuren meist auf die ester- und ethergebundene, monomere Ferulasäure und die estergebundene *p*-Cumarsäure. Höhere Oligomere der Ferulasäure wurden bislang nur in wenigen Studien und auch dort nur unvollständig identifiziert und quantifiziert. Die Bedeutung von photochemisch gekoppelten Cyclobutandimeren der Phenolcarbonsäuren auf die Futtermittelabbaubarkeit ist bislang weitestgehend unklar.

Aus Sicht der Tierernährung liegt das Hauptaugenmerk der Futtermittelanalytik zwar auf der Untersuchung tatsächlich in der Landwirtschaft verwendeter Sorten. Die Zielsetzung ist hier aber weniger die detaillierte Beurteilung der Einflüsse einzelner Zellwandstrukturkomponenten als vielmehr die möglichst schnelle und einfache Untersuchung, die den Vergleich vieler Sorten ermöglicht. Die Analytik beschränkt sich daher häufig auf die Bestimmung der *in vitro*, *in situ* und/oder *in vivo* Abbaubarkeit der Trockensubstanz und die mit verschiedenen extraktiven und/oder gravimetrischen Methoden ermittelten Fasergehalte. Die häufigsten extraktiven Methoden sind die bereits im 19. Jahrhundert beschriebene Bestimmung des Rohfaseranteils (crude fiber) im Rahmen der Weender-Futtermittel-Analyse (HENNEBERG & STOHMANN, 1859) sowie die Bestimmung des NDF-Gehaltes (neutral detergent fiber) im Rahmen der von VAN SOEST (1963) erstmals beschriebenen Detergenzienanalyse. Es ist bekannt, dass die ermittelten Gehalte lediglich variable Teile der Zellwandstrukturen repräsentieren, da z.B. nicht lignifizierte Xylane und Pektine unter den gewählten Bedingungen zumindest teilweise in Lösung gehen.

Detaillierte Erkenntnisse über einzelne Zellwandstrukturkomponenten können mit diesen Methoden somit nicht erhalten werden. Aufgrund der einfachen, teilweise automatisierbaren Durchführung, die aus wirtschaftlicher Sicht ein schnelles Screening vieler Sorten erlaubt, sowie aufgrund der Vielzahl an bereits vorhandenen Vergleichsdaten sind diese Methoden in der Futtermittelanalytik und -beurteilung jedoch von großer Bedeutung (JUNG, 1997, HUHTANEN et al., 2006).

Ziele der vorliegenden Arbeit, die Teil eines Kooperationsprojektes mit der Abteilung für Tierernährung der Technischen Universität München war, waren daher die möglichst detaillierte qualitative und quantitative Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten der Maisrestpflanze, die Beurteilung des Einflusses des Genotyps, der Reife und der Witterungsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten sowie die Frage, ob die in der Literatur beschriebenen Einflüsse der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Trockensubstanz- und Polysaccharidabbaubarkeit auch in tatsächlich in der Futtermittelproduktion verwendeten Maissorten und realistischen Erntezeitpunkten wiedergefunden werden können.

Es sollten insgesamt sechs Maissorten, die in Deutschland seit längerem zur Produktion von Maissilage verwendet werden, über zwei Anbaujahre (2004 und 2005) und zwei für die Herstellung von Maissilage realistische Erntezeitpunkte hinweg untersucht werden.

Die **Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten** sollte in die Analytik der Kohlenhydrate, der PCS und des Lignins unterteilt werden. Neben der Bestimmung der Kohlenhydratgehalte sollten die Monosaccharidzusammensetzung sowie die Struktur (Monosaccharidbindungsverhältnisse) der **Zellwandpolysaccharide** analysiert werden. Für die **Identifizierung und Quantifizierung monomerer und dimerer Phenolcarbonsäuren** sollte zunächst eine verlässliche Bestimmungsmethode mittels Hochleistungsflüssigchromatographie entwickelt und validiert werden. Dabei wurde die flüssigchromatographische Bestimmung einer Bestimmung mittels Gaschromatographie vorgezogen, um eventuell vorhandene Triferulasäuren mitbestimmen zu können. Die **Isolierung und Identifizierung von höheren Oligomeren der Ferulasäure sowie von Cyclobutandimeren der Phenolcarbonsäuren** sollten darüber hinaus einen Beitrag zur detaillierten Strukturcharakterisierung pflanzlicher Zellwände liefern. Es ist bekannt, dass verschiedene Methoden zur Bestimmung von Lignin zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Um ein gutes Bild über den tatsächlichen Ligningehalt der Untersuchungsmaterialien zu gewinnen, sollte die **Bestimmung des Ligningehaltes** über zwei Methoden erfolgen, die sich hinsichtlich ihrer analytischer Prinzipien und Fehlerquellen unterscheiden. Die **Bestimmung der Monolignolzusammensetzung** sollte darüber hinaus der Strukturcharakterisierung dienen und Aussagen über einen möglichen Einfluss der Ligninstruktur auf die Abbaubarkeit ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Der Anbau sowie die Ernte des Untersuchungsmaterials erfolgte an der Abteilung für Tierernährung der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Frieder Schwarz und Frau Friederike Zeller. Das Saatgutmaterial wurde von der Monsanto Agrar Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt.

Es wurden insgesamt 6 Maissorten (*Zea mays* L.) unterschiedlicher Reifegruppen über zwei Anbaujahre (2004 und 2005) zu jeweils 2 Erntezeitpunkten (E 1 und E 2) untersucht. Die Erntezeitpunkte wurden anhand des Trockensubstanzgehaltes (TS) der Körner bestimmt und stellen in der Praxis übliche Reifestadien zur Herstellung von Maissilage dar.

Maissorten werden in der Regel anhand ihrer Siloreifezahl in verschiedene Reifegruppen eingeteilt. Die Siloreifezahl ist ein empirisch vom Saatguthersteller ermittelter Wert, der dem TS-Gehalt der Ganzpflanze (in g/kg) zum optimalen Erntezeitpunkt (maximale Kolbenausbeute) entspricht. In dieser Arbeit erfolgt eine Aufteilung in zwei Reifegruppen. Reifegruppe I umfasst die frühen bis mittelfrühen Sorten mit Siloreifezahlen bis S 250, während in Reifegruppe II die mittelspäten bis späten Sorten mit Siloreifezahlen über S 260 zusammengefasst werden.

Tab. 2.1 zeigt eine Übersicht der untersuchten Maissorten, der Siloreifezahlen, der Erntedaten sowie der entsprechenden TS-Gehalte in der Restpflanze bzw. in den Körnern zum Zeitpunkt der Ernte.

Tab. 2.1: Übersicht der untersuchten Maissorten - Einteilung in Reifegruppen anhand der Siloreifezahl (SRZ), Trockensubstanzgehalte (%) in der Restpflanze (RPf) bzw. den Körnern (K) zum Zeitpunkt der Ernte (E 1/E 2) (%) (ZELLER, 2008)

Sorte	SRZ	2004						2005					
		E 1			E 2			E 1			E 2		
		Ernte	RPf	K	Ernte	RPf	K	Ernte	RPf	K	Ernte	RPf	K
Reifegruppe I (früh bis mittelfrüh)													
DK 233	S 220	06.09.	20,3	51,6	27.09.	23,3	64,0	07.09.	20,2	48,6	26.09.	21,9	62,5
DKc 2949	S 230	13.09.	20,7	49,6	04.10.	25,5	62,4	14.09.	18,1	50,9	05.10.	20,1	60,7
DK 247	S 240	09.09.	21,1	52,4	27.09.	22,6	62,4	07.09.	20,4	47,6	26.09.	22,1	61,2
Reifegruppe II (mittelspät bis spät)													
Monumental	S 260	13.09.	21,7	52,8	03.10.	23,7	63,2	15.09.	18,4	56,8	28.09.	20,3	62,8
DK 281	S 260	15.09.	20,2	50,0	06.10.	25,8	62,4	16.09.	18,4	47,0	07.10.	21,8	61,0
DK 287	S 270	14.09.	20,0	52,4	06.10.	25,8	64,0	15.09.	17,8	50,8	05.10.	20,8	58,1

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden lediglich an der isolierten Restpflanze (Maisstroh) durchgeführt. Hierzu wurden nach der Ernte der Pflanzen die Kolben von der Gesamtmaispflanze getrennt und entliescht. Die Lieschen wurden der Restpflanze zugeordnet. Diese wurde zunächst mit einem Standhäcksler grob zerkleinert, gefriergetrocknet und anschließend mit einer Schlagkreuzmühle mit Segmentsieb auf eine Partikelgröße von < 3 mm vermahlen. Aus dem so erhaltenen Rohmaterial wurden die verschiedenen Untersuchungsmaterialien (siehe 2.1.1 - 2.1.3) hergestellt, wobei die 0 h- und 24 h-Materialien in 2005 für alle Sorten und in 2004 nur für die Sorten DK 233, DKc 2949 und DK 247 untersucht wurden.

2.1.1 Ausgangsmaterial

Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials (AM) wurde das Rohmaterial mit einer Planetenkugelmühle auf eine Partikelgröße von < 0,2 mm vermahlen und anschließend bei 40°C über Nacht im Vakuumtrockenschrank erneut getrocknet.

2.1.2 Wasserunlösliche Faserbestandteile - 0 h-Material

Zur Herstellung des 0 h-Materials (0 h) wurden die aus der Bestimmung der Auswaschverluste (siehe 2.2.1.2) zurückgebliebenen, gepoolten Faserbestandteile, wie für das Ausgangsmaterial unter 2.1.1 beschrieben, auf eine Partikelgröße von < 0,2 mm vermahlen und anschließend erneut getrocknet.

2.1.3 24 h ruminal inkubiertes Material

Zur Herstellung des 24 h ruminal inkubierten Materials (24 h) wurden die aus der Bestimmung der Inkubationsverluste (siehe 2.2.1.1) zurückgebliebenen, gepoolten Faserbestandteile, wie für das AM unter 2.1.1 beschrieben, auf eine Partikelgröße von < 0,2 mm vermahlen und anschließend erneut getrocknet.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Bestimmung der ruminalen Abbaubarkeit, des Auswaschverlustes, des Rohproteins und der Rohasche

Die Bestimmung der ruminalen Abbaubarkeit, der Auswaschverluste, der Rohprotein- sowie der Rohaschegehalte wurden an der Technischen Universität München (TUM) von Frau Friederike Zeller durchgeführt. Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit soll daher nur ein knapper Überblick über die für diese Arbeit wichtigen Parameter der angewandten Methoden gegeben werden, für eine detaillierte Beschreibung siehe ZELLER (2008).

2.2.1.1 Bestimmung der ruminalen Abbaubarkeit

Für die Bestimmung der ruminalen Abbaubarkeit von Futtermitteln existieren verschiedene Methoden, die auf *in vivo*, *in situ* (= *in sacco*) oder *in vitro* Bestimmungen basieren. Dabei wird die *in situ* Methode im Allgemeinen als Referenzmethode für die Beschreibung der Abbauvorgänge im Pansen angesehen (DEWHURST et al., 1995, DE BOEVER et al., 2002).

In vivo Methoden sind klassischerweise Ausscheidungsversuche, bei denen die Gesamtabbaubarkeit eines Futtermittels durch die Differenz der vom Rind aufgenommenen Futtermenge zur Kotmenge bestimmt wird (KIRCHGESSNER, 1997). Eine Rückgewinnung des Materials zur Beurteilung des direkten Einflusses der Pansenfermentation ist somit bei der Verwendung von *in vivo* Methoden nicht möglich. *In vitro* Methoden verwenden für den Abbau der Pflanzenbestandteile meist Pansensaft oder Enzymgemische, während bei *in situ* Abbaubarkeitsmessungen das Untersuchungsmaterial in Nylonbeuteln geringer Porengröße direkt im Pansen fistulierter Tiere inkubiert wird. Mit beiden Methoden ist eine Rückgewinnung des verdauten Materials möglich. Die Bedingungen der *in vitro* Fermentation sind allerdings nur bedingt mit den Bedingungen im Pansen vergleichbar. So dass der Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten *in situ* Methode gegenüber den *in vitro* Methoden vor allem in der Fermentation des Pflanzenmaterials unter maximal realistischen Bedingungen besteht. Durch die Untersuchung eines zeitlichen Inkubationsverlaufs kann darüber hinaus zum einen ein Überblick über die Abbaukinetik erhalten werden. Als ein Nachteil der Methode ist hingegen ein tierspezifischer Effekt zu nennen, der sowohl zwischen einzelnen Tieren als auch zwischen verschiedenen Spezies (Rind/Schaf) auftreten und zu unterschiedlichen Abbaubarkeiten führen kann. Darüber hinaus kann es, bedingt durch die Porengröße der Nylonbeutel, zu einem anteiligen Verlust unverdauter Materialpartikel kommen (DE BOEVER et al., 2002). Die Wahl der Porengröße der verwendeten Nylonbeutel stellt daher stets einen Kompromiss zwischen dem Materialverlust und der Zugänglichkeit des Untersuchungsmaterials für Mikroorganismen dar, wobei sich in den in der Literatur beschriebenen Studien eine Porengröße von ca. 50 µm bewährt hat (FLACHOWSKY

et al., 1993, MADSEN & HVELPLUND, 1994, DEWHURST et al., 1995, HUNTINGTON & GIVENS, 1995, VALENTIN et al., 1999, ETTLE et al., 2001, HÖNER et al., 2002).

Ruminaler Abbau mittels in situ-Methodik

Die *in situ* Abbaubarkeitsmessungen erfolgten in Anlehnung an FLACHOWSKY (1993) sowie MADSEN & HVELPLUND (1994). Je 4 g des Rohmaterials (siehe 2.1) wurden in Nylonbeutel mit einer Porengröße von $50 \pm 10 \mu\text{m}$ gegeben und je zweimal in drei bzw. sechs pansenfistulierten Kühen der Rasse "Deutsche Schwarzbunte" für 2 h bis 96 h inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Nylonbeutel in Eiswasser gespült, um die Enzymaktivität der Mikroorganismen einzudämmen. Anschließend wurden die Nylonbeutel in einer kommerziellen Waschmaschine im Kaltwaschgang ohne Schleudern (19 min) gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (FLASHOFF, 2005, ZELLER, 2008).

Bestimmung des Trockensubstanzverlustes nach ruminaler Inkubation

Nach Gefrier Trocknung der gewaschenen Nylonbeutel wurden die Trockensubstanzverluste aus den Rückwagen bestimmt.

In dieser Arbeit wurden nur die Rückstände der 24 h ruminalen Inkubation weiter untersucht. Um den beschriebenen tierspezifischen Einfluss zu minimieren, wurden die zurückgewonnenen Rückstände der 24 h-Inkubationen für die nachfolgenden Bestimmungen jeweils gepoolt.

Die entsprechenden Inkubationsverluste sowie Standardabweichungen (SD) sind im Anhang 5.4 in Tab. 5.1 aufgelistet.

2.2.1.2 Bestimmung des Auswaschverlustes

Zur Bestimmung der Trockensubstanzverluste bedingt durch die Auswaschung aus den Nylonbeutel während des Waschens in der Waschmaschine und während der ruminalen Inkubation, wurde das Rohmaterial (siehe 2.1) (3 Sorten in 2004, 6 Sorten in 2005), analog zur ruminalen *in situ* Abbaubarkeitsmessung, in Nylonbeutel gegeben und in einer handelsüblichen Waschmaschine im Kaltwaschgang gewaschen (siehe Abschnitt 2.2.1.2). Nach Gefrier Trocknung der Nylonbeutel wurden die Trockensubstanzverluste aus den Rückwagen bestimmt. Die Auswaschrückstände der durchgeführten Vierfachbestimmung wurden gepoolt und gemäß Abschnitt 2.1.2 zu den 0 h-Materialien vermahlen.

Die ermittelten Auswaschverluste sind im Anhang 5.4 in Tab. 5.2 aufgelistet.

2.2.1.3 Bestimmung des Rohproteins und der Rohasche in den Rohmaterialien

Die Bestimmung des Rohaschegehaltes erfolgte im Rahmen der Weender-Futtermittel-Analyse nach Veraschung im Muffelofen bei 550 °C für 3 h (VDLUFA, 2004). Die Bestimmung des Rohproteingehaltes erfolgte mittels Verbrennungsanalyse nach DUMAS (VDLUFA, 2004).

Die Ergebnisse sind im Anhang in Tab. 5.3 aufgelistet.

2.2.2 Methoden zur Bestimmung der Kohlenhydrate

Um Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen der Kohlenhydratzusammensetzung in Abhängigkeit der Reife und dem ruminalen Abbau feststellen zu können, wurde neben der Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte sowie der Gehalte an freier Glucose in den Ausgangsmaterialien die Polysaccharidzusammensetzung der untersuchten Pflanzenmaterialien charakterisiert. Die Gesamtkohlenhydratgehalte wurden zum einen photometrisch als Summenparameter bestimmt und zum anderen aus den ermittelten Gehalten der neutralen und sauren Monosaccharide nach Hydrolyse der Polysaccharide berechnet. Die Bestimmung der hydrolytisch freigesetzten neutralen und sauren Monosaccharide diente darüber hinaus der detaillierten Charakterisierung der prozentualen Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide. Während die neutralen Monosaccharide nach saurer Hydrolyse und Umsetzung zu deren Alditolacetaten gaschromatographisch bestimmt wurden, erfolgte die Bestimmung der Uronsäuren in einem zweiten Bestimmungsverfahren photometrisch. Mit Hilfe der Methylierungsanalyse konnten darüber hinaus die Bindungsverhältnisse der einzelnen in den Polysacchariden enthaltenen Monomere ermittelt werden, was der Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen diente.

2.2.2.1 Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte

Die photometrische Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte als Summenparameter beruht auf der säurebedingten Umsetzung der Kohlenhydrate zu Furanderivaten und der Bildung gefärbter Verbindungen durch Reaktion mit Phenol (DUBOIS et al., 1956).

Vor der eigentlichen Umsetzung der Kohlenhydrate mit Phenol in konzentrierter Schwefelsäure wurde das Untersuchungsmaterial in Anlehnung an die SAEMAN-Hydrolyse für 2 h bei Raumtemperatur (RT) in 12 M Schwefelsäure vorgequollen (siehe 2.2.2.3.1) (SAEMAN et al., 1954, THEANDER & WESTERLUND, 1986). Nach Verdünnen der Suspension auf 2 M Schwefelsäure wurde ein Aliquot der erhaltenen Lösung mit 5 % wässriger Phenollösung und konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach Abkühlen der Lösungen erfolgte die photometrische Bestimmung bei 480 und 490 nm. Das Absorptionsmaximum der aus Pentosen, Methylpentosen und Uronsäuren gebildeten Produkte liegt bei ca. 480 nm, während die Produkte aus Hexosen

und Methylhexosen ein Absorptionsmaximum bei 490 nm aufweisen. Die Quantifizierung der Gehalte an Pentosen und Hexosen, die im Weiteren nur als Summe angegeben werden, erfolgte über eine Gleichung mit zwei Unbekannten unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten von Standardsubstanzen bei beiden Wellenlängen. Diese wurden aus externen Kalibrierfunktionen von Glucose und Xylose erhalten. Glucose und Xylose wurden als Standardsubstanzen gewählt, da sie die in den Zellwandpolysacchariden von Gräsern dominierenden Hexosen bzw. Pentosen darstellen.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.1 zu entnehmen.

2.2.2.2 Bestimmung der Gehalte an freier Glucose in den Ausgangsmaterialien

Da es sich bei den untersuchten Ausgangsmaterialien um das direkt getrocknete Maisrestpflanzenmaterial handelt, sind hierin noch freie Kohlenhydrate, vorrangig D-Glucose, aus den Nährstoffleitungsbahnen (Phloem) und aus dem Zelllumen enthalten. Die Gehalte an freier Glucose wurden daher enzymatisch aus einem wässrigen Probenextrakt bestimmt. Nach enzymatischer Umsetzung der D-Glucose zu D-Gluconat-6-phosphat, wird das entstehende reduzierte Nicotinamadeninucleotidphosphat (NADPH) photometrisch bei 340 nm bestimmt. Dieses ist der Menge an enthaltener D-Glucose äquivalent.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.2 zu entnehmen.

2.2.2.3 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide

2.2.2.3.1 Bestimmung der neutralen Monosaccharide in den Zellwandpolysacchariden

Hydrolyse

Zur Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden wurden zahlreiche Methoden beschrieben, die auf zwei grundlegenden Verfahren beruhen, der nach ALBERSHEIM beschriebenen Hydrolyse mit 2 M Trifluoressigsäure bei 121°C sowie der SAEMAN-Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure (2 M) bei 100°C (SAEMAN et al., 1954, ALBERSHEIM et al., 1967). Der Vorteil der in dieser Arbeit gewählten SAEMAN-Hydrolyse besteht darin, dass das Zellwandmaterial vor der eigentlichen Hydrolyse bei 100°C zunächst in 12 M Schwefelsäure bei RT vorgequollen wird, wodurch auch die Cellulose der Hydrolyse zugänglich gemacht wird. In verdünnter Schwefelsäure allein ist Cellulose aufgrund ihrer mikrokristallinen Struktur hingegen nicht hydrolysierbar (MOORE & HATFIELD, 1994). Ein grundlegendes Problem aller sauren Polysaccharidhydrolysen ist die teilweise Zersetzung der bereits freigesetzten Monosaccharide. Die Freisetzung der Monosaccharide verläuft je nach Bindung im Polysaccharid unterschiedlich schnell. So sind Monomere in Furanoseform leichter aus Polysacchariden freizusetzen als Pyranosen, und α -glykosidische Bindungen sind säurelabiler als β -glykosidische. Es muss daher Ziel bei allen

Hydrolysen sein, das Optimum zwischen Freisetzung und Zersetzung der Monosaccharide zu erreichen. Die in der Literatur beschriebenen Hydrolysezeiten variieren stark. Während THEANDER & WESTERLUND eine Hydrolyse für 6 h unter Rückfluss beschreiben, erzielten BLAKENEY et al. eine optimale Monosaccharidausbeute nach 2-3 h (BLAKENEY et al., 1983, THEANDER & WESTERLUND, 1986). Für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Maisrestpflanzenmaterial wurden exemplarisch Hydrolysezeiten zwischen 1 und 5 h untersucht, wobei sich für Glucose und Arabinose jeweils ein Ausbeuteoptimum bei einer Hydrolysezeit von 3 h ergab, während Xylose zwischen 2 und 5 h konstante Ausbeuten zeigte. Die Untersuchungsmaterialien wurden daher nach Vorquellung mit 12 M Schwefelsäure für 2 h bei RT und Verdünnen auf 2 M Schwefelsäure für 3 h bei 100°C hydrolysiert.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.3 zu entnehmen.

Reduktion und Acetylierung

Die Reduktion und Acetylierung der erhaltenen Monosaccharid-Einheiten erfolgten gemäß der von BLAKENEY et al. (1983) beschriebenen Methode. Ein Aliquot des mit Ammoniaklösung schwach alkalisch eingestellten Hydrolysats wurde bei 60°C mit Natriumborhydrid in Dimethylsulfoxid zu den entsprechenden Alditolen reduziert. Überschüssiges Natriumborhydrid wurde mit 80 %iger Essigsäure, die die internen Standardsubstanzen Erythrit und *myo*-Inosit enthielt, zu Borat umgesetzt. Anschließend erfolgte die Acetylierung der nicht flüchtigen Alditole mit Essigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol als Katalysator. Eine vorherige Entfernung des Borats aus der Lösung ist bei der Verwendung von 1-Methylimidazol als Katalysator nicht notwendig (BLAKENEY et al., 1983). Nach Zerstörung des überschüssigen Essigsäureanhydrids mit Wasser wurden die Alditolacetate mit Chloroform extrahiert.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.3 zu entnehmen.

Gaschromatographische Trennung und Bestimmung der Alditolacetate

Die gaschromatographische Trennung der Alditolacetate erfolgte nach BUNZEL (2001) an einer DB-5-Kapillarsäule mit einem für das Trennsystem optimierten Temperaturprogramm. Zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt. Die Identifizierung der Alditolacetate erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten (RRT) bezogen auf die internen Standardsubstanzen Erythrit und *myo*-Inosit. Zur Quantifizierung über die Methode des internen Standards wurde *myo*-Inosit herangezogen.

Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Abschnitt 5.1.1.1 zu entnehmen. Ein Beispielchromatogramm ist in Abb. 5.1 im Anhang 5.5 dargestellt.

2.2.2.3.2 Bestimmung der Uronsäuren in den Zellwandpolysacchariden

Die photometrische Bestimmung der Uronsäuren als Summenparameter beruht, ähnlich wie die Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate, auf deren säurebedingten Umsetzung zu Furanderivaten und der Bildung eines pinkfarbenen Chromogens durch Reaktion mit *m*-Hydroxydiphenyl (BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973).

Vor der eigentlichen Umsetzung der Uronsäuren wurde das Untersuchungsmaterial wie bei der Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes (siehe 2.2.2.1) und der Bestimmung der neutralen Monosaccharidzusammensetzung (siehe 2.2.2.3.1) für 2 h bei RT in 12 M Schwefelsäure vorgequollen (SAEMAN et al., 1954). Nach Verdünnen der Suspension wurde ein Aliquot der erhaltenen Lösung mit schwefelsaurer Natriumtetraboratlösung (0,0125 M in 18 M Schwefelsäure) versetzt und exakt 5 min bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlen und Zugabe von *m*-Hydroxydiphenyl wurden die entstehenden pinkfarbenen Lösungen nach exakt 20 min bei 520 nm photometrisch vermessen.

Da neutrale Monosaccharide unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen auch ohne Zugabe von Farbreagenz in geringem Maße zu rötlichen Verbindungen reagieren (AHMED & LABAVITCH, 1977, KINTNER & VAN BUREN, 1982), wurden die Probenlösungen parallel zur eigentlichen Bestimmung zusätzlich anstatt mit *m*-Hydroxydiphenyllösung mit 0,5 %iger Natriumhydroxidlösung versetzt. Die Quantifizierung der enthaltenen Uronsäuren erfolgte nach Abzug der durch neutrale Monosaccharide verursachten Hintergrundabsorption über eine externe Kalibrierfunktion.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.4 zu entnehmen.

2.2.2.4 Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide

Die Methylierungsanalyse ist ein bewährtes Verfahren zur Charakterisierung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb von Zellwandpolysacchariden. Sie beruht auf der Methylierung der freien Hydroxylgruppen der Polysaccharide, der säurehydrolytischen Spaltung der methylierten Polysaccharide in die entsprechenden partiell methylierten Monosaccharide und der anschließenden Reduktion und Acetylierung der Monomere zu den entsprechenden permethylierten Alditolacetaten (PMAA) (BJÖRNDAL et al., 1967, LINDBERG, 1972). Abb. 2.1 zeigt exemplarisch das Reaktionsschema der Methylierungsanalyse am Beispiel eines Xylanausschnitts.

Methylierung

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Methylierung der freien Hydroxylgruppen von Polysacchariden beschrieben, wobei man allgemein alkalische und neutrale Verfahren unter-

scheidet. Das Problem neutraler Methylierungsmethoden liegt meist darin, ein geeignetes Lösungsmittel zu finden, in dem sowohl die Polysaccharide als auch das Methylierungsreagenz löslich und ausreichend reaktiv sind (KIWITT-HASCHEMIE, 1994). Bei den alkalischen Verfahren wird das in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöste Polysaccharid durch die Reaktion mit einer starken Base in ein Polyalkoxidanion überführt und anschließend meist mit Methyljodid (MeI) als Methylierungsreagenz umgesetzt. Als bedeutendste Verfahren zu nennen sind die von HAKOMORI et al. (1964) beschriebene Methylierung unter Verwendung der starken Base Methylsulfinylnatrium (Na-Dimsyl), sowie die von CIUCANU & KEREK (1984) beschriebene Methode, bei der die basenkatalysierte Polyalkoxidbildung durch pulverisiertes Natriumhydroxid erfolgt. Dieses Verfahren hat sich, insbesondere aufgrund der einfacheren Handhabung und der Minimierung von Nebenprodukten, gegenüber dem HAKOMORI-Verfahren durchgesetzt (HEIMS, 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde das von NUNES & COIMBRA (2001) beschriebene Verfahren, das auf den Methoden von CIUCANU & KEREK (1984) und ISOGAI et al. (1985) beruht, mit geringen Modifikationen angewendet. Das getrocknete Untersuchungsmaterial wurde in wasserfreiem DMSO möglichst vollständig gelöst. Nach Zugabe von unter Stickstoffstrom pulverisiertem Natriumhydroxid und einer Reaktionszeit mit der Base von insgesamt 3 h, wurde unter Zugabe von MeI für 1 h methyliert. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von Wasser gestoppt wurde, erfolgte die Extraktion des permethylierten Materials mit Chloroform. Anschließend wurde die organische Phase zur Entfernung von Nebenprodukten und überschüssigen Reagenzien mehrmals mit Wasser gewaschen.

Zum Erhalt der Strukturinformationen über die Polysaccharide ist eine erschöpfende Methylierung der freien Hydroxylgruppen notwendig. Insbesondere bei in DMSO schwer löslichen Polysacchariden wie Cellulose kann dies nur durch stufenweise Methylierung gewährleistet werden, wobei zwei Methylierungsschritte in der Regel ausreichend sind (HEIMS, 1990). Für diese Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine zweimalige Methylierung der Probenmaterialien ausreichte, um eine ausreichende Permethylierung zu gewährleisten. Der relative Anteil an Untermethylierungen betrug deutlich unter 5 %.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.5 zu entnehmen.

Hydrolyse

Die säurehydrolytische Spaltung der Polysaccharide ist ein weiterer kritischer Schritt der Methylierungsanalyse. Wie bereits für die Bestimmung der neutralen Monosaccharidzusammensetzung beschrieben (Abschnitt 2.2.2.3.1), ist ein Optimum zwischen der Spaltung der glykosidischen Bindungen und der Zerstörung von bereits freigesetzten Monosacchariden anzustreben. Darüber hinaus muss eine Demethylierung während der Hydrolyse weitgehend verhindert werden (KIWITT-HASCHEMIE, 1994). In der Literatur werden verschiedene Hydrolysemethoden beschrieben, u. a. die Hydrolyse mit 2 M Trifluoressigsäure (TFA) (ALBERSHEIM et al., 1967), die stufenweise Hydrolyse mit Schwefelsäure (O'NEILL & SELVENDRAN,

1980) oder die stufenweise Hydrolyse mit 90 %iger Ameisensäure und verdünnter Schwefelsäure (LINDBERG, 1972). Dabei hat die in der Literatur am häufigsten beschriebene Hydrolyse mit TFA gegenüber den anderen Methoden neben einer geringen Demethylierung insbesondere den Vorteil, dass die flüchtige TFA relativ leicht aus dem Reaktionssystem entfernt werden kann. FENGEL et al. (1977) beschrieben darüber hinaus eine Methode zur schonenden, stufenweisen Hydrolyse von Cellulose mit TFA, die erfolgreich auf das in der vorliegenden Arbeit untersuchte cellulosereiche Maisrestpflanzenmaterial angepasst werden konnte. Das permethylierte Probenmaterial wurde zunächst bei RT in konzentrierter TFA und anschließend in zwei Verdünnungsschritten (9 M bzw. 2 M TFA) bei 100 °C hydrolysiert.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.5 zu entnehmen.

Reduktion und Acetylierung

Die Reduktion und Acetylierung der erhaltenen partiell methylierten Monosaccharide erfolgte nach NUNES & COIMBRA (2001). In schwach ammoniakalischer Lösung wurde zunächst mit Natriumborodeuterid reduziert, wodurch die Information über die Aldehydfunktion (C-1-Atom) erhalten bleibt. Anschließend erfolgte die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol als Katalysator. Nach Zerstörung des überschüssigen Essigsäureanhydrids mit Wasser wurden die permethylierten Alditolacetate (PMAA) mit Chloroform extrahiert.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.1.5 zu entnehmen.

Gaschromatographische Trennung

Identifizierung und Quantifizierung der erhaltenen PMAA erfolgten an unterschiedlichen GC-Systemen, die sich in den verwendeten Detektoren unterschieden. Die gaschromatographische

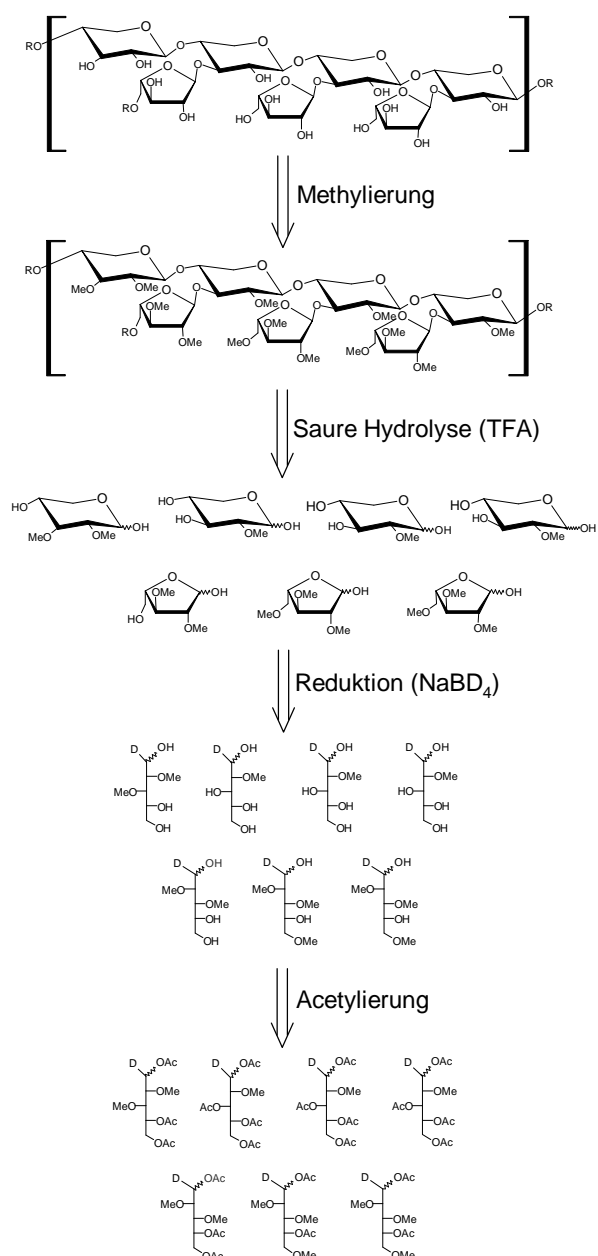


Abb. 2.1: Vereinfachtes Reaktionsschema der Methylierungsanalyse

Trennung erfolgte jedoch jeweils an einer DB-5-Kapillarsäule unter Verwendung des gleichen Temperaturprogramms.

Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Abschnitt 5.1.1.2 zu entnehmen.

Identifizierung der permethylierten Alditolacetate mittels massenspektrometrischer Detektion

Die Identifizierung der PMAA erfolgte mittels massenspektrometrischer Detektion an einem Quadrupol-Massenspektrometer (MS) mit Elektronenstoß-Ionisierung (EI). Die gaschromatographisch getrennten Moleküle gelangen durch das Interface in die Ionisierungskammer, wo sie mit den auf 70 eV beschleunigten Elektronen zusammenstoßen und ionisieren. Durch überschüssige Energie können die Moleküle an labilen Bindungen auseinanderbrechen. Für die Fragmentierung der PMAA ist bekannt, dass die Spaltung der Kohlenstoffhauptkette der PMAA bevorzugt zwischen zwei benachbarten, methoxylierten Kohlenstoffatomen erfolgt, gefolgt von der Spaltung zwischen einem methoxylierten und einem acetylierten Kohlenstoffatom. Eine Spaltung zwischen zwei acetylierten Kohlenstoffatomen ist hingegen weniger wahrscheinlich. Die Massenfragmente sind für das Substitutionsmuster der PMAA charakteristisch und können zu deren Identifizierung herangezogen werden (LINDBERG, 1972, JANSSON et al., 1976). Im Anschluss an die Ionisierung werden die Ionen, durch elektrostatische Linsensysteme fokussiert, in den Analysatorraum gelenkt. Im elektrischen Quadrupolfeld werden die Ionen anhand ihres Masse/Ladung-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt. Je nach angelegter Spannung können jeweils nur Ionen mit bestimmtem (m/z)-Verhältnis den Detektor erreichen, alle anderen Ionen werden abgelenkt und durch Kollision mit den Quadrupolstäben entladen. Durch wiederholtes Anlegen unterschiedlicher Spannungsfelder kann über einen bestimmten Massenbereich gescannt werden (Total-Ion-Chromatogram (TIC)). In den daraus resultierenden Massenspektren wird das (m/z)-Verhältnis gegen die relative Häufigkeit der Massenfragmente aufgetragen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Identifizierung der PMAA über den Vergleich der erhaltenen Massenspektren (m/z 50 - 500) mit Massenspektren aus verschiedenen Literaturdatenbanken. Neben der frei zugänglichen Internetdatenbank des Complex Carbohydrate Research Centers der Universität von Georgia, USA (CCRC, 2008) wurden die von der Arbeitsgruppe um COIMBRA & NUNES (Universität von Aveiro, Portugal) zur Verfügung gestellten Massenspektren verwendet. Die Elutionsreihenfolge der PMAA, die von NUNES auf einem vergleichbaren GC-MS-System an einer DB-1-Säule ermittelt wurden, wurde ergänzend zur Identifizierung herangezogen. Dies ist teilweise nötig, da Monosaccharide gleichen Substitutionsmusters aber unterschiedlicher Stereochemie gleiche Massenspektren liefern, sich jedoch in ihren Retentionszeiten unterscheiden, wie z.B. 1→4-verknüpfte Glucopyranose, Galactopyranose oder Mannopyranose.

Die in den untersuchten Probenmaterialien identifizierten PMAA sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abb. 5.5, Abb. 5.6, Abb. 5.7 und Abb. 5.8 im Anhang 5.6 abgebildet.

Quantitative Bestimmung und Berechnung der relativen molaren Anteile der permethylierten Alditolacetate

Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels FID über die integrierten Peakflächen der identifizierten PMAA. Die relativen molaren Anteile (mol %) der einzelnen Derivate wurden nach Korrektur der ausgewerteten Peaks auf Basis des Effective-Carbon-Response-Konzeptes (E.C.R.-Konzept) berechnet (SWEET et al., 1975). Das E.C.R.-Konzept beruht auf der Annahme, dass das molare Detektorsignal einer Substanz am FID sowohl von der Anzahl der Kohlenstoffatome als auch von deren Bindungsverhältnissen im Molekül abhängig ist. SWEET et al. (1975) konnten zeigen, dass dieses Konzept für die Methylierungsanalyse anwendbar ist und dass der Fehler eines rechnerisch ermittelten Korrekturfaktors zu einem praktisch ermittelten Korrekturfaktor nicht größer als $\pm 5\%$ ist.

Ein Beispielchromatogramm ist Abb. 5.2 im Anhang 5.5 abgebildet. Die Korrekturfaktoren der identifizierten PMAA sind Tab. 2.2 zu entnehmen.

Tab. 2.2: Identifizierte permethylierten Alditolacetate der Probenmaterialien, verwendete Abkürzungen sowie deren zur Quantifizierung verwendeten Korrekturfaktoren nach SWEET et al. (1975)

PMAA	glykosidische Verknüpfung	verwendete Abkürzung	Korrekturfaktoren
1,5-Di-O-acetyl-1-deuterio-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol	terminal	T-Glcp	0,70
1,4,5-Tri-O-acetyl-1-deuterio-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol	1→4	4-Glcp	0,74
1,5-Di-O-acetyl-1-deuterio-2,3,4-tri-O-methyl-D-xylitol	terminal	T-Xylp	0,61
1,4,5-Tri-O-acetyl-1-deuterio-2,3-di-O-methyl-D-xylitol	1→4	4-Xylp^{a)}	0,66
1,3,4,5-Tetra-O-acetyl-1-deuterio-2-O-methyl-D-xylitol	1→4; 3→	3,4-Xylp	0,70
1,2,4,5-Tetra-O-acetyl-1-deuterio-3-O-methyl-D-xylitol	1→4; 2→	2,4-Xylp	0,70
1,2,3,4,5-Penta-O-acetyl-1-deuterio-D-xylitol	1→4; 3→; 2→	2,3,4-Xylp^{b)}	
1,4-Di-O-acetyl-1-deuterio-2,3,5-tri-O-methyl-D-arabinitol	terminal	T-Araf	0,60
1,2,4-Tri-O-acetyl-1-deuterio-3,5-di-O-methyl-D-arabinitol	2→	2-Araf	0,65
1,5-Di-O-acetyl-1-deuterio-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactitol	terminal	T-Galp^{c)}	

^{a)} gleiche RRT und gleiches Fragmentierungsmuster wie 2-Xylp

^{b)} nicht nachweisbar mittels GC-MS

^{c)} nicht bestimmbar mittels GC-FID, aber identifiziert mittels GC-MS

2.2.3 Analytik der Phenolcarbonsäuren

Alle nachfolgend beschriebenen Bestimmungen der PCS beruhen auf deren Freisetzung mittels alkalischer Hydrolyse und anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion, weshalb diese im Folgenden zusammengefasst beschrieben werden.

Alkalische Hydrolyse

Wie im Allgemeinen Teil in Abschnitt 1.1.2 ausführlich beschrieben, liegen PCS in der pflanzlichen Zellwand estergebunden an Polysaccharide (über FS) und Lignin (über p CS) vor. Zur Spaltung der Esterbindungen hat sich in der Praxis die alkalische Hydrolyse durchgesetzt, aber auch enzymatische und saure Esterspaltungen sind möglich. Die verwendeten Alkalikonzentrationen, Reaktionstemperaturen und vor allem die Hydrolysezeiten variieren dabei zum Teil erheblich (0,1 bis 4 M NaOH, 20 min bis 24 h), wie von BARBEROUSSE et al. (2008) kürzlich in einem Übersichtsartikel zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hydrolyse mit 2 M NaOH für 18 h bei RT angewendet (BUNZEL et al., 2000, BUNZEL et al., 2001). Um Oxidationen und lichtinduzierten Isomerisierungen vorzubeugen, erfolgte die Hydrolyse unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluss.

FS oder deren Dimere können darüber hinaus über verschiedene Ether- und C-C-Bindungen mit Ligninen verknüpft sein. Während C-C-Bindungen, Biphenylether sowie Etherbindungen über die β -Position der FS (β -O-4'-Styrylether) mit den derzeitigen analytischen Methoden nicht freigesetzt werden können, können die 4-O- β '- und 4-O- α '-Etherbindungen zum Lignin alkalisch gespalten werden. Allerdings sind zur Spaltung dieser Etherbindungen wesentlich drastischere Hydrolysebedingungen, insbesondere höhere Reaktionstemperaturen und Alkalikonzentrationen (4 M NaOH), notwendig. Neben der in der Literatur am häufigsten beschriebene Methode, der alkalischen Druckhydrolyse bei 170°C (IYAMA et al., 1990, LAM et al., 1994), wurden auch Mikrowellenhydrolysen (750 W, 90 sec) beschrieben (PROVAN et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die alkalische Druckhydrolyse mit 4 M NaOH für 2 h bei 170°C in Teflongefäßen.

Extraktion

Die freigesetzten Phenolcarbonsäuren werden in der Regel mit unpolaren, organischen Lösungsmitteln, meist Diethylether oder Ethylacetat, aus dem zuvor angesäuerten Reaktionsansatz extrahiert. Es wurden verschiedene Verfahren zur weiteren Reinigung dieses Hydrolyseextraktes beschrieben, wie z.B. Festphasen-Extraktion (SPE) (RENGER & STEINHART, 2000) oder Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Natriumhydrogencarbonatlösung (PACKERT, 1993).

In dieser Arbeit erfolgte die Extraktion mit Diethylether aus dem mit Salzsäure auf einen pH-Wert von < 2 angesäuerten Hydrolysat (RALPH et al., 1994b, BUNZEL, 2001). Eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Natriumhydrogencarbonatlösung erfolgt lediglich zur präparativen Isolierung und Identifizierung von TFS und Cyclobutanderivaten (siehe Abschnitt 2.2.3.5). Zur quantitativen

Bestimmung der ester- sowie ethergebundenen PCS wurde auf eine Aufreinigung verzichtet, um mögliche Verluste zu vermeiden.

2.2.3.1 Methodenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung monomerer Phenolcarbonsäuren sowie di- und trimerer Ferulasäuren

Für die Identifizierung und Quantifizierung monomerer PCS und DFS (siehe Abschnitte 2.2.3.2 und 2.2.3.3) sollte eine HPLC-Methode entwickelt werden, die die Bestimmung aller bislang in Gräsern nachgewiesenen monomeren PCS und DFS, mit Ausnahme der nur in Spuren nachweisbaren 4-O-5'-DFS (BUNZEL et al., 2000), ermöglicht. Darüber hinaus sollten drei der bislang identifizierten TFS in die Methode integriert werden.

Standardsubstanzen - monomere Phenolcarbonsäuren

In verschiedenen Arbeiten konnten in Getreideballaststoffen folgende monomere phenolische Säuren nachgewiesen werden: *trans/cis*-FS, *trans/cis-p*CS, SS, 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBS), 4-Hydroxyphenylelessigsäure (4-HPES), Vanillinsäure (VS), Syringasäure (SyS) und 4-Hydroxyphenylpropionsäure (4-HPPS) (PACKERT, 1993, BUNZEL, 2001). Dabei konnten die dominierenden PCS, FS und *p*CS, jeweils zu geringen Anteilen in Form ihrer *cis*-Isomere nachgewiesen werden. Diese können sowohl durch Lichteinfluss in der Pflanze selbst (YAMAMOTO et al., 1999) als auch während der Probenaufarbeitung durch *cis/trans*-Isomerisierungen gebildet werden. Im Rahmen der Biosynthese der PCS werden hingegen ausschließlich deren *trans*-Isomere gebildet. Die in dieser Arbeit verwendeten *cis-p*CS- und *cis*-FS-Standardsubstanzen waren von BUNZEL (2001) durch lichtinduzierte Isomerisierung aus deren *trans*-Isomeren gewonnen worden. Während der alkalischen Hydrolyse können die PCS darüber hinaus in geringem Maße zu deren Aldehyden abgebaut werden. Dieser Abbau geht mit einer Verkürzung der Seitenkette einher. Daher wurden neben den genannten PCS auch die entsprechenden Aldehyde der dominierenden PCS in die Methode integriert. Dies waren 4-Hydroxybenzaldehyd (4-HBA), der aus *p*CS gebildet wird, Vanillin (VN) aus FS und Syringaldehyd (SyA) aus SS. Als interner Standard wurde Kaffeesäure (IS 1) gewählt. Zwar konnten CHERNEY et al. (1989) Kaffeesäure (KS) als Minor Komponente in verschiedenen Futtermitteln, u.a. auch Maispflanzen, nachweisen, in dieser Arbeit ist KS allerdings in Vorversuchen in keinem der untersuchten Materialien nachweisbar gewesen und auch in den genannten Arbeiten von PACKERT (1993) und BUNZEL (2001) wurde KS nicht nachgewiesen. Gegenüber der in der Literatur ebenfalls als IS beschriebenen *ortho*-CS hatte KS den Vorteil, dass keine Coelution mit der früh eluierenden 8-8'-*c*-DFS auftrat.

Standardsubstanzen - Di- und Triferulasäuren

Die DFS- und TFS-Standardsubstanzen sind nicht käuflich erhältlich, so dass diese zunächst in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden mussten. Die Isolierung der Standardsubstanzen erfolgte mittels der von BUNZEL et al. (2004a) beschriebenen Methode aus Maiskleie,

die im Folgenden nur kurz skizziert werden soll. Nach alkalischer Hydrolyse (2 M NaOH, 18 h, RT) und Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether wurden die aus unlöslichen Ballaststoffen von Maiskleie gewonnenen PCS zunächst mittels Sephadex LH 20 Chromatographie vorfraktioniert und anschließend mittels semipräparativer RP-HPLC oder Umkristallisation (5-5'-DFS) aufgereinigt. Die 8-8'(THF)-DFS konnte mit der beschriebenen Methode nicht isoliert werden und wurde daher alternativ durch Verseifung und anschließende Aufreinigung aus einer veresterten Vorstufe gewonnen (BUNZEL et al., 2003b). Diese Vorstufe war ebenso wie die als interner Standard verwendete monomethylierte Form der 5-5'-DFS (5-5'(Me)-DFS - IS 2) von der Arbeitsgruppe von RALPH am U.S. Dairy Forage Research Center, USDA, Madison, WI zur Verfügung gestellt worden.

Tab. 2.3 zeigt eine Übersicht der isolierten bzw. aufgereinigten DFS- und TFS-Standardsubstanzen. Deren Identitäten und Reinheiten wurden mittels HPLC-DAD sowie mittels ¹H-NMR über den Vergleich mit Literaturdaten (RALPH et al., 1994b, BUNZEL et al., 2003a, FUNK et al., 2005) überprüft.

Die genauen Arbeitsvorschriften sind den Abschnitten 5.3.2.1 und 5.3.2.2 im Anhang zu entnehmen. Die Geräte- und Messparameter der verschiedenen chromatographischen Fraktionierungs- und Aufreinigungsschritte sind in den Abschnitten 5.1.2.2 und 5.1.3.1 aufgelistet.

Tab. 2.3: Übersicht der zur Methodvalidierung isolierten Dehydrodi- (DFS) und Dehydrotriferulasäure (TFS)-Standardsubstanzen (c = cyclisch, nc = nicht cyclisch, dc = decarboxyliert, Me = methyliert, THF = Tetrahydrofuranform)

Standard	Menge (mg) ¹	Reinheit (%)	Standard	Menge (mg) ¹	Reinheit (%)
8-8'c-DFS	18,2	96	8-5'nc-DFS	16,6	99
8-8'nc-DFS	4,3	99	8-5'dc-DFS	25,5	99
8-8'(THF)-DFS	12,8	97	5-5'(Me)-DFS	10,8	98
5-5'-DFS	121,2	98	5-5',8'-O-4''-TFS	19,6	98
8-O-4'-DFS	52,4	95	8-8'c,8'-O-4''-TFS	3,8	93
8-5'c-DFS	22,6	94	8-O-4',8'-O-4''-TFS	2,2	94

¹ angegebene Mengen entsprechen nicht den tatsächlichen Verhältnissen in Maiskleie, da die isolierten Standards z. T. mit noch aus vorherigen Arbeiten vorhandenen Standardsubstanzen vereinigt wurden

Methodenentwicklung

Für die Bestimmung monomerer und dimerer PCS wurden in der Literatur eine Reihe sowohl gaschromatographischer als auch flüssigchromatographischer Methoden beschrieben, die von BARBEROUSSE et al. (2008) kürzlich zusammengefasst wurden. Als Vorteile der gaschromatographischen Methoden, wie z.B. von RALPH et al. (1994b) beschrieben, gelten insbesondere eine hohe Trennschärfe und Empfindlichkeit bei der Bestimmung der Dimeren sowie eine problemlose Trennung von Monomeren und Dimeren (RALPH et al., 2000). Ein Nachteil der Gaschromato-

graphie ist allerdings die Notwendigkeit zur Derivatisierung der PCS, z.B. der Trimethylsilylierung und/oder Methylierung, bei der es zu Isomerisierungen kommen kann (RALPH et al., 1994b). Darüber hinaus können die mittlerweile identifizierten höheren Oligomere der FS aufgrund ihrer nicht ausreichenden Flüchtigkeit nicht mittels Gaschromatographie analysiert werden. Die Bestimmung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgt meist an C18- oder C8-Umkehrphasen (RP-Phasen) mittels UV- oder Diodenarraydetektion (DAD), wobei die Phenolcarbonsäuren anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert werden können, wie z.B. durch WALDRON et al. (1996) beschrieben. Eine Derivatisierung ist zur Bestimmung mittels flüssigchromatographischer Methoden nicht notwendig. Hauptproblem der meisten bislang beschriebenen HPLC-Methoden, wie z.B. der von ANDREASEN et al. (2000) beschriebenen Methode, ist allerdings eine unzureichende chromatographische Trennung insbesondere der früh eluierenden Dimeren (8-8'-gekoppelte DFS) von den mengenmäßig stark dominierenden monomeren PCS.

Ziel der Methodenoptimierung dieser Arbeit war es daher, die monomeren PCS entweder in einem vorgeschalteten Schritt quantitativ abzutrennen oder die flüssigchromatographische Trennung derart zu optimieren, dass eine simultane Bestimmung von Monomeren, DFS und TFS ohne Coelutionen möglich ist.

Trennung der monomeren Phenolcarbonsäuren von den Ferulasäuredi- und -trimeren mittels Sephadex LH-20 Chromatographie im analytischen Maßstab

Es wurde zunächst versucht, die monomeren PCS analog zur Methode der Gewinnung von DFS- und TFS-Standardsubstanzen (BUNZEL et al., 2004a) mittels Sephadex LH-20 Chromatographie im analytischen Maßstab abzutrennen. Hierzu wurde 1 g Sephadex LH-20 in einer leeren 6 mL Festphasenkartusche für mindestens 8 h in Wasser gequollen. Es wurden sowohl Mischungen von Standardsubstanzen (Konzentrationsbereiche siehe unten: Validierung der Methode) als auch Probenextrakte (siehe 5.3.2.3) nach den in einer Vorarbeit von FEBIRI (2004) entwickelten Bedingungen untersucht. Die Elution der PCS erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die monomeren PCS mit 150 mL 3 mM HCl eluiert, im zweiten Schritt folgte die Elution der DFS und TFS mit 50 mL Ethanol (EtOH, 96 %). Abschließend wurden die Kartuschen mit 40 mL Methanol (MeOH) gespült. Die monomeren Standardsubstanzen wurden mit Diethylether aus dem HCl-Eluat rückextrahiert.

Die Abtrennung der monomeren PCS von den DFS und TFS wurde mittels HPLC-DAD überprüft und war nahezu quantitativ. Die Gehalte monomerer Standardsubstanzen im Ethanol-Eluat waren < 0,5 %, die Gehalte der DFS/TFS im HCl-Eluat betrugen maximal 2,5 % der gesamten aufgegebenen Standardmenge. Während die Wiederfindungsraten (WFR) der monomeren Standardsubstanzen mit durchschnittlich > 90 % sehr gut waren, wurden insgesamt nur zwischen 34 % und 81 % der aufgegebenen DFS/TFS im Ethanol-Eluat wiedergefunden. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den früh eluierenden 8-8'-gekoppelten DFS und den später

eluiierenden DFS, wie z.B. 8-O-4'-DFS, festgestellt werden. Diese konnten weder mit erhöhten Elutionsvolumina an EtOH noch in dem zum abschließenden Spülen der Sephadex LH-20-Kartuschen verwendeten MeOH-Eluat vollständig eluiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass diese entweder auf dem Sephadex LH-20 Material verbleiben oder nach Einengen des EtOH-Eluats nicht mehr vollständig gelöst werden konnten.

Aufgrund der zeitlich aufwendigen Durchführung und insbesondere aufgrund der nur mäßigen Wiederfindungsraten der DFS- und TFS-Standardsubstanzen wurde auf die beschriebene Vortrennung im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet.

Entwicklung zweier HPLC-Programme zur Trennung monomerer Phenolcarbonsäuren sowie zur Trennung von Ferulasäuredimeren und -trimeren

Da wie beschrieben eine vorherige Abtrennung der DFS und TFS von den monomeren PCS nicht in zufriedenstellendem Maße möglich war, sollte im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung die flüssigchromatographische Trennung derart optimiert werden, dass eine simultane Bestimmung von Monomeren, DFS und TFS ohne Coelutionen möglich ist. Die Detektion der Standardsubstanzen erfolgte im Rahmen der Methodenentwicklung mittels DAD. Im Gegensatz zu einem UV-Detektor erfolgt die Messung der Lichtabsorption beim DAD nicht durch einzelne Photozellen, sondern durch eine Anordnung vieler einzelner Photodioden, einem Diodenarray, so dass der Anzahl der Dioden entsprechend viele Wellenlängen gleichzeitig erfasst werden und somit das UV-Absorptionsspektrum einer Substanz gemessen werden kann. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte anhand ihrer UV-Spektren (Abb. 5.9 und Abb. 5.10 im Anhang 5.6) über den Vergleich mit Literaturdaten. Als Detektionswellenlängen (λ) wurden entsprechend der UV-Absorptionsmaxima der Standardsubstanzen 280 nm (monomere PCS und 8-8'(THF)-DFS) und 325 nm (DFS und TFS) gewählt, die quantitative Auswertung erfolgte allerdings bei 280 nm, da hier alle Standardsubstanzen detektiert werden konnten. Dies sollte gewährleisten, dass die entwickelte Methode auch in Laboratorien angewendet werden kann, die über keine DAD verfügen.

Während, wie bereits erwähnt, die meisten in der Literatur beschriebenen HPLC-Methoden C18- oder C8-RP-Phasen als stationäre Phase verwenden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Phenyl-Hexyl-Säule gewählt, bei der das Kieselgelgrundgerüst über Hexylketten mit Phenylgruppen derivatisiert ist. Gegenüber herkömmlichen RP-Phasen zeichnet sich die Phenyl-Hexyl-Phase durch eine größere Selektivität für phenolische Verbindungen aus, da die Trennung nicht nur aufgrund unpolarer Wechselwirkungen sondern auch aufgrund von π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Systemen der Analytmoleküle und der stationären Phase erfolgt. Die gewählte Säulentemperatur betrug 45°C. Als Eluent wurde ein ternäres Gradientengemisch, bestehend aus 1 mM TFA, Acetonitril (ACN) und MeOH, gewählt. Dabei wurde die chromatographische Trennung insbesondere durch MeOH beeinflusst. Bereits sehr geringe Anteile an MeOH erhöhten die Elutionskraft des Eluenten stark. Die Trennung der spät

eluiierenden DFS und TFS konnte durch die Verwendung von MeOH deutlich verbessert und beschleunigt werden. Die Trennung der monomeren Standardsubstanzen sowie der früh eluierenden DFS, 8-8'-gekoppelte und 8-5'nc-DFS, verschlechterte sich hingegen durch die erhöhte Elutionskraft von MeOH. Zur Trennung der monomeren PCS und der entsprechenden Aldehyde wurde daher ein minimaler MeOH-Anteil gewählt, der erst zum Spülen der Säule erhöht wurde. Abb. 2.2 zeigt ein Standardchromatogramm der optimierten Trennung bei 280 nm, das optimierte Gradientensystem ist Abschnitt 5.1.3.2 im Anhang zu entnehmen. Es konnte die Grundlinientrennung aller 14 Standardsubstanzen innerhalb von 24 min gewährleistet werden.

Bei der Trennung der DFS und TFS wurde MeOH erst nach 20 min in den Gradienten eingeführt, wodurch die gewünschte Abtrennung der Monomeren von den DFS und TFS erreicht wurde. Das in Abb. 2.3 dargestellte Standardchromatogramm der optimierten Trennung zeigt darüber hinaus eine insgesamt gute Trennung der 11 untersuchten DFS-/TFS-Standardsubstanzen. Die Trennung der früh eluierenden DFS, insbesondere der 8-8'(THF)-DFS von der 8-8'c und der 8-5'nc-DFS, konnte nicht weiter verbessert werden, ohne Coelutionen mit monomeren Standards (*cis*-FS) hervorzurufen.

Das optimierte Gradientensystem ist Abschnitt 5.1.3.3 im Anhang zu entnehmen.

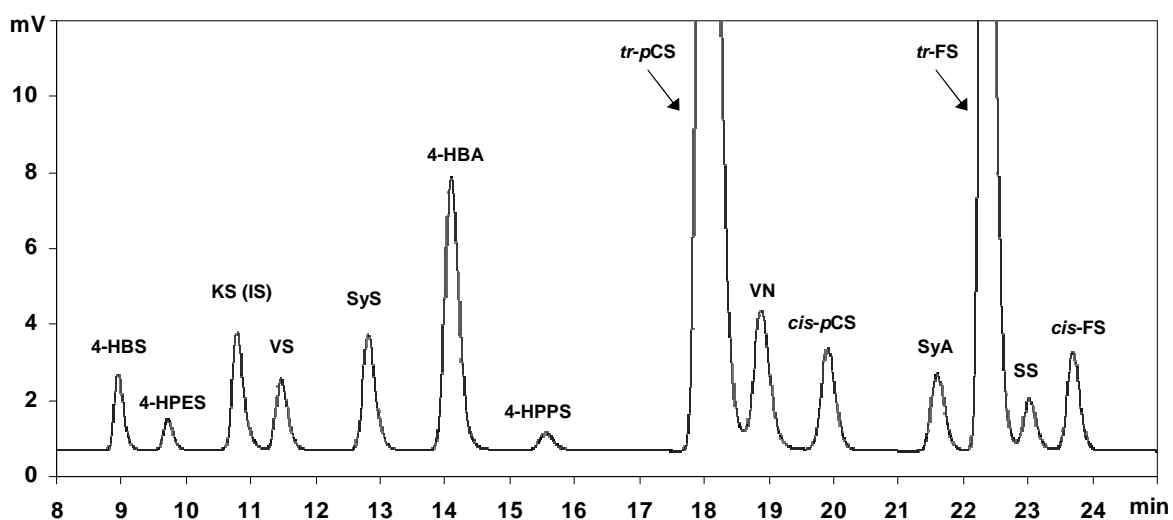


Abb. 2.2: Standardchromatogramm der optimierten Trennung der monomeren Phenolcarbonsäuren und -aldehyde bei 280 nm (4-HBS = 4-Hydroxybenzoesäure, 4-HPES = 4-Hydroxyphenylelessigsäure, KS (IS)= interner Standard Kaffeesäure, VS = Vanillinsäure, SyS = Syringasäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-HPPS = 4-Hydroxyphenylelessigsäure, *tr*-pCS = *trans p*-Cumarsäure, VN = Vanillin, *cis*-pCS = *cis p*-Cumarsäure, SyA = Syringaldehyd, *tr*-FS = *trans* Ferulasäure, SS = Sinapinsäure, *cis*-FS = *cis* Ferulasäure)

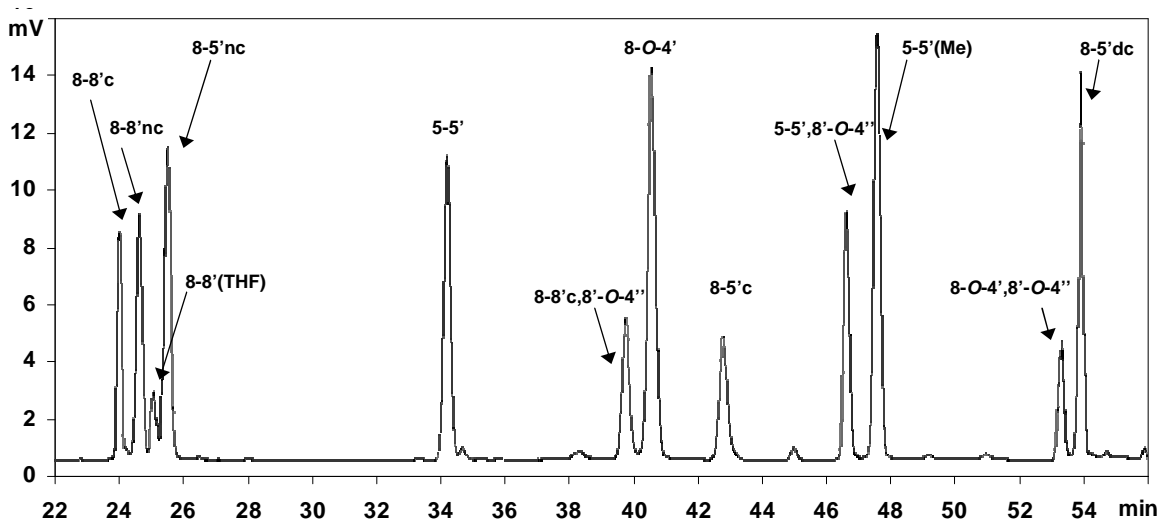


Abb. 2.3: Standardchromatogramm der optimierten Trennung der Di- und Triferulasäuren bei 280 nm (c = cyclisch, nc = nicht cyclisch, THF = Tetrahydrofuranform, Me = methyliert, dc = decarboxyliert)

Methodenvalidierung

Mit Hilfe der nachfolgend zusammengefassten Methodenvalidierung, die sich in Grund- und Matrixkalibrierung gliederte, sollte die Leistungsfähigkeit der beiden entwickelten HPLC-Verfahren beurteilt werden. Dabei erfolgte die Validierung von FS und p CS analog zu ihrer Dominanz in der Pflanzenzellwand in einem zehnfach höheren Konzentrationsbereich (25 - 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) als die Validierung der anderen monomeren Standardsubstanzen (2,5 - 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Validierung der DFS und TFS erfolgte ebenfalls in zwei Konzentrationsbereichen (2,5 - 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 5,0 - 25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siehe Tab. 5.5 im Anhang 5.4) entsprechend ihrer ungefähren Verhältnisse in Maiskleie. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Standardmenge der 8-O-4',8'-O-4''-TFS erfolgte deren Validierung nur über einen Konzentrationsbereich von 1,0 - 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Als Blindmatrix, die keine PCS enthalten sollte, wurde ein Cellulose/Xylan/Lignin-Gemisch (50/45/5, w/w/w) eingesetzt. Die Zugabe der Standardsubstanzen erfolgte direkt nach der alkalischen Hydrolyse der Matrix (siehe 5.3.2.3) vor der Etherextraktion. Analog zur Aufarbeitung der Probenmaterialien wurden die Etherextrakte zur Matrixkalibrierung der monomeren PCS 1:10 verdünnt.

Die wichtigsten Verfahrenskenndaten der Grund- und Matrixkalibrierung (GK bzw. MK), Verfahrensvariationskoeffizient (CV), WFR, Nachweisgrenze (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) der Standardsubstanzen, sind in Abschnitt 5.4 in Tab. 5.4 (monomere PCS) und in Tab. 5.5 (DFS/TFS) aufgelistet. Als Maß für die Präzision der Methode wurde der CV berechnet, der sich aus der Normierung der Reststandardabweichung der Kalibriergeraden auf die mittlere eingesetzte Standardkonzentration ergibt. Die WFR ist ein Maß für die Richtigkeit der Methode. NWG und BG wurden über das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) bestimmt, mit $\text{NWG} = 3 \cdot \text{S/N}$ und $\text{BG} = 9 \cdot \text{S/N}$.

Für die entwickelte Monomeren-Methode ergab sich eine sehr gute Leistungsfähigkeit, mit CV zwischen 1 und 5 % für GK und MK, sowie WFR von 80 - 109 %.

In den Chromatogrammen der MK der DFS und TFS wirkten sich die Effekte der eingesetzten Matrix in wesentlich stärkerem Maße aus als bei den Monomeren, da die Etherextrakte der alkalischen Hydrolyse hier unverdünnt zur HPLC-Bestimmung eingesetzt wurden. Dabei sind vermutlich insbesondere niedermolekulare Hydrolyseprodukte des Lignins für die Schwankungen der Grundlinie verantwortlich. Die WFR der meisten DFS lag zwischen 80 - 90 %, 8-8'(THF)- und 8-5'*c*-DFS zeigten hingegen nur eine WFR von rund 52 %. Die WFR der Trimeren (8-8'*c*,8'-O-4''; 5-5',8'-O-4'') lag mit 34 bzw. 45 % noch niedriger. Die 8-O-4',8'-O-4''-TFS konnte aufgrund der sehr geringen zur Verfügung stehenden Standardmenge nicht zur MK eingesetzt werden, weshalb keine Verfahrenskenndaten ermittelt werden konnten. Während die Präzision der Kalibrierfunktionen aller DFS- und TFS-Standards in der GK mit CV zwischen 1 und 9 % ebenfalls gut waren, zeigten sich in der MK aufgrund der beschriebenen Matrixeffekte wesentlich stärkere Streuungen der Messdaten. Die Präzision der Matrixkalibrierfunktionen der meisten DFS war mit CV < 25 % zwar nicht mehr gut, lag aber in einem akzeptablen Rahmen. Für die 8-8'*nc*-, 8-8'(THF)- und 8-5'*dc*-DFS sowie für die 5-5',8'-O-4''-TFS wurden CV von 47,5 %, 45,5 %, 57,4 % bzw. 65,5 % ermittelt, so dass deren Gehalte mit der entwickelten Methode zumindest semiquantitativ abgeschätzt werden können. Die quantitative Bestimmung der 8-8'*c*,8'-O-4''-TFS ist hingegen aufgrund der zu geringen Präzision (CV 80,5 %) mit der entwickelten Methode nur in unzureichendem Maße möglich.

Überprüfung der Anwendbarkeit der Methoden auf verschiedene Probenmaterialien

Die Anwendbarkeit der Methoden sollte neben den in dieser Arbeit untersuchten Maisrestpflanzenmaterialien auch an verschiedenen anderen Pflanzenmaterialien überprüft werden. Aus der Familie der *Gramineen* wurden unlösliche Ballaststoffe (UBS) aus Weizen, Roggen und Maiskleie untersucht sowie UBS der Zuckerrübe (*Chenopodiaceae*) und von Spargel (*Asparagaceae*). Die Probenaufarbeitung (alkalische Hydrolyse und Etherextraktion) erfolgte dabei wie in Abschnitt 5.3.2.3 beschrieben.

Die Methode zur Trennung der monomeren PCS sowie deren Aldehyde war auf alle genannten Materialien sehr gut anwendbar. Dabei konnten neben den dominierenden PCS, *tr*-FS und *tr*-*p*CS, nur sehr geringe Mengen der entsprechenden *cis*-Isomere und Aldehyde, VA und 4-HBA, nachgewiesen werden. SS war nur in Wildreis UBS nachweisbar. Tab. 5.7 im Anhang 5.4 zeigt eine Übersicht der ermittelten Gehalte der monomeren PCS und der entsprechenden Aldehyde. Ein Probenchromatogramm der Bestimmung aus Maisrestpflanzenmaterial ist in Abb. 5.3 im Anhang 5.5 dargestellt.

Die Methode zur Bestimmung der DFS und TFS war auf die verschiedenen Probenmaterialien unterschiedlich gut anwendbar. Abb. 2.4 zeigt zur Verdeutlichung den Vergleich der

Chromatogramme der Maiskleie UBS und der Maisrestpflanze (0 h Material = unlösliche Faserbestandteile).

In den ligninarmen Untersuchungsmaterialien, mit Ausnahme von Wildreis und Spargel (siehe unten), waren nur geringe Störungen durch andere phenolische Substanzen zu beobachten, so dass hier eine quantitative Bestimmung gut möglich war. Das Chromatogramm des ligninreichen Maisrestpflanzenmaterials zeigt hingegen deutlich mehr Störpeaks. Diese können sowohl durch niedermolekulare Hydrolyseprodukte des enthaltenen Lignins als auch durch andere phenolische Substanzen, wie z.B. durch die Cyclobutandimere der PCS, verursacht worden sein. Es konnten zahlreiche Peaks nachgewiesen werden, deren UV-Spektren auf Cyclobutanderivate hinweisen. Da diese allerdings sehr uncharakteristisch sind, war eine Identifizierung einzelner Isomere nicht möglich (siehe hierzu 2.2.3.5). Aufgrund der zahlreichen Störpeaks und der insgesamt hohen Grundabsorption war die Quantifizierung der DFS deutlich erschwert. Die drei untersuchten TFS

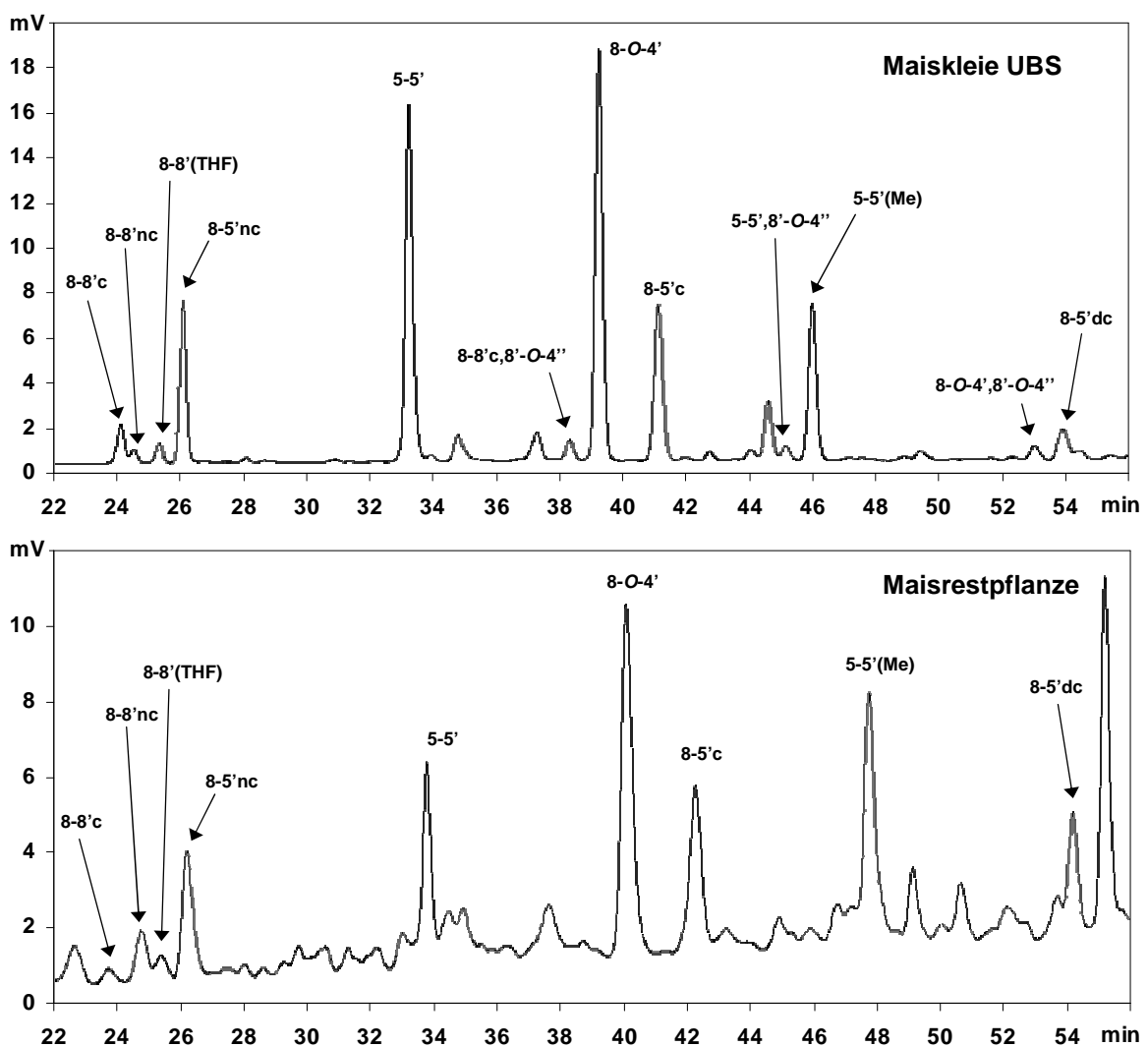


Abb. 2.4: Probenchromatogramme der Bestimmung der Di- und Triferulasäuren aus unlöslichen Maiskleieballaststoffen (UBS) (oben) und Maisrestpflanzenmaterial (unten, DK 247 (2004), E 1, 0h) bei 280 nm (c = cyclisch, nc = nicht cyclisch, THF = Tetrahydrofuranform, Me = methyliert, dc = decarboxyliert)

konnten im Maisrestpflanzenmaterial unter den gewählten Bedingungen nicht quantifiziert und auch nicht in allen Probenchromatogrammen eindeutig identifiziert werden. Für Maiskleie, bei deren Bestimmung nicht nur wenig Störungen auftraten, sondern die im Vergleich zu den anderen Getreideballaststoffen auch wesentlich höhere Gehalte an PCS enthält, konnten auch die Gehalte der TFS semiquantitativ abgeschätzt werden.

Tab. 2.4 enthält eine Übersicht der ermittelten Gehalte der Summe der DFS (und TFS) sowie der prozentualen Zusammensetzung der DFS-Isomere in den untersuchten Probenmaterialien. Die in dieser Arbeit untersuchten Getreideballaststoffen standen aus vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe von BUNZEL zur Verfügung. Da es sich um die gleichen Materialien handelt, deren DFS-Gehalte bereits von BUNZEL et al. (2001) mittels GC-FID bestimmt wurden, war eine direkte Vergleichbarkeit der Methoden möglich. Mit Ausnahme der UBS von Maiskleie waren die ermittelten Gehalte mit der entwickelten Methode zum Teil deutlich niedriger als die von BUNZEL et al. (2001) bestimmten Gehalten. Die prozentualen Zusammensetzungen waren weitestgehend vergleichbar. Die Anteile der 8,8'-gekoppelten DFS waren in allen Proben höher, während die Anteile der 8-5'-gekoppelten DFS niedriger waren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die 8-8'(THF)-DFS mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode erstmals quantifiziert worden ist.

Tab. 2.4: Übersicht der Summe der ermittelten Diferulasäure (DFS)- (und Triferulasäure (TFS)-) Gehalte in den untersuchten Probenmaterialien ($\mu\text{g/g}$; $n = 2$, $SD < 10\%$) sowie deren prozentualer Zusammensetzung (+ = nachweisbar, - = nicht nachweisbar, UBS = unlösliche Ballaststoffe, Σ = Summe)

	Maisrest- pflanze	Maiskleie UBS	Weizen UBS	Roggen UBS	Wildreis UBS ²	Zucker- rübe UBS	Spargel UBS
Σ DFS ($\mu\text{g/g}$)	2091	13965	1956	1925	1534	1586	545
Σ DFS ($\mu\text{g/g}$) ¹		12596	2372	3647	2840		
Σ 8-8' (% DFS)	24	21 (17 ¹)	25 (17 ¹)	26 (18 ¹)	45 (26 ¹)	26	44
Σ 8-5' (% DFS)	57	42 (38 ¹)	44 (47 ¹)	45 (54 ¹)	30 (47 ¹)	43	43
5-5' (% DFS)	8	19 (25 ¹)	16 (16 ¹)	16 (13 ¹)	10 (14 ¹)	15	4
8-O-4' (% DFS)	11	17 (21 ¹)	16 (20 ¹)	14 (14 ¹)	14 (14 ¹)	16	9
Σ TFS ($\mu\text{g/g}$)		916					
5-5',8'-O-4'' (% TFS)	-	86	+	+	+	+	+
8-8'c,8'-O-4'' (% TFS)	-	6 ³	+	+	-	+	+
8-O-4',8'-O-4'' (% TFS)	-	8	+	+	+	+	+

¹ nach BUNZEL et al. (2001); ² $n = 1$

³ aufgrund der schlechten Präzision der Matrixkalibrierung, kann der ermittelte Gehalt der 8-8'c,8'-O-4''-TFS nur als grobe Abschätzung betrachtet werden

Größere Unterschiede waren insbesondere bei den prozentualen Anteilen der 8-8'- und 8-5'-gekoppelten DFS in den UBS von Wildreis festzustellen, allerdings waren bei der Bestimmung

der DFS aus den Wildreis UBS auch erhebliche Coelutionen im Bereich der früheluiierenden 8-8'-gekoppelten DFS aufgetreten. Diese könnten eventuell durch die im Wildreis nachgewiesenen Anteile von Dehydrodisinapinsäuren verursacht worden sein (BUNZEL et al., 2003b). Eine eindeutige Identifizierung anhand der UV-Spektren war allerdings nicht möglich. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge an Wildreis UBS konnte die Bestimmung zudem nur in Einfachbestimmung durchgeführt werden. Die Anwendbarkeit der entwickelten Methode auf die UBS von Wildreis sollte daher zwingend in nachfolgenden Arbeiten mit mehr Untersuchungsmaterial überprüft werden. Ebenso wie bei den UBS von Wildreis traten bei der Bestimmung aus den UBS von Spargel Störungen in der flüssigchromatographischen Trennung der früheluiierenden 8-8'-gekoppelten DFS auf, so dass der ermittelte Anteil von 44 % vermutlich zu hoch ist.

Abschließende Methodendiskussion

Die Methode zur Bestimmung der monomeren PCS zeigte eine sehr gute Leistungsfähigkeit. Die Anwendbarkeit konnte anhand verschiedener Probenmaterialien gezeigt werden, so dass über die im Rahmen der Validierung ermittelten Korrekturfaktoren eine verlässliche Quantifizierung möglich ist.

Mit der optimierten Methode zur Bestimmung der DFS und TFS war nicht nur die Trennung aller insgesamt 11 eingesetzten DFS und TFS in einem chromatographischen Lauf möglich. Es konnte auch eine gute chromatographische Abtrennung der dominierenden monomeren PCS gewährleistet werden. Sowohl in der GK der Methode als auch bei der Untersuchung von PCS-reicher UBS aus Maiskleie konnte eine gute Leistungsfähigkeit der Methode gezeigt werden. Bei der Untersuchung der ligninreichen Maisrestpflanzenmaterialien traten allerdings erhebliche Störungen in den Chromatogrammen auf, so dass die Quantifizierung der DFS erschwert und die Bestimmung der TFS nicht möglich war. Neben zahlreichen Störpeaks, die eventuell Cyclobutandimeren zugeordnet werden können, war die Grundabsorption in diesen Proben deutlich erhöht. Es ist anzunehmen, dass dies vorrangig durch andere phenolische Substanzen, wie z.B. durch die bereits erwähnten Cyclobutandimeren oder durch niedermolekulare Hydrolyseprodukte des Lignins, begründet ist. Die Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe wäre eine Möglichkeit die Störungen zumindest zu verringern, allerdings ist diese Art der Probenvorbereitung für die routinemäßige Untersuchung vieler Proben zeitlich nicht realisierbar.

Auch bei der Untersuchung von Wildreis und Spargel UBS traten Probleme bei der chromatographischen Trennung der früheluiierenden 8-8'-gekoppelten DFS auf, die durch andere unbekannte Verbindungen hervorgerufen werden.

Um die Bestimmung der DFS und TFS zukünftig weiter zu optimieren, sind verschiedene Lösungswege denkbar. Die Bestimmung mittels HPLC-MS oder insbesondere mittels HPLC-MS/MS würde über die Detektion der Molekülonen oder charakteristische Tochterionen eine spezifische Detektion der Verbindungen ermöglichen, so dass Störungen durch andere UV aktive

Substanzen eliminiert werden könnten. Da die genannten Messtechniken nicht in allen Laboratorien zur routinemäßigen Analyse zur Verfügung stehen, sollten andere Möglichkeiten zur vorherigen Abtrennung der niedermolekularen Substanzen untersucht werden. Die in dieser Arbeit erprobte Trennung an Sephadex LH-20 Material in Festphasenextraktionskartuschen war allein aufgrund der Elution mit insgesamt 240 mL verschiedener Eluenten zeitlich recht aufwendig und zeigte darüber hinaus recht hohe Verlusten der eingesetzten Standardsubstanzen. Eine andere Möglichkeit wäre die HPLC-Bestimmung nach einer vorgeschalteten Gelpermeationschromatographie (GPC)-Trennung der Verbindungen im analytischen Maßstab. So beschrieben WARD et al. (2001) die analytische Trennung von DFS und TFS an TSK Gel G3000 mit Tetrahydrofuran (THF) als Eluenten. Es konnte im Rahmen der Methodenentwicklung gezeigt werden, dass THF als Lösungsmittel für die Proben die chromatographische Trennung an der Phenyl-Hexyl-Phase nicht negativ beeinflusste. So wurden die Probenextrakte zur HPLC-Bestimmung in THF/H₂O (50/50, v/v) aufgenommen. Eine kombinierte Bestimmung SEC/HPLC ist dementsprechend durchaus vorstellbar.

2.2.3.2 Identifizierung und Quantifizierung von estergebundenen monomeren Phenolcarbonsäuren und Diferulasäuren

Alkalische Hydrolyse und Extraktion

Die alkalische Hydrolyse (2 M NaOH für 18 h bei RT) und anschließende Etherextraktion der estergebundenen monomeren PCS, DFS und TFS erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.3 allgemein beschrieben. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.2.3 zu entnehmen.

Bestimmung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Bestimmung der estergebundenen monomeren PCS und DFS erfolgte mit den nach Abschnitt 2.2.3.1 optimierten HPLC-Programmen an zwei HPLC-Systemen mit unterschiedlichen Detektoren.

Aus den 1:10 verdünnten Probenextrakten erfolgte die Bestimmung der monomeren PCS mittels HPLC-UV. Die Identifizierung erfolgte anhand der RRT zum internen Standard KS (IS 1). Zur quantitativen Auswertung wurde die Methode des internen Standards unter Berücksichtigung der ermittelten Korrekturfaktoren, die das Responseverhältnis der Standards bezogen auf den internen Standard KS (IS 1) darstellen, angewendet.

Die Bestimmung der DFS erfolgte aus dem unverdünnten Probenextrakt mittels HPLC-DAD. Zu deren Identifizierung aus den wesentlich komplexeren Probenchromatogrammen wurden zusätzlich zu den RRT die UV-Spektren (Abb. 5.17 im Anhang (5.6)) herangezogen. Die Quantifizierung der DFS erfolgte wie beschrieben über die Korrekturfaktoren und den internen Standard 5-5'(Me)-DFS (IS 2).

Wie bereits im Abschnitt 2.2.3.1 dargestellt, war die quantitative Auswertung der TFS sowie zum Teil auch deren Identifizierung in den erhalten Probenchromatogrammen, aufgrund von Coelutionen mit anderen phenolischen Substanzen, wie z.B. Cyclobutandimeren, nicht möglich.

Die RRT sowie Korrekturfaktoren der monomeren PCS sowie der DFS sind in Tab. 5.6 im Anhang 5.4 aufgelistet. Abb. 5.3 im Anhang und Abb. 2.4 zeigen exemplarisch jeweils ein Probenchromatogramm der Bestimmungen. Die verwendeten Mess- und Geräteparameter sind den Abschnitten 5.1.3.2 und 5.1.3.3 zu entnehmen.

2.2.3.3 Identifizierung und Quantifizierung monomerer ethergebundener Phenolcarbonsäuren

Alkalische Hydrolyse und Extraktion

Die Bestimmung ethergebundener monomerer PCS erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.3 allgemein beschrieben, nach alkalischer Druckhydrolyse (4 M NaOH bei 170 °C für 2 h) und Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.2.4 zu entnehmen.

Bestimmung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Die HPLC-Bestimmung der ethergebundenen Monomeren erfolgte analog zur Bestimmung der estergebundenen PCS (siehe Abschnitt 2.2.3.2). Durch die alkalische Druckhydrolyse werden sowohl die ester- als auch die ethergebundenen PCS freigesetzt, so dass deren Gehalte in Summe quantifiziert werden. Der Gehalt der ethergebundenen PCS berechnet sich daraus nach Abzug der nach Abschnitt 2.2.3.2 bestimmten Gehalte der estergebundenen PCS. Da somit die analytischen Fehler beider Analysen in die erhaltenen Werte einfließen, sind diese per se ungenauer. Zudem ist bei der Interpretation der erhaltenen Werte zu berücksichtigen, dass es unter den Bedingungen der alkalischen Druckhydrolyse vermehrt zu Zersetzungsreaktionen kommen kann, so dass die quantifizierten Gehalte nicht zwingend den tatsächlichen Gehalten in der Pflanzenzellwand entsprechen. Die Verluste bedingt durch die Druckhydrolyse können allerdings nur schwer mit Hilfe isolierter Standardsubstanzen nachgestellt werden, da zu erwarten ist, dass diese in größerem Maße zerstört werden als zellwandgebundene PCS. GRABBER et al. (1995) konnten jedoch zeigen, dass die Zerstörung der Standardsubstanzen nach Zugabe von Cellulose auch bei der alkalischen Druckhydrolyse bei 170 °C nur relativ gering war. Die auf diese Weise ermittelten Korrekturfaktoren waren mit denen der GC-MS-Bestimmung (ohne vorherige alkalische Hydrolyse) vergleichbar. Die Quantifizierung erfolgte daher in dieser Arbeit ebenfalls mit den im Rahmen der Methodenentwicklung bestimmten Korrekturfaktoren der HPLC-Bestimmung (siehe 2.2.3.1).

Die verwendeten Mess- und Geräteparameter sind dem Abschnitt 5.1.3.2 im Anhang zu entnehmen.

2.2.3.4 Identifizierung estergebundener oligomerer Phenolcarbonsäuren durch präparative Isolierung und Anwendung spektroskopischer Methoden

Die Isolierung der oligomeren Hydroxyzimtsäuren erfolgte unter Anpassung an die veränderte Probenmatrix in Anlehnung an die von BUNZEL et al. (2006) beschriebene Methode zur Isolierung von oligomeren Ferulasäurederivaten aus Maiskleie. Abb. 2.5 zeigt schematisch die einzelnen Reaktionsschritte der Isolierung und Identifizierung.

Isolierung der unlöslichen Faserbestandteile

Das auf eine Partikelgröße von $< 0,5$ mm vermahlene Untersuchungsmaterial (DK 233, E 2, 2004) wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend in einer Soxhlet-Extraktion mit 96 %igem Ethanol sowie mit Aceton extrahiert, um sowohl grobe anorganische Verunreinigungen, wie z.B. Ackerbodenrückstände, aber auch organische Substanzen, wie z.B. Pflanzenfarbstoffe und lipophile Stoffe zu entfernen. Im Anschluss erfolgte zur Isolierung der unlöslichen Faserbestandteile ein enzymatischer Proteinabbau. Im Gegensatz zu der von BUNZEL et al. (2001) beschriebenen Methode konnte bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchtem Maisstroh auf Grund des vernachlässigbar geringen Stärkeanteils auf einen enzymatischen Stärkeabbau verzichtet werden. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.2.5 zu entnehmen.

Alkalische Hydrolyse und Extraktion

Die gewonnenen unlöslichen Faserbestandteile wurden, wie unter 2.2.3 allgemein beschrieben, für 18 h in 2 M NaOH hydrolysiert und die so freigesetzten PCS nach Ansäuern des Reaktionsansatzes mit Diethylether extrahiert. Zur Aufreinigung des Extraktes erfolgte anschließend eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Natriumhydrogencarbonatlösung. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.2.5 zu entnehmen.

Fraktionierung des Hydrolyseextraktes mittels Gelpermeationschromatographie

In der GPC werden als stationäre Phasen poröse Polymere eingesetzt, die in dem verwendeten Lösungsmittel zu einem heteroporösen Gel (Netzwerk) quellen. Die gelösten Analytmoleküle können entsprechend ihrer effektiven Größe unterschiedlich stark in die Poren des Gels diffundieren. Im Unterschied zu den übrigen chromatographischen Methoden existieren dabei zwischen den Analytmolekülen und der stationären sowie der mobilen Phase im Idealfall weder chemische noch physikalische Wechselwirkungen, so dass die Trennung allein anhand der Molekülgröße erfolgt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Fraktionierung der freigesetzten PCS nach der von BUNZEL et al. (2006) beschriebenen Methode mit Bio-Beads S-X3 als stationärer und THF als mobiler Phase erfolgen. Bio-Beads S-X3 besteht aus neutralen, porösen Polystyrol-Divinylbenzol-Perlen, die bis zu 3 % quervernetzt sind. Die genauen Geräte- und Messparameter sind Abschnitt 5.1.2.1 im Anhang zu entnehmen.

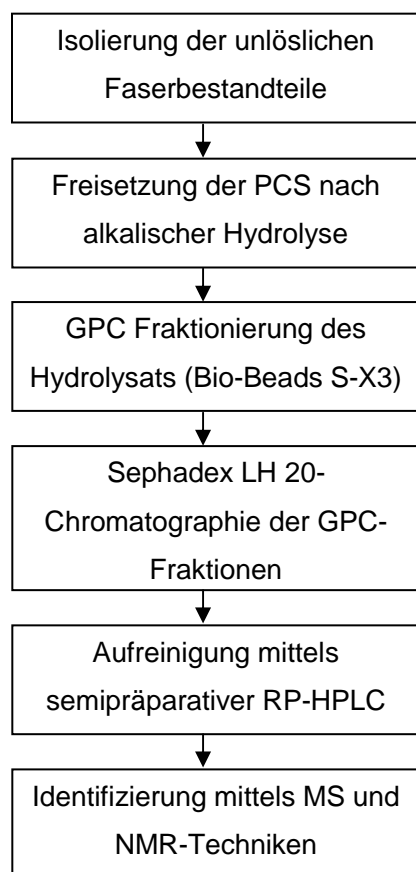


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Isolierung und Identifizierung oligomerer Phenolcarbonsäuren

Fraktionierung der nach Gelpermeationschromatographie erhaltenen Fraktionen mittels Sephadex LH-20 Chromatographie

Zur weiterführenden Fraktionierung der nach GPC erhaltenen Dimeren- und Trimeren-Fraktionen wurde analog zu der von BUNZEL et al. (2004a) beschriebenen Methode Sephadex LH-20 als stationäre Phase und verschiedene Gemische bestehend aus MeOH und 0,5 mM wässriger TFA als mobile Phasen verwendet. Sephadex LH-20 ist ein zur Erhöhung der Lipophilie hydroxypropyliertes Dextrangel, das sowohl in Wasser als auch in verschiedenen organischen Lösungsmitteln quillt. Die Trennung erfolgt dabei nicht ausschließlich nach der Molekülgröße, sondern wird zusätzlich, insbesondere bei der Verwendung von wasserhaltigen Lösungsmitteln, durch sekundäre Wechselwirkungen zwischen den phenolischen Verbindungen und stationärer Phase beeinflusst. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 325 nm bzw. 280 nm. Mit einem Fraktionensammler wurden alle 12 Minuten Fraktionen gesammelt, die entsprechend der Chromatogramme vereinigt wurden.

Die Geräte- und Messparameter sind Abschnitt 5.1.2.2 im Anhang zu entnehmen.

Weiterführende Fraktionierung bzw. Aufreinigung mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigchromatographie und UV-spektrometrischer Detektion

Abschließend wurden ausgewählte Fraktionen aus der Sephadex LH-20 Chromatographie der Dimeren- und Trimeren-GPC-Fraktionen mittels semipräparativer HPLC an einer Phenyl-Hexyl-Säule weiter fraktioniert bzw. aufgereinigt. Dabei erfolgte die Auswahl der entsprechenden Fraktionen in Abhängigkeit von den in analytischen HPLC-Vorversuchen (siehe Abschnitt 5.1.3.3) erhaltenen Chromatogrammen. Als mobile Phasen wurden verschiedene ternäre Gradientensysteme, bestehend aus MeOH, ACN und 1 mM TFA, verwendet.

Die Geräte- und Messparameter sind Abschnitt 5.1.3.1 im Anhang zu entnehmen.

Strukturcharakterisierung der isolierten Verbindungen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und massenspektrometrischer Detektion

Einen Beitrag zur Strukturcharakterisierung der isolierten Verbindungen sollte die Bestimmung ihrer Massenspektren liefern. Nach chromatographischer Trennung an einer Phenyl-Hexyl-Phase

mit 0,1 % wässriger Ameisensäure und ACN als mobiler Phase, erfolgte die massenspektrometrische Detektion mit Hilfe eines gekoppelten Quadrupol-MS. Als Ionisationsverfahren wurde die Elektrospray-Ionisierung (ESI) gewählt. Die ESI ist ein schonendes Ionisationsverfahren, bei dem meistens relativ wenige Fragmentierungen zu beobachten sind. Die Analytlösung wird durch eine Mikrokapillare versprüht. Ein elektrisches Feld mit einer Potentialdifferenz von einigen Kilovolt zwischen diesem Kapillarende und der Gegenelektrode (Kammermantel) erzeugt ein Spray geladener Tröpfchen. Unterstützt durch einen Inertgas-Gegenstrom, verringert sich deren Größe durch Verdampfung des Lösungsmittels, während die Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche zunimmt. Durch Coulomb-Explosionen entstehen in der Gasphase einfach und mehrfach geladene Analytionen. Im Anschluss werden die Ionen, durch elektrostatische Linsensysteme fokussiert, in den Analysatorraum (Quadrupol) gelenkt und entsprechend ihres m/z -Verhältnisses getrennt. Die Identifizierung der isolierten Verbindungen erfolgte anhand der erhaltenen Massenspektren über den Vergleich mit Literaturdaten, wobei eine Vergleichbarkeit nur dann gewährleistet ist, wenn die Vergleichsspektren unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurden. Aufgrund der geringen Fragmentierung der Analyten kann aus den Massenspektren zudem das Molekulargewicht der isolierten Verbindung abgelesen werden. Das verwendete HPLC-System verfügte zusätzlich über einen vorgeschalteten DAD, so dass auch die UV-Spektren zur Charakterisierung herangezogen werden konnten.

Die Geräte- und Messparameter sind Abschnitt 5.1.3.4 im Anhang zu entnehmen.

Strukturidentifizierung mittels Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektroskopie stellt die wichtigste spektroskopische Methode zur Strukturaufklärung von Molekülen dar, weshalb die grundlegenden Prinzipien der in dieser Arbeit verwendeten 1D- und 2D-NMR-Experimente im Folgenden kurz erläutert werden (FRIEBOLIN, 1998, HESSE et al., 2005).

Atomkerne, deren Spinquantenzahl I ungleich Null ist, besitzen durch ihren Eigendrehimpuls ein magnetisches Moment. In einem sehr starken äußeren Magnetfeld richten sich diese Kerne anhand des Magnetfeldes aus. Dabei können ^1H und ^{13}C , die die häufigsten mittels NMR untersuchten Kerne darstellen, aufgrund ihrer Spinquantenzahl von $I = \frac{1}{2}$ zwei Orientierungen, parallel bzw. antiparallel zum äußeren Magnetfeld, einnehmen. Durch Energie einer bestimmten Frequenz im Radiowellenbereich können die Kerne vom energetisch ärmeren, parallelen Zustand in den energiereicheren, antiparallelen Zustand übergehen.

In der NMR erfolgt die Anregung aller Kerne einer Sorte verbunden mit einer Quermagnetisierung mit einem oder einer Sequenz von Hochfrequenzimpulsen. Nach Abschalten des Hochfrequenzgenerators kehren die Spins in den energieärmeren Zustand zurück. Dieser Abfall der Quermagnetisierung über die Zeit wird gemessen (Free Induction Decay, FID^{NMR}). Durch Fourier-Transformation wird dieses Spektrum in der Zeitdomäne in ein Frequenzspektrum überführt. In den resultierenden NMR-Spektren sind die (Resonanz-)Frequenzen auf der Abszisse gegenüber

der Signalintensität auf der Ordinate aufgetragen. Die Lage eines Signals, d.h. die exakte Resonanzfrequenz eines Kerns, wird dabei auf charakteristische Weise von seiner Kernumgebung beeinflusst. Die Elektronen, die sich um den Kern befinden, induzieren ein lokales Magnetfeld, durch welches das äußere angelegte Magnetfeld abgeschwächt wird. Dabei hängt die Stärke dieser als Abschirmung bezeichneten Verringerung des effektiven Magnetfeldes von der Elektronendichte des Kerns ab, die sowohl von der Art der Bindung als auch von den benachbarten Atomen und der An- oder Abwesenheit elektronenziehender oder -liefernder Gruppen beeinflusst wird. Die resultierende Verschiebung der Resonanzfrequenz wird als chemische Verschiebung δ (ppm) bezeichnet. Die chemische Verschiebung ist eine dimensionslose, von der Messfrequenz bzw. Magnetfeldstärke unabhängige, für den betrachteten Kern charakteristische Größe, die auf eine Referenzsubstanz (meist Tetramethylsilan) bezogen wird. Darüber hinaus weisen die Resonanzsignale in den Spektren häufig Feinstrukturen (Aufspaltung) auf, die aus Wechselwirkungen mit benachbarten Kerndipolen resultieren. Diese Spin-Spin-Kopplungen können sowohl zwischen Kernen der gleichen Sorte (homonuklear) als auch zwischen Kernen verschiedener Elemente (heteronuklear) auftreten. Die Größe der Kopplung wird durch die Kopplungskonstante J beschrieben und wird in Hertz (Hz) angegeben. Die Anzahl der Teilbanden ist direkt abhängig von der Anzahl der koppelnden Kerne, so dass u. a. Dubletts, Triplets, Quadrupletts oder Multipletts entstehen, die eine charakteristische Intensitätsverteilung aufweisen. Während in der ^1H -NMR-Spektroskopie das Integral eines Resonanzsignals proportional zur Anzahl der Kerne ist, sind in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie exakte quantitative Aussagen durch die Signalintensitäten nur durch zeitaufwendige Experimente möglich.

Neben den 1D-NMR-Experimenten zur Strukturidentifizierung von Substanzen haben sich zur vollständigen Konstitutionsaufklärung verschiedene 2D-NMR-Experimente etabliert. Der Vorteil mehrdimensionaler Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen 1D-NMR-Experimenten besteht darin, dass Kopplungen zwischen den einzelnen Kernen sichtbar gemacht werden können. Es handelt sich dabei sowohl um indirekte Spin-Spin-Kopplungen (über Bindungen) als auch um direkte Spin-Spin-Kopplungen durch den Raum. Experimentell unterscheiden sich die 2D-Experimente von den 1D-Experimenten vor allem durch die Einbindung einer zusätzlichen Evolutionsphase zwischen der Präparations- und der Detektionsphase. In der Präparationsphase erfolgt die Anregung des Spinsystems durch eine komplexe Impulsfolge. In der Evolutionsphase entwickelt sich das Spinsystem mit der variablen Evolutionszeit t_1 . Das Empfängersignal ist eine Funktion von t_1 und der Detektionszeit t_2 . Fourier-Transformationen bezüglich t_1 und t_2 führen zu einem zweidimensionalen Spektrum, in dem zwei Frequenzachsen gegeneinander aufgetragen werden. Die Intensität entspricht der dritten Dimension.

Bei COSY-Spektren (Correlated Spectroscopy = korrelierte Spektroskopie) werden auf beiden Frequenzachsen die chemischen Verschiebungen aufgetragen. Die Spektren zeigen Diagonalepeaks für Signale mit gleicher chemischer Verschiebung und Kreuz- oder Korrelationspeaks für

skalar (durch die Bindung) miteinander koppelnde Kerne. Im Allgemeinen können über drei Bindungen koppelnde Kerne erkannt werden, so dass aus den erhaltenen Spektren abzulesen ist, welche Kerne im Molekül benachbart sind. Mit dem in dieser Arbeit angewendeten homonuklearen ^1H , ^1H -COSY-Experiment konnten Informationen über skalar miteinander koppelnde Protonen erhalten werden.

Das HMQC-Experiment (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) ist eine einfache Methode, um ^1H - ^{13}C -Korrelationen über nur eine Bindung festzustellen. Die Kreuzpeaks in diesen Spektren entsprechen den Kopplungen jeweils aneinander gebundener ^1H - und ^{13}C -Kerne. Um die Korrelationen zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen über zwei, drei oder selten über vier Bindungen bestimmen zu können, wurde das HMBC-Experiment (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) angewendet. Bei beiden Experimenten handelt es sich um inverse Messtechniken, bei denen im Kanal der unempfindlichen Kerne (^{13}C) Kohärenzen erzeugt werden, die dann auf den empfindlichen Kern (^1H), dessen Resonanzen gemessen werden, übertragen werden. Die Nachweisempfindlichkeit der Experimente ist durch diese inverse Messtechnik gegenüber normalen heteronuklearen 2D-Experimenten, wie dem ^{13}C , ^1H -COSY-Experiment, deutlich gesteigert, so dass diese auch mit geringeren Probenmengen durchgeführt werden können.

Das NOESY-Experiment (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) unterscheidet sich von den anderen hier erläuterten 2D-Verfahren (COSY, HMQC, HMBC) dadurch, dass hier keine Beziehungen zwischen Kernen, die über skalare Spin-Spin-Kopplungen, d.h. über Bindungen, miteinander in Wechselwirkung treten, sichtbar gemacht werden. Im NOESY können Wechselwirkungen zwischen koppelnden Kerndipolen detektiert werden, die direkt über den Raum übertragen werden. Dieser detektierbare Magnetisierungstransfer durch den Raum erfolgt über den Kern-Overhauser-Effekt (NOE). Vorteilhaft ist die Aufnahme eines NOESY-Spektrums, wenn Beziehungen zwischen Protonen vermutet werden, die zwar nicht skalar miteinander koppeln, aber sich räumlich sehr nahe sind.

Die Geräteparameter sind in Abschnitt 5.1.4 im Anhang aufgelistet.

2.2.3.5 Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte mittels Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion

Zur vorläufigen Identifizierung von estergebundenen Cyclobutanderivaten und FS-Monolignol-Kreuzprodukten wurden sowohl Etherextrakte (estergebundene PCS, siehe Abschnitt 5.3.2.3) unterschiedlicher Untersuchungsmaterialien, 0 h- und 24 h-Material unterschiedlicher Sorten als auch die Dimeren-GPC-Fraktion (siehe 5.3.2.5) nach Trimethylsilylierung mittels GC-MS untersucht.

Zur Erhöhung der Flüchtigkeit der PCS und der Kreuzprodukte wurden diese mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) und Pyridin bei 60°C derivatisiert (R ALPH et al., 1994b, BUNZEL, 2001). Zur gaschromatographischen Trennung der trimethylsilylierten (TMS) Derivate wurde eine DB-5 Kapillarsäule eingesetzt. Die massenselektive Detektion erfolgte nach EI an einem Ion-Trap-MS, das sich von dem bereits beschriebenen Quadrupol-MS, vor allem in der Art der Ionentrennung unterscheidet. Während bei dem Quadrupol-MS je nach angelegtem Spannungsfeld nur Ionen eines bestimmten *m/z*-Verhältnis den Analysator passieren können, werden in der Ion-Trap alle Ionen gleichzeitig eingefangen und jeweils nur bestimmte Ionen in den Detektor entlassen. Die erhaltenen MS-Spektren unterscheiden sich dabei vor allem in den Intensitäten der Massenfragmente, was bei der Identifizierung über den Vergleich mit Referenzspektren aus der Literatur berücksichtigt werden sollte.

Da keine Standardsubstanzen der Cyclobutandimere und der FS-Monolignol-Kreuzprodukte zur Verfügung standen, erfolgte deren Identifizierung in dieser Arbeit über den Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit Referenzdaten aus der Literatur (FORD & HARTLEY, 1989, 1990, HARTLEY et al., 1990a, STEWART et al., 1992, PACKERT, 1993, JACQUET et al., 1995, BUNZEL, 2001).

Die genauen Durchführungsbedingungen für die Trimethylsilylierung sind in Abschnitt 5.3.2.6 aufgeführt. Die Geräte- und Messparameter sind Abschnitt 5.1.1.4 im Anhang zu entnehmen.

2.2.4 Ligninanalytik

Wie bereits beschrieben, wird die Lignifizierung der pflanzlichen Zellwand als primärer limitierender Faktor für deren Abbaubarkeit angesehen. Die Bestimmung des Gehaltes an Lignin in den zu untersuchenden Materialien ist daher von besonderem Interesse. Obwohl Lignin nahezu vollständig resistent gegenüber chemischem oder biologischem Abbau ist, ist der Gehalt nicht einfach zu bestimmen. In der Literatur wurde eine Vielzahl von Methoden zur Ligninbestimmung beschrieben, die je nach zugrunde liegender Methodik zum Teil recht unterschiedliche Ergebnisse liefern. Die derzeit am häufigsten angewendeten Methoden lassen sich grob in folgende drei Klassen unterteilen. Methoden bei den alle Zellwandbestandteile außer Lignin entfernt werden, hier zu zählen gravimetrische Bestimmungen, wie Klason-Lignin (KL) oder acid detergent lignin (ADL). Methoden die auf der Oxidation von Lignin z.B. mit Kaliumpermanganat beruhen sowie Methoden die auf einer Derivatisierung des Lignins und Überführung in eine lösliche Form beruhen. Hierzu gehört z.B. die in dieser Arbeit angewendete Derivatisierung in essigsauerm Acetylbromid. Keine dieser Methoden kann als eindeutige Standardmethode für alle Arten von Pflanzenmaterialien angesehen werden (FUKUSHIMA & HATFIELD, 2004, HATFIELD & FUKUSHIMA, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden daher zwei Methoden, KL und acetylbromidlösliches Lignin (ABSL), zur Bestimmung des Ligningehaltes vergleichend angewendet. Da die gewählten Methoden auf unterschiedlichen Mechanismen

beruhen und somit auch unterschiedliche Fehlerquellen beinhalten, kann über deren Vergleich ein gutes Bild über die tatsächlichen Ligningehalte innerhalb der Zellwand gewonnen werden.

2.2.4.1 Bestimmung des Klason-Lignins

Die Bestimmung des KL ist die mit Abstand am häufigsten verwendete Methode zur Ligninbestimmung. Die ursprünglich bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch KLASON entwickelte Methode zur Bestimmung des Ligningehaltes in Holzproben wurde in den letzten Jahrzehnten zur Anwendung auf verschiedenste Pflanzenmaterialien vielfach modifiziert (HATFIELD & FUKUSHIMA, 2005). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung nach einer modifizierten Methode von THEANDER und WESTERLUND (1986).

Die Methode beruht auf der Hydrolyse des Pflanzenmaterials mit 12 M Schwefelsäure und der anschließenden gravimetrischen Bestimmung des Lignins als säureunlöslichen Rückstand. Die zwei Hauptfehlerquellen der Methode sind zum einen der mögliche Verlust von Ligninanteilen, die unter den gewählten stark sauren Bedingungen löslich sind. Zum anderen können insbesondere Zellwandstrukturproteine oder auch assoziierte Pflanzensubstanzen, wie Wachse oder Cutine, im säureunlöslichen Rückstand verbleiben und somit erhöhte Ligningehalte vortäuschen (HATFIELD et al., 1994).

Das Zellwandmaterial wird analog zur Bestimmung der Zusammensetzung der neutralen Monosaccharide (siehe Abschnitt 2.2.2.3.1) zunächst 2 h in 12 M Schwefelsäure bei RT und anschließend nach Verdünnen auf 2 M für 2 h bei 100°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde unter Vakuum über Glasfaserfilter mit einer Porengröße von 2 µm abfiltriert, säurefrei gewaschen und nach Trocknung ausgewogen. Zur Korrektur der berechneten KL-Gehalte wurden die Glasfaserfilter anschließend bei 500°C im Muffelofen verascht.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.3.1 im Anhang zu entnehmen.

Bestimmung des Proteingehaltes im Klason-Lignin

Wie beschrieben, stellen Strukturproteine, die bei der Bestimmung des KL im säureunlöslichen Rückstand verbleiben, eine der Hauptfehlerquellen der Methode dar. Um den Einfluss von Strukturproteinen auf die in dieser Arbeit ermittelten Ligningehalte beurteilen zu können, wurde der Proteingehalt im Klason Lignin des Maisrestpflanzenmaterials exemplarisch nach einer von WILLIS et al. (1996) beschriebenen Methode bestimmt.

Nach säurehydrolytischem Kjeldahl-Aufschluss des im präparativen Maßstab gewonnenen KL erfolgt die Umsetzung des freigesetzten Ammoniums mit Salicylsäure und Natriumhypochlorit in Anwesenheit von Natriumnitroprussid zu einem blauen Farbstoff, der bei 685 nm photometrisch vermessen wurde. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierreihe mit Ammoniumchlorid. Die detaillierte Durchführung ist Abschnitt 5.3.3.2 im Anhang zu entnehmen.

2.2.4.2 Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignins

Wie viele Ligninbestimmungsmethoden stammt auch die Bestimmung des ABSL ursprünglich aus der Holzchemie und wurde zur Anwendung auf verschiedenste Pflanzenmaterialien vielfach modifiziert. Die Bestimmung erfolgte in dieser Arbeit nach einer modifizierten Methode von FUKUSHIMA und HATFIELD (2001, 2004), die auf der Acetylierung freier Hydroxylgruppen des Ligninkomplexes sowie auf der Bromierung der α -C-Atome des Lignins in essigsaurer Acetylbromidlösung beruht. Das derart modifizierte Lignin ist in Eisessig löslich. Es folgt die photometrische Messung der Absorption bei 280 nm. Die Berechnung des Ligningehaltes erfolgte über einen experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten von 17,747, der für aus Maisrestpflanzen isoliertes Lignin ermittelt wurde (FUKUSHIMA & HATFIELD, 2004). Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Bestimmungen besteht in seiner einfachen und schnellen Durchführung. Nach Inkubation des Untersuchungsmaterials in einer 25 %igen Lösung von Acetylbromid in Eisessig für 2 h bei 50 °C wurde der Überstand nach Verdünnung mit einem Lösungsgemisch aus Natronlauge, Essigsäure und Hydroxylaminhydrochloridlösung zur photometrischen Messung bei 280 nm eingesetzt.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.3.3 im Anhang zu entnehmen.

2.2.4.3 Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung

Die Bestimmung der Monolignolzusammensetzung erfolgte mittels der 1997 erstmals beschriebenen DFRC-Methode (derivatization followed by reductive cleavage) (LU & RALPH, 1997a), die analog zur Bestimmung des ABSL (siehe Abschnitt 2.2.4.2) auf der Derivatisierung des Lignins mit Acetylbromid in Eisessig beruht. Die entstandenen β -Bromo-Ether werden anschließend mit Zinkstaub im essigsauren Medium unter reduktiven Bedingungen selektiv gespalten. Nach Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und Pyridin als Katalysator können die entstandenen Reaktionsprodukte gaschromatographisch analysiert und mittels massenspektrometrischer Detektion identifiziert werden. Abb. 2.6 zeigt schematisch die Reaktionsschritte der DFRC-Methode.

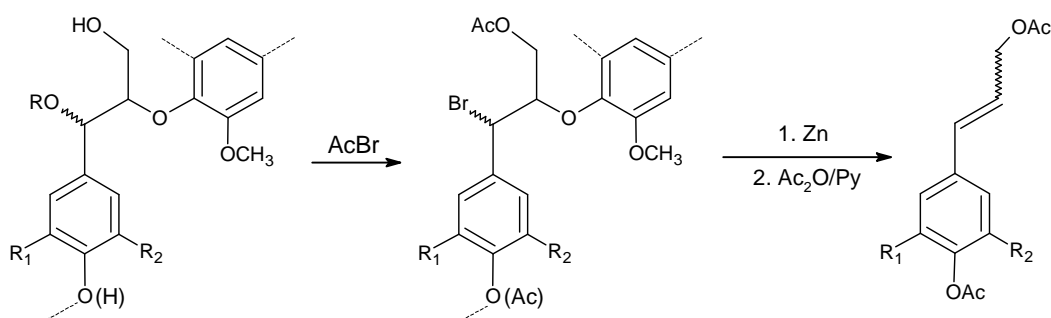


Abb. 2.6: Vereinfachte Darstellung des Reaktionsschemas der DFRC (derivatization followed by reductive cleavage)-Methode (R = H oder Aryl, *p*-Hydroxyphenyl-Einheit: R₁ = R₂ = H, Guaiacyl-Einheit: R₁ = H, R₂ = OCH₃, Syringyl-Einheit: R₁ = R₂ = OCH₃)

Die DFRC-Methode stellt zusammen mit der Methode der Thioacidolyse eine der bedeutendsten Methoden zur Bestimmung der Ligninzusammensetzung dar. Beide Methoden basieren auf der Spaltung der im Ligninkomplex dominierenden β -O-4-Bindungen. Während die Thioacidolyse auf der Reaktion mit Ethylmercaptan beruht, sind die verwendeten Chemikalien und die milderen Reaktionsbedingungen als deutliche Vorteile der in dieser Arbeit verwendeten DFRC-Methode zu werten (LU & RALPH, 1998a). Ein weiterer Vorteil der DFRC-Methode ist, dass Esterbindungen, wie z.B. *p*CS-S-Ester (siehe Abschnitt 1.1.2), die insbesondere in Gräsern einen beachtlichen Anteil ausmachen, während der Reaktion erhalten bleiben und somit einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Ligninzusammensetzung liefern (LU & RALPH, 1998a, 1999). Während in Modellligninen eine nahezu quantitative Monolignolausbeute (95 %) mittels DFRC-Methode gegenüber einer nur 75 %igen Ausbeute mittels Thioacidolyse festgestellt wurde (LU & RALPH, 1997b), wurden in einer Studie an Holz einer Pinienart (*Pinus taeda* L.) höhere Monolignolausbeuten mittels Thioacidolyse erhalten (HOLTMAN et al., 2003), was vermutlich mit der höheren Selektivität der Reaktion zu erklären ist (LU & RALPH, 2001). Störungen der gaschromatographischen Bestimmung der Reaktionsprodukte durch Polysaccharidabbau-Produkte sind bei der Anwendung der DFRC-Methode auf komplexe Zellwandmaterialien unvermeidbar. Durch eine Aufreinigung der Reaktionsprodukte mittels SPE an Kieselgel können diese aber minimiert werden (LU & RALPH, 1998a).

Derivatisierung, reduktive Spaltung und Acetylierung

In der vorliegenden Arbeit wurde das von LU & RALPH beschriebene Verfahren mit geringen Modifikationen angewendet (LU & RALPH, 1997a, BUNZEL et al., 2005c).

Das Untersuchungsmaterial wurde zunächst für 3 h bei 50°C in einer 20%igen essigsäuren Acetylbro midlösung derivatisiert. Der nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom erhaltene Rückstand wurde in wässrigem, essigsäurem Dioxan aufgenommen und unter Zugabe von Zinkstaub für 40 min bei RT reduziert. Im Anschluss an die Reduktion und die Zugabe von 4,4'-Etylidenbisphenol als IS erfolgte die Extraktion der Reaktionsprodukte. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ammoniumchloridlösung und Dichlormethan in einen Scheidetrichter überführt. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit Salzsäure auf einen pH von < 3 erfolgte die Extraktion mit Dichlormethan. Die vereinigten, getrockneten organischen Phasen wurden über Nacht mit Essigsäureanhydrid und Pyridin als Katalysator acetyliert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Vakuumrotationsverdampfer unter Verwendung von Ethanol als Schlepper erfolgte zum möglichst quantitativen Entfernen von störenden Polysaccharidabbau-Produkten eine Aufreinigung mittels SPE an Kieselgel. Die DFRC-Reaktionsprodukte wurden mit Chloroform/Ethylacetat (10/1 v/v) von der SPE-Kartusche eluiert und nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufnahme in Dichlormethan zur gaschromatographischen Trennung eingesetzt.

Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.3.4 im Anhang zu entnehmen.

Gaschromatographische Bestimmung

Die Identifizierung und Quantifizierung der erhaltenen Reaktionsprodukte erfolgte an unterschiedlichen gaschromatographischen Systemen, wobei zur gaschromatographischen Trennung jeweils eine DB-5-Kapillarsäule eingesetzt wurde.

Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Abschnitt 5.1.1.3 zu entnehmen.

Identifizierung der DFRC-Reaktionsprodukte mittels massenspektrometrischer Detektion

Zur Identifizierung der DFRC-Reaktionsprodukte mittels massenselektiver Detektion wurde das gleiche GC-(EI)MS-System eingesetzt, das bereits bei der Methylierungsanalyse in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben wurde. Die Zuordnung der Signale der Monolignoldiacetatderivate erfolgte über den Vergleich der Massenspektren mit einem analysierten Standardgemisch der acetylierten Monolignole. Seltene DFRC Monomere sowie die Monolignol-*p*CS-Ester wurden über den Vergleich der Massenspektren und des Retentionsverhaltens mit Literaturdaten identifiziert (LU & RALPH, 1998b, a, 1999).

Die erhaltenen Massenspektren der identifizierten DFRC-Reaktionsprodukte sind in Abb. 5.16 und Abb. 5.17 im Anhang 5.5 dargestellt.

Quantitative Bestimmung der relativen molaren Anteile der Monolignoleinheiten

Die quantitative Bestimmung der relativen molaren Anteile der Monolignoleinheiten erfolgte mittels FID. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand der relativen Retentionszeiten und den Vergleich des Elutionsmusters mit dem GC-MS-System. Die quantitative Auswertung erfolgte über die integrierten Peakflächen der einzelnen identifizierten Peaks. Die Berechnung der Gehalte erfolgte über den eingesetzten internen Standard 4,4'-Ethylidenbisphenol unter der Verwendung von KF der monomeren Standards (*p*-Cumarylalkoholdiacetat 1,42; Coniferylalkoholdiacetat 1,39; Sinapylalkoholdiacetat 1,44) sowie des *p*CS-S-Esters 3,00.

Ein Beispielchromatogramm ist in Abb. 5.4 im Anhang 5.5 dargestellt.

2.2.4.4 Abschätzung des Ligningehaltes über *p*-Cumarsäure

Wie im Allgemeinen Teil dieser Arbeit bereits ausführlich beschrieben, ist *p*CS in der pflanzlichen Zellwand vorwiegend an die γ -Position der S-Einheiten und in geringerem Maße auch der G-Einheiten im Ligninpolymer estergebunden. Der *p*CS-Gehalt der Pflanzenzellwand wird daher häufig als Indikator für den Lignifizierungsgrad angesehen (GRABBER et al., 2004). Der Nachweis der Esterbindung von *p*CS an Lignin kann über verschiedene Methoden direkt oder indirekt erfolgen. Wie bereits in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben, bleibt die Esterbindung der *p*CS an Lignin während der DFRC-Methode zur Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung erhalten. Im resultierenden GC-MS Chromatogramm können diese Ester anhand ihrer Massenspektren

direkt identifiziert und eventuell quantifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse der PCS an die verschiedenen Zellwandpolymere (Polysaccharide und Lignin) bietet die Bestimmung der estergebundenen PCS nach enzymatischer Hydrolyse der Zellwandpolysaccharide (ISHII, 1997, BUNZEL, 2001). Während polysaccharidgebundene PCS als lösliche, niedermolekulare PCS-Oligosaccharide im Überstand des Hydrolysats enthalten sind, verbleiben Lignin assoziierte Verbindungen im unlöslichen Rückstand. Nach alkalischer Hydrolyse und anschließender Etherextraktion können die PCS mittels HPLC-UV bestimmt werden.

Enzymatische Hydrolyse der Zellwandpolysaccharide mit Driselase

Es werden in der Literatur verschiedene Enzympräparate zur Hydrolyse von Zellwandpolysacchariden beschrieben, wobei das aus Basidiomyceten isolierte Enzymgemisch Driselase am häufigsten Anwendung findet (ISHII & HIROI, 1990b, a, ISHII, 1991a, b, HARTLEY et al., 1992, HIMMELSBACH et al., 1994, BUNZEL, 2001, LEVIGNE et al., 2004). Driselase enthält verschiedene Endo- und Exocarbohydrasen (Arabinanase, Cellulase, Xylanase, Galactanase und Polygalacturonase), die eine Spaltung möglichst aller Zellwandpolysaccharide gewährleisten. Darüber hinaus weist Driselase keine Esterase-Aktivität auf, so dass die Esterbindungen der PCS sowohl an die Zellwandpolysaccharide als auch an das Lignin erhalten bleiben (BORNEMANN et al., 1990, RALET et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde die enzymatische Hydrolyse mit Driselase für 48 h bei 37°C nach der von BUNZEL (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Die genaue Arbeitsvorschrift ist Abschnitt 5.3.3.5 im Anhang zu entnehmen.

Alkalische Hydrolyse, Etherextraktion und Bestimmung mittels HPLC-UV

Sowohl der Überstand als auch der unlösliche Rückstand der enzymatischen Hydrolyse wurden alkalisch hydrolysiert und die freigesetzten PCS nach Extraktion mit Diethylether mittels HPLC-UV analysiert. Dabei erfolgte die alkalische Hydrolyse des Rückstandes, wie in Abschnitt 5.3.2.3 beschrieben, mit 2 M NaOH für 18 h bei RT, während der getrocknete Überstand der enzymatischen Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen mit einer verkürzten Hydrolysezeit von 4 h hydrolysiert wurde. Die anschließende Etherextraktion der auf pH < 2 angesäuerten Hydrolysate sowie die Bestimmung der PCS mittels HPLC-UV erfolgte gemäß den Abschnitten 5.3.2.3 bzw. 5.1.3.2.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Gehalte der Zellwandstrukturkomponenten bzw. der daraus gebildeten Verhältniszahlen erfolgte unter Anwendung von SPSS für Windows (Version 14.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA) mittels univariater, mehrfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA -

analysis of variance). Als post-hoc Signifikanztest der ANOVA wurde der TUKEY-HSD-Test (honest significant difference) durchgeführt, um zu prüfen, welche Mittelwerte bzw. Mittelwertgruppen sich signifikant unterschieden. Der TUKEY-HSD-Test gilt als relativ konservativer Test und findet bei komplexen Vergleichen Anwendung (FOSTER, 1998, GEORGE & MALLERY, 1999).

Nur drei der insgesamt sechs Maissorten wurden in beiden Anbaujahren untersucht. Für diese Sorten (DK 233, DKc 2949 und DK 247) wurden im Rahmen einer dreifaktoriellen ANOVA die Einflüsse der Sorte, des Erntezeitpunktes und des Anbaujahres untersucht. Dabei werden nicht nur signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stufen der drei Hauptfaktoren ermittelt, sondern auch sämtliche möglichen Interaktionen zwischen den Faktoren (Sorte x Anbaujahr, Sorte x Erntezeitpunkt, Erntezeitpunkt x Anbaujahr sowie Sorte x Erntezeitpunkt x Anbaujahr) betrachtet. Zusätzlich wurde für alle Sorten aus dem Anbaujahr 2005 (DK 233, DKc 2949, DK 247, Monumental, DK 281 und DK 287) eine zweifaktorielle ANOVA mit den unabhängigen Variablen Sorte und Erntezeitpunkt durchgeführt. Hierbei wurden wiederum signifikante Unterschiede zwischen den Stufen der Hauptfaktoren sowie Wechselwirkungen zwischen Sorte und Erntezeitpunkt betrachtet.

Um die Einflüsse der abbauinhibierenden Zellwandstrukturkomponenten auf die ermittelten ruminalen Abbaubarkeiten der Zellwand (% TS) bzw. der Zellwandpolysaccharide und der Xylane zu ermitteln, wurde die Gehalte bzw. Verhältniszahlen der entsprechenden Zellwandstrukturkomponenten mit den drei verschiedenen berechneten Abbaubarkeiten korreliert. Die beschriebene bivariate Korrelation wurde ebenfalls unter Anwendung von SPSS für Windows durchgeführt, der Korrelationskoeffizient wurde nach PEARSON bestimmt (FOSTER, 1998, GEORGE & MALLERY, 1999). Er ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs den untersuchten Zellwandstrukturkomponenten und der entsprechenden Abbaubarkeit. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen, wobei ein Wert von $+1$ bzw. -1 einem vollständig linearen Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen entspräche. Bei einem Korrelationskoeffizient von 0 besteht hingegen gar kein linearer Zusammenhang. Der zweiseitige Signifikanztest gibt zudem an inwieweit der ermittelte Korrelationskoeffizient mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant abgesichert werden kann.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten

Die Zellwandstrukturkomponenten der Maisrestpflanzen sollten zunächst unabhängig vom Einfluss der Sorten, der Reife und der unterschiedlichen Witterungsbedingungen in den Anbaujahren generell charakterisiert werden. Hierzu werden im Folgenden die Ergebnisse für die untersuchten AM und 0 h-Materialien über die untersuchten Sorten und Erntezeitpunkte beider Anbaujahre zusammengefasst betrachtet. Durch die Gegenüberstellung der Ergebnisse der AM sowie der 0 h-Materialien sollten zudem die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsmaterialien (AM und 0 h) herausgestellt werden.

Während für das AM alle 6 Sorten in beiden Jahren und zu beiden Erntezeitpunkten untersucht wurden, erfolgte die Untersuchung des 0 h-Materials in 2004 nur an drei der sechs Sorten (DK 233, DKc 2949, DK 247). Die in diesem Kapitel (3.1) dargestellten Ergebnisse der 0h-Materialien beziehen sich jeweils nur auf die drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten. Um die Ergebnisse der AM und 0 h-Materialien direkt miteinander vergleichen zu können, werden die Ergebnisse der AM in den folgenden Diagrammen einmal für alle sechs Sorten sowie für die drei Sorten, für die auch die 0 h-Materialien untersucht wurden, dargestellt.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form von Box-Whisker-Plots (Boxplots), mit denen es möglich ist, eine Reihe statistischer Kenndaten in sehr konzentrierter Form darzustellen (TUKEY, 1977, BÄRLOCHER, 1999). Dabei entsprechen die Whisker dem Minimal- bzw. Maximalwert der Datenreihe (maximale Streuung). Die Box wird durch den Quartilabstand zwischen dem ersten und dem dritten Quartil (Viertelwerte, 25 bzw. 75 %) bestimmt. Sie umfasst 50 % der Messdaten und ist somit ein Maß für die mittlere Streuung der Messdaten. Durch Angabe des Medians (–) zusätzlich zum arithmetischen Mittelwert (•) wird zudem die Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung deutlich.

3.1.1 Unterscheidung der untersuchten Ausgangs- und 0 h-Materialien

Die AM entsprechen den direkt getrockneten und vermahlenden Maisrestpflanzen. Sie enthalten dementsprechend neben den Strukturkomponenten der pflanzlichen Zellwände auch sämtliche wasserlöslichen Inhaltsstoffe aus dem Zelllumen sowie den Leitungsbahnen der Pflanzen. Dies sind insbesondere Nicht-Struktur-Kohlenhydrate, aber auch andere organische sowie anorganische Verbindungen. Unter den Nicht-Struktur-Kohlenhydraten dominieren freie Monosaccharide, insbesondere freie D-Glucose, während der Gehalt von Stärke in der Maisrestpflanze vernachlässigbar gering ist (MOORE & HATFIELD, 1994). Aufgrund ihrer dynamischen Funktionen in verschiedenen Metabolismusreaktionen sowie im Energietransport und der Energiespeicherung der Pflanze schwanken die Gehalte von Nicht-Struktur-

Kohlenhydraten je nach physiologischem Status der Pflanze, aber auch über den Tagesverlauf hinweg, zum Teil erheblich (SMITH, 1973). Die in verschiedenen Studien an Maisrestpflanzen vergleichbarer Reife ermittelten Gehalte wasserlöslicher Kohlenhydrate schwanken zwischen 4 - 12 % der Gesamttrockenmasse der Restpflanze (CHEN et al., 2007, KRUSE et al., 2008). TOVAR-GÓMEZ et al. (1997) wiesen in außergewöhnlichen Maishybriden bei Siloreife sogar bis zu 25 % lösliche Kohlenhydrate nach.

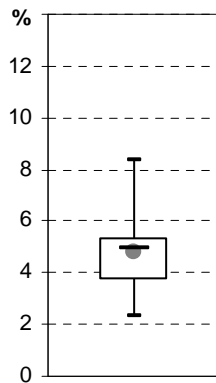


Abb. 3.1: Gehalte freier D-Glucose in den Ausgangsmaterialien (sechs Sorten) (% der Trockensubstanz)

In den in dieser Arbeit untersuchten AM wurden in Vorversuchen aus wässrigen Probenextrakten vor allem freie D-Glucose sowie geringe Mengen freier D-Mannose nach Umsetzung zu deren Alditolacetaten nachgewiesen. Stärke konnte hingegen nach Anfärben mit Iod-Kaliumiodid-Lösung in den AM nicht nachgewiesen werden. Als Indikator für den Gesamtgehalt an Nicht-Struktur-Kohlenhydraten in den untersuchten AM wurden die Gehalte an freier D-Glucose, die in Abb. 3.1 zusammengefasst dargestellt sind, enzymatisch bestimmt. Die Werte der einzelnen Sorten, Erntezeitpunkte und Anbaujahre sind in Tab. 5.8 im Anhang 5.4 aufgeführt. Die ermittelten Gehalte stimmten gut mit den beschriebenen Literaturdaten überein. Der durchschnittliche Glucose-Gehalt betrug 4,8 % TS, wobei sich insgesamt starke Schwankungen der ermittelten Gehalte zwischen 2,3 % und 8,4 % TS zeigten. Diese können sowohl sorten- und/oder reifespezifisch bedingt, zum Teil aber auch auf eine unterschiedliche Verarbeitung der Pflanzen nach der Ernte

zurückzuführen sein. Wurden mehrere Sorten an einem Tag geerntet, kann es aufgrund der begrenzten Kapazität der zur Verfügung stehenden Geräte zu unterschiedlich langen Standzeiten zwischen Ernte und Gefriertrocknung gekommen sein (ZELLER, persönliche Mitteilung). Während dieser Zeit könnte bereits ein Teil der freien Kohlenhydrate, verursacht durch die weiterhin ablaufende Zellatmung (MOSER, 1980, MOORE & HATFIELD, 1994), abgebaut worden sein, was bei der Interpretation der Gehalte freier D-Glucose berücksichtigt werden sollte.

CHEN et al. (2007) bestimmten in Maisrestpflanzen verschiedener zur Körnerreife geernteter Sorten nach Soxhlet-Extraktion einen wasserlöslichen Gesamtanteil von 14 - 27% der Pflanzen-Trockenmasse. Im Rahmen einer detaillierten Charakterisierung der wasserlöslichen Substanzen wiesen sie neben dominierenden Anteilen von Nicht-Struktur-Kohlenhydraten (Monosaccharide 30 - 46 % der wasserlöslichen TS, oligomere Kohlenhydrate 4 - 12 %) unter anderem aliphatische und phenolische Säuren (7 - 21 %, z.B. Äpfelsäure, *iso*-Zitronensäure, *p*CS, 4-HBS, VS, KS), Zuckeralkohole (3 - 7 %, z.B. Glycerol), anorganische Ionen (10 - 18 %) sowie einen Anteil von nicht genauer identifizierten Oligomeren (10 - 18 %) nach.

Dies verdeutlicht, dass die AM neben den freien Kohlenhydraten auch noch eine Vielzahl anderer Substanzen enthalten, die die Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten stören

könnten. So können z.B. insbesondere niedermolekulare, lösliche phenolische Substanzen die Bestimmung des ABSL und/oder der zellwandgebundenen PCS stören. Da die AM aber die tatsächlich zur Fütterung eingesetzten Materialien darstellen, sollte im Folgenden geklärt werden, inwieweit sie zur Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten geeignet sind.

Die neben den AM zur Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten eingesetzten 0 h-Materialien wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, durch Waschen der Rohmaterialien in Nylonbeuteln in einer Waschmaschine gewonnen. Sie entsprechen somit den wasserunlöslichen Faserbestandteilen der Maisrestpflanzen. Die nach Trocknen und Rückwaage der Nylonbeutel ermittelten Auswaschverluste sind in Abb. 3.2 dargestellt, die zugehörigen Daten sind Tab. 5.2 im Anhang 5.4 zu entnehmen. Der durch die Auswaschung bedingte TS-Verlust betrug durchschnittlich 31 % und lag somit oberhalb des von CHEN et al. (2007) beschriebenen wasserlöslichen Anteil. In anderen Studien an Maissilage wurden ähnliche *in situ* Auswaschverluste von 24 ± 5 % TS (VALENTIN et al., 1999), 36 ± 10 % TS (DE BOEVER et al., 2002) sowie 23 - 33 % TS (HÖNER, 2001) beschrieben. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Bedingungen der Auswaschung in den genannten Studien zum Teil stark von in dieser Arbeit abweichen, so dass die ermittelten Verluste nur bedingt miteinander vergleichbar sind.

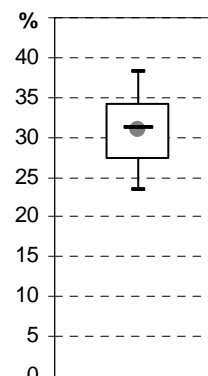


Abb. 3.2: Auswaschverlust (% Trockensubstanz)

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, kann es bei der *in situ* Abbaubarkeitsmessung bedingt durch die Porengröße der verwendeten Nylonbeutel neben dem Verlust an wasserlöslichen Verbindungen, die im Allgemeinen aber schnell und vollständig verdaut werden (MOORE & HATFIELD, 1994), auch zu einem anteiligen Verlust von noch unverdauten und/oder unverdaubaren Faserpartikeln kommen (DEWHURST et al., 1995, DE BOEVER et al., 2002). Dieser kann sowohl während des Waschvorgangs in der Waschmaschine als auch während des ruminalen Verdauens auftreten. Während der Verlust während des ruminalen Verdauens nicht bestimmt werden kann, wurde der Partikelverlust während des Waschvorgangs exemplarisch im Labor nachgestellt und gravimetrisch ermittelt. Hierzu wurden 4 g des Rohmaterials in einen Nylonbeutel (siehe Abschnitt 2.2.1.1) gegeben und im Becherglas mit 1 L Wasser unter kräftigem Rühren extrahiert. Da die mechanische Bewegung der Beutel unter diesen Bedingungen sicherlich deutlich geringer war als beim Waschen der Beutel in der Waschmaschine (19 min) wurde eine verlängerte Extraktionszeit von 60 min gewählt. Das erhaltene Washwasser wurde durch einen Glasfaserfilter (2 μ m Porengröße) filtriert und nach Trocknen des Rückstandes bzw. Gefriertrocknen des wässrigen Extraktes wurde der TS-Verlust ermittelt. Der Gesamt-TS-Verlust (löslich + unlöslich) betrug 32 % und stimmte somit sehr gut mit den ermittelten Auswaschverlusten der Waschmaschinenbehandlung (Abb. 3.2) überein. Der Anteil unlöslicher Faserpartikel betrug durchschnittlich 3,6 % TS (n = 3). Auch wenn die gewählte Methode nur bedingt geeignet ist, die Auswaschung in der Waschmaschine nachzustellen und nur exemplarisch

durchgeführt wurde, wird deutlich, dass der Verlust an Faserpartikeln bedingt durch die Porengröße relativ gering ist. Bestätigt wird dies zudem durch Studien von DEWHURST et al. (1995), die über den Vergleich von *in situ* und *in vitro* Abbaubarkeitsmessungen gleicher Futtermittel feststellten, dass für faserreiche Futtermittel (ADF > 25 %) nur geringe Verluste unverdaubaren Fasermaterials zu erwarten sind. Die ADF-Gehalte aller in dieser Arbeit untersuchten Maisrestpflanzen liegen bei > 30 % (ZELLER, 2008).

Gegenüber den AM haben die 0 h-Materialien den Vorteil, dass alle wasserlöslichen Bestandteile, die unter Umständen zu Störungen in der Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten führen könnten, bereits entfernt wurden. Tatsächlich können in den 0 h-Materialien noch geringe Mengen an z.B. ethanol- oder acetonlöslicher Inhaltsstoffe enthalten sein, die eventuell Störungen hervorrufen könnten. Eine alternative, präparative Isolierung der pflanzlichen Zellwände im Sinne einer enzymatisch-gravimetrischen Ballaststoffisolierung (PROSKY et al., 1994) wäre aber für den in dieser Arbeit untersuchten Probenumfang nicht realisierbar gewesen.

3.1.2 Protein- und Aschegehalt

Die Rohprotein- und Rohaschegehalte der Ausgangsmaterialien wurden von Frau Friederike Zeller an der TUM im Rahmen der Weender-Futtermittel-Analyse bestimmt. Die durchschnittlichen Gehalte betragen, gemittelt über alle in dieser Arbeit untersuchten Sorten, Erntezeitpunkte und Anbaujahre, 5,2 % TS Rohprotein sowie 5,6 % TS Rohasche. Die Daten der einzelnen Rohmaterialien sind Tab. 5.3 im Anhang 5.4 zu entnehmen. Zwischen den Sorten, Erntezeitpunkten und Anbaujahren bestanden nur geringe Schwankungen (nicht dargestellt). Da der Einfluss des Protein- und Aschegehaltes für die Betrachtung der ruminalen Abbaubarkeit der Restpflanze unerheblich ist, wurde auf eine separate Bestimmung in den AM und 0 h-Materialien verzichtet.

3.1.3 Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide

3.1.3.1 Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte in den unverdauten Untersuchungsmaterialien

Während in den meisten Studien zur Charakterisierung der Zellwandzusammensetzung der Gesamtkohlenhydratgehalt der pflanzlichen Zellwände von Futtermitteln allein über die Summe der ermittelten Gehalte der Monosaccharide bestimmt wird (Uppsala-Methode) (THEANDER & WESTERLUND, 1986), wurde der Gesamtkohlenhydratgehalt der Untersuchungsmaterialien in der vorliegenden Arbeit zusätzlich photometrisch als Summenparameter bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Abb. 3.3 zeigt den Vergleich der erhaltenen Gesamtkohlenhydratgehalte. Die genauen

Gehalte sind Tab. 5.9 (Gesamtkohlenhydratgehalte, photometrisch) sowie Tab. 5.10 und Tab. 5.11 (saure und neutrale Monosaccharidgehalte) im Anhang 5.4 zu entnehmen.

Die photometrisch als Summenparameter bestimmten Gesamtkohlenhydratgehalte lagen deutlich über den aus der Summierung der neutralen Monosaccharide, was durch die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen beider Methoden verursacht wird. In beiden Bestimmungen wurde das Material zunächst in 72 %iger Schwefelsäure vorgequollen, um die Cellulose der Bestimmung zugänglich zu machen. Während bei der photometrischen Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate die Monosaccharide durch

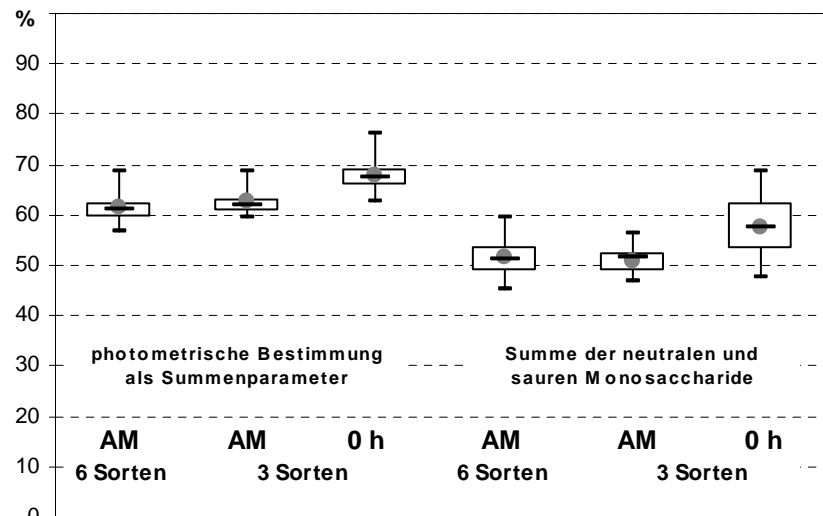


Abb. 3.3: Gesamtkohlenhydratgehalte im Ausgangs- (AM) und 0 h-Material (% Trockenmasse); Vergleich der Gehalte der photometrischen Bestimmung als Summenparameter und der Summe der neutralen und sauren Monosaccharidgehalte

kurzzeitige Erhitzung in konzentrierter Schwefelsäure abgebaut werden (siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.2.1), wurde zur Bestimmung der neutralen Monosaccharide für 3 h bei 100°C in verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert. Bei dieser Hydrolyse der Polysaccharide besteht stets ein Gleichgewicht zwischen der Freisetzung der Monosaccharide aus den Polysaccharidstrukturen und deren Zerstörung, was vermutlich Grund für die niedrigeren Gesamtkohlenhydratgehalte aus der Bestimmung der Monosaccharide und Uronsäuren ist. In Vorversuchen mit Mischungen von freien Monosacchariden in Polysacchariden (Glucose in Xylan bzw. Arabinose und Xylose in Cellulose) konnte eine Zerstörung von 14 % für Glucose, 17 % für Xylose und 10 % für Arabinose festgestellt werden. Eine unzureichende Hydrolyse der Polysaccharide kann hingegen weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Hydrolysezeit, wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben, hinsichtlich der Monosaccharidausbeute optimiert worden war. Da der exemplarisch ermittelte Hydrolyseverlust für die drei in den Maisrestpflanzen dominierenden Monosaccharide vergleichbar war, ist die Bestimmung der Alditolacetate zwar geeignet, um die prozentuale Monosaccharidzusammensetzung der Proben zu bestimmen; zur Ermittlung des Gesamtkohlenhydratgehaltes scheint allerdings die photometrische Bestimmung besser geeignet zu sein.

Die mittlere Streuung der photometrisch bestimmten Gesamtkohlenhydratgehalte war relativ gering. Der Schwankungsbereich zwischen unterem und oberem Quartil betrug lediglich 3 - 4 % TS. Zwischen den untersuchten und hier zusammengefasst dargestellten Sorten, Erntezeitpunkten und Anbaujahren bestanden somit insgesamt nur relativ geringe Unterschiede

im Gesamtkohlenhydratgehalt, was insbesondere durch die Gegenüberstellung der Ergebnisse von sechs gegenüber drei Sorten in den AM deutlich wird. Die relative große maximale Streuung (Whisker) deutete allerdings daraufhin, dass einige Proben deutlich abweichende Gehalte aufweisen. Eine detaillierte Untersuchung des Einflusses von Sorte, Reife und Witterungsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten erfolgt in Abschnitt 3.2 dieser Arbeit. Da in die als Summe der neutralen Monosaccharide und Uronsäuren berechneten Gesamtkohlenhydratgehalte die analytischen Fehler mehrerer Methoden eingehen, sind die hier beobachteten größeren Streuungen der Gehalte teilweise sicherlich auch darauf zurückzuführen.

Neben den beschriebenen Unterschieden zwischen den beiden Bestimmungsmethoden bestanden auch zwischen den Untersuchungsmaterialien deutliche Unterschiede in den ermittelten Gesamtkohlenhydraten. Die ermittelten Gehalte waren in den AM (3 Sorten) mit 61,5 bzw. 50,2 % TS mit beiden Bestimmungsmethoden niedriger als in den 0 h-Materialien (67,7 % bzw. 56,6 % TS). Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 ausführlich beschrieben, enthalten die AM einen nicht unerheblichen Anteil wasserlöslicher nicht Kohlenhydrat-Substanzen, aufgrund derer die ermittelten relativen Anteile der Kohlenhydrate an der Gesamttrockenmasse der Untersuchungsmaterialien niedriger sind. Es ist anzunehmen, dass die ebenfalls in den AM enthaltenen freien Kohlenhydrate größtenteils mitbestimmt werden. Diese Zucker tragen auch zum Gesamtfutterwert der Maisrestpflanze bei. Allerdings ist eine detaillierte Betrachtung der Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide bedingt durch den ruminalen Abbau aufgrund dieser Mitbestimmung der freien Kohlenhydrate nicht möglich. Die AM sind somit für die Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide nicht geeignet. Für die in den folgenden Abschnitten beschriebene prozentuale Monosaccharidzusammensetzung (siehe 3.1.3.2) sowie die Charakterisierung der Zellwandpolysaccharidstrukturen (siehe 3.1.3.3) werden daher jeweils nur die Ergebnisse der 0 h-Materialien beschrieben und diskutiert.

Der über die photometrische Bestimmung ermittelte Gesamtkohlenhydratgehalt der untersuchten 0 h-Materialien stimmte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Probenvorbereitungen und Bestimmungsmethoden mit einem mittleren Gehalt von 67,7 % der TS relativ gut mit den aus der Literatur bekannten Kohlenhydratgehalten von Maisrestpflanzen überein. So beschrieben MORRISON et al. (1998) einen durchschnittlichen Gesamtkohlenhydratgehalt von etwa 80 % der Zellwand von Maisinternodien unterschiedlicher Reifestadien. JUNG & CASLER (2006a) bestimmten in Maisrestpflanzen vergleichbarer Reife einen Gesamtkohlenhydratgehalt von 75,5 - 76,3 % der Zellwand. Der prozentuale Gesamtkohlenhydratgehalt wurde in beiden Studien als Summe der neutralen Monosaccharide und Uronsäuren aus einem ethanolunlöslichen Rückstand der Maisrestpflanzen bzw. Maisinternodien bestimmt. Der Zellwandgehalt wurde in beiden genannten Studien definiert als die Summe aus dem genannten Gesamtkohlenhydratgehalt, dem KL-Gehalt und den Gehalten ester- und ethergebundener monomerer PCS. Sonstige Bestandteile, wie z.B. Proteine, wurden nicht berücksichtigt. Die ermittelten prozentualen

Gesamtkohlenhydratgehalte sind demnach höher als in der vorliegenden Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass die als Summe der neutralen Monosaccharide und Uronsäuren berechneten Gesamtkohlenhydratgehalte zu niedrig sind.

3.1.3.2 Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide



Abb. 3.4: Prozentuale Monosaccharidzusammensetzung in den 0 h-Materialien (Glc = Glucose, Xyl = Xylose, Ara = Arabinose, Urons. = Uronsäuren)

Wie bereits erwähnt, waren Glucose, Xylose und Arabinose die drei dominierenden Monosaccharide der Maisrestpflanzen. Dabei stammt die Glucose nahezu vollständig aus Cellulose. Mixed-linked- β -Glucane und Xyloglucane sind in den vegetativen Pflanzenteilen von Gräsern hingegen von untergeordneter Bedeutung (HEREDIA et al., 1995, CARPITA et al., 2001). Xylose und Arabinose stammen aus den Heteroxylenen, wobei in den vegetativen Pflanzenteilen von Gräsern die sauren GAX gegenüber den neutralen AX dominieren (ÅMAN, 1993, IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995). Die in Summe bestimmten Uronsäuren können sowohl aus Pektinen, vorwiegend Galacturonsäure, sowie aus den sauren GAX, vorwiegend Glucuronsäure, stammen. Eine Differenzierung der enthaltenen Uronsäuren ist mit der angewendeten Methode allerdings nicht möglich. Neben den dominierenden Monosacchariden Glucose, Xylose und Arabinose, deren prozentuale Verteilung in den Zellwandpolysacchariden der untersuchten Probenmaterialien

in Abb. 3.4 dargestellt ist, konnten in den meisten Proben auch geringe Mengen Mannose (ca. 0,3 % TS) und Galactose (ca. 0,5 % TS) nachgewiesen werden. Galactose kann z.B. an die Arabinoseseitenketten der sauren GAX gebunden sein (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995, SAULNIER et al., 1995), Mannose bildet das Grundgerüst der Mannane. Die detaillierten Monosaccharidgehalte der einzelnen Sorten, Erntezeitpunkte und Anbaujahre sind in Tab. 5.10 und Tab. 5.11 im Anhang 5.4 aufgeführt.

Cellulose ist das dominierende Polysaccharid in den untersuchten Maisrestpflanzen (mittlerer Glucoseanteil 56,9 %), gefolgt von den Heteroxylenen (Xyloseanteil 33,4 % sowie 4,2 % Arabinose). Die ermittelte prozentuale Zusammensetzung stimmt gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten für vergleichbar reife Maisrestpflanzen überein (MOORE & HATFIELD, 1994, MORRISON et al., 1998, JUNG, 2003, JUNG & CASLER, 2006b). BUXTON et al. (1987) beschrieben

für Gräser im Allgemeinen ein Hemicellulose/Cellulose-Verhältnis zwischen 0,57 - 0,70. Das mittlere Hemicellulose/Cellulose-Verhältnis ($\sum(\text{Arabinose} + \text{Xylose})/\text{Glucose}$), der untersuchten Proben betrug in dieser Arbeit 0,66.

Wie anhand der mittleren Streuung der Messdaten erkennbar ist, bestanden zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Sorten, Erntezeitpunkten und Anbaujahren insgesamt nur geringe Unterschiede. Die maximalen Streuungen der Glucose- und Xylosegehalte deuten allerdings darauf hin, dass einige Proben eine deutlich abweichende Polysaccharidzusammensetzung aufweisen; siehe hierzu Abschnitt 3.2.

Heteroxylane weisen strukturelle Heterogenität auf, wobei sowohl der Grad der Substitution mit Arabinose und/oder Glucuronsäure, die Verteilung der Substituenten als auch der Grad der Polymerisation variabel sind (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.1.2). Daraus resultierend variieren die physikochemischen Eigenschaften der Heteroxylane, wie z.B. deren Löslichkeit, aber auch deren Abbaubarkeit wird u.a. mit dem Arabinosesubstitutionsgrad in Verbindung gebracht (GLITSØ et al., 1999). Während für wasser- bzw. alkalilösliche Arabinoxylane in Getreideballaststoffen A/X-Verhältnisse zwischen 0,40 und 0,60 beschrieben wurden (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995, BUNZEL, 2001), sind die Xylane in den vegetativen Pflanzenteilen der Gräser in nur sehr geringem Maße mit Arabinose substituiert. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten molaren A/X-Verhältnisse (siehe Abb. 3.5) von 0,10 bis 0,16 sind gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten für Maisrestpflanzen ähnlicher Reife vergleichbar, die zwischen 0,08 und 0,14 lagen (GOTO et al., 1994, MORRISON et al., 1998, JUNG & CASLER, 2006b). Von größerer Bedeutung in bezug auf die Beeinflussung der physikochemischen Eigenschaften und der Abbaubarkeit der GAX scheint aber insbesondere der Substitutionsgrad der GAX mit FS sowie das Ausmaß der FS/DFS-Cross-Links zu weiteren Polysaccharidsträngen oder zu Lignin zu sein.

3.1.3.3 Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen

Über die Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide im Rahmen der Methylierungsanalyse (SMA) (siehe 2.2.2.4) konnten die Polysaccharidstrukturen detaillierter charakterisiert werden. Während die freien Hydroxylgruppen der Polysaccharide methyliert werden, liegen die glykosidisch gebundenen Hydroxylgruppen in den erhaltenen PMAA acetyliert vor. Mit einigen Ausnahmen lassen sich sowohl die exakten Bindungsverhältnisse zwischen den Monosaccharid-Einheiten aufklären, als auch in welcher Form (furanosidisch oder pyranosidisch) diese im Polysaccharid vorliegen.

Für die vorliegende Arbeit ist dabei insbesondere die Betrachtung der Bindungsverhältnisse innerhalb der (Glucurono-)Arabinoxylane interessant, da, wie bereits beschrieben, u.a. deren Substitutionsgrad die physikochemischen Eigenschaften der Heteroxylane und eventuell deren Abbaubarkeit beeinflussen. Die relativen molaren Anteile der unterschiedlichen Monosaccharid-Einheiten sind im Anhang 5.4 in Tab. 5.12 (Glucose), Tab. 5.13 (Arabinose) und Tab. 5.14

(Xylose) aufgeführt. Die nachgewiesenen, glykosidisch gebundenen Monosaccharid-Einheiten sind charakteristisch für die in Maisrestpflanzen dominierenden Polysaccharide: Cellulose (T-Glcp und 4-Glcp) und (Glucurono-)Arabinoxylane (T-Xylp, 4-Xylp(+2-Xylp), 3,4-Xylp, 2,4-Xylp, T-Araf, 2-Araf und T-Galp). Da bekannt ist, dass die Xylose-Einheiten in den GAX zum Teil in O-2- und O-3-Position mit Arabinose substituiert sind (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995), wurde versucht, das entsprechende PMAA-Derivat 2,3,4-Xylp in den Probenchromatogrammen zu identifizieren. 2,3,4-Xylp konnte aber in keinem der Probenchromatogrammen eindeutig identifiziert werden.

Die mittels SMA ermittelte prozentuale Zusammensetzung der Monosaccharide in den 0 h-Materialien stimmte mit durchschnittlich 55 % Glucose, 38 % Xylose und 5 % Arabinose sehr gut mit der aus der Bestimmung der Alditolacetate (siehe 3.1.3.2) ermittelten Zusammensetzung überein. Dies bestätigte grundsätzlich die Anwendbarkeit der modifizierten Reaktionsbedingungen der SMA auf die zu untersuchenden Probenmaterialien. Aufgrund der dominierenden Anteile von Cellulose in den Probenmaterialien wurden insbesondere die Hydrolysebedingungen (stufenweise Hydrolyse mit verschiedenen Konzentrationen von TFA) verändert (siehe hierzu Abschnitt 2.2.2.4). Auch das A/X-Verhältnis betrug wie bei der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung als deren Alditolacetate (AA) durchschnittlich 0,13 (siehe Abb. 3.5). Bedingt durch die vielen Reaktionsschritte der Methode waren die im Rahmen der SMA ermittelten relativen molaren Gehalte der Monosaccharideinheiten (Tab. 5.12, Tab. 5.13, Tab. 5.14 im Anhang 5.4) im Vergleich zur Bestimmung der Alditolacetate allerdings stärker fehlerbehaftet. Dies wurde z.B. anhand der maximalen Streuung der A/X-Verhältnisse beider Bestimmungsmethoden, die in Abb. 3.5 gegenübergestellt sind, deutlich. Als kritische Punkte der SMA sind insbesondere die vollständige Methylierung sowie die säurehydrolytische Spaltung der permethylierten Polysaccharide zu nennen. Die Quantifizierung der verzweigten Xylopyranose-Einheiten (3,4-Xylp und 2,4-Xylp) ist zudem erschwert, da die beiden Peaks in den Probenchromatogrammen nicht grundliniengetrennt waren (siehe Abb. 5.2 im Anhang 5.5).

Die Bindungsverhältnisse innerhalb der (Glucurono-)Arabinoxylane sollen im Folgenden anhand verschiedener Verhältniszahlen näher charakterisiert werden. Neben den bereits beschriebenen A/X-Verhältnissen aus beiden Bestimmungsmethoden (AA und SMA) sind in Abb. 3.5 vergleichend das Verhältnis der Summe der verzweigten Xylose-Einheiten ($X^{3,4+2,4}$) zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4+2,4}/\sum X = [3,4\text{-Xylp} + 2,4\text{-Xylp}]/[T\text{-Xylp} + 4\text{-Xylp} + 3,4\text{-Xylp} + 2,4\text{-Xylp}]$) und das Verhältnis der in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4}/\sum X$) gegenübergestellt. Das mittlere A/X-Verhältnis (0,13) war niedriger als das mittlere Verhältnis der Summe der verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose (0,15). Dies bedeutet, dass statistisch jede 7. Xylose-Einheit des Xylanhauptstranges glykosidisch verzweigt ist, aber nur ca. jede 8. Xyloseeinheit mit Arabinose verknüpft ist. Der Xylanhauptstrang ist also nicht nur mit Arabinose-Einheiten, sondern zusätzlich auch mit anderen Monosaccharid-Einheiten substituiert. Gleiches kann durch das in Abb. 3.6 dargestellte molare Verhältnis der Summe der

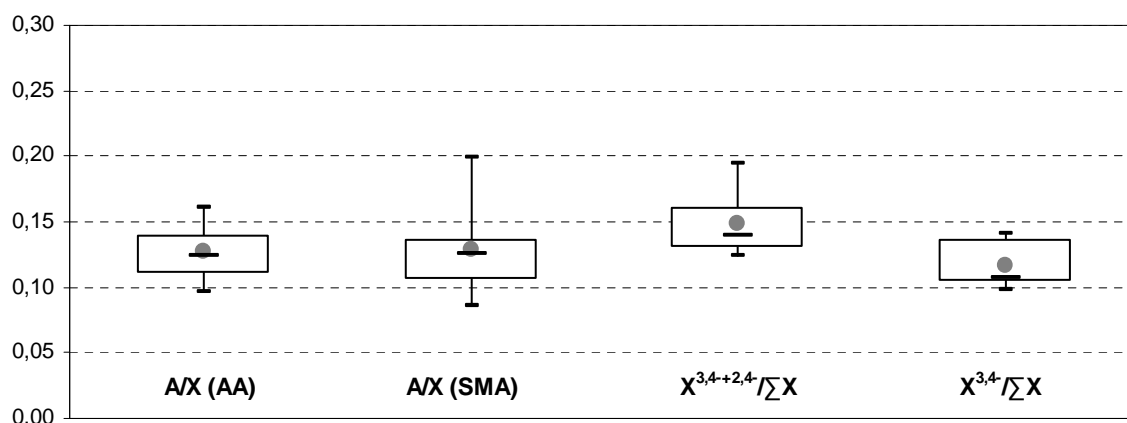


Abb. 3.5: Vergleich verschiedener molarer Verhältnisse der Heteroxylane in den 0 h-Materialien (A/X (AA) = Verhältnis von Arabinose zu Xylose aus der Bestimmung der Alditolacetate, A/X (SMA) und der Standardmethylierungsanalyse ($X^{3,4+2,4}/\sum X$ = Verhältnis der Summe der verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose, $X^{3,4}/\sum X$ = Verhältnis der in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose)

Arabinofuranose-Einheiten ($\sum A = T\text{-Araf} + 2\text{-Araf}$) zu der Summe der verzweigten Xylopyranose-Einheiten ($\sum A/X^{3,4+2,4}$), das im Durchschnitt < 1 (0,88) war, ausgedrückt werden. Inwieweit dies für die verschiedenen Sorten und Erntezeitpunkte allgemein gültig ist oder ob es signifikante Unterschiede gibt, wird in Abschnitt 3.2 näher betrachtet.

Da Arabinose und die Uronsäuren, Glucopyranuronsäure und 4-O-Methyl-Glucopyranuronsäure, die einzigen in der Literatur beschriebenen Substituenten des Xylanhauptstranges in Heteroxylanen sind, handelte es sich bei den anderen Xylansubstituenten in den hier beschriebenen Proben vermutlich um Glucopyranuronsäure- und/oder 4-O-Methyl-Glucopyranuronsäure-Einheiten. Eine Bestimmung der Uronsäuren war unter den gewählten Bedingungen der SMA allerdings nicht möglich, da das Redoxpotential des eingesetzten Natriumbordeuterids nicht zur Reduktion der Uronsäuren ausreicht. Zu deren Charakterisierung wäre daher eine zusätzliche Bestimmung unter Verwendung eines stärkeren Reduktionsmittels, wie z.B. Lithiumaluminiumdeuterid, notwendig gewesen (LINDBERG, 1972). Durch Reduktion der Säurefunktion am C-6-Atom entsteht aus beiden Uronsäuren das gleiche PMAA. Eine Differenzierung zwischen den beiden Uronsäuren (Glucopyranuronsäure und 4-O-Methyl-Glucopyranuronsäure) ist nicht möglich, da die O-4-Position der Glucopyranuronsäure, ebenso wie alle anderen freien OH-Gruppen im Molekül, im Verlauf der Reaktion methyliert wird und somit nicht von einer bereits *in planta* vorhanden Methylgruppe in O-4 unterschieden werden kann. Darüber hinaus unterscheidet sich das aus den Uronsäuren gebildete PMAA lediglich durch Anwesenheit von zwei Deuterium-Ionen anstatt einem von dem aus der terminalen Glucopyranose (T-Glcp) entstehenden PMAA. Die Retentionszeit beider PMAA wäre somit identisch, so dass eine gesonderte Quantifizierung der Uronsäuren lediglich mittels GC-MS möglich wäre.

Das ebenfalls in Abb. 3.5 dargestellte molare Verhältnis der in O-3-Stellung verzweigten Xylose-Einheiten ($3,4\text{-Xylp}$) zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4}/\sum X$) betrug im Durchschnitt 0,12 und lag somit leicht unterhalb des ermittelten A/X-Verhältnisses (0,13). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Arabinose zwar größtenteils an die O-3-Position der Xylose-Einheiten des Xylanhauptstranges gebunden ist, aber zu einem geringen Anteil auch an die O-2-Position. Gleiches kann wiederum durch das in Abb. 3.6 dargestellte molare Verhältnis der Summe der Arabinofuranose-Einheiten zur Summe der in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten ($\sum A/X^{3,4}$) ausgedrückt werden, das im Durchschnitt über 1 (1,13) lag. Da allerdings bekannt ist, dass die FS-tragenden Arabinofuranose-Einheiten stets in O-3-Stellung an die Xylopyranose-Einheiten des Xylanhauptstranges gebunden vorliegen, nicht aber in O-2-Stellung (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995), ist für die Betrachtung eines möglichen Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die Abbaubarkeit der pflanzlichen Zellwände insbesondere der Anteil der in O-3-Stellung verzweigten Xylose-Einheiten interessant.

Neben dem Arabinosesubstitutionsgrad des Xylanhauptstranges hat auch die Komplexität der Seitenketten vermeintlich einen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften und damit verbunden eventuell auch auf die Abbaubarkeit der GAX. In den untersuchten Maisrestpflanzen wurden neben der terminalen Arabinofuranose (T-Araf), die in O-1-Position glykosidisch an den Xylanstrang (in O-3 oder O-2-Position der Xylose) gebunden ist, auch geringe Anteile zusätzlich in O-2-Stellung glykosidisch verzweigter Arabinose-Einheiten (2-Araf) nachgewiesen. Diese stammen aus den Seitenketten der GAX. In den UBS von Maiskleie konnten bislang insbesondere 2→1-glykosidische Bindungen zu Xylopyranose-Einheiten nachgewiesen werden. Die am häufigsten nachgewiesene Verbindung ist die O-β-D-Xylopyranosyl-(1→2)-[5-O-(*trans*-feruloyl)-L-arabinofuranose] (FAX) (SAULNIER et al., 1995, WENDE & FRY, 1997, BUNZEL, 2001). Aber auch komplexere Seitenketten, die zusätzlich Galactopyranose-Einheiten sowie weitere Xylopyranose-Einheiten (z.B. 2-Xylp) enthielten, wurden in UBS aus Maiskleie nachgewiesen werden (ALLERDINGS et al., 2006). Der Nachweis von T-Galp-Einheiten in den Probenchromatogrammen dieser Arbeit deutet auf das Vorhandensein von komplexeren Seitenketten hin. Wie aber bereits in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben, waren die Gehalte der T-Galp nicht mittels GC-FID bestimmbar. Die ebenfalls aus den Seitenketten stammenden T-Xylp- sowie 2-Xylp-Einheiten, waren nicht von den aus dem Xylanhauptstrang stammenden T-Xylp- bzw. 4-Xylp-Einheiten zu unterscheiden. 1→4 Glykosidisch verknüpfte Xylopyranose (4-Xylp) und 1→2 glykosidisch verknüpfte Xylopyranose (2-Xylp) ergeben PMAA-Derivate, die sich lediglich in ihrer Stereochemie nicht aber im Substitutions-

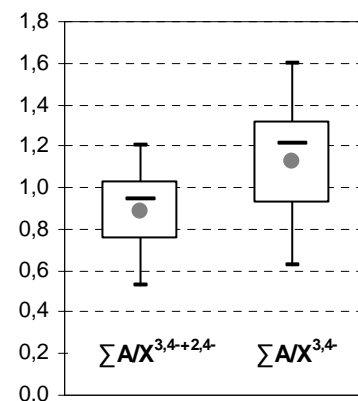


Abb. 3.6: Molare Verhältnisse der Summe der Arabinofuranose-Einheiten zur Summe der in O-2- und O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten ($\sum A/X^{3,4+2,4}$) sowie zu den in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten ($\sum A/X^{3,4}$) in den 0 h-Materialien

muster unterscheiden. Die entstehenden Massenfragmente können lediglich anhand der Deuterierung am C-1-Atom unterschieden werden. Da die PMAA zudem aber auch die gleiche Retentionszeit im GC besitzen, kann anhand der Probenchromatogrammen nicht differenziert werden, ob neben dem dominierenden Anteil an 4-Xylp auch 2-Xylp-Einheiten enthalten sind. Anhand des nur geringen Anteils der 2-Araf-Einheiten an der Gesamt-Arabinose, der im Durchschnitt 15 % betrug, wird jedoch deutlich, dass die Seitenketten in den GAX der Maisrestpflanze überwiegend monomerer Natur, d.h. wenig komplex sind.

Die in der Literatur beschriebenen Studien zur Strukturcharakterisierung der Heteroxylyane beschränken sich meist auf die Untersuchung von Ballaststoffen aus Getreidekaryopsen (IZYDORCZYK & BILIADERIS, 1995, GLITSØ et al., 1999, GLITSØ et al., 2000) oder die primären Zellwände von drei Tage alten Keimlingen der Maispflanze (CARPITA et al., 2001) und sind daher mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur schwer zu vergleichen. Detaillierte Untersuchungen zur Struktur von (Glucurono)-Arabinoxylanen aus den vegetativen Pflanzenteilen von voll ausgebildeten (reifen) Gräsern, die als Futtermittel eingesetzt werden, wurden bislang allerdings nicht beschrieben.

3.1.4 Charakterisierung zellwandgebundener Phenolcarbonsäuren

3.1.4.1 Identifizierung und Quantifizierung estergebundener, monomerer Phenolcarbonsäuren

Nach alkalischer Hydrolyse mit 2 M NaOH (18 h, RT) und der anschließenden Flüssig-Flüssig-Extraktion der freigesetzten PCS aus dem angesäuerten Hydrolysat (pH < 2) mit Diethylether erfolgte deren Identifizierung und Quantifizierung mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-UV Methode (siehe hierzu Abschnitt 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Es konnten neben den dominierenden *trans*-Isomeren der *p*CS und FS geringe Mengen der entsprechenden *cis*-Isomere sowie der entsprechenden, wahrscheinlich bei der Hydrolyse gebildeten Aldehyde HBA und VN nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung wurden die Gehalte der *trans*- und *cis*-Isomere jeweils addiert. Abb. 3.7 zeigt die ermittelten Gehalte der estergebundenen FS und *p*CS in den AM sowie in den 0 h-Materialien der untersuchten Sorten, Erntezeitpunkte und Anbaujahre. Wie in Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben, erfolgt auch hier die Darstellung der Ergebnisse der AM einmal für alle sechs untersuchten Sorten sowie zur Vergleichbarkeit mit dem 0 h-Material nur für die drei Sorten DK 233, DKc 2949 und DK 247. Gehalte der einzelnen Untersuchungsmaterialien sind im Anhang 5.4 in Tab. 5.15 aufgeführt.

*p*CS konnte als dominierende PCS in der Maisrestpflanze bestätigt werden. Die Gehalte in den 0 h-Materialien variierten zwischen 1,55 und 2,23 % TS, der mittlere Gehalt betrug 1,93 % TS. Die Gehalte der FS in den 0 h-Materialien lagen zwischen 0,54 und 0,92 % TS, mit einem mittleren Gehalt von 0,66 % TS. Vergleichbare Gehalte wurden auch in anderen Studien an

Maisrestpflanzen zum Zeitpunkt der Siloreife beschrieben (MORRISON et al., 1998, MÉCHIN et al., 2000, JUNG, 2003, MÉCHIN et al., 2005, JUNG & CASLER, 2006b).

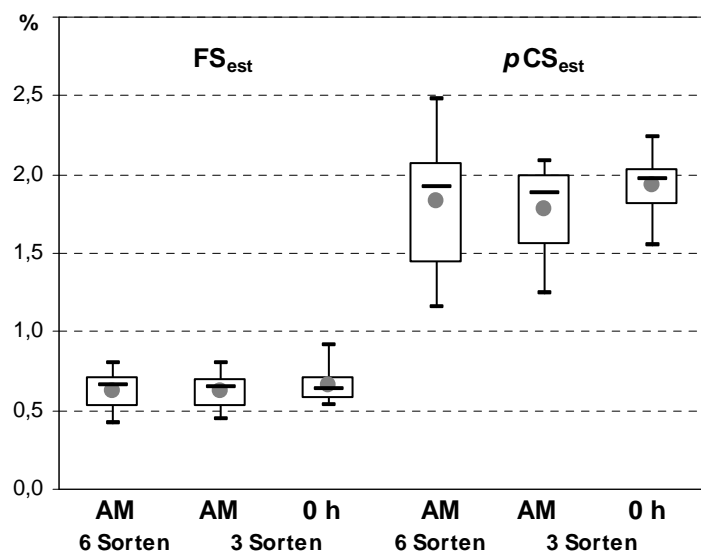


Abb. 3.7: Gehalte estergebundener Ferulasäure (FS_{est}) und p-Cumarsäure (pCS_{est}) in den Ausgangs- und 0 h-Materialien (% Trockensubstanz)

Sornte, für die auch die 0 h-Materialien untersucht wurden, macht deutlich, dass für diesen Parameter deutliche sortenspezifische Unterschiede nachweisbar waren, die in Abschnitt 3.2.2 näher betrachtet werden.

Wie in Abschnitt 3.1.1 ausführlich beschrieben, stellen die AM die direkt getrockneten und vermahlenden Restpflanzen dar, während die 0 h-Materialien den wasserunlöslichen Rückständen entsprechen. Während dieser Auswaschung gehen durchschnittlich 30,9 % der Trockensubstanz der Rohmaterialien verloren. Da in dieser Arbeit nur die zellwandgebundenen PCS untersucht werden sollten, wäre eine Anreicherung in den 0 h-Materialien zu erwarten gewesen. Anhand der Ergebnisse ist somit anzunehmen, dass in den AM ein beachtlicher Teil an freien PCS, bzw. löslichen konjugierten PCS enthalten ist, aufgrund derer die ermittelten Gehalte ähnlich hoch sind wie in den 0 h-Materialien. Wie bereits für die Bestimmung der Zellwandpolysaccharide beschrieben, ist somit auch hier festzustellen, dass die AM zur Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten nicht geeignet sind.

An Zellwandpolysaccharide estergebundene FS kann auf vielfältige Weise Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren ausbilden (siehe hierzu auch 1.1.2.3). Über die Dimerisierung oder auch Oligomerisierung der FS können zwei oder eventuell auch mehr als zwei Polysaccharidstränge miteinander verknüpft werden. In Maiszellsuspensionen konnte gezeigt werden, dass über 50 % der zellwandgebundenen FS radikalisch dimerisieren können. Die Bildung photochemisch gekoppelter Cyclobutandimere scheint gemäß Literatur dagegen von geringerer Bedeutung zu sein. Darüber hinaus können insgesamt bis zu 90 % der FS und DFS über verschiedene Ether-

Im Gegensatz zur Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte (siehe Abschnitt 3.1.3.1) waren zwischen den mittleren Gehalten von FS und pCS nur geringe Unterschiede in den unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien, AM und 0 h-Materialien, festzustellen. Allerdings wird anhand der dargestellten Boxplots, insbesondere der estergebundenen pCS, deutlich, dass die Gehalte in den AM deutlich größere Schwankungen aufweisen. Der Vergleich zwischen den pCS-Gehalten in den AM aller sechs untersuchten Sorten und der drei

und C-C-Bindungen mit Ligninen verknüpft sein (RALPH et al., 1994b, GRABBER et al., 1995, GRABBER et al., 2000, GRABBER et al., 2004). Die mit dieser Methode ermittelten FS-Gehalte spiegeln somit lediglich den Teil der FS wieder, der nicht in Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren involviert ist. Während die entstehenden, estergebundenen DFS ebenfalls durch die beschriebene alkalische Hydrolyse freigesetzt werden und damit analytisch bestimmt werden können (siehe hierzu Abschnitt 3.1.4.2), können lediglich die 4-O- β '- und die 4-O- α '-Etherbindungen zum Lignin im Rahmen einer alkalische Druckhydrolyse gespalten werden (Abschnitt 3.1.4.3). GRABBER et al. (2000) konnten zeigen, dass auf diese Weise lediglich 25 bis 65 % der gesamten FS-Isomere von Maiszellwänden freigesetzt werden. C-C-Bindungen sowie β -O-4'-Styryl- und Biphenylether können hingegen mit den derzeitigen analytischen Methoden nicht freigesetzt werden. Einige dieser Strukturen konnten mit NMR-Methoden in synthetischen und aus Gräsern isolierten Ligninen nachgewiesen werden (RALPH et al., 1992b, RALPH et al., 1995, QUIDEAU & RALPH, 1997). Es ist somit davon auszugehen, dass die ermittelten Gehalte der FS und DFS in der Regel deutlich unterschätzt werden.

*p*CS ist in der pflanzlichen Zellwand überwiegend an die γ -Position der Syringyl-Einheiten des Lignins estergebunden und scheint vor allem die Oxidation des Sinapylalkohols und damit dessen Einbau in das Ligninpolymer zu beschleunigen (HATFIELD et al., 2008). Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren über radikalische Kopplungsreaktionen der *p*CS konnten bislang *in planta* nicht nachgewiesen werden und gelten aufgrund der nachgewiesenen Radikal-Transfer-Reaktionen als unwahrscheinlich (RALPH et al., 1994a). Es ist daher im Gegensatz zur FS und deren Di- bzw. Oligomeren davon auszugehen, dass die ermittelten Gehalte den tatsächlichen in der Zellwand vorliegenden Gehalten entsprechen (GRABBER et al., 2004).

3.1.4.2 Identifizierung und Quantifizierung estergebundener Dehydrodiferulasäuren

Die Identifizierung und Quantifizierung der DFS erfolgten mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD Methode. Es konnten in den untersuchten Maisrestpflanzenmaterialien mit Ausnahme der 4-O-5'-DFS, die bislang nur in Spuren in den UBS verschiedener Getreide identifiziert werden konnte, sämtliche in der Literatur beschriebenen DFS-Isomere nachgewiesen werden. In den bislang veröffentlichten Studien zur Bestimmung von DFS in Maisrestpflanzen bzw. Futtermitteln im Allgemeinen wurden je nach verwendeter Methode zum Teil nur wenige Isomere bestimmt. MARITA et al. (2003) ebenso wie ABEDON et al. (2006) bestimmten DFS in genetisch veränderten Maispflanzen bzw. -blättern und den entsprechenden Wildtypen mittels GC-FID-Methoden, die auf der von RALPH et al. (1994) beschriebenen Methode beruhen. Sie quantifizierten mit Ausnahme der 8-8'(THF)-DFS ebenfalls alle in dieser Arbeit bestimmten DFS. Vergleichbare Studien, die auf HPLC-Methoden beruhen, existieren bislang allerdings nicht. SANTIAGO et al. (2006, 2007) identifizierten und quantifizierten mittels HPLC-DAD nach 4 h alkalischer Hydrolyse (2 M NaOH, RT) drei der insgesamt 9 DFS-Isomere, die 8-5'nc-, 8-5'c- und

die 8-O-4'-DFS, sowie kürzlich als viertes Isomer auch die 5-5'-DFS (SANTIAGO et al., 2008). RIBOULET et al. (2008) bestimmten lediglich 2 DFS-Isomere, die 5-5'- und die 8-O-4'-DFS, aus Maisrestpflanzen zur Siloreife nach 20 h alkalischer Hydrolyse (1 M NaOH, 25 °C) mittels GC-FID und NIRS (near infrared spectroscopy). 8-8'-Gekoppelte DFS wurden in keiner dieser Studien beschrieben. Unabhängig von den verwendeten Quantifizierungsmethoden sind die ermittelten Gehalte der DFS in den genannten HPLC-Methoden somit allein aufgrund der Bestimmung nur weniger Isomere als deutlich zu niedrig anzusehen.

Während für die drei bekannten Formen der 8-8'-gekoppelten DFS (8-8'-c-, 8-8'-nc- und 8-8'(THF)-DFS) bislang nicht eindeutig geklärt wurde, welche Isomere die native Form in der Pflanze darstellen, wird für die drei Isomere der 8-5'-gekoppelten DFS davon ausgegangen, dass lediglich die 8-5'-c-DFS die native Form in der Pflanze ist. Die 8-5'-nc- sowie 8-5'-dc-DFS werden hingegen erst bei der alkalischen Hydrolyse aus der cyclischen Form gebildet (RALPH et al., 1994b, BUNZEL et al., 2001). Da das Verhältnis der einzelnen 8-5'-gekoppelten Isomere zueinander z.T. von den Reaktionsbedingungen abhängig ist, sind für die Betrachtung der prozentualen Verhältnisse der unterschiedlichen Kopplungsreaktionen, die in Abb. 3.8 dargestellt sind, nur die Summen der 8-5'-gekoppelten DFS interessant. Da die Vorläufer der 8-8'-gekoppelten DFS noch nicht geklärt sind, sollten auch diese Werte addiert und gemeinsam behandelt werden.

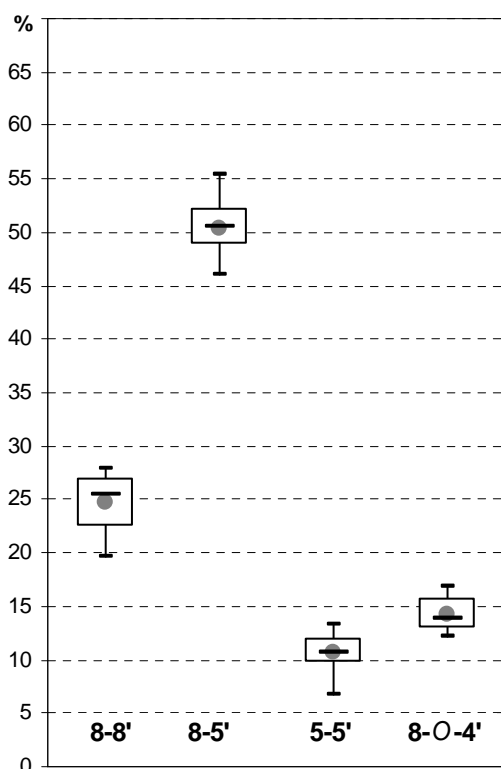


Abb. 3.8: Prozentuale Zusammensetzung der unterschiedlich verknüpften Ferulasäuredimere in den 0 h-Materialien

Die 8-5'-gekoppelten DFS machen mit einem mittleren Anteil von 50,4 % den mit Abstand größten Anteil der DFS in der Maisrestpflanze aus, gefolgt von der Summe der 8-8'-gekoppelten DFS, deren mittlerer Anteil 24,8 % betrug, sowie der 8-O-4'- und der 5-5'-DFS mit 14,2 % bzw. 10,7 % relativem Anteil. Ein exakter Vergleich der ermittelten prozentualen Zusammensetzung mit Literaturdaten ist aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Analysemethoden sowie der unterschiedlichen Quantifizierung im Allgemeinen schwierig. Dabei konnte im Rahmen der Methodenentwicklung dieser Arbeit (siehe 2.2.2.3.1) die Wichtigkeit spezifischer Korrekturfaktoren der einzelnen DFS-Isomere für eine möglichst korrekte Quantifizierung bestätigt werden (RALPH et al., 1994b, BUNZEL et al., 2001, BARBEROUSSE et al., 2008b). In

Abschnitt 2.2.3.1 wurde die Vergleichbarkeit der mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode für verschiedene Getreideballaststoffe ermittelten DFS-Zusammensetzungen mit den von BUNZEL et al.

der 8-8'-gekoppelten DFS sind dabei vor allem darauf zurückzuführen, dass in der in dieser Arbeit entwickelten Methode erstmals auch die kürzlich beschriebene 8-8'(THF)-DFS (SCHATZ et al., 2006) integriert war. Im Vergleich zur relativen Zusammensetzung der DFS in den UBS von Maiskleie (8-8'-DFS 21,1 %, 8-5'-DFS 42,5 %, 8-O-4'-DFS 19,2 %, 5-5'-DFS 17,3 %, siehe 2.2.3.1) wurden in den Maisrestpflanzen höhere Anteile den 8-8'- und 8-5'-gekoppelten DFS nachgewiesen. Insgesamt war die prozentuale Zusammensetzung aber vergleichbar.

Abb. 3.9 zeigt zusammengefasst die ermittelten DFS-Gehalte in den AM und 0 h-Materialien. Eine detaillierte Auflistung der Gehalte der einzelnen DFS ist Tab. 5.16 im Anhang 5.4 zu entnehmen. Der Vergleich der DFS-Gehalte zwischen den Untersuchungsmaterialien (AM und 0 h, je 3 Sorten) zeigt die aufgrund der Auswaschung wasserlöslicher Inhaltsstoffe erwartete Anreicherung. Es wurde bereits im Rahmen der Methodenentwicklung (Abschnitt 2.2.3.1) beschrieben, dass bei der Bestimmung aus nicht aufgereinigten, ligninreichen Probenmaterialien, wie den AM, nicht unerhebliche Störungen sowohl bei der Identifizierung als auch bei der Quantifizierung der DFS auftraten. Die AM sind demnach nicht geeignet, die Gehalte estergebundener DFS in den Zellwänden korrekt wiederzuspiegeln. Der etwas größere Schwankungsbereich der ermittelten DFS-Gehalte in den AM aller sechs untersuchten Sorten deutet wiederum auf mögliche sortenspezifische Unterschiede hin (siehe hierzu Abschnitt 3.2.2).

Der DFS-Gehalt der untersuchten Maisrestpflanzen (0 h-Materialien) war mit durchschnittlich 1,9 mg/g TS sieben- bis achtfach niedriger als der in den UBS von Maiskleie bestimmte Gehalt von 14,0 mg/g. Die bislang in der Literatur beschriebenen Studien, in denen DFS in den vegetativen Teilen von Mais quantifiziert wurden, sind sowohl aufgrund der methodischen Unterschiede als auch aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien nur bedingt mit den in dieser Arbeit ermittelten Gehalten vergleichbar. Die von RIBOULET et al. (2008) sowie von SANTIAGO et al. (2006, 2007, 2008) mittels HPLC bestimmten DFS-Gehalte von 0,5 - 0,6 mg/g NDF bzw. 0,1 - 0,3 mg/g TS sind allein aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der erfassten DFS-Isomere kaum mit denen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. ABEDON et al. (2006) bestimmten in den Blättern genetisch veränderter Maispflanzen DFS-Gehalte (estergebunden) zwischen 2,04 und 3,38 mg/g Zellwand. Die Gehalte waren somit höher als in dieser Arbeit. Allerdings zeigten auch die dort ermittelten Gehalte der ester- und ethergebundenen monomeren PCS starke Abweichungen zu den in dieser Arbeit ermittelten Werten. So waren z.B. die Gehalte der estergebundenen FS höher als die Gehalte der *p*CS und der ethergebundenen FS. Es ist daher davon auszugehen, dass die in der genannten Arbeit untersuchten Maisblätter aufgrund der genetischen Veränderung eine deutlich abweichende

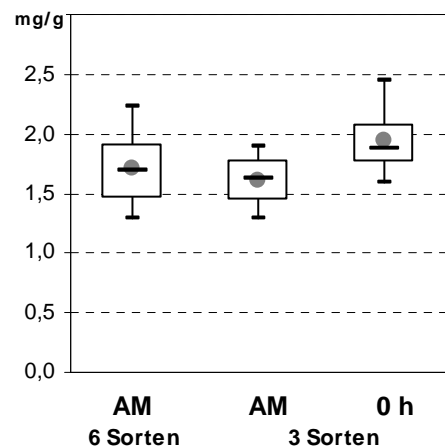


Abb. 3.9: Diferulasäuregehalte in den Ausgangs- (AM) und 0 h-Materialien (mg/g Trockensubstanz)

Zellwandzusammensetzung aufweisen und die Ergebnisse somit wiederum nicht mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird zudem durch die unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien eingeschränkt, da in der genannten Studie, wie beschrieben, nur die Maisblätter nicht aber die gesamte Maisrestpflanze eingesetzt wurden. Lediglich in der von MARITA et al. (2003) veröffentlichten Studie an verschiedenen brown midrib Mutanten sowie dem entsprechenden Wildtyp konnten für den Wildtyp vergleichbare DFS-Gehalte von 1,85 mg/g Zellwand ermittelt werden.

Neben den absoluten Gehalten der DFS ist für die Beurteilung sorten- und reifespezifischer Einflüsse (siehe Abschnitt 3.2) sowie insbesondere für die Beurteilung des Einflusses auf die ruminale Abbaubarkeit (siehe Abschnitt 3.3) der Dimerisierungsgrad der zellwandgebundenen FS von Interesse. Zur Abschätzung des Dimerisierungsgrades der zellwandgebundenen FS können verschiedene Faktoren gebildet werden. Ein einfacher Faktor ist die Berechnung des Anteils der DFS an der Summe der insgesamt bestimmten estergebundenen FS ($\frac{\sum \text{DFS} (\%)}{(\text{FS}_{\text{est}} (\%) + \sum \text{DFS} (\%))} \times 100$). Es muss allerdings bei der Betrachtung dieses Faktors berücksichtigt werden, dass sich dieser ausschließlich auf die estergebundenen monomeren und dimeren FS bezieht. Die durch Reaktion mit Monolignolen in die Lignifizierung mit einbezogenen FS/DFS werden bei der Betrachtung dieses Faktors hingegen nicht berücksichtigt, so dass die Aussagekraft des beschriebenen Faktors begrenzt ist.

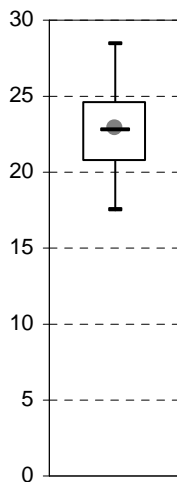


Abb. 3.10: Dimerisierungsgrad der estergebundenen Feruläure in den 0 h-Materialien

Wie in Abb. 3.10 für die untersuchten 0 h-Materialien dargestellt, betrug der genannte Faktor, der dem ungefähren prozentualen Anteil der DFS an der Gesamt-FS entspricht, im Durchschnitt 23,0. Anhand der Whisker wird zudem deutlich, dass zwischen den verschiedenen untersuchten Proben zum Teil große Unterschiede im Dimerisierungsgrad bestehen (Minimum: 17,6, Maximum: 28,4). Der Schwankungsbereich zwischen oberem und unterem Quartil, der 50 % der Werte entspricht, lag zwischen 20,6 und 24,6. Inwieweit diese Unterschiede sorten- und/oder reifespezifisch sind und in beiden Anbaujahren wiedergefunden werden konnten, wird in Abschnitt 3.2 näher betrachtet. Ein möglicher Zusammenhang des Dimerisierungsgrades zur ruminale Abbaubarkeit wird in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Wie bereits für die ermittelten absoluten Gehalte der DFS beschrieben, waren nur die Ergebnisse von MARITA et al. (2003) mit denen dieser Arbeit vergleichbar. Aus der beschriebenen Untersuchung lässt sich der genannte Faktor vergleichsweise berechnen. Er betrug für den untersuchten Mais-Wildtyp 29,3 und lag somit noch oberhalb des in dieser Arbeit ermittelten Maximalwerts (28,4). Für UBS aus Maiskleie wurde ein noch deutlich höherer FS-Dimerisierungsgrad von 33,7 beschrieben (BUNZEL, 2001).

3.1.4.3 Identifizierung und Quantifizierung ethergebundener, monomerer Phenolcarbonsäuren

Die Bestimmung der ethergebundenen monomeren Phenolcarbonsäuren erfolgte nach alkalischer Druckhydrolyse (4 M NaOH, 170°C, 2 h) und anschließender Etherextraktion mit HPLC-UV (siehe 2.2.3.3). Da durch die alkalische Druckhydrolyse sowohl die ester- als auch die ethergebundenen PCS freigesetzt und in Summe quantifiziert werden, berechnet sich der Gehalt der ethergebundenen PCS als Differenz aus den Gesamtgehalten und den Gehalten der estergebundenen PCS (siehe 3.1.4.1). Während ethergebundene FS in allen Untersuchungsmaterialien in deutlichen Mengen nachgewiesen werden konnte, waren die Gehalte ethergebundener *p*CS gering. Vergleichbares wurde z.B. auch von MORRISON et al. (1998) beschrieben. Wie bereits in Abschnitt 3.1.4.1 erläutert, sind radikalisch gebildete Cross-Links der *p*CS im Gegensatz zur FS bislang *in planta* nicht beschrieben und gelten darüber hinaus als unwahrscheinlich (RALPH et al., 1994a, GRABBER et al., 2004). Das Auftreten größerer Mengen ethergebundener *p*CS ist somit nicht zu erwarten gewesen und hätte vielmehr darauf hingedeutet, dass aufgrund einer unzureichenden Hydrolyse zu niedrige Gehalte estergebundener *p*CS bestimmt wurden.

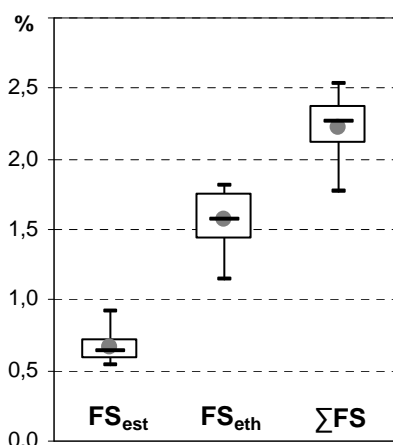


Abb. 3.11: Gehalte der ester- (FS_{est}) und ethergebundener Ferulasäure (FS_{eth}) sowie deren Summe (ΣFS) in den 0 h-Materialien (% Trockensubstanz)

Die ermittelten Gehalte der ester- und ethergebundenen FS sowie der Summe der freigesetzten FS in den 0 h-Materialien sind in Abb. 3.11 zusammengefasst dargestellt. Die ermittelten Gehalte der einzelnen Probenmaterialien sind Tab. 5.15 im Anhang 5.4 zu entnehmen. Da bereits für die Bestimmung der estergebundenen PCS festgestellt wurde, dass die untersuchten AM nicht zur Charakterisierung der zellwandgebundenen PCS geeignet waren, wird an dieser Stelle auf eine Darstellung der ermittelten Gehalte ethergebundener FS in den AM verzichtet. Erwähnt sei nur, dass die Chromatogramme der AM analog zur Bestimmung der estergebundenen PCS deutlich mehr Störungen als die 0 h-Materialien aufwiesen (siehe hierzu auch 3.1.4.1). Die untersuchten 0 h-Materialien enthielten durchschnittlich 1,6 % TS ethergebundene FS gegenüber 0,7 % TS estergebundener FS, was einem prozentualen Anteil der ethergebundenen FS von durchschnittlich 70 % der gesamten monomeren FS entsprach. Die Ergebnisse für den entsprechenden Faktor $\frac{FS_{eth}(\%)}{(FS_{eth}(\%) + FS_{est}(\%))} \cdot 100$ sind in Abb. 3.12 für die 0 h-Materialien zusammengefasst in einem Boxplot dargestellt. Anhand der dargestellten Whisker fällt auf, dass einige Sorten einen deutlich niedrigeren Anteil ethergebundener FS aufweisen. Inwieweit dies sorten- und/oder reife-spezifisch ist und mit der Abbaubarkeit korreliert, wird wiederum in den Abschnitten 3.2 und 3.3

Die untersuchten 0 h-Materialien enthielten durchschnittlich 1,6 % TS ethergebundene FS gegenüber 0,7 % TS estergebundener FS, was einem prozentualen Anteil der ethergebundenen FS von durchschnittlich 70 % der gesamten monomeren FS entsprach. Die Ergebnisse für den entsprechenden Faktor $\frac{FS_{eth}(\%)}{(FS_{eth}(\%) + FS_{est}(\%))} \cdot 100$ sind in Abb. 3.12 für die 0 h-Materialien zusammengefasst in einem Boxplot dargestellt. Anhand der dargestellten Whisker fällt auf, dass einige Sorten einen deutlich niedrigeren Anteil ethergebundener FS aufweisen. Inwieweit dies sorten- und/oder reife-spezifisch ist und mit der Abbaubarkeit korreliert, wird wiederum in den Abschnitten 3.2 und 3.3

näher betrachtet. Allerdings ist auch hier auf die begrenzte Aussagekraft des Faktors hinzuweisen, da die mit dieser Methode gespaltenen Etherbindungen nur einen Teil der Verknüpfungen zum Lignin widerspiegeln.

Im Vergleich zu anderen Studien an siloreifen Maisrestpflanzen, die meist in etwa gleiche Anteile ester- und ethergebundener FS beschrieben (JUNG &

BUXTON, 1994, MORRISON et al., 1998, JUNG & CASLER, 2006a), waren die in dieser Arbeit nachgewiesenen Gehalte ethergebundener FS generell deutlich höher. Inwieweit dies auf methodische Unterschiede oder auf Sortenunterschiede zurückzuführen ist, kann nicht abschließend beurteilt werden. Alle drei genannten Studien verwendeten ebenfalls eine alkalische Druckhydrolyse mit 4 M NaOH, wobei Temperatur (160 - 170 °C) und Dauer der Hydrolyse (1 - 3 h) zum Teil aber unterschiedlich waren.

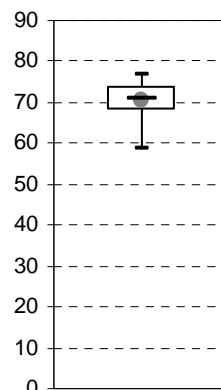


Abb. 3.12: Anteil der ethergebundenen Ferulasäure (FS) an der gesamten, monomeren Ferulasäure in den 0 h-Materialien

3.1.4.4 Ferulasäure-Substitutionsgrad der Glucuronoarabinoxylane

Wie bereits bei der Charakterisierung der Zellwandpolysaccharidstrukturen der Maisrestpflanzen in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben wurde, werden die physikochemischen Eigenschaften der GAX in gewissem Maße durch den Grad der Verzweigung des Xylanhauptstranges sowie durch die Komplexität der Seitenketten beeinflusst. Wesentlich bedeutender, insbesondere in Bezug auf die Abbaubarkeit der Zellwandpolysaccharide, ist allerdings der Substitutionsgrad der Heteroxylane mit FS, der Dimerisierungsgrad der gebundenen FS (siehe 3.1.4.2) sowie das Ausmaß der Verknüpfung der polysaccharidgebundenen FS zu Lignin (siehe 3.1.4.3). Da die GAX-Gehalte in den Untersuchungsmaterialien variieren können, sind die absoluten Gehalte an monomeren und dimeren FS wenig aussagekräftig. Aus diesem Grund sollen im Folgenden die ermittelten FS- und DFS-Gehalte auf den GAX-Gehalt bezogen werden.

FS ist über die Arabinosesubstituenten an den Xylanhauptstrang gebunden. Da das makromolekulare Verhalten der GAX aber hauptsächlich auf der linearen Hauptkette beruht, sollten die ermittelten Gehalte der FS und DFS auf den Xylose-Gehalt und nicht auf den Arabinosegehalt bezogen werden (BUNZEL, 2001). So ist es z.B. vorstellbar, dass ein lineares GAX mit nur wenigen Seitenketten das gleiche Ausmaß an DFS-Cross-Links besitzt wie ein stark mit Arabinoseseitenketten substituiertes GAX, was durch das Verhältnis $DFS/Arabinose$ allerdings nicht erkannt werden würde. Abb. 3.13 zeigt zur Übersicht die molaren Quotienten FS_{est}/Xyl (A), $(FS_{est}+2x\sum DFS)/Xyl$ (B), DFS/Xyl (C) und FS_{eth}/Xyl (D) in den in beiden Anbaujahren untersuchten 0 h-Materialien. Dabei stellt der Faktor $(FS_{est}+2x\sum DFS)/Xyl$ das Verhältnis der (hypothetischen) gesamten estergebundenen FS vor der Dimerisierung dar. Für diesen Faktor ebenso wie für den Quotienten der ethergebundenen FS zum molaren Xylose-Gehalt FS_{eth}/Xyl

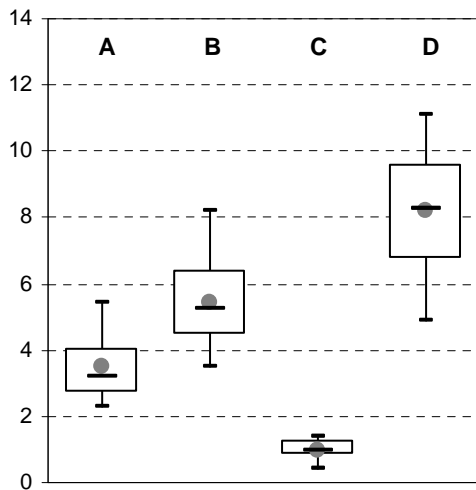


Abb. 3.13: Molare Verhältnisse der ester- und ethergebundenen Ferulasäure (FS) sowie der Diferulasäuren (DFS) zu den Xylose-Gehalten (Xyl) in den 0 h-Materialien (A = $FS_{est}/Xyl \cdot 100$, B = $(FS_{est} + 2x DFS)/Xyl \cdot 100$, C = $DFS/Xyl \cdot 100$, D = $FS_{eth}/Xyl \cdot 100$)

(D)) wurden die größten Schwankungen zwischen den hier zusammengefasst dargestellten Untersuchungsmaterialien festgestellt. Inwieweit diese auf signifikante Unterschiede zwischen den Sorten und/oder Erntezeitpunkten in beiden Anbaujahren zurückzuführen waren und mit der ruminalen Abbaubarkeit kor-

relierten, soll in den Abschnitten 3.2 und 3.3 mittels verschiedener statistischer Experimente untersucht werden.

3.1.4.5 Präparative Isolierung und Identifizierung von estergebundenen Dehydrotriferulasäuren

Die bisher bekannten TFS und auch TetraFS wurden bislang ausschließlich aus Getreidekleien, vorrangig aus Maiskleie, isoliert und identifiziert. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, inwiefern bekannte und gegebenenfalls neue Oligomere auch in den vegetativen Pflanzenteilen von Mais nachzuweisen sind.

3.1.4.5.1 Vorfraktionierung der nach alkalischer Hydrolyse freigesetzten Phenolcarbonsäuren

Die präparative Isolierung der oligomeren Hydroxymitsäuren erfolgte unter Anpassung an die veränderte Probenmatrix in Anlehnung an die von BUNZEL et al. (2006) beschriebenen Methoden zur Isolierung von oligomeren Ferulasäurederivaten.

Aus insgesamt 284 g Maisrestpflanzen-Rohmaterial wurden nach verschiedenen Extraktionsschritten sowie nach teilweise enzymatischem Proteinabbau 165 g unlöslicher Pflanzenrückstand erhalten (siehe 2.2.3.4). Nach alkalischer Hydrolyse (2 M NaOH, RT, 18 h) und anschließender Etherextraktion wurden die daraus erhaltenen 4,4 g Hydrolysat zur GPC-Trennung an Bio-Beads SX-3 eingesetzt. Abb. 3.14 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm der Trennung. Während in der von BUNZEL et al. (2006) beschriebenen Arbeit nahezu eine Grundlinientrennung der Fraktionen mit Ausnahme der Fraktion B1 erhalten wurde, konnte in dieser Arbeit trotz nahezu identischer Chromatographiebedingungen keine vergleichbare Trennung erreicht werden. Dieses kann z.B. durch die veränderte Matrix erklärt werden. Wie schon bei der Bestimmung der DFS mittels HPLC-DAD festzustellen war, enthält die Maisrestpflanze eine Vielzahl anderer UV-aktiver Substanzen, wie z.B. Cyclobutanderivate der

FS und/oder *p*CS aber auch Hydrolyseprodukte des Lignins (siehe hierzu auch Abschnitte 2.2.3.1 und 3.1.4.2), die die Trennung stören können. Entsprechende Verbindungen können molekulare Massen aufweisen, die zwischen denen der verschiedenen PCS-Oligomere liegen. Diese Verbindungen können somit zwischen den Fraktionen der PCS-Mono- bzw. Oligomere eluieren und könnten so die beobachtete „kontinuierliche“ Elution erklären. Nach Trocknen der erhaltenen Fraktionen unter einem Stickstoffstrom wurden Bruttoausbeuten von 98,7 mg B 1 (eventuell Tetramere), 385,6 mg B 2 (vermutlich überwiegend Trimere), 874,8 mg B 3 (vermutlich überwiegend Dimere) sowie 1,15 g Monomere (B 4) erhalten.

Die erhaltenen Dimeren- und Trimeren-Fractionen (B 3 und B 2) wurden zur weiterführenden Auftrennung mittels Sephadex LH-20 Chromatographie eingesetzt. Dabei wurde die Trimeren-Fraktion in zwei Sephadex LH-20 Läufen vollständig aufgereinigt, während die Aufreinigung der Dimeren-Fraktion nur anteilig in einem Lauf erfolgte (siehe hierzu 3.1.4.6). Auf eine weiterführende Aufreinigung der Fraktion B 1, die eventuell TetraFS enthielt, wurde aufgrund der starken zu erwartenden Verunreinigungen verzichtet.

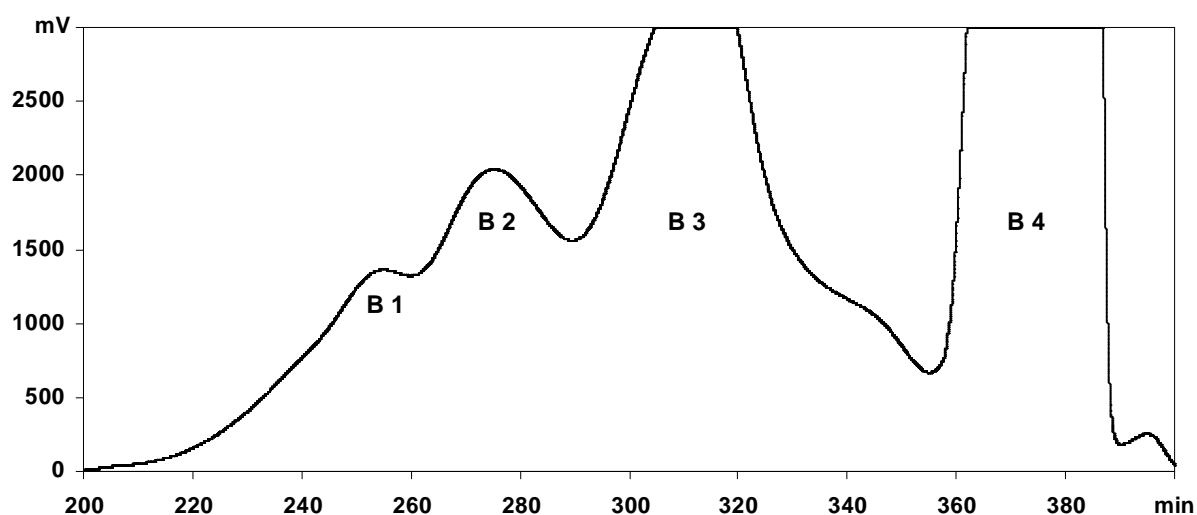


Abb. 3.14: Chromatogramm der GPC-Trennung an Bio-Beads SX-3 bei einer Detektionswellenlänge von 325 nm (B 1 = eventuell Tetramere, B 2 = überwiegend Trimere, B 3 = überwiegend Dimere, B 4 Monomere)

3.1.4.5.2 Weiterführende Fraktionierung der Trimeren-Fraktion B 2 aus der GPC an Bio-Beads SX-3 mittels Sephadex LH-20 Chromatographie

Die Elution der GPC-Fractionen erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, in drei Elutionsschritten mit unterschiedlichen Gemischen von MeOH und 0,5 mM wässriger TFA. Im ersten Elutionsschritt mit MeOH/0,5 mM TFA (5/95, v/v) eluieren erwartungsgemäß keine oligomeren Verbindungen, sondern überwiegend monomere FS und *p*CS, so dass auf eine Darstellung des Chromatogramms verzichtet wurde. Die Chromatogramme der beiden folgenden Elutionsschritte mit MeOH/0,5 mM TFA (50/50, v/v) bzw. MeOH/0,5 mM TFA (60/40, v/v) sind in

Abb. 3.15 dargestellt. Die Fraktionierung wurde, soweit es möglich war, in Anlehnung an die Isolierung der Standardsubstanzen aus den UBS von Maiskleie vorgenommen (BUNZEL et al., 2004a). Während die Chromatogramme des zweiten Elutionsschrittes nahezu identisch waren, dargestellt ist nur das Chromatogramme des ersten Sephadex LH-20 Laufes, ist anhand der beiden dargestellten Chromatogramme des jeweils dritten Elutionsschrittes zu erkennen, dass diese sich nicht vollständig entsprachen. Während die Fraktionen LH^{Tri}9-12 bezüglich ihrer Elutionszeiten miteinander vergleichbar waren, eluierte die Fraktion LH^{Tri}13 in dem zweiten Lauf deutlich früher. Warum es zu den festgestellten Unregelmäßigkeiten bei der Chromatographie kam, kann nicht abschließend geklärt werden. Für die Fraktion LH^{Tri}12 war zudem im Vergleich der beiden Chromatogramme ein deutlicher, relativer Intensitätsunterschied zu erkennen. Dieser ist eventuell auf eine nicht vollständige Lösung der in Fraktion LH^{Tri}12 enthaltenen Verbindungen zurückzuführen.

Wie bereits bei der GPC-Trennung an Bio-Beads SX-3 festzustellen war, konnte auch bei der Sephadex LH-20 Chromatographie keine zur Isolierung der Standardsubstanzen aus den UBS von Maiskleie (siehe 2.2.3.1) (BUNZEL et al., 2004a) vergleichbar gute Trennung erreicht werden. Anhand der dargestellten Chromatogramme, insbesondere des zweiten Elutionsschrittes (MeOH/0,5 mM TFA (50/50, v/v)), wird deutlich, dass in der Trimeren-GPC-Fraktion (B 2) eine Vielzahl von Verbindungen enthalten sind, die ein ähnliches chromatographisches Verhalten aufweisen, teilweise coeluiieren und überwiegend nicht ausreichend voneinander getrennt sind.

Nach einem Screening der erhaltenen Fraktionen mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD-Methode (siehe auch Abschnitt 2.2.3.1 bzw. 5.1.3.3) wurde aus dem zweiten Elutionsschritt lediglich die Fraktion LH^{Tri}7 zur weiteren Aufreinigung ausgewählt. Für die übrigen Fraktionen der Elution mit MeOH/0,5 mM TFA (50/50, v/v) konnten aus der analytischen HPLC keine Hinweise auf das Vorhandensein von trimeren Verbindungen erhalten werden. Die analytischen HPLC-Vorversuche der erhaltenen Sephadex LH-20 Fraktionen des jeweils dritten Elutionsschrittes (LH^{Tri}9-13) beider Läufe zeigten, dass diese trotz der unterschiedlichen Sephadex-Chromatogramme vereinigt und weiter fraktioniert werden konnten. Die Bruttoausbeuten der Fraktionen sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Übersicht der Bruttoausbeuten der aus der Trennung der Trimeren-GPC-Fraktion erhaltenen Sephadex LH-20 Fraktionen

Fraktion	LH ^{Tri} 7	LH ^{Tri} 9	LH ^{Tri} 10	LH ^{Tri} 11	LH ^{Tri} 12	LH ^{Tri} 13
Ausbeute (mg)¹	19,4	10,2	9,0	7,4	12,5	20,7

¹ Ausbeuten können noch Lösungsmittelreste enthalten, da die Trocknung nur unter N₂ erfolgte

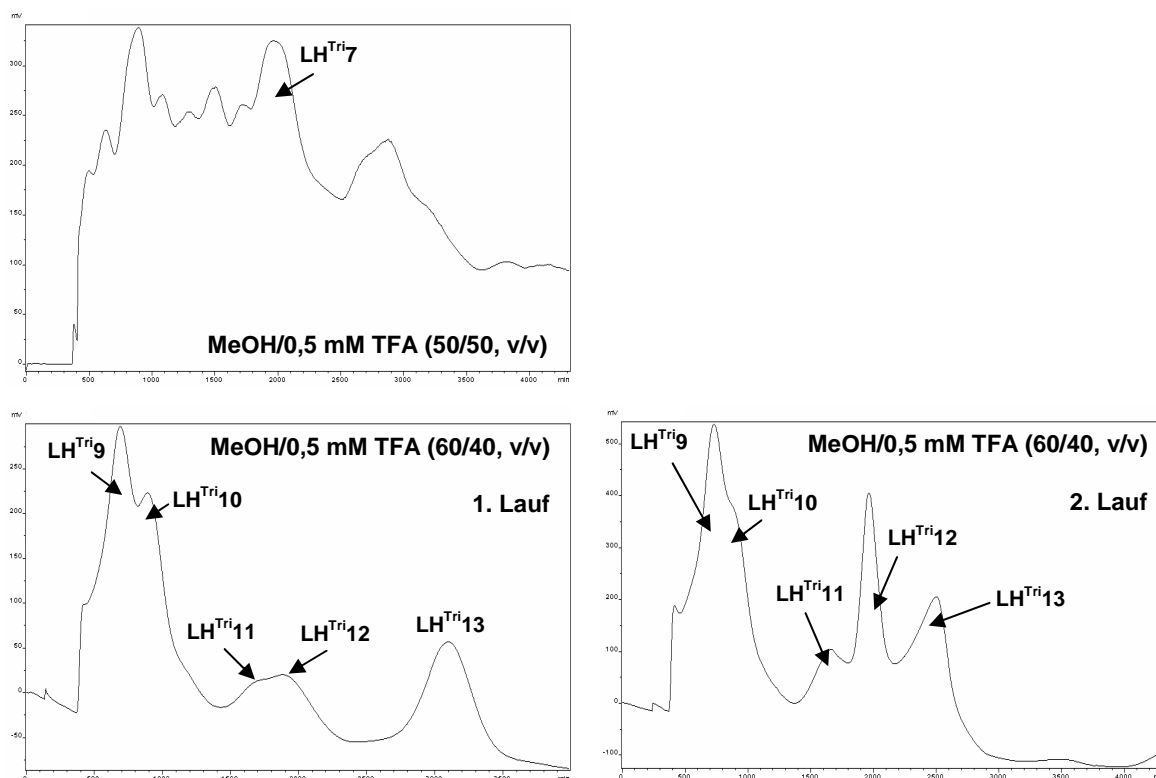


Abb. 3.15: Chromatogramme der Fraktionierung der Trimeren Fraktion B 2 an Sephadex LH-20; oben: Elutionsschritt II mit MeOH/0,5 mM TFA (50/50, v/v), unten: Elutionsschritt III mit MeOH/0,5 mM TFA (60/40, v/v)

3.1.4.5.3 Abschließende Isolierung und Strukturidentifizierung von Triferulasäuren aus den Trimeren-Sephadex LH-20-Fractionen LH^{Tri7} sowie LH^{Tri9} - LH^{Tri13}

Die abschließende semipräparative Aufreinigung der Trimeren-Fractionen erfolgte an einer Phenyl-Hexyl-Säule mit verschiedenen ternären Gradientensystemen (BUNZEL et al., 2006) bei einer Detektionswellenlänge von 325 nm. Die Chromatogramme der entsprechenden Trennungen sind in Abb. 3.16 dargestellt. Die Fraktionierung wurde manuell anhand der Chromatogramme vorgenommen. Zur Strukturcharakterisierung der in den gesammelten Fractionen enthaltenen Verbindungen wurden diese zunächst mittels HPLC-DAD-MS untersucht. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben, ist die Fragmentierung der Analyten bei der angewendeten Elektrospray-Ionisierung meistens gering. Über die entstehenden Molekülionen $(M-H)^-$ im negativen Modus sowie die Natrium- und Kalium-Addukte $(M+Na)^+$ und $(M+K)^+$, die im positiven Modus gebildet werden, kann aus den Massenspektren auf das Molekulargewicht der isolierten Verbindung geschlossen werden. Die Massenspektren sowie die UV-Spektren sind zur eindeutigen Identifizierung zwar nicht geeignet, sie können aber als zusätzliche Hinweise auf das Vorhandensein von TFS herangezogen werden. Die abschließende Strukturidentifizierung erfolgte mit verschiedenen NMR-Experimenten über den Vergleich mit Literaturdaten (BUNZEL et al., 2003a, 2005a, FUNK et al., 2005, BUNZEL et al., 2006).

Wie bereits bei der GPC-Trennung an Bio-Beads SX-3 und der Fraktionierung mittels Sephadex LH-20 Chromatographie zu beobachten war, traten auch bei der abschließenden Aufreinigung der Trimeren-Fraktionen mittels semipräparativer HPLC zum Teil nicht unerhebliche Störungen der Chromatographie durch unbekannte, ebenfalls UV-aktive Substanzen auf. Aufgrund der beschriebenen „kontinuierlichen“ Elution bei der GPC-Trennung ist es zudem nicht verwunderlich, dass in den aufgereinigten Trimeren-Fraktionen zum Teil größere Mengen an DFS nachweisbar waren (u.a. 8-5'nc-DFS aus LH^{Tri}7, 5-5'-DFS aus LH^{Tri}11). Anhand der in Abb. 3.16 dargestellten Chromatogramme wird, mit Ausnahme von Fraktion LH^{Tri}7, darüber hinaus deutlich, dass die erreichte chromatographische Trennung der Fraktionen nur von geringer Qualität war. Im Gegensatz zu der von BUNZEL et al. (2006) beschriebenen semipräparativen Aufreinigung, die an einem weitgehend identischen chromatographischen System durchgeführt wurde, waren die Trennungen in der vorliegenden Arbeit wesentlich verschlechtert und die Retentionszeiten deutlich verlängert. Versuche, durch Modifikationen des Gradientensystems und Austausch von Geräte- bzw. Säulenkomponenten (z.B. der Vorsäule) die Trennung zu optimieren, blieben ohne Erfolg. Die Reinheiten der isolierten Verbindungen waren dementsprechend mitunter relativ niedrig, was zum Teil zu Schwierigkeiten bei der Zuordnung der Signale in den NMR-Spektren führte.

Einige der isolierten Verbindungen wurden daher nochmals mittels analytischer HPLC aufgereinigt (Chromatogramme nicht dargestellt). Weitere Probleme der Strukturidentifizierung lagen in den häufig geringen Probenmengen sowie in der Löslichkeit einiger FS-Derivate in NMR geeigneten Lösungsmitteln begründet.

Isolierung und Identifizierung der 8-5'nc,8'-O-4''-TFS und der 8-8'c,8'-O-4''-TFS aus Fraktion LH^{Tri}7

Gemäß der in der Literatur beschriebenen Isolierung und Identifizierung von TFS aus den UBS von Maiskleie waren in der entsprechenden Sephadex LH-20 Fraktion LH^{Tri}7 insgesamt drei TFS, die 8-8'c,8'-O-4''-, 8-5'nc,8'-O-4''- sowie die 5-5',8'-O-4''(H₂O)-gekoppelte TFS, zu erwarten gewesen (BUNZEL et al., 2005a, FUNK et al., 2005). Aus der semipräparativen Aufreinigung der Fraktion LH^{Tri}7 wurden insgesamt fünf Peaks fraktioniert (Abb. 3.16). Während die erste Verbindung eindeutig als 8-5'nc-DFS identifiziert werden konnte, wiesen die Massenspektren der als zweites und drittes eluierenden Verbindungen mit Molekulargewichten von jeweils 578 g/mol auf TFS hin. Die ebenfalls fraktionierten Verbindungen X₁ und X₂ konnten nicht abschließend identifiziert werden.

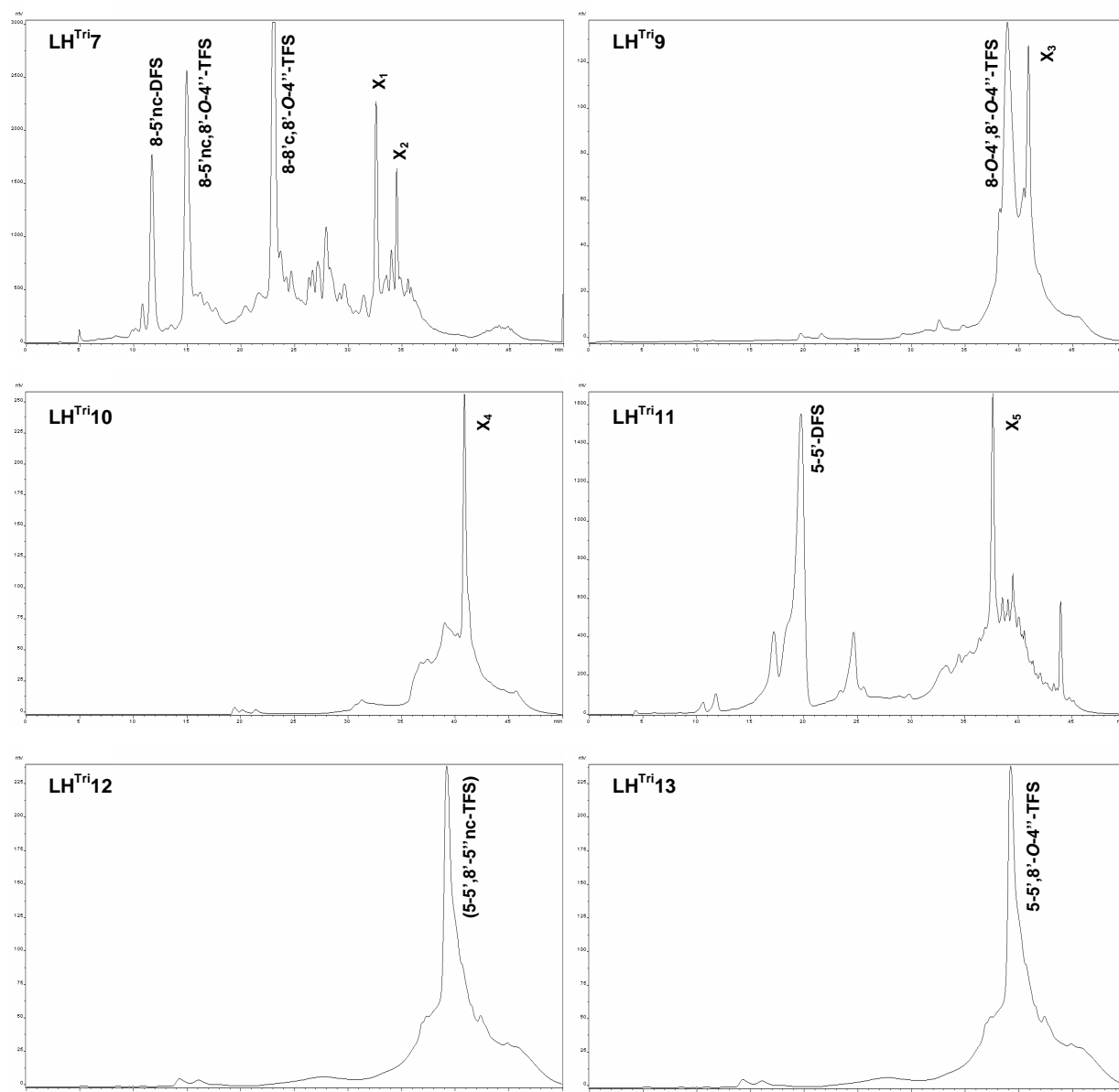


Abb. 3.16: Chromatogramme der abschließenden Fraktionierung/Aufreinigung der Sephadex LH-20 Trimeren-Fractionen mittels semipräparativer HPLC-UV (Detektionswellenlänge 325 nm)

Die zweite isolierte Verbindung (Retentionszeit: 15,4 min, Bruttoausbeute: 1,3 mg) konnte über den Vergleich der ermittelten ¹H-NMR-Daten mit den entsprechenden Referenzdaten (FUNK et al., 2005) eindeutig als 8-5'nc,8'-O-4''-TFS (Abb. 3.17) identifiziert werden. Das UV- und Massenspektrum (positiver Modus) stimmten ebenfalls mit den Literaturdaten überein (siehe Abb. 5.11 im Anhang 5.6). Das entsprechende ¹H-NMR-Spektrum ist im Anhang 5.6 in Abb. 5.18 zusammen mit den zugehörigen NMR-Daten (Tab. 5.22) dargestellt.

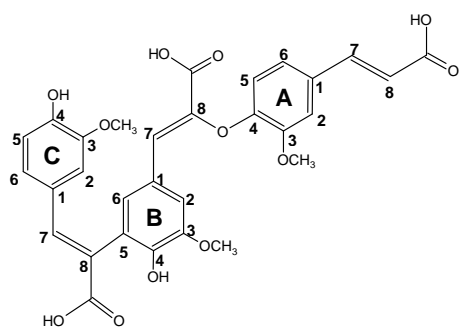


Abb. 3.17: Strukturformel der isolierten und identifizierten 8-5'nc,8'-O-4''-Dehydrotriferulasäure

was durch eine fehlende 8 Hz-Kopplung des Signals für das Proton in 6-Stellung deutlich wird.

Zur abschließenden Bestätigung der identifizierten 8-5'nc,8'-O-4''-TFS sollten die aus dem HMQC-Experiment bestimmten ^{13}C -Verschiebungen mit denen der Literatur verglichen werden (FUNK et al., 2005). Da das beschriebene ^1H -Spektrum, das an einem 500 MHz NMR-Gerät aufgenommen wurde, bereits nur sehr schwache Signale zeigte (number of scans: 256), wurde das HMQC-Experiment von Prof. John Ralph am U.S. Dairy Forage Research Center, USDA, Madison, USA an einem 750 MHz NMR-Spektrometer mit gekühltem Probenkopf (cryoprobe) gemessen. Sowohl durch die Messung bei einem höherfrequenten Feld und vor allem durch die cryoprobe-Technik wird die Empfindlichkeit der NMR-Messung deutlich gesteigert. Als Lösungsmittel wurde gemäß der Literaturangabe (FUNK et al., 2005) Aceton- d_6 gewählt. Überraschenderweise lieferten die erhaltenen ^1H - und HMQC-Spektren allerdings keinerlei verwertbaren Signale. Es ist vorstellbar, dass die Verbindung nicht vollständig gelöst war, wodurch die „effektiv messbare“ Probenmenge herabgesetzt wäre. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die nicht vollständig gelöste Verbindung beim Überführen in ein anderes Vial verloren wurde. Ähnliche Probleme waren in der Arbeitsgruppe bereits in vorherigen Arbeiten beobachtet worden.

Die dritte aus $\text{LH}^{\text{Tri}}7$ isolierte Verbindung (Retentionszeit: 23,6 min, Bruttoausbeute: 2,3 mg) konnte nach erneuter Aufreinigung mittels analytischer HPLC (Ausbeute 0,8 mg) über den Vergleich der ermittelten ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten mit den entsprechenden Referenzdaten (FUNK et al., 2005) eindeutig als 8-8'c,8'-O-4''-TFS (Abb. 3.18) identifiziert werden. Das UV-Spektrum sowie die Massenspektren im positiven und negativen Modus (Abb. 5.12 im Anhang 5.6) stimmten ebenfalls mit den Literaturdaten überein. Die entsprechenden NMR-Spektren des ^1H - sowie des HMQC-Experiments sind im Anhang 5.6 in Abb. 5.19 und Abb. 5.20 zusammen mit den zugehörigen NMR-Daten (Tab. 5.22) dargestellt.

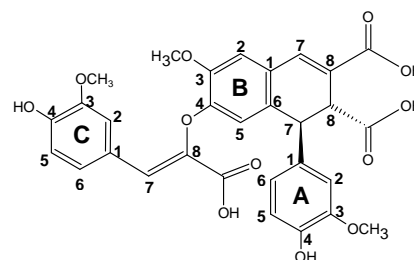


Abb. 3.18: Strukturformel der isolierten und identifizierten 8-8'c,8'-O-4''-Dehydrotriferulasäure

Charakteristisch sind unter anderem zwei Dubletts vom Dublett mit Kopplungskonstanten von ca. 8,0 und 2,0 Hz, die auf zwei vollständige aromatische FS-Systeme, mit Protonen an den 2-, 5- und 6-Positionen, hindeuten. Anhand des Fehlens von Protonensignalen mit einer Kopplungskonstante von 16 Hz ist zu erkennen, dass keine der FS-Seitenketten intakt ist. Die zwei Singulets bei 7.33 und 7.61 ppm in Verbindung mit den entsprechenden ^{13}C -Verschiebungen deuten zudem auf zwei 8-gebundene FS-Einheiten hin. Charakteristisch für die 8-8'-c-Kopplung sind darüber hinaus zwei Dubletts (Kopplungskonstante ca. 2 Hz) bei 4.58 bzw. 3.93 ppm (A7 und A8), die auf eine gesättigte Seitenkette hindeuten.

Identifizierung von 8-O-4',8'-O-4''-TFS aus Fraktion LH^{Tri}9

Die Fraktion LH^{Tri}9 wurde mittels semipräparativer HPLC in zwei Fraktionen (Retentionszeiten: 39,8 und 41,8 min, Bruttoausbeuten: 2,5 und 1,4 mg) aufgetrennt. Allerdings wird anhand des Chromatogramms (Abb. 3.16) deutlich, dass die chromatographische Auftrennung der Fraktion, wie bereits erwähnt, wenig zufriedenstellend war. Beide erhaltenen Fraktionen wiesen identische Massenspektren auf (Abb. 5.13 im Anhang 5.6). Das daraus abzulesende Molekulargewicht von 578 g/mol deutete auf das Vorhandensein von TFS hin. Die UV-Spektren beider Fraktionen waren ebenfalls identisch.

Während die abschließende Strukturidentifizierung der zweiten Verbindung mittels NMR keine verwertbaren Ergebnisse lieferte, konnte die erste Verbindung über den Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums (Abb. 5.21 im Anhang 5.6) mit einem Referenzspektrum aus der Literatur (FUNK et al., 2005) als 8-O-4',8'-O-4''-gekoppelte TFS (Abb. 3.19) identifiziert werden. Die entsprechenden NMR-Daten sind in Tab. 5.23 im Anhang 5.6 aufgeführt. Zwei charakteristische 16 Hz Dubletts weisen auf eine intakte FS-Seitenkette hin, wohingegen zwei charakteristische Singulets bei 7.31 und 7.34 ppm auf zwei 8-O-4'-Bindungen in der Verbindung hindeuten. Ebenso zeigen drei Signale mit Dublett-Dublett-Aufspaltung (Kopplungskonstanten von ca. 8 und ca. 2 Hz), dass keiner der drei aromatischen Ringe zusätzlich in 5-Position substituiert vorliegt. Wie bereits für die Identifizierung der 8-5'nc,8'-O-4''-TFS beschrieben, lieferten auch hier die auf einem wesentlich empfindlicheren NMR-Spektrometer gemessenen ^1H - sowie HMQC-Spektren keine verwertbaren Ergebnisse.

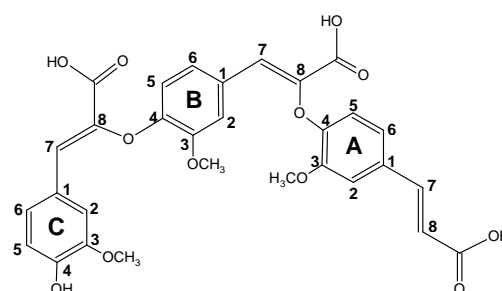


Abb. 3.19: Strukturformel der isolierten und identifizierten 8-8'-c,8'-O-4''-Dehydrotriferulasäure

Semipräparative Aufreinigung und Strukturcharakterisierung von LH^{Tri}10

Aus der semipräparativen Aufreinigung der Fraktion LH^{Tri}10 mittels semipräparativer HPLC (Abb. 3.16) wurde eine Fraktion X₄ (Retentionszeit: 41,4 min, Bruttoausbeute: 1,6 mg) erhalten. Anhand des Chromatogramms wird deutlich, dass die semipräparative HPLC-Trennung auch bei dieser

Fraktion eine geringe Qualität aufweist. Da die Fraktionen LH^{Tri}9 und LH^{Tri}10 in der Sephadex LH-20 Chromatographie (Abb. 3.15) coeluieren, ist wenig überraschend, dass die Fraktion X₄ eine vergleichbare HPLC-Retentionszeit aufweist wie die aus der Aufreinigung von LH^{Tri}9 erhaltene Fraktion X₃. Die Menge der hier isolierten Fraktion X₄ scheint jedoch geringer zu sein als die angegebene Bruttoausbeute (Angabe gemäß Auswaage). So führte bereits die Identifizierung der Fraktion mittels HPLC-DAD-MS zu keinen Ergebnissen. Aus den UBS von Maiskleie konnte kürzlich aus einer vergleichbaren Sephadex LH-20 Fraktion erstmals die 8-8'(THF),5'-5''-TFS isoliert und identifiziert werden (BUNZEL et al., 2006).

Semipräparative Aufreinigung und Strukturcharakterisierung von LH^{Tri}11

Aus der Fraktion LH^{Tri}11 konnte die 5-5'-DFS als dominierende Verbindung nachgewiesen werden. Die zweite fraktionierte Verbindung X₅ (Retentionszeit: 25,4 min, Bruttoausbeute: ca. 1 mg) lieferte keine verwertbaren Ergebnisse aus der Strukturcharakterisierung mittels HPLC-DAD-MS, so dass keine NMR-Experimente durchgeführt wurden.

Vorläufige Identifizierung der 5-5',8'-5''nc-TFS aus LH^{Tri}12

Wie anhand des in Abb. 3.16 dargestellten Chromatogramms ersichtlich ist, wurde mittels semipräparativer HPLC-Fraktionierung der Fraktion LH^{Tri}12 eine Fraktion (Retentionszeit: 39,8 min, Bruttoausbeute: 1,1 mg) erhalten. Die Bestimmung der Molekülmasse ergab 578 g/mol, was wiederum auf das Vorhandensein einer TFS hindeutet. Gemäß der von BUNZEL et al. (2006) beschriebenen Isolierung und Identifizierung von TFS und TetraFS aus den UBS von Maiskleie ist in der entsprechenden Fraktion die 5-5',8'-5''nc-TFS (Abb. 3.20) zu erwarten gewesen.

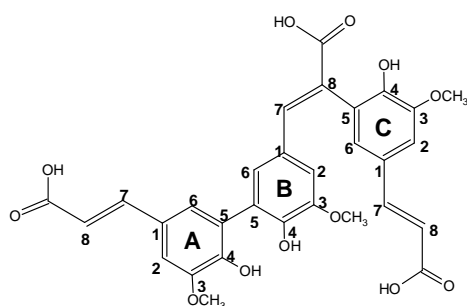


Abb. 3.20: Strukturformel der isolierten und vorläufig identifizierten 5-5',8'-5''nc-Dehydrotriferulasäure

Sowohl das UV-Spektrum (charakteristische Maxima bei 220, 242 und 325 nm) als auch die Massenspektren (positiver und negativer Modus; Abb. 5.15 im Anhang 5.6) stimmten mit den für die 5-5',8'-5''nc-TFS beschriebenen Daten sehr gut überein. So zeigt das Massenspektrum der isolierten Verbindung (negativer Modus) analog zur 5-5',8'-5''nc-TFS ein intensives Signal bei m/z 533 (80 % des Basispeaks, m/z 577), das dem Decarboxylierungsprodukt der Verbindung entspricht (BUNZEL et al., 2006). Da die abschließende Strukturidentifizierung mittels NMR keine verwertbaren Ergebnisse lieferte, konnte die isolierte Verbindung nicht eindeutig, sondern nur vorläufig als 5-5',8'-5''nc-TFS identifiziert werden.

nische lieferte, konnte die isolierte Verbindung nicht eindeutig, sondern nur vorläufig als 5-5',8'-5''nc-TFS identifiziert werden.

Identifizierung von 5-5',8'-O-4''-TFS aus Fraktion LH^{Tri}13

Während gemäß der von BUNZEL et al. (2006) beschriebenen Methode eine direkte Identifizierung der 5-5',8'-O-4''-TFS aus der erhaltenen Sephadex LH-20 Fraktion möglich war, musste diese Fraktion (LH^{Tri}13) in der vorliegenden Arbeit zunächst mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt werden (siehe Abb. 3.16, Retentionszeit: 26,5 min, Bruttoausbeute: 2,9 mg). Die daraus isolierte Verbindung konnte anschließend anhand ihrer Molekularmasse von 578 g/mol (siehe Abb. 5.14 im Anhang 5.6) sowie über den Vergleich der ermittelten ¹H- und ¹³C-NMR-Daten mit den entsprechenden Referenzdaten (BUNZEL et al., 2003a) eindeutig als 5-5',8'-O-4''-TFS identifiziert werden. Das erhaltene UV- und Massenspektrum (positiver Modus) stimmten ebenfalls mit den Literaturdaten überein. Die entsprechenden NMR-Spektren des ¹H- sowie des HMQC-Experiments sind im Anhang 5.6 in Abb. 5.22 und Abb. 5.23 abgebildet, die zugehörigen NMR-Daten sind Tab. 5.24 zu entnehmen.

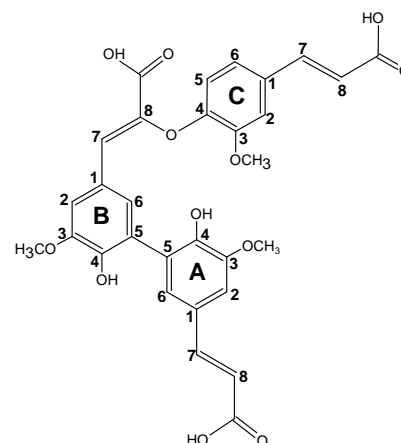


Abb. 3.21: Strukturformel der isolierten und identifizierten 5-5',8'-O-4''-Dehydrotriferulasäure

Charakteristisch sind unter anderem vier Dubletts mit Kopplungskonstanten von ca. 16 Hz, die auf zwei intakte Ferulasäureseitenketten hindeuten. Ein Singulett bei 7.40 ppm weist auf eine 8-O-4-Bindung innerhalb des Trimeren hin. Die Tatsache, dass nur ein Signal mit Dublett-Dublett-Aufspaltung (Kopplungskonstanten von 8,4 und 2,0 Hz) vorhanden ist, zeigt, dass nur einer der aromatischen Ringe der FS unsubstituiert vorliegt. Die beiden anderen Ferulasäurearomaten (Ringe A und B, Abb. 3.21) sind in C5-Stellung gebunden, was durch fehlende 8 Hz-Kopplungen der Signale für die Protonen in 6-Stellung deutlich wird.

3.1.4.5.4 Abschließende Diskussion zur Identifizierung von Triferulasäuren aus den unlöslichen Faserbestandteilen der Maisrestpflanze

Es konnten in der vorliegenden Arbeit insgesamt vier Triferulasäuren isoliert und eindeutig identifiziert werden (8-5'nc,8'-O-4''-, 8-8'c,8'-O-4''-, 8-O-4',8'-O-4''- und 5-5',8'-O-4''-TFS), eine weitere TFS (5-5',8'-5''nc-TFS) wurde vorläufig identifiziert. Damit gelang es erstmals, die Existenz von TFS auch in den vegetativen Pflanzenteilen von *Gramineen* zu belegen. Sämtliche der sieben bislang beschriebenen TFS wurden zuerst aus den UBS des Maisorns isoliert und identifiziert (BUNZEL et al., 2003a, 2005a, FUNK et al., 2005, BUNZEL et al., 2006). Seitdem gelang es in verschiedenen Arbeiten einige dieser Isomere auch in anderen Materialien nachzuweisen. So konnte die mengenmäßig dominierende 5-5',8'-O-4''-TFS in Weizenkleie (CYRAN & SAULNIER, 2005) und den äußeren Schichten des Roggenkorns (ANTOINE et al., 2004) identifiziert werden. Darüber hinaus gelang es mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD Methode

sowohl die 5-5',8'-O-4''-TFS als auch die 8-8',8-O-4''- und die 8-O-4',8'-O-4''-TFS in analytischem Maßstab in den UBS von Weizen, Roggen, Wildreis (nur 5-5',8'-O-4''- und 8-O-4',8'-O-4''-TFS), Spargel und Zuckerrübe anhand der Retentionszeiten und der UV-Spektren nachzuweisen. JARAMILLO et al. (2007) lieferten ebenfalls anhand der UV-Spektren den vorläufigen Nachweis der genannten drei TFS mittels RP-HPLC-DAD nach alkalischer Hydrolyse aus den Zellwänden von Spargel. Allerdings standen ihnen keine TFS-Standardsubstanzen zur Verfügung, so dass keine Absicherung z.B. über die RRT zum IS (*trans*-Zimtsäure) erfolgen konnte.

Polysaccharid-Polysaccharid-Cross-Links über DFS beeinflussen nicht nur die physikochemischen Eigenschaften der Heteroxylane, sondern gelten auch als einer der Haupteinflussparameter der Abbaubarkeit pflanzlicher Zellwände (HATFIELD et al., 1999, GRABBER, 2005). Detaillierte Studien zur Bedeutung der TFS auf die Eigenschaften pflanzlicher Zellwände sind bislang noch nicht beschrieben. Da über die TFS theoretisch aber bis zu drei Polysaccharidketten in den Zellwänden der Maisrestpflanze miteinander verknüpft werden können, ist anzunehmen, dass diese einen erheblichen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften sowie auf die Abbaubarkeit pflanzlicher Zellwände haben.

3.1.4.6 Identifizierung und semiquantitative Abschätzung von Cyclobutandimeren und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukten

Anders als im Maiskorn stellt *p*CS in der Maisrestpflanze die dominierende PCS dar, gefolgt von FS. Während die Bildung von radikalisch gekoppelten *p*CS-Dimeren *in planta* bislang nicht nachgewiesen werden konnte und aufgrund der nachgewiesenen Radikaltransfer-Reaktionen als unwahrscheinlich gilt (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.2), wurde die Bildung von photochemisch gekoppelten Cyclobutandimeren der *p*CS und FS in verschiedenen Pflanzenmaterialien beschrieben. Dabei konnten sowohl Homodimere der *p*CS sowie der FS als auch Heterodimere von *p*CS und FS u.a. in tropischen Gräsern (FORD & HARTLEY, 1990), in Gerstenstroh, Gerstenblättern und Weizenblättern (TURNER et al., 1993) sowie auch in den UBS einiger Getreidekaryopsen (PACKERT, 1993) nachgewiesen werden.

Bereits bei der Bestimmung der estergebundenen DFS (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1.4.2 sowie Abschnitt 2.2.3.1) aber auch bei der präparativen Isolierung oligomerer PCS aus dem Maisrestpflanzenmaterial und der entsprechenden GPC-Trennung an Bio-Beads SX-3 (Abschnitt 3.1.4.5) wurde festgestellt, dass die Chromatogramme viele Peaks mit einem für Cyclobutandimere typischen, aber insgesamt recht uncharakteristischen UV-Spektrum aufwiesen (siehe hierzu Abb. 3.26). Während monomere PCS ebenso wie radikalisch gekoppelte DFS ein typisches Absorptionsmaximum im Bereich über 300 nm (*p*CS ca. 310 nm, FS ca. 325 nm) besitzen, ist bei Sättigung der Propenylseitenkette, einhergehend mit einer Begrenzung des konjugierten Systems, nur noch das für phenolische Verbindungen allgemein typische Maximum

im Bereich von 280 nm zu erkennen. Gleiches gilt auch für die 8-8'(THF)-DFS. Eine Unterscheidung der Vielzahl an möglichen Cyclobutanderivaten untereinander (insgesamt je 11 Stereoisomere der Homodimere sowie 14 Stereoisomere der Heterodimere) ebenso wie deren Unterscheidung zu anderen „einfachen“ phenolischen Substanzen ist daher anhand der UV-Spektren nicht möglich.

Um die Bedeutung der photochemischen Kopplung der PCS in den vegetativen Pflanzenteilen von Mais beurteilen zu können, wurden zum einen einige der aus der Bestimmung der estergebundenen DFS vorhandenen Etherextrakte (3.1.4.2) nach Trimethylsilylierung mittels GC-MS untersucht. Zum anderen sollten Cyclobutandimere aus der Dimeren-GPC-Fraktion (Abschnitt 3.1.4.5.2) präparativ isoliert und mit verschiedenen spektroskopischen Methoden identifiziert werden.

Wie im Allgemeinen Teil dieser Arbeit in Abschnitt 1.1.2.3 beschrieben, kann polysaccharidgebundene FS (aber auch DFS) über eine Vielzahl von Bindungen Cross-Links zu Lignin ausbilden. Diese Verknüpfungen von FS zu Monolignolen gelten als Initiationsstellen der Lignifizierung. Da ein Großteil dieser Bindungen (C-C-Bindungen sowie β -O-4'-Styryl- und Biphenylether) mit den derzeitigen analytischen Methoden nicht gespalten werden können, ist der Anteil der mit Lignin verknüpften FS nur schwer bestimmbar. Eine Möglichkeit bietet die Quantifizierung der nach alkalischer Druckhydrolyse freigesetzten FS (siehe hierzu Abschnitt 3.1.4.3), bei der aber nur die 4-O- α '- und vor allem die 4-O- β '-Bindungen gespalten werden können. Dementsprechend repräsentieren diese Gehalte nicht die tatsächlichen Lignin-FS Interaktionen in der pflanzlichen Zellwand.

Eine Möglichkeit die Bindungsverhältnisse zwischen FS und Lignin zu klären, bietet der Nachweis von FS-Monolignol-Kreuzprodukten mittels GC-MS, die die „Lignifizierung“ im Dimerenstadium repräsentieren (BUNZEL, 2001). Aus diesem Grund wurden die GC-MS-Chromatogramme der alkalischen Hydrolysate auf die bislang beschriebenen FS-Monolignol-Kreuzprodukte (JACQUET et al., 1995, RENGER, 1999, BUNZEL, 2001) untersucht.

3.1.4.6.1 Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte mittels GC-MS

Die Identifizierung der Cyclobutanderivate erfolgte über den Vergleich der erhaltenen Massenfragmente mit den Literaturdaten. Es ist bekannt, dass bei der EI für die hh-Typen der Cyclobutandimere sowohl asymmetrische als auch symmetrische Molekülsplaltungen möglich sind, während bei ht-Typen nur die Möglichkeit symmetrischer Spaltungen besteht (Abb. 3.22). Zur Differenzierung der hh- und ht-Typen werden daher die durch asymmetrische Spaltung entstehenden Stilben- (A in Abb. 3.22; m/z 416, 386 bzw. 356 bei FS-FS-, pCS-FS bzw. pCS-pCS-Dimeren) und Dicarboxylat-Fragmente (B in Abb. 3.22; m/z 260) sowie insbesondere das nach Abspaltung einer Methylgruppe entstehende Massenfragment m/z 245 herangezogen.

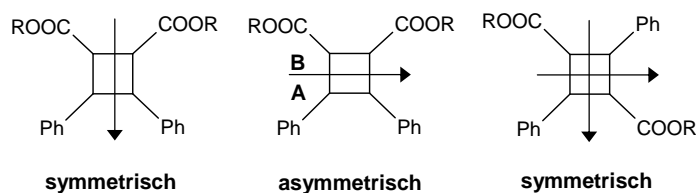


Abb. 3.22: Asymmetrische und symmetrische Spaltung von Cyclobutanderivaten bei Elektronenstoßionisation

Charakteristisch für Cyclobutandimere ist das durch symmetrische Spaltung entstehende Massenfragment, das der halben Molekülmasse des tetra-TMS-Derivates entspricht ($\frac{1}{2} M_{\text{sym}}$). Dies ist bei *pCS-pCS*-Homodimeren m/z 308, während bei *pCS-FS*-Heterodimeren m/z 338 und m/z 308 entstehen. Aus *FS-FS*-Homodimeren entsteht als $\frac{1}{2} M_{\text{sym}}$ m/z 338. Da aber für die weitere Fragmentierung der Cyclobutanderivate die Abspaltung einer oder mehrerer Methylgruppen typisch ist, entsteht hier durch die Abspaltung zweier Methylgruppen teilweise das Massenfragment m/z 308 ($\frac{1}{2} M_{\text{sym}} - 2 \times \text{CH}_3$). Während die Homomere der *pCS* also eindeutig anhand des Fehlens des Massenfragments m/z 338 identifiziert werden können, ist die Unterscheidung von *pCS-FS*-Heterodimeren und *FS-FS*-Homodimeren schwieriger. Zu deren Differenzierung werden in der Literatur verschiedene Quotienten vorgeschlagen. FORD & HARTLEY (1989) zogen zur Differenzierung die Bildung der Quotienten (m/z 219/249 und 249/308) heran. Waren beide Quotienten > 1 wurde ein *pCS-FS*-Heterodimer angenommen. PACKERT (1993) verwendete hingegen als Entscheidungskriterium die Quotienten (m/z 219/249 und 293/308). Nur wenn beide Quotienten > 1 lagen, wurde ein Heterodimer angenommen, andernfalls ein *FS-FS*-Homodimer. Zudem schlägt PACKERT (1993) zur Unterscheidung die Betrachtung des höheren Massenbereichs ($> \frac{1}{2} M_{\text{sym}}$) vor. Während die Molekülionen der vollständig silylierten tetra-TMS-Derivate (m/z 676, m/z 646 bzw. m/z 616) aufgrund der Instabilität der Verbindungen nur in geringem Maße detektiert werden (FORD & HARTLEY, 1990) und somit als Unterscheidungsmerkmal ungeeignet sind, haben sich in der vorliegenden Arbeit insbesondere die nach Abspaltung einer Methylgruppe entstehenden Massenfragmente (M-CH_3 , m/z 661, 631 bzw. 601) als hilfreich erwiesen. Während die entsprechenden Massenfragmente aus *pCS-pCS*-Homodimeren und den Heterodimeren uncharakteristisch sind, kann das Massenfragment m/z 661 nur aus *FS-FS*-Homodimeren entstehen und somit als charakteristischer Nachweis dienen. Die Quotienten m/z 219/249 und m/z 249/308 stellten sich hingegen als ungeeignet heraus, da der erstgenannte stets < 1 lag und der zweite uneinheitliche Ergebnisse lieferte. Es wurde daher beim Nachweis des Fragments m/z 661 und einem m/z 293/308 Verhältnis > 1 ein *FS-FS*-Homodimer angenommen. Der Nachweis des Massenfragments m/z 245 wurde als positiver Nachweis für den hh-Typ gewertet.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Identifizierungsmöglichkeiten der Cyclobutandimere mittels GC-MS-Analyse, insbesondere da keine Standardsubstanzen der Cyclobutandimere zur Verfügung standen, begrenzt sind. Die Verwendung von allgemeingültigen Quotienten der Massenfragmente ist darüber hinaus schwierig, da die relativen Anteile der entstehenden

Massenfragmente in gewissem Maße auch von dem verwendeten Massenspektrometer abhängen (Quadrupol- oder Ion-Trap-MS, siehe hierzu 2.2.3.5).

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels GC-MS aus den Etherextrakten der alkalischen Hydrolyse zur Bestimmung der DFS mittels HPLC-DAD (3.1.4.2) sowie aus der Dimeren-GPC-Fraktion (3.1.4.5) und den entsprechenden Sephadex LH-20 Fraktionen (3.1.4.6.2) vorläufig identifizierten Cyclobutandimere sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Abb. 3.23 zeigt exemplarisch das Chromatogramm der Dimeren-Fraktion der GPC-Trennung an Bio-Beads SX-3. Massenspektren der *p*CS-*p*CS-Homodimere (hh und ht) sowie eines *p*CS-FS-Heterodimers und eines FS-FS-Homodimers sind exemplarisch im Anhang 5.6 abgebildet (Abb. 5.24).

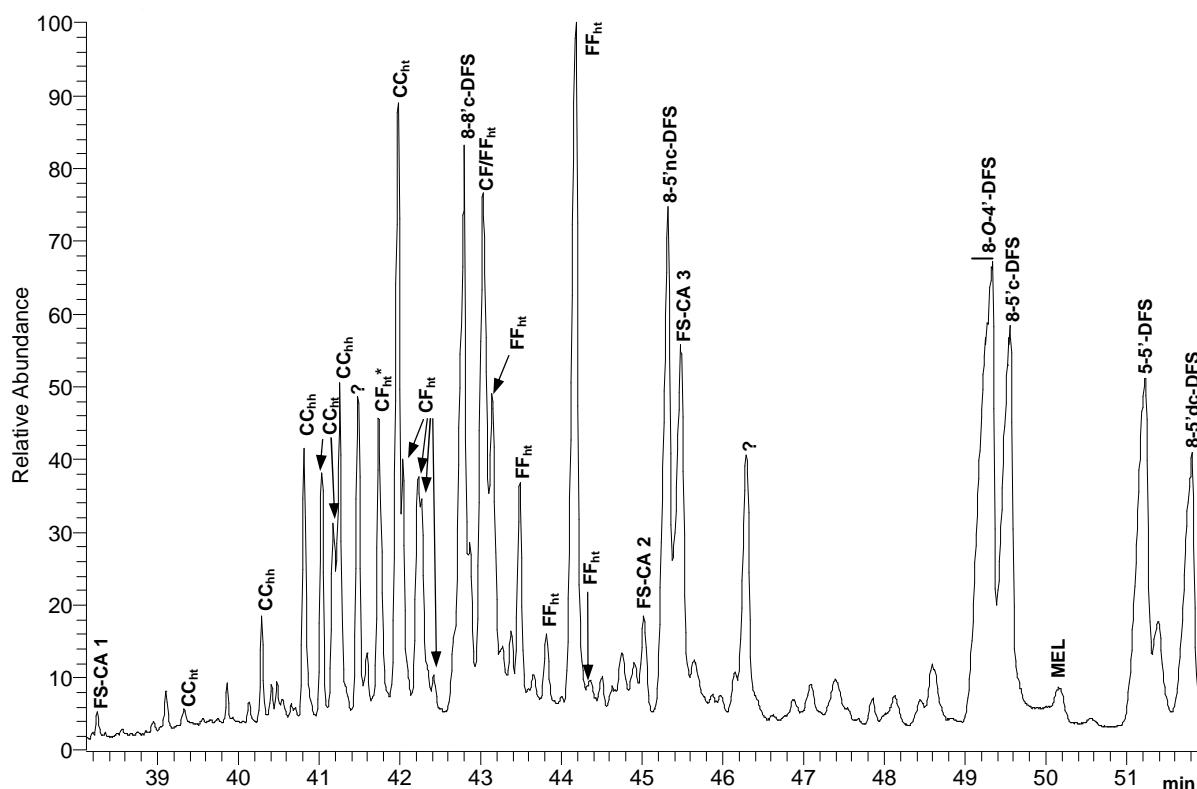


Abb. 3.23: Ausschnitt des GC-MS-Chromatogramms (TIC, Massenbereich m/z 150 -750) der Dimeren-GPC-Fraktion aus der präparativen Isolierung oligomerer Phenolcarbonsäuren ((CC = *p*CS-*p*CS-Homodimer, CF = *p*CS-FS-Heterodimer, FS-CA = Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukt, MEL = 8- β -gekoppeltes Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukt mit Pinoresinolstruktur, ? = unbekannte Verbindung)

Es wurden insgesamt 18 verschiedene Cyclobutanderivate in den untersuchten Maisrestpflanzenmaterial identifiziert, mit etwa gleichen Verhältnissen der unterschiedlichen Homo- bzw. Heterodimere zueinander. Eine quantitative Abschätzung der Gehalte von Cyclobutandimeren in den Maisrestpflanzenmaterialien ist allerdings schwierig. Da keine Standardsubstanzen zur Verfügung standen, konnten keine spezifischen Korrekturfaktoren ermittelt werden. Spezifische Korrekturfaktoren wurden bislang auch nicht in der Literatur beschrieben (FORD & HARTLEY, 1989, 1990, PACKERT, 1993). Eine verlässliche Quantifizierung der Cyclobutandimeren ist somit im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die ungefähren Verhältnisse von Cyclobutandimeren zu

DFS wurden unter der Annahme einer ähnlichen Fragmentierung anhand der relativen Peakflächen in den GC-MS-Chromatogrammen grob abgeschätzt. Das Screening der 0 h-Materialien zweier Sorten in Anbaujahr 2004 zu Erntezeitpunkt E 1 ergab ein durchschnittliches Verhältnis von Cyclobutandimeren zu DFS von 2,2.

Tab. 3.2: Übersicht der vorläufig identifizierten Cyclobutandimere der *p*-Cumarsäure (*p*CS) und der Ferulasäure (FS) (CC = *p*CS-*p*CS-Homodimer, CF = *p*CS-FS-Heterodimer, FF = FS-FS-Homodimer; + = nachweisbar, - = nicht nachweisbar)

Cyclobutandimer		Retentions- zeit (min)	m/z 245	Quotient	Quotient	Quotient	m/z 661
				m/z 219/249	m/z 249/308	m/z 293/308	
CC	ht	39,32	-				
CC	hh	40,29	+				
CC	hh	40,81	+				
CC	ht	41,03	-				
CC	ht	41,17	-				
CC	hh	41,25	+				
CF*	ht	41,73	-	< 1	< 1	> 1	-
CC	ht	41,97	-				
CF	ht	42,04	-	< 1	< 1	> 1	-
CF	ht	42,23	-	< 1	< 1	> 1	-
CF	ht	42,27	-	< 1	> 1	> 1	-
CF	ht	42,42	-	< 1	< 1	> 1	-
CF/FF	ht	43,03	-	< 1	< 1	> 1	(+)
FF	ht	43,14	-	< 1	< 1	< 1	+
FF	ht	43,49	-	< 1	< 1	< 1	+
FF	ht	43,82	-	< 1	< 1	< 1	+
FF	ht	44,17	-	< 1	< 1	< 1	+
FF	ht	44,35	-	< 1	< 1	< 1	+

* isoliertes und identifiziertes Cyclobutandimer nach 3.1.4.6.2

Aus den erhaltenen Ergebnissen wird deutlich, dass Cyclobutandimere in der Maisrestpflanze entgegen dem Maiskorn bzw. Getreidekaryopsen im Allgemeinen, in denen Cyclobutanderivate der PCS im Vergleich zu den radikalisch gekoppelten DFS nur von untergeordneter Bedeutung sind (RALPH et al., 1994b), durchaus Bedeutung als Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren haben können. Dabei könnten sowohl Polysaccharid-Polysaccharid- (FS-FS-Homodimere), als auch Polysaccharid-Lignin- (*p*CS-FS-Heterodimere) oder Lignin-Lignin-Cross-Links (*p*CS-*p*CS-Homodimere) gebildet werden. Berücksichtigt man die unterschiedliche zeitliche Aussetzung von Maisrestpflanze und Kolben gegenüber dem Sonnenlicht, der Maiskolben ist durch die Umhüllung der Lieschenblätter zusätzlich geschützt, erscheint dies durchaus realistisch. Für eine

zukünftige, sichere Quantifizierung ist allerdings die Bestimmung spezifischer Korrekturfaktoren unumgänglich.

Neben den beschriebenen Cyclobutandimeren konnten drei Peaks mit einem für Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukte (FS-CA) typischen Massenfragment von m/z 297 als Basispeak bestimmt werden. In Ermangelung von Standardsubstanzen war eine genauere Differenzierung zwischen 4-O- β -Etherbindungen (JACQUET et al., 1995) bzw. 8- β -THF-Bindungen allerdings nicht möglich. Darüber hinaus konnte das von BUNZEL (2001) erstmals mit GC-MS nachgewiesene 8- β -gekoppelte Ferulasäure-Coniferylalkohol-Kreuzprodukt mit Pinoresinolstruktur (Monoepoxy-lignanolid - MEL) anhand des Massenfragments m/z 516 als Basispeak vorläufig identifiziert werden.

3.1.4.6.2 Fraktionierung der Dimeren-GPC-Fraktion B 3 mittels Sephadex LH-20 Chromatographie sowie abschließende Identifizierung der enthaltenen dimeren Phenolcarbonsäuren

Wie in Abschnitt 3.1.4.5 beschrieben wurde die Dimeren-Fraktion teilweise mittels Sephadex LH-20 Chromatographie weiterfraktioniert. Da die Cyclobutanderivate der PCS aufgrund der gesättigten Seitenketten anders als die DFS, mit Ausnahme der 8-8'(THF)-DFS, keine UV-Absorption bei 325 nm zeigen, erfolgte die Detektion mit zwei hintereinander geschalteten UV-Detektoren bei unterschiedlichen Detektionswellenlängen 325 nm und 280 nm. Wie anhand der in Abb. 3.24 gegenübergestellten Chromatogramme bei beiden Wellenlängen zu erkennen ist, war mit der Detektion bei 280 nm sowohl eine Verschiebung der relativen als auch der absoluten Intensitäten zu beobachten, wobei die absoluten Intensitäten aufgrund der unterschiedlichen UV-Detektoren allerdings wenig aussagekräftig sind. Analog zu der bereits beschriebenen Bestimmung der DFS aus den verschiedenen Maisrestpflanzen-Probenmaterialien (siehe 3.1.4.2) konnten aus den erhaltenen Fraktionen acht der bisher neun isolierten und strukturidentifizierten DFS mittels HPLC-DAD-MS identifiziert werden (UV-Spektren Abb. 5.10, MS-Spektren Abb. 5.26 und Abb. 5.27 im Anhang 5.6). Die 4-O-5'-gekoppelte DFS konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Die Bruttoausbeuten der Fraktionen sowie die darin identifizierten DFS sind in Tab. 3.3 aufgeführt.

Die 8-8'(THF)-DFS wurde bislang in keiner Fraktion der Sephadex LH-20 Chromatographie detektiert (BUNZEL et al., 2004a) und konnte somit auch nicht präparativ als Standardsubstanz aus Maiskleie gewonnen werden. Die Gewinnung der 8-8'(THF)-DFS erfolgte bislang mittels Synthese (SCHATZ et al., 2006) (siehe hierzu auch 2.2.3.1). Durch die Detektion bei 280 nm wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals das Elutionsverhalten der 8-8'(THF)-DFS bei der Sephadex LH-20 Chromatographie charakterisiert. Es ist daher zukünftig möglich, auch diese DFS als Standardsubstanz aus Maiskleie zu gewinnen und somit die zeitaufwendige Synthese zu umgehen.

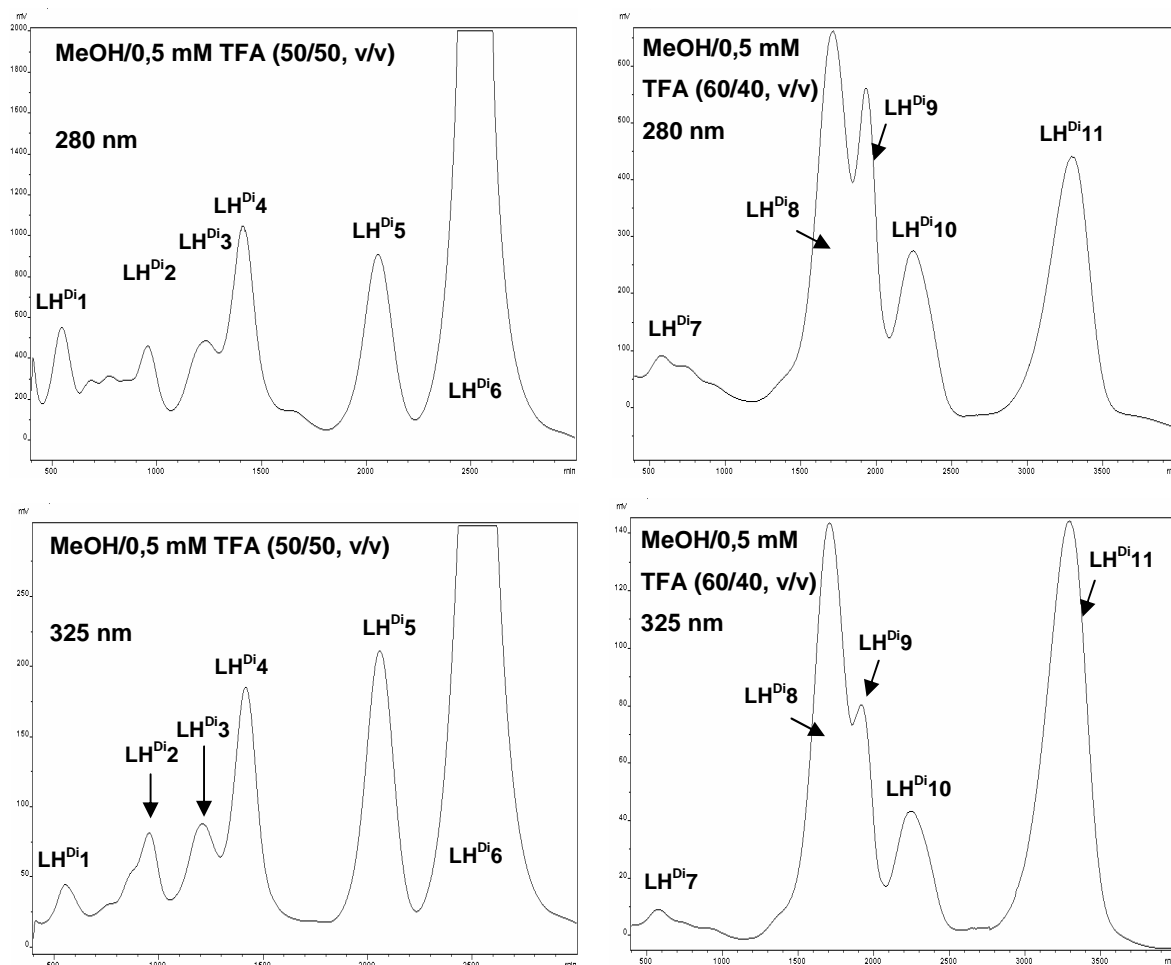


Abb. 3.24: Chromatogramme der Fraktionierung der Dimeren-Fraktion B 3 an Sephadex LH-20 bei den Detektionswellenlängen 280 nm (oben) und 325 nm (unten); links: Elutionsschritt II mit MeOH/0,5 mM TFA (50/50, v/v), rechts: Elutionsschritt III mit MeOH/0,5 mM TFA (60/40, v/v)

Beim Vergleich der Chromatogramme beider Detektionswellenlängen fiel darüber hinaus für die Fraktion LH^{Di1} eine deutlich erhöhte Absorption bei 280 nm auf. Da diese Fraktion eine oder mehrere bisher nicht identifizierte radikalisch gekoppelte Dimere bzw. Cyclobutandimere beinhalten könnte, wurde diese Fraktion mittels semipräparativer HPLC weiter aufgereinigt.

Tab. 3.3: Übersicht der Bruttoausbeuten der erhaltenen Sephadex LH-20 Fraktionen sowie der darin nachgewiesenen Diferulasäuren (DFS)

Fraktion	LH^{Di1}	LH^{Di2}	LH^{Di3}	LH^{Di4}	LH^{Di5}	LH^{Di6}
Ausbeute (mg) ¹	11,0	9,3	11,1	13,6	16,4	27,3
DFS		8-8'(THF)-DFS	8-8'c-DFS	8-8'nc	8-5'nc	8-O-4'-DFS; 8-5'c-DFS

Fraktion	LH^{Di7}	LH^{Di8}	LH^{Di9}	LH^{Di10}	LH^{Di11}
Ausbeute (mg) ¹	12,0	8,5	5,5	9,5	21,0
DFS	-	5-5'-DFS	5-5'-DFS	-	8-5'dc-DFS

¹ Ausbeuten können noch Lösungsmittelreste enthalten, da die Trocknung nur unter N_2 erfolgte

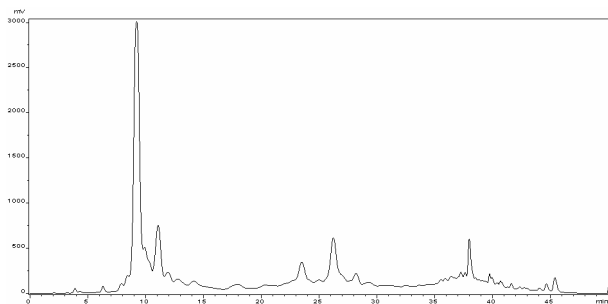


Abb. 3.25: Chromatogramm der semipräparativen Aufreinigung der Fraktion LH^{Di}1 (Detektionswellenlänge 280 nm)

Abb. 3.25 zeigt das Chromatogramm der Aufreinigung der Fraktion LH^{Di}1 mittels semi-präparativer HPLC bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm. Es wurde eine dominierende Fraktion erhalten (Retentionszeit: 9,6 min, Bruttoausbeute: 3,3 mg), deren Struktur, wie nachfolgend beschrieben, zunächst mittels HPLC-DAD-MS und GC-EI-MS charakterisiert und abschließend mit Hilfe verschiedener NMR-Experimente identifiziert werden sollte.

Das UV-Spektrum der isolierten Verbindung (Abb. 3.26) zeigt das u.a. für Cyclobutanerivate typische, aber wenig charakteristische UV-Spektrum (WALDRON et al., 1996). Anhand der LC-Massenspektren (Abb. 5.25 im Anhang 5.6) konnte das Molekulargewicht der Verbindung mit 358 g/mol bestimmt und eine DFS somit ausgeschlossen werden. Das Molekulargewicht entspricht vielmehr dem eines photochemisch gebildeten pCS-FS-Heterodimers. Im negativen Modus wurde der Molekülpeak mit m/z 357 ($M-H$)⁻ als Basispeak gemessen. Im positiven Modus erfolgte die Bestimmung

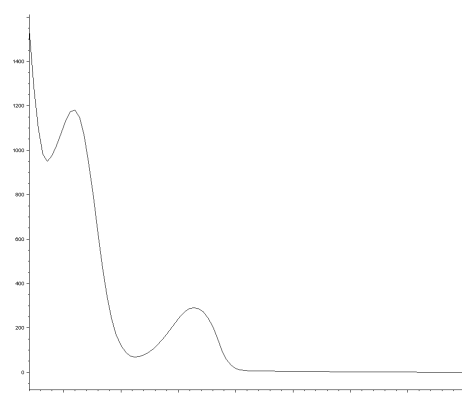


Abb. 3.26: UV-Spektrum der aus LH^{Di}1 isolierten Verbindung

der Molmasse mit Hilfe des Natriumadduktes mit m/z 381 ($M+Na$)⁺. Analog zur Fragmentierung mittels EI-MS konnten auch in den LC-MS-Spektren die nach symmetrischer Spaltung entstehenden charakteristischen Massenfragmente der enthaltenen monomeren PCS (m/z 165 ($M(pCS)+H$)⁺ und m/z 195 ($M(FS)+H$)⁺) nachgewiesen werden. Spaltprodukte aus einer asymmetrischen Spaltung, z.B. Stilben-Fragmente oder Dicarboxylat-Fragmente, die für den hh-Typ charakteristisch wären, konnten weder mittels GC-MS noch mittels LC-MS detektiert werden. Über den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren konnte die isolierte Verbindung auch in den untersuchten Probenmaterialien identifiziert werden (siehe hierzu Abschnitt 3.1.4.6.1). Der entsprechende Peak ist in Abb. 3.23 und Tab. 3.2 mit CF_{ht}^{*} gekennzeichnet.

Zur Aufklärung der Molekülstruktur des isolierten Cyclobutanheterodimers wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen für die Kohlenstoffatome wurden dabei dem HMQC- oder HMBC-Spektrum entnommen, weil die Substanzmenge für die Aufnahme eines ¹³C-Spektrums nicht ausreichend gewesen ist. Mit Hilfe der durchgeführten Experimente ist eine eindeutige Signalzuordnung zu den einzelnen Einheiten möglich. Zur Absicherung der Zuordnung wurden zudem Vergleiche mit NMR-Daten verwandter bzw. monomerer Verbindungen aus der Literatur herangezogen.

Anhand des ^1H -NMR-Spektrums (Abb. 3.27, NMR-Daten Tab. 3.4) konnte das Vorhandensein einer Methoxygruppe (chemische Verschiebung von 3.84 ppm, Integral von 3 Protonen) und damit einer FS-Einheit im Dimer bestätigt werden. Die Multipllett-Signale bei 3.86 ppm und 4.31 ppm entsprechen jeweils zwei Protonen. Sie können weder $p\text{CS}$ noch FS eindeutig zugeordnet werden, sondern sind vielmehr charakteristisch für cyclische Struktureinheiten. Sie entsprechen somit den Protonen des Cyclobutanrings. Darüber hinaus sind zwei weitere Multipletts (7.21 ppm und 6.77 ppm) zu erkennen, die jeweils von zwei Protonen hervorgerufen werden. Da es sich hierbei um chemisch äquivalente, aromatische Protonen handeln muss, konnten diese Signale

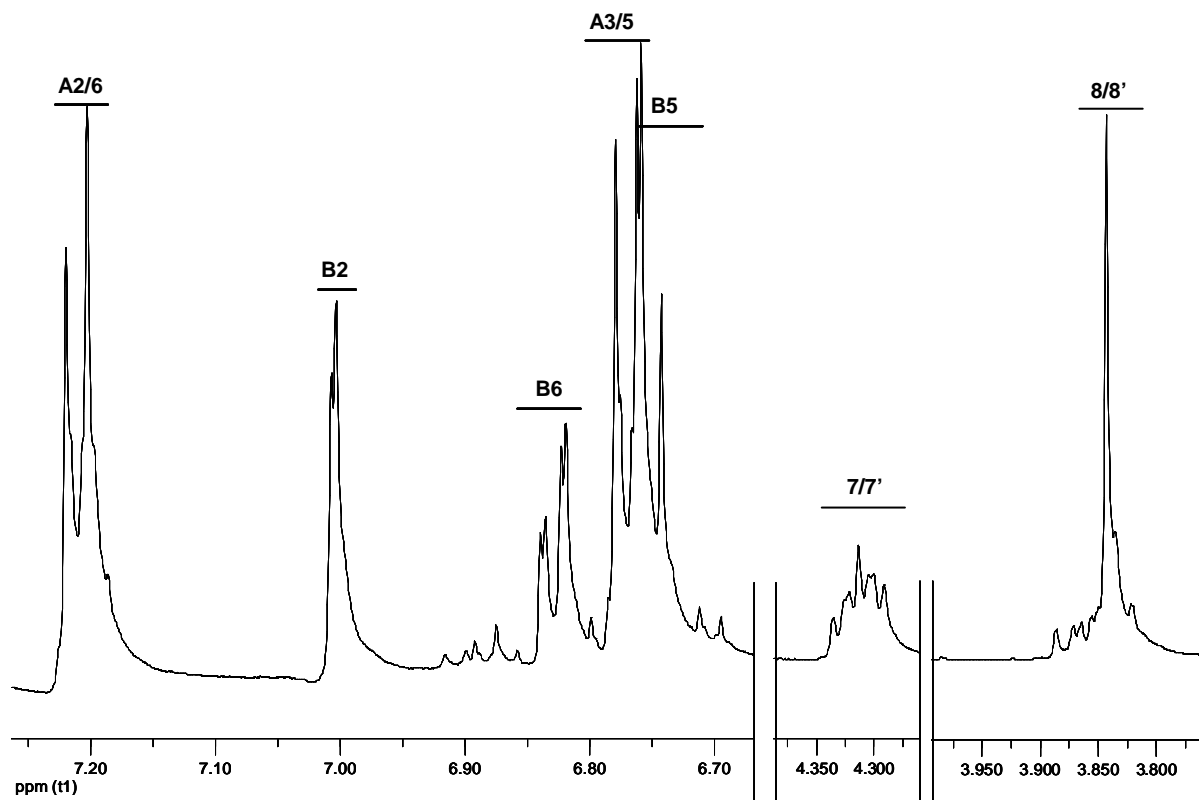


Abb. 3.27: Ausschnitte aus dem ^1H -Spektrum des aus $\text{LH}^{\text{Di}1}$ isolierten p -Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimers

eindeutig den Protonen $\text{H}_{2/6}$ und $\text{H}_{3/5}$ der $p\text{CS}$ -Einheit zugeordnet werden. Die weiteren aromatischen Protonensignale werden jeweils von einem Proton hervorgerufen und weisen die für FS typische Aufspaltung (zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von ca. 8 Hz und 2 Hz sowie ein Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von ca. 8 Hz und 2 Hz) auf.

Das $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Experiment diente der Überprüfung der Signalzuordnung anhand der chemischen Verschiebungen, Integrale und Kopplungskonstanten (siehe Abb. 5. im Anhang 5.6). Zur Bestätigung der Bindungsverhältnisse und zur Ermittlung der chemischen ^{13}C -Verschiebungen (Tab. 3.4) wurden im HMQC-Spektrum den ^1H -Signalen die entsprechenden ^{13}C -Signale zugeordnet. Das HMQC-Spektrum ist im Anhang (5.6) in Abb. 5.29 dargestellt. Zur weiteren Aufklärung der Bindungsverhältnisse innerhalb des Moleküls und zur Bestimmung der chemischen Verschiebungen für die quaternären Kohlenstoffatome wurde das HMBC-Experiment (siehe An-

hang (5.6), Abb. 5.30) durchgeführt. Das NOESY-Experiment diente zur Aufklärung der stereo-chemischen Verhältnisse innerhalb des Dimers. Die Signale in NOESY-Spektren zeigen Kopplungen zwischen räumlich benachbarten Kernen, die auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beruhen. Der NOE tritt allerdings nur auf, wenn der Abstand der über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen koppelnden Kerne kleiner als 3 Å ist. Das NOESY-Experiment dient somit in erster Linie als eine Art Positivkontrolle. Das NOESY-Experiment bei diesem Cyclobutandimer erzeugte keine Signale. Es lassen daher sich keine definitiven Aussagen über die Stereochemie der untersuchten Verbindung treffen. Es konnte somit in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Stereochemie des isolierten *p*CS-FS-Cyclobutandimers nicht vollständig geklärt werden.

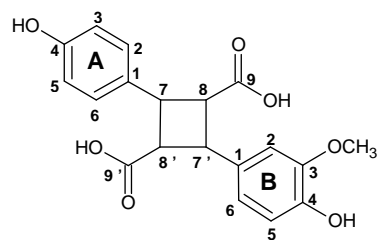


Abb. 3.28: Strukturformel des isolierten und identifizierten *p*-Cumarsäure – Ferulasäure - Cyclobutandimers (A = *p*-Cumarsäure, B = Ferulasäure)

Tab. 3.4: NMR-Daten der isolierten und identifizierten 4,4'-Dihydroxy-3-methoxy-Truxillsäure und der verwendeten Referenzsubstanzen

Dimeren-Einheit	¹ H		¹³ C	
	in Aceton-d ₆	Referenzdaten in Aceton-d ₆	in Aceton-d ₆	Referenzdaten in Aceton-d ₆
A1			130.8 ^a	127.0 ^e
A2/6	7.21 (2H, <i>m</i>)	7.31 (2H, <i>m</i>) ^c	129.4 ^b	130.9 ^e
A3/5	6.77 (2H, <i>m</i>)	6.80 (2H, <i>m</i>) ^c	115.3 ^b	116.7 ^e
A4			157.4 ^a	160.5 ^e
A7 / B7'	4.31 (2H, <i>m</i>)	-	41.8 ^b	-
A8 oder A8'	3.86 (2H, <i>m</i>)	-	47.8 ^b	-
A9 oder A9'			171.1 ^a	169.0 ^e
B1			131.6 ^a	127.4 ^f
B2	7.00 (1H, <i>d</i> , 2.0)	7.04 (1H, <i>d</i> , 1.9) ^d	112.3 ^b	111.3 ^f
B3			146.3 ^a	148.6 ^f
B4			147.8 ^a	150.0 ^f
B5	6.75 (1H, <i>d</i> , 8.2 Hz)	6.76 (1H, <i>d</i> , 8.1) ^d	115.3 ^b	116.0 ^f
B6	6.83 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.0)	6.84 (1H, <i>dd</i> , 8.1, 1.9) ^d	121.9 ^b	123.8 ^f
B7' / A7	4.31 (2H, <i>m</i>)	-	41.8 ^b	-
B8 oder B8'	3.86 (2H, <i>m</i>)	-	47.8 ^b	-
B9 oder B9'			171.1 ^a	168.9 ^f
OMe	3.84 (3H, <i>s</i>)	3.84 (3H, <i>s</i>) ^d	56.0 ^b	56.3 ^f

^a Daten aus dem HMBC-Spektrum entnommen

^b Daten aus dem HMQC-Spektrum entnommen

^c Referenzdaten dem *p*-Cumarylalkohol (identische aromatische Einheit) entnommen (RALPH et al., 2004d)

^d Referenzdaten dem Coniferylalkohol (identische aromatische Einheit) entnommen (RALPH et al., 2004d)

^e Referenzdaten der *p*-Cumarsäure entnommen (RALPH et al., 2004d)

^f Referenzdaten der *trans*-Ferulasäure entnommen (RALPH et al., 2004d)

- keine geeigneten Referenzdaten verfügbar

Die Ergebnisse aus der HPLC-DAD-MS sowie aus der GC-MS-Untersuchung zeigen jedoch, wie bereits beschrieben, dass es sich um ein Dimer des ht-Types handelt, da ausschließlich symmetrische Fragmente detektiert wurden. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse ergibt sich somit für das isolierte *p*CS-FS-Cyclobutandimer als wahrscheinlichste Struktur die in der Abb. 3.28 dargestellte Molekülstruktur, eine 4,4'-Dihydroxy-3-methoxy-Truxillsäure.

3.1.5 Charakterisierung des Ligningehaltes und der Monolignolzusammensetzung der Maisrestpflanze

3.1.5.1 Bestimmung des Ligningehaltes über zwei Methoden

Analog zur Bestimmung der Zellwandpolysaccharide sowie zur Quantifizierung der monomeren PCS und DFS sollen die ermittelten Ligningehalte in den Untersuchungsmaterialien vor ruminaler Inkubation zunächst zusammengefasst betrachtet werden. Eine detaillierte Untersuchung von sorten- oder reifespezifischen Unterschieden sowie von Unterschieden zwischen den beiden Anbaujahren folgt in Abschnitt 3.2 dieser Arbeit. Abb. 3.29 zeigt zusammengefasst die ermittelten Ligningehalte beider Bestimmungsmethoden, Klason-Lignin und acetylbromidlösliches Lignin, in den AM sowie in den 0 h-Materialien. Die Gehalte der einzelnen Untersuchungsmaterialien sind im Anhang 5.4 in Tab. 5.17 aufgeführt.

Wie bereits in Abschnitt 2.2.4 dieser Arbeit beschrieben, existiert für die Bestimmung des Ligningehaltes keine für sämtliche Pflanzenmaterialien allgemeingültige Standardmethode (HATFIELD & FUKUSHIMA, 2005), weshalb in der vorliegenden Arbeit zwei Methoden angewandt wurden. Diese beruhen auf unterschiedlichen Prinzipien und unterscheiden sich somit auch in ihren Hauptfehlerquellen. Die Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignins erfolgte nach „Lösung“ des Lignins in 25 %igem Acetylbromid in Essigsäure photometrisch bei 280 nm (siehe 2.2.4.2). Da keine Extraktion oder anderweitige Abtrennung des Lignins von den sonstigen Zellwandbestandteilen erfolgt, handelt es sich somit um eine recht unspezifische Messung der Gesamtabsorption bei 280 nm. Die Quantifizierung des Ligningehaltes erfolgt über einen für Maisrestpflanzenzellwände spezifischen Korrekturfaktor (FUKUSHIMA & HATFIELD, 2004). Die Bestimmung des KL erfolgt hingegen gravimetrisch. Hierbei wird der nach saurer Hydrolyse verbleibende Rückstand (siehe 2.2.4.1) bestimmt. Auch dies ist eine relativ unspezifische Methode deren Hauptfehlerquellen zum einen in einem teilweisen Verlust von Lignin sowie zum anderen in der Mitbestimmung von Strukturproteinen oder anderen säureunlöslichen Bestandteilen, wie z.B. Cutin oder Wachsen, liegen. Um den Anteil der Strukturproteine im KL der Untersuchungsmaterialien abschätzen zu können, wurde exemplarisch aus den AM dreier Sorten zu beiden Erntezeitpunkten das KL im präparativen Maßstab gewonnen und der Proteingehalt darin bestimmt. Die ermittelten Proteingehalte im KL schwankten zwischen 9 - 16 % des KL, was

in etwa 1,5 - 2,5 % der Trockensubstanz entspricht. Analog zu den Rohproteingehalten der Ausgangsmaterialien (siehe 3.1.2) war eine leichte Abnahme des Proteinanteils im KL zum zweiten Erntezeitpunkt festzustellen. Der Anteil der Strukturproteine am KL ist somit durchaus nicht zu vernachlässigen. Unter Berücksichtigung des in dieser Arbeit analysierten Probenumfangs war eine Bestimmung und anschließende Korrektur der KL-Gehalte um den Proteingehalt allerdings nicht realisierbar. Strukturproteine sind, ebenso wie Lignin, gegenüber dem ruminalen Abbau weitestgehend resistent (HATFIELD et al., 1999). Dies konnte durch die ebenfalls exemplarisch durchgeführte Bestimmung der Proteinanteile im KL der ruminal verdauten 24 h-Materialien, für die ein konstanter Proteinanteil im KL bestimmt wurde, bestätigt werden.

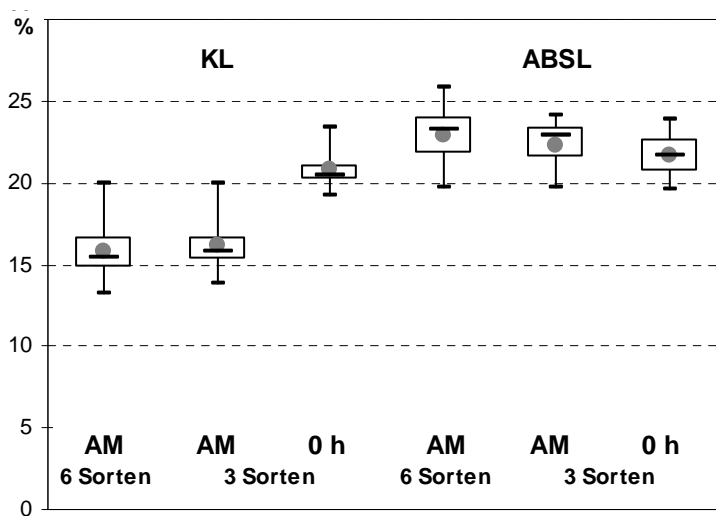


Abb. 3.29: Gehalte an Klason-Lignin (KL) und acetylbromid-löslichem Lignin (ABSL) in den Ausgangs- (AM) und 0 h-Materialien (% Trockenmasse)

Die ermittelten KL-Gehalte in den AM waren mit durchschnittlich 16,2 % TS (3 Sorten) deutlich niedriger als in den 0 h-Materialien, in denen der mittlere KL-Gehalt 20,3 % TS betrug. Diese „Anreicherung“ des KL in den 0 h-Materialien gegenüber den AM war aufgrund der Auswaschung hauptsächlich wasserlöslicher Bestandteile (durchschnittlich 30,9 % TS, siehe hierzu Abschnitt 3.1.1) zu erwarten. Im Gegensatz dazu waren die ermittelten ABSL-Gehalte in den AM mit durchschnittlich 22,3 % TS (3 Sorten) höher als in den 0 h-Materialien, in denen ein mittlerer Gehalt von 21,7 % TS bestimmt wurde. Wie bereits beschrieben, beruht die Bestimmung des ABSL auf der Messung der Gesamtaborption bei 280 nm, eine Extraktion oder Abtrennung des Lignins von den anderen Inhaltsstoffen findet nicht statt. Die erhöhten ABSL-Gehalte in den AM, die der direkt getrockneten und vermahlene Pflanze entsprechen, sind somit auf die Mitbestimmung sämtlicher anderer hierin enthaltener löslicher UV-aktiver Substanzen, wie u.a. freie PCS (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1.4.1) oder auch Blattfarbstoffe, zurückzuführen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Bestimmung des ABSL eine Extraktion löslicher Bestandteile vorausgehen muss. Daher kann diese Methode keine sinnvolle Anwendung auf unbehandelte Pflanzenmaterialien wie das AM finden.

In den 0 h-Materialien, die den wasserunlöslichen Fasermaterialien entsprechen, lieferten beide Ligninmethoden vergleichbare Werte. FUKUSHIMA & HATFIELD (2004) stellten beim Vergleich der Methoden einen etwas höheren Gehalt des ABSL gegenüber dem KL fest. In den Zellwänden von Maispflanzen nach der Blüte bestimmten sie 7,7 % KL gegenüber 9,2 % ABSL. Da es sich dabei im Vergleich zu dieser Arbeit um wesentlich unreiferes Material handelte, sind die

absoluten Gehalte nicht mit denen dieser Arbeit zu vergleichen. Es konnte hier aber ebenfalls im Durchschnitt der untersuchten Sorten und Erntezeitpunkte beider Anbaujahre etwas höhere ABSL-Gehalte festgestellt werden. Die maximalen Streuungen zwischen den in Abb. 3.29 zusammengefasst dargestellten Sorten waren hingegen mit beiden Methoden nahezu gleich (KL: 19,3 - 23,4 % TS, ABSL: 19,6 - 23,9 % TS). JUNG & SHEAFFER (2004) bestimmten hingegen in Maisinternodien und ganzen Maispflanzen (inklusive Kolben) etwas niedrigere, aber dennoch mit dem KL vergleichbare Lignin ABSL-Gehalte. Der mittlere KL-Gehalt in den Internodien der sechs untersuchten, genetisch nicht veränderten Maissorten betrug 14,8 % TS gegenüber 14,2 % TS ABSL.

Bei Verwendung von für die Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten geeigneten Untersuchungsmaterialien (hier den 0 h-Materialien) kann keine der beiden Methoden abschließend favorisiert werden. Die Bestimmung des ABSL hat gegenüber dem KL den Vorteil einer sehr schnellen und einfachen Durchführung. Allerdings hat sich die Methode in der Futtermittelanalytik bislang noch nicht etabliert, so dass kaum Literaturdaten zum Vergleich herangezogen werden können. Das KL stellt hingegen eine der am häufigsten verwendeten Ligninbestimmungsmethoden dar. In Studien an vergleichbar reifen Maisrestpflanzenmaterialien wurden ähnliche KL-Gehalte zwischen 15 % und 23 % bezogen auf den Zellwandgehalt (JUNG & BUXTON, 1994, JUNG et al., 2000, JUNG & CASLER, 2006a) bzw. den NDF-Gehalt (MÉCHIN et al., 2005) ermittelt.

3.1.5.2 Bestimmung der Monolignolzusammensetzung

Die Lignine der Gymnospermen sind vorrangig aus G-Einheiten aufgebaut, während Angiospermen je nach Spezies unterschiedliche Verhältnisse von G- und S-Einheiten aufweisen (JOSELEAU & RUEL, 1997). In den Ligninen von Pflanzen aus der Familie der *Gramineen* sind die Monolignole generell in Verhältnissen $(H) < G < S$ nachzuweisen (LEWIS & YAMAMOTO, 1990). *p*-Cumarylalkohol ist nur als Minor Komponente vorhanden und konnte in den Probenchromatogrammen erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Abb. 3.30 zeigt zusammengefasst die ermittelten molaren S/G-Verhältnisse in den 0 h-Materialien. Die entsprechenden molaren Verhältnisse der einzelnen Materialien sind in Tab. 5.18 im Anhang 5.4 aufgelistet. Entgegen den meisten bislang veröffentlichten Studien zur Monolignolzusammensetzung des Lignins aus nicht genetisch veränderten Maispflanzen wurde in dieser Arbeit in allen untersuchten Proben ein höherer molarer Anteil der G-Einheiten im Vergleich zu den S-Einheiten bestimmt. Die ermittelten molaren S/G-Verhältnisse schwankten in den verschiedenen Proben zwischen 0,20 und 0,27. Im Durchschnitt betrug das Verhältnis 0,24. Tab. 3.5 zeigt eine Übersicht einiger bislang veröffentlichten Studien zur Monolignolzusammensetzung von Mais. Für genetisch nicht veränderte Maissorten wurden mit verschiedenen Methoden, Thioacidolyse, Pyrolyse-GC-MS und Nitrobenzol-Oxidation, S/G-Verhältnisse von minimal 0,93 bis zu größer 3 bestimmt.

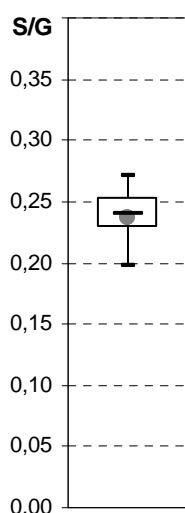


Abb. 3.30: molares Syringyl (S)/ Guaiacyl (G)-Verhältnis in den 0 h-Materialien

Mit den in dieser Arbeit ermittelten S/G-Verhältnissen vergleichbare Werte wurden bislang nur für die brown midrib Mutante von Mais (bm3-Mais) beschrieben (LAPIERRE, 1993, JUNG & BUXTON, 1994, MÉCHIN et al., 2000, MÉCHIN et al., 2005). Bm3-Mais zeichnet sich dadurch aus, dass das Enzym Kaffeesäure O-Methyltransferase (COMT), das im Rahmen der Ligninbiosynthese für die Bildung von Sinapylaldehyd bzw. -alkohol aus 5-Hydroxyconiferylaldehyd bzw. -alkohol verantwortlich ist (siehe hierzu Abschnitt 1.1.3), durch eine genetische Mutation in seiner Aktivität herunterreguliert ist (BARRIÈRE & ARGILLIER, 1993, BARRIÈRE et al., 2003). In den entsprechenden Ligninen von bm3-Mais sind daher deutlich niedrigere Gehalte an S-Einheiten enthalten. Lediglich LU & RALPH (1999) bestimmten mit der auch in dieser Arbeit angewendeten DFRC-Methode ein S/G-Verhältnis von 0,36 für isoliertes Maislignin, ohne aber diese Abweichung von den sonstigen veröffentlichten Studien näher zu kommentieren.

Tab. 3.5: Literaturübersicht zur Bestimmung der Monolignolzusammensetzung in Maispflanzen

	Methoden	Untersuchungsmaterial	S/G-Verhältnis
LAPIERRE (1988, 1993)	Thioacidolyse	Maisinternodien	1,72 0,39 (bm3)
JUNG & BUXTON (1994)	Pyrolyse-GC-MS	45 Mais-Genotypen, Siloreife	1,17 - 2,76
MORRISON et al. (1998)	Pyrolyse-GC-MS	Maisinternodien, a) Mark b) Rindengewebe	1 - 2 1 - über 3
LU & RALPH (1999)	DFRC	isoliertes Maislignin	0,36
JUNG et al. (2000)	Nitrobenzol-Oxidation	16 Mais-Genotypen	0,93 – 2,00
MÉCHIN et al. (2000, 2005)	Thioacidolyse	16 Mais-Genotypen	1,03 - 1,79 0,25 -32 (bm3)
JUNG & CASLER (2006a)	Pyrolyse-GC-MS	Maisinternodien, ~ Siloreife	1,8 -2,4

Die festgestellten Unterschiede der ermittelten Monolignolzusammensetzung scheinen somit auf einem methodischen Unterschied zu beruhen. Dass es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Maissorten um bm3-Mais handelt, kann hingegen ausgeschlossen werden. Dies wäre allein an der für bm3-Mais typischen rotbraunen Färbung der Blattrippen und Stängel zu erkennen gewesen. In den Ligninen entsprechender Pflanzen konnte darüber hinaus ein vermehrter Einbau 5-Hydroxyconiferylalkohol nachgewiesen werden (LAPIERRE et al., 1988). Hieraus stammende 5-Hydroxyguaiacyl-Einheiten (5-OH-G) ebenso wie die daraus entstehenden Benzodioxan-Strukturen (RALPH et al., 2001, MARITA et al., 2003) wären mittels DFRC-Methode in signifikanten Anteilen nachweisbar gewesen (LU & RALPH, 2001). In den Probenchromatogrammen der in dieser Arbeit untersuchten Maisrestpflanzenmaterialien konnten das Dimer allerdings nicht und 5-

OH-G nur in Spuren nachgewiesen werden. Darüber hinaus wären bereits bei der Bestimmung der Phenolcarbonsäuren (Abschnitt 3.1.4) Auffälligkeiten aufgetreten, da bm3-Mais sich auch durch abweichende PCS-Gehalte auszeichnet (BARRIÈRE, 2004).

LU & RALPH (1997,1998) beschrieben hinsichtlich der Anwendbarkeit der DFRC-Methode auf unterschiedliche Probenmaterialien, dass insbesondere bei Zellwandmaterialien aus Maispflanzen vermehrt Probleme bei der Abtrennung der Monolignolderivate von den unvermeidbar auftretenden Kohlenhydratabbauprodukten zu beobachten waren. Dass die erhöhten Anteile der G-Einheiten durch eine Coelution mit Kohlenhydratabbauprodukten verursacht wurden, kann anhand des Massenspektrums des Peaks, das über den gesamten Elutionszeitraum eine hohe Reinheit aufwies, ausgeschlossen werden. Darüber hinaus spricht das von LU & RALPH (1999) ermittelte S/G-Verhältnis von Maislignin sowie das entsprechende, in einer anderen Arbeit veröffentlichte GC-MS-Chromatogramm (LU & RALPH, 1998a) wie bereits erwähnt für einen grundlegenden methodischen Unterschied im Vergleich zu den übrigen Methoden.

Wie bereits beschrieben, ist *pCS* in der pflanzlichen Zellwand überwiegend an Lignin estergebunden. Dabei erfolgt die Esterbindung ausschließlich über die γ -Position der Monolignoleinheiten, hauptsächlich der S-Einheiten, des Lignins (siehe hierzu Abschnitt 1.1.2.1). Die genannten γ -Ester, *pCS*-S- und *pCS*-G-Ester, bleiben mit der in dieser Arbeit angewendeten DFRC-Methode erhalten (LU & RALPH, 1998a, 1999) und konnten in den Probenchromatogrammen der untersuchten Maisrestpflanzenmaterialien eindeutig nachgewiesen werden. Dabei dominierten die Anteile der *pCS*-S-Ester erwartungsgemäß gegenüber den *pCS*-G-Estern. Letztgenannte waren nicht mittels GC-FID bestimmbar, so dass das exakte Verhältnis nicht berechnet werden konnte. Eine Abschätzung anhand des in Abb. 3.31 dargestellten GC-MS-Chromatogramms ergab einen dreifach höheren Anteil der *pCS*-S-Ester gegenüber den *pCS*-G-Estern. LU & RALPH (1999) beschrieben für isoliertes Maislignin ein noch deutlich drastischeres *pCS*-S/*pCS*-

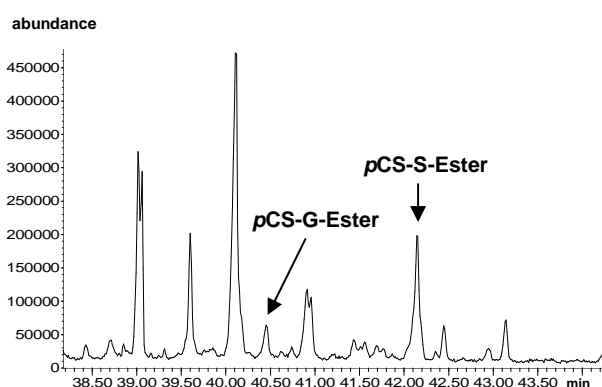


Abb. 3.31: Ausschnitt eines GC-MS-Chromatogramms der untersuchten Maisrestpflanzen (TIC, Massenbereich m/z 50 – 550) (*pCS* = *p*-Cumarsäure, G = Guaiacyl-Einheit, S = Syringyl-Einheit)

G-Verhältnis von 13,73. Aus den dort genannten Freisetzungsraten der Monomere sowie der *pCS*-Ester durch Anwendung der DFRC-Methode lässt sich abschätzen, dass ca. 50 % der S-Einheiten verestert vorlagen. Rechnet man den aus den *pCS*-Estern stammenden Anteil der S-Einheiten mit in das molare S/G-Verhältnis ein, erhöht sich dieses auf $\sim 0,7$, liegt somit aber immer noch deutlich unterhalb der üblicherweise in der Literatur beschriebenen Verhältnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen den verschiedenen Probenmaterialien deutlich unterschiedliche Freisetzungsraten sowohl der Monolignoleinheiten als auch der *p*CS-S-Ester bestimmt. Tab. 3.6 zeigt eine Übersicht der freigesetzten DFRC-Derivate der Monolignoleinheiten und *p*CS-S-Ester. Dabei zeigte sich, dass zeitgleich analysierte Proben stets relativ ähnliche Freisetzungsraten aufwiesen und die festgestellten Schwankungen somit auf einer schlechten Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit der Methode beruhen. Es war zudem eine reziproke Freisetzung der *p*CS-S-Ester zu den Monolignoleinheiten festzustellen. Bei höheren Freisetzungsraten der Monolignoleinheiten (> 600 $\mu\text{mol/g KL}$) war der Anteil der Ester deutlich niedriger (5,9 - 7,5 %), während bei Monolignolfreisetzungsraten zwischen 169 und 226 $\mu\text{mol/g KL}$ der Anteil der *p*CS-S-Ester an den Gesamt-S-Einheiten zwischen 20,2 und 40,8 % schwankte. Trotz der stark unterschiedlichen Freisetzungsraten waren die S/G-Verhältnisse relativ konstant.

Da bei beiden Analysezeitpunkten (Tab. 3.6) die gleichen Reaktionsbedingungen eingehalten wurden, können die Gründe für die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden. Es muss allerdings davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Ergebnisse, insbesondere der Anteile der verestert vorliegenden S-Einheiten, nicht den tatsächlichen Verhältnissen in der Zellwand entsprechen. Die Anwendbarkeit der DFRC-Methode auf die in dieser Arbeit untersuchten Maisrestpflanzenmaterialien bleibt somit zu klären.

Tab. 3.6: Übersicht der Gehalte der freigesetzten Monolignole und *p*-Cumaräure-Syringyl-Ester, des prozentualen Anteil der veresterten Syringyl-Einheiten sowie der molaren Syringyl/Guaiacyl-Verhältnisse mit und ohne Berücksichtigung der veresterten Syringyl-Einheiten in den 0 h-Materialien¹ (zeitgleich untersuchte Proben sind gleichfarbig hinterlegt) (KL = Klason-Lignin, S = Syringyl-Einheit, G = Guaiacyl-Einheit, *p*CS = *p*-Cumarsäure, E = Erntezeitpunkt)

		G	S	<i>p</i> CS-S-Ester	Anteil	molares S/G-Verhältnis	
		($\mu\text{mol/g KL}$)	($\mu\text{mol/g KL}$)	($\mu\text{mol/g KL}$)	veresteter	(inklusive	
					S-Einheiten	veresteter	
					(%)	S-Einheiten)	
DKc 2949 (2004)	E 1	167 \pm 24	41 \pm 7	21 \pm 5	23,1	0,25	0,32
	E 2	149 \pm 20	36 \pm 7	16 \pm 8	20,2	0,24	0,30
DK 233 (2005)	E 1	743 \pm 28	184 \pm 32	25 \pm 1	7,5	0,25	0,27
	E 2	609 \pm 55	162 \pm 41	22 \pm 2	7,3	0,27	0,29
DKc 2949 (2005)	E 1	213 \pm 4	49 \pm 5	31 \pm 11	27,3	0,23	0,32
	E 2	207 \pm 19	47 \pm 0	55 \pm 0	40,8	0,23	0,38
DK 247 (2005)	E 1	508 \pm 163	122 \pm 41	13 \pm 4	5,9	0,24	0,26
	E 2	700 \pm 18	158 \pm 9	20 \pm 6	6,8	0,23	0,24

¹ für die Sorten DK 233 und DK 247 aus 2004 wurde die Bestimmung mit einem verkürzten Temperaturprogramm durchgeführt, weshalb die *p*CS-S-Ester für diese Sorten nicht quantifiziert werden konnten

3.1.5.3 Abschätzung des Ligningehaltes über *p*-Cumarsäure

Wie bereits mehrfach beschrieben, ist *p*CS in der pflanzlichen Zellwand vorwiegend an die γ -Position der S-Einheiten und in geringerem Maße auch der G-Einheiten im Ligninpolymer estergebunden. Esterbindungen an die Arabinoxylane (analog zur FS) konnten nur zu Beginn der Zellwandentwicklung in der Primärwand in geringem Maße nachgewiesen werden. Der *p*CS-Gehalt der Pflanzenzellwand wird daher häufig als Indikator für den Lignifizierungsgrad angesehen (GRABBER et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte die Bindung der *p*CS an Lignin über zwei Methoden bestätigt werden. Zum einen konnten, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, *p*CS-S- und in geringerem Maße auch *p*CS-G-Ester im Rahmen der DFRC-Methode zur Bestimmung der Monolignolzusammensetzung nachgewiesen werden. Zum anderen konnten die Bindungsverhältnisse der PCS nach enzymatischer Hydrolyse der Polysaccharide bestimmt werden. Hierzu wurde, wie in Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben, das 0 h-Material (DK 247, E 1, 2005) exemplarisch mit Driselase hydrolysiert, wobei die Zellwandpolysaccharide nicht aber die Esterbindungen zu den PCS hydrolysiert werden. Während die an Zellwandpolysaccharide gebundenen PCS weitgehend zu löslichen PCS-Oligosacchariden umgesetzt werden, verbleiben die an das Lignin gebundenen PCS im unlöslichen Rückstand. Aus dem erhaltenen Über- sowie Rückstand der enzymatischen Hydrolyse wurden anschließend nach Freisetzung mit alkalischer Hydrolyse die Anteile der monomeren PCS bestimmt. Wie zu erwarten war, konnte im Überstand neben geringen Anteilen von *p*CS überwiegend FS nachgewiesen werden, während im verbliebenen Rückstand vorrangig *p*CS enthalten war. Das Verhältnis *p*CS/FS betrug in dem erhaltenen Rückstand 10,5 gegenüber 2,3 in dem nicht enzymatisch hydrolysierten 0 h-Material. Es konnte somit sowohl anhand der Ergebnisse der DFRC-Methode, als auch anhand des beschriebenen Driselase-Versuchs bestätigt werden, dass *p*CS im Gegensatz zur FS in der pflanzlichen Zellwand der Maisrestpflanze vorrangig an Lignin estergebunden vorliegt. Die Verwendung von *p*CS als Ligninindikator ist somit zumindest hinsichtlich der Bindungsverhältnisse in der pflanzlichen Zellwand denkbar. Inwieweit der *p*CS-Gehalt aber zur Abschätzung des Ligningehaltes geeignet ist, bleibt fraglich. Um dies möglich zu machen, müsste das Verhältnis von *p*CS zum Ligningehalt in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien konstant sein. Abb. 3.32 zeigt zur Übersicht die Verhältnisse der *p*CS zu den ermittelten Ligningehalten in den in beiden Anbaujahren untersuchten 0 h-Materialien. Es wird deutlich, dass die Änderungen zwischen den verschiedenen Untersuchungsmaterialien (Sorten, Erntezeitpunkte und Anbaujahren) zwar insgesamt nicht sehr groß sind, eine Abschätzung des Lignin-

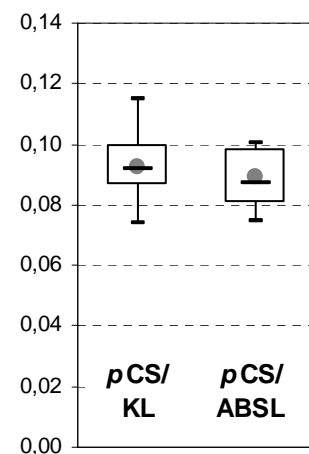


Abb. 3.32: Verhältnis der Gehalte von *p*-Cumarsäure (*p*CS) zu Lignin (Klason-Lignin (KL) und acetylbromidlösliches Lignin (ABSL)) in den 0 h-Materialien

gehalten über den ermittelten p CS-Gehalt, etwa über einen konstanten Korrekturfaktor, wäre aber doch sehr ungenau. Inwieweit der p CS-Gehalt aber eventuell besser als der Ligningehalt geeignet ist, signifikante Sorten- und/oder Reifeunterschiede sowie einen Einfluss auf die ruminale Abbaubarkeit aufzuzeigen, bleibt in den Abschnitten 3.2 und 3.3 dieser Arbeit zu klären.

3.2 Charakterisierung des unverdauten Pflanzenmaterials - Einfluss der Sorte, der Reife sowie des Anbaujahres

Die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten wird sowohl durch den Genotyp (Sorte) als auch durch die Reife der Pflanze beeinflusst. Zudem ist vorstellbar, dass auch die vorherrschenden Witterungsbedingungen wie Sonnenscheindauer, Durchschnittstemperatur und/oder die Niederschlagsmenge einen Einfluss auf das Abreifeverhalten der Pflanzen haben. Im folgenden Abschnitt sollen daher die Einflüsse dieser drei genannten Faktoren (Sorte, Reife und Anbaujahr) auf die ermittelte Zellwandzusammensetzung betrachtet werden. Dabei sollen sowohl signifikante Einflüsse der einzelnen Faktoren als auch mögliche Wechselwirkungen (Interaktionen) zwischen den Faktoren ermittelt werden. Als statistisches Modell bietet sich hierfür die mehrfaktorielle ANOVA an. In Abschnitt 3.1 konnte für verschiedene Zellwandstrukturkomponenten eindeutig gezeigt werden, dass die untersuchten AM nicht für die Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten geeignet sind, weshalb für die folgende statistische Auswertung nur die Betrachtung der Ergebnisse der 0h-Materialien sinnvoll erscheint. Da nicht alle 6 Sorten in beiden Anbaujahren untersucht wurden, erfolgte die statistische Auswertung in zwei Schritten. Der Einfluss der Sorte und des Erntezeitpunktes sowie die Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren wurde zunächst für die im Anbaujahr 2005 untersuchten Sorten im Rahmen einer zweifaktoriellen ANOVA betrachtet. Anschließend wurde für die drei in beiden Jahren untersuchten Sorten zusätzlich eine dreifaktorielle ANOVA unter Berücksichtigung des Anbaujahres sowie der sich daraus ergebenden Interaktionen durchgeführt (siehe hierzu auch 2.2.5).

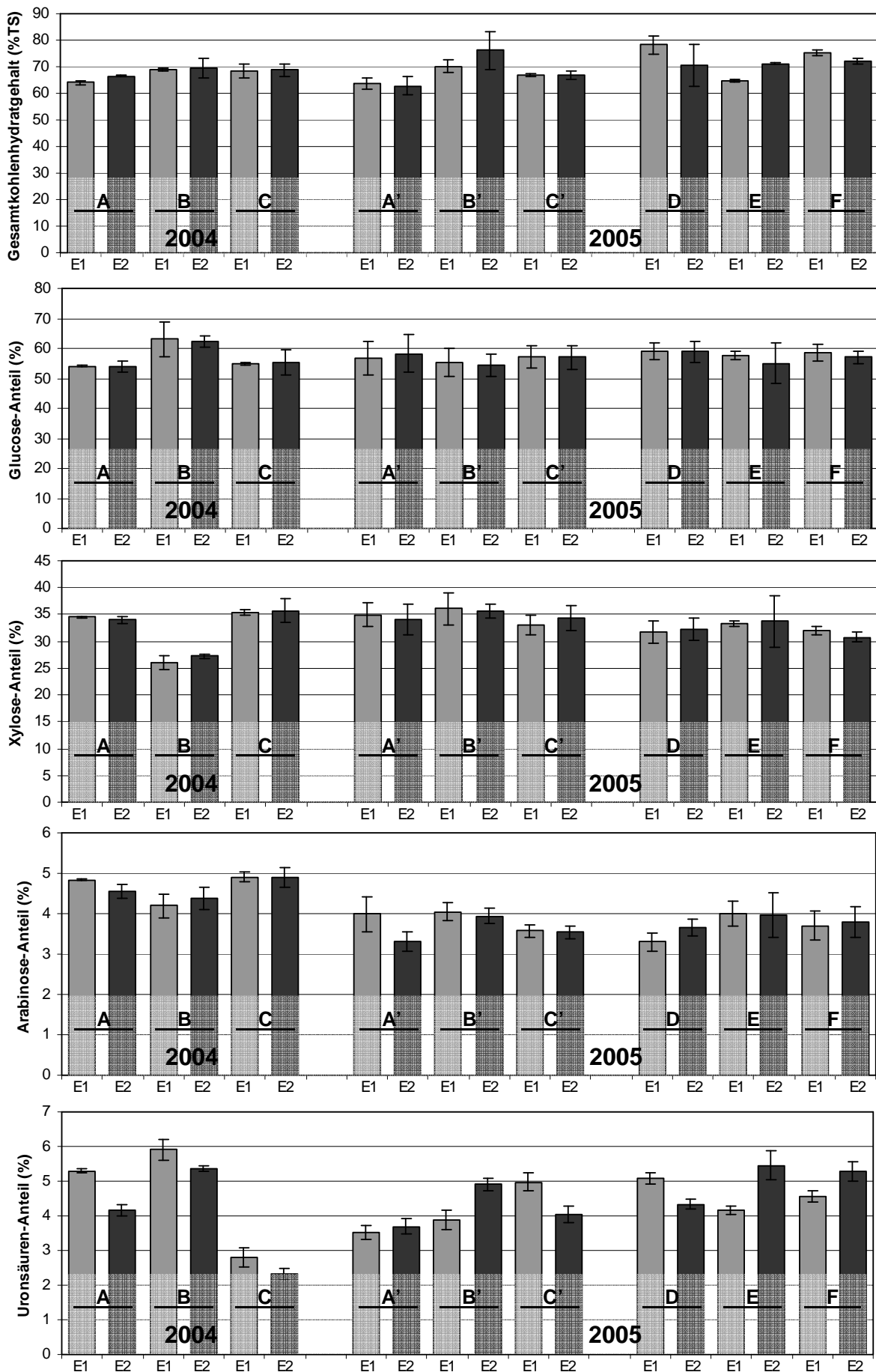
Die statistische Auswertung und Interpretation der Vielzahl an untersuchten Parametern der Zellwandzusammensetzung in den verschiedenen Probenmaterialien ist äußerst komplex. Die Betrachtung der nachgewiesenen signifikanten Haupteffekte und Interaktionen erfolgt daher zunächst unterteilt in die Zellwandpolysaccharide, die zellwandgebundenen Ferulasäuren und das Lignin sowie der an Lignin gebundenen p CS. Abschließend werden die Einflüsse der Sorte, der Reife sowie der Witterungsbedingungen in den Anbaujahren gemeinsam diskutiert. Es sollte im Voraus darauf hingewiesen werden, dass nicht jeder ermittelte, signifikante Unterschied auch zwingend eine relevante Bedeutung für die Zellwandzusammensetzung, die ruminale Verdaubarkeit der Zellwände und damit verbunden dem Futterwert haben muss, was am Beispiel der Uronsäuren kurz erläutert werden soll.

3.2.1 Zellwandpolysaccharide

Abb. 3.33 zeigt die ermittelten Gesamtkohlenhydratgehalte (% TS), die prozentualen Anteile der häufigsten Monosaccharide (Glucose, Xylose, Arabinose, Uronsäuren), das A/X-Verhältnis sowie das Verhältnis der in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4}/\sum X$) in den Oh-Materialien der verschiedenen untersuchten Sorten zu beiden Erntezeitpunkten in beiden Anbaujahren 2004 und 2005. Es wird anhand der dargestellten Diagramme deutlich, dass für die einzelnen Parameter zum Teil deutliche Unterschiede sowohl zwischen den Sorten, den Erntezeitpunkten, aber auch zwischen den Anbaujahren bestehen. Jedoch sind diese zum Teil aber auch konträr. Eine generelle Aussage zum Einfluss der Faktoren Sorten, Reife und Anbaujahr ist anhand dieser Darstellung aufgrund ihrer Komplexität nicht möglich. Sie ist aber notwendig, um die im Rahmen der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA ermittelten signifikanten Unterschiede sowohl der Haupteffekte als auch der Interaktionen, die in Tab. 3.7 aufgeführt sind, interpretieren zu können.

In Bezug auf den Gesamtkohlenhydratgehalt in den Oh-Materialien konnte für die Daten aus 2005 (zweifaktorielle ANOVA) ein signifikanter Einfluss der Sorte nachgewiesen werden. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten A/A', B/B' und C/C' (DK 233, DKc 2949 und DK 247), die in beiden Anbaujahren untersucht wurden, konnten im Rahmen der dreifaktoriellen ANOVA bestätigt werden. Anhand des durchgeführten TUKEY-HSD-Tests werden die untersuchten Sorten in homogene Untergruppen aufgeteilt, wobei zwischen den Untergruppen jeweils signifikante Unterschiede bestehen. Die Faktoren Erntezeitpunkt und Anbaujahr bleiben dabei unberücksichtigt. Aus den in Tab. 3.7 aufgeführten Untergruppen ist ersichtlich, dass die Sorte DK 233 (A') signifikant niedrigere Gesamtkohlenhydratgehalte aufwies als die Sorten DKc 2949, Monumental und DK 287 (B', D und F), während sich DK 247 und DK 281 (C' und E) von den anderen Sorten nicht signifikant unterschieden. In Bezug auf die Erntezeitpunkte konnte in keinem der beiden statistischen Experimente ein signifikanter Unterschied zwischen den Erntezeitpunkten nachgewiesen werden. Bei detaillierter Betrachtung der in Abb. 3.33 dargestellten Gesamtkohlenhydratgehalte über die Reife wird deutlich, dass die meisten der untersuchten Sorten nahezu keine Veränderung über die Reife zeigten. Deutliche Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten konnten nur für die Sorten B' (DKc 2949 in 2005) sowie für die Sorten D und E (Monumental und DK 281) beobachtet werden, allerdings waren diese zueinander gegensätzlich. Während der Gesamtkohlenhydratgehalt der Sorte D (Monumental) zum zweiten Erntezeitpunkt hin abnahm, zeigten die beiden anderen Sorten (B' und E) die entgegengesetzte Tendenz. Anhand der in dieser Arbeit gewählten Erntezeitpunkte konnte somit insgesamt kaum ein Einfluss der Reife auf den Gesamtkohlenhydratgehalt der Zellwände festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Anbaujahren waren ebenfalls nicht signifikant.

3 Ergebnisse und Diskussion



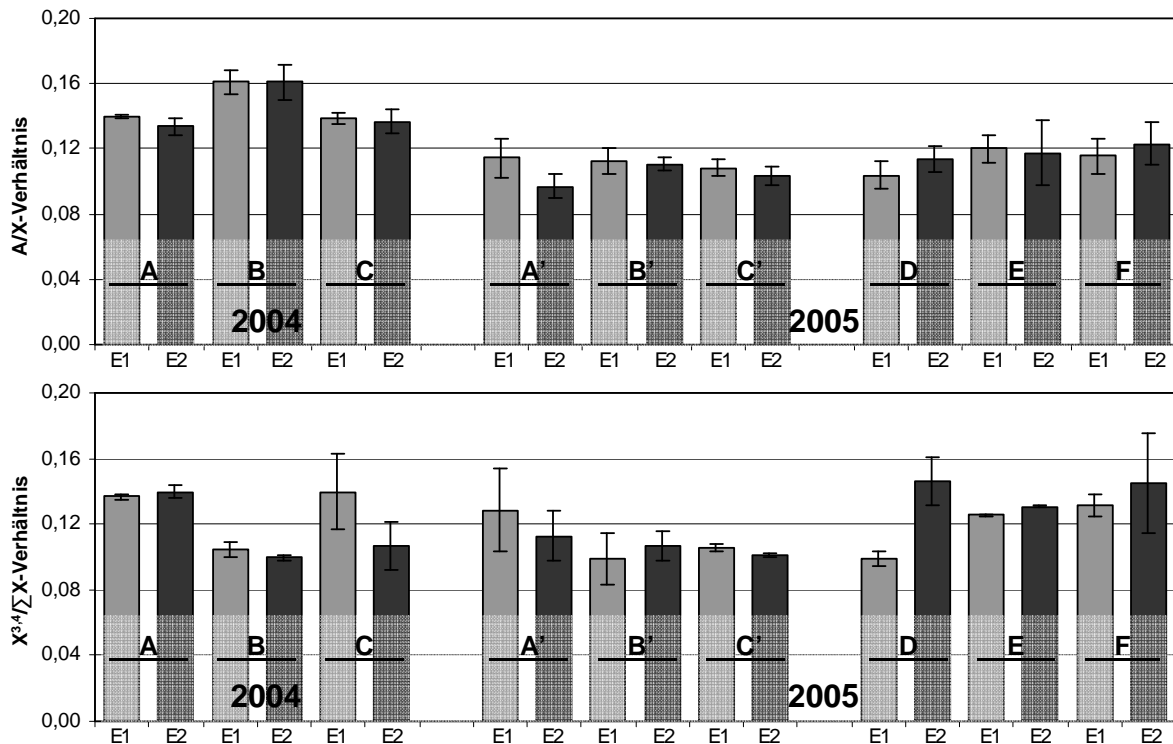


Abb. 3.33: Übersicht der Gesamtkohlenhydratgehalte (GesKH, % Trockenmasse) sowie der prozentualen Anteile der Hauptmonosaccharide in den Zellwandpolysacchariden der untersuchten Sorten in beiden Anbaujahren (2004 und 2005) und beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) (A/X = Arabinose/Xyloseverhältnis, $X^{3,4}/\Sigma X$ = Verhältnis der in O-3 verknüpften Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose, A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D = Monumental (2005), E = DK 281 (2005), F = DK 287 (2005))

Hinsichtlich der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide in den Oh-Materialien wurden für die zwei- bzw. dreifaktorielle ANOVA zum Teil unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So ergaben sich im Rahmen der zweifaktoriellen ANOVA für die Daten aus 2005 signifikante Sortenunterschiede nur für die prozentualen Anteile der Xylose und der Uronsäuren. Die prozentualen Anteile der Glucose und der Arabinose waren in den sechs Sorten hingegen nicht signifikant unterschiedlich (siehe hierzu auch Abb. 3.33). Werden nur die drei Sorten betrachtet, die in beiden Anbaujahren (dreifaktorielle ANOVA) untersucht wurden, wird hingegen zusätzlich auch ein signifikanter Sortenunterschied in Bezug auf den prozentualen Glucose-Anteil festgestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten konnten in beiden statistischen Experimenten lediglich für die Uronsäuren festgestellt werden. Allerdings waren für die Daten aus 2005 die Uronsäuren-Anteile in E2 signifikant höher als in E1, während bei Betrachtung der Daten der Sorten A/A' – C/C' aus beiden Anbaujahren der Uronsäuren-Anteil in E1 signifikant höher war als in E2. Insgesamt kann also auch hier kein eindeutiger Einfluss der Reife festgestellt werden.

Für Xylose und Arabinose wurden signifikante Unterschiede zwischen den Anbaujahren festgestellt. Dabei ist, wie anhand der Abb. 3.33 deutlich wird, der Xylose-Anteil insbesondere für die Sorte DKc 2949 (B) in 2004 signifikant niedriger als in 2005 (B'), während die Arabinose-Anteile in allen drei Sorten in 2004 höher sind als in 2005. Dies wird zusätzlich durch die nachge-

Tab. 3.7: Übersicht der im Rahmen der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA ermittelten Signifikanzniveaus der Haupteffekte (Sorte, Erntezeitpunkt (EZP/E) und Anbaujahr (nur bei dreifaktorieller ANOVA)) und der jeweils möglichen Interaktionen auf abhängige Variablen der Zellwandpolysaccharide. Bei einem Wert kleiner von 0,05 (*) liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ein signifikanter Unterschied zwischen den zugrunde liegenden Mittelwerten vor. Übersicht der nach dem TUKEY-HSD-Test ermittelten homogenen Untergruppen für den Faktor Sorte (a ist signifikant niedriger als b, usw.). (GesKH (%) = Gesamtkohlenhydratgehalt (% Trockensubstanz), Glc (%), Xyl (%), Ara (%) und Urons. (%) = prozentuale Anteile von Glucose, Xylose, Arabinose und den Uronsäuren an der Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide, A/X = Arabinose/Xylose-Verhältnis und $X^{3,4}/\sum X$ = Verhältnis der in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten an der Gesamt-Xylose)

Zweifaktorielle ANOVA (nur Daten aus 2005)							
	GesKH (%)	Glc (%)	Xyl (%)	Ara (%)	Urons. (%)	A/X	$X^{3,4}/\sum X$
Haupteffekte							
Sorte	0,003*	0,110	0,001*	0,034 ¹	0,000*	0,196	0,030*
Homogene Untergruppen der Sorten aus TUKEY-HSD-Test							
DK 233 (A')	a		bc		a		ab
DKc 2949 (B')	b		c		b		a
DK 247 (C')	ab		abc		bc		ab
Monumental (D)	b		ab		bcd		ab
DK 281 (E)	ab		abc		cd		ab
DK 287 (F)	b		a		d		b
EZP	0,992	0,356	0,356	0,513	0,002*	0,663	0,364
E2 > E1							
Interaktion							
Sorte x EZP	0,095	0,726	0,726	0,134	0,000*	0,501	0,086
Homogene Untergruppen aus TUKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4							
Dreifaktorielle ANOVA (nur Daten der Sorten A, B und C)							
	GesKH (%)	Glc (%)	Xyl (%)	Ara (%)	Urons. (%)	A/X	$X^{3,4}/\sum X$
Haupteffekte							
Sorte	0,002*	0,017*	0,000*	0,435	0,000*	0,004*	0,005*
Homogene Untergruppen der Sorten (TUKEY-HSD-Test)							
DK 233 (A/A')	a	a	b		b	a	b
DKc 2949 (B/B')	b	b	a		c	b	a
DK 247 (C/C')	ab	a	b		a	a	ab
EZP	0,272	0,917	0,585	0,051	0,001*	0,076	0,089
E1 > E2							
Anbaujahr	0,941	0,344	0,000*	0,000*	0,092	0,000*	0,030*
2004>2005 2004>2005 2004>2005 2004>2005							
Interaktionen							
Sorte x EZP	0,583	0,743	0,195	0,005 ¹	0,000 ¹	0,597	0,351
Sorte x Jahr	0,103	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,054	0,257
Jahr x EZP	0,807	0,865	0,666	0,073	0,000 ¹	0,422	0,763
Sorte x Jahr x EZP	0,333	0,824	0,351	0,450	0,000*	0,797	0,324
Homogene Untergruppen aus TUKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4							

¹ Signifikanzniveau der ANOVA < 0,05, aber kein signifikanten Unterschiede in TUKEY-HSD-Test

wiesene signifikante Interaktion zwischen Sorte und Anbaujahr, die für die prozentualen Anteile sämtlicher aufgeführten Monosaccharide gefunden wurde, bestätigt. Anhand dieser nachgewiesenen Interaktion wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen den Anbaujahren für die verschiedenen Sorten nicht gleich waren. Die Sorten reagierten hinsichtlich der Polysaccharidzusammensetzung somit, wie beschrieben, signifikant unterschiedlich auf die Veränderungen der Witterungsbedingungen in den Anbaujahren.

Für die prozentualen Anteile der Uronsäuren konnten nicht nur signifikante Unterschiede zwischen den Sorten und Erntezeitpunkten festgestellt werden, sondern auch signifikante Wechselwirkungen zwischen allen drei festen Faktoren (Tab. 3.7, Abb. 3.33). In Bezug auf die ruminale Verdaubarkeit ist der Anteil der Uronsäuren in der pflanzlichen Zellwand allerdings von geringfügiger Bedeutung, so dass diese nachgewiesenen Signifikanzen nicht überwertet werden sollten. Zudem kann bei den in dieser Arbeit in Summe bestimmten Uronsäuren nicht differenziert werden, welcher Anteil aus den im Allgemeinen leicht und vollständig abbaubaren Pektinen (HATFIELD et al., 1999) stammt und welcher Anteil aus den GAX, deren Abbaubarkeit eventuell über deren Zusammensetzung, vor allem aber über das Ausmaß der FS-Cross-Links beeinflusst werden könnte.

Für die ermittelten A/X-Verhältnisse konnte, wie aufgrund der Ergebnisse für Xylose und Arabinose zu erwarten war, bei der dreifaktoriellen ANOVA ein signifikant erhöhtes Verhältnis für DKc 2949 (B, 2004) sowie ein signifikanter Unterschied zwischen den Anbaujahren (2004 > 2005) festgestellt werden. Bei Betrachtung der Daten aus 2005 wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den sechs Sorten festgestellt. Die Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten sowie die Wechselwirkungen zwischen den Hauptfaktoren waren in beiden statistischen Experimenten nicht signifikant. Anhand der Darstellung der A/X-Verhältnisse der Oh-Materialien in Abb. 3.33 wird zudem wiederum deutlich, dass die Unterschiede zwischen den Anbaujahren gegenüber den Unterschieden zwischen den Sorten weitaus bedeutender waren.

Wie bereits beschrieben, ist FS nur an solche Arabinose-Einheiten gebunden, die an die O-3-Position der Xylose-Einheiten des Xylanhauptstranges gebunden sind. Dieser Anteil kann durch den Quotienten $X^{3,4}/\sum X$ beschrieben werden (siehe hierzu auch 3.1.3.3). Beim Vergleich der Diagramme des A/X-Verhältnisses sowie des Quotienten der in O-3-Position glykosidisch verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4}/\sum X$) fallen zum Teil deutlich unterschiedliche Verhältnisse zwischen Sorten, Erntezeitpunkten und Anbaujahren auf. Insbesondere gilt dies für die Sorte DKc 2949 in 2004 (B), die das höchste A/X-Verhältnis aber zugleich das niedrigste $X^{3,4}/\sum X$ -Verhältnis aufwies. Im Gegensatz zur statistischen Auswertung der A/X-Verhältnisse konnten für die $X^{3,4}/\sum X$ -Verhältnisse mit beiden statistischen Experimenten (siehe Tab. 3.7) signifikante Sortenunterschiede festgestellt werden. Dabei war das $X^{3,4}/\sum X$ -Verhältnis von Sorte B/B' (DKc 2949) signifikant niedriger als von Sorte F (DK 287) (zweifaktorielle ANOVA

der Daten aus 2005) sowie von Sorte A (DK 233) bei der dreifaktoriellen ANOVA. Die übrigen Sorten unterschieden sich hingegen weder signifikant voneinander noch von Sorte B und F.

Wie bereits erwähnt ist das erniedrigte $X^{3,4}/\sum X$ -Verhältnis von Sorte B (DKc 2949, 2004) insofern interessant, da das A/X-Verhältnis dieser Sorte signifikant erhöht war. Das Verhältnis der gesamten verknüpften Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4+2,4}/\sum X$, Verhältnisse hier nicht dargestellt) war in der Sorte DKc 2949 (B) ebenfalls nicht erhöht. Der erhöhte Anteil an Arabinose scheint somit auf das gleiche Verhältnis von verzweigten Xylose-Einheiten verteilt zu sein. Diese Ergebnisse deuten auf eine höhere Komplexität der Arabinoseseitenketten, die z.B. zusätzlich Xylose enthalten können, in Sorte B (DKc 2949) hin. Glykosidisch verzweigte Arabinose-Einheiten (2-Araf) wurden, wie in Abschnitt 3.1.3.3 beschrieben, insgesamt nur in geringen Anteilen nachgewiesen. Ein deutlich erhöhter Anteil wurde für die Sorte DKc 2949 aber nicht festgestellt (siehe Tab. 5.13 im Anhang 5.4), so dass oligomere Arabinoseseitenketten für diese Sorte nicht direkt bestätigt werden können.

Analog zum A/X-Verhältnis wurde auch beim Quotienten $X^{3,4}/\sum X$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Anbaujahren (2004 > 2005) festgestellt, dabei waren insbesondere die Verhältnisse der Sorten A/A' und C/C' (DK 233 und DK 247) in 2005 niedriger als in 2004.

3.2.2 Zellwandgebundene Ferulasäuren

Die Gehalte der ester- und ethergebundenen FS sowie der Summe der estergebundenen DFS in den untersuchten Sorten in beiden Anbaujahren (2004 und 2005) zu beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) sind in Abb. 3.34 dargestellt. Die Abbildung zeigt zudem die daraus berechneten Dimerisierungsgrade der estergebundenen FS und den prozentualen Anteil der ethergebundenen FS. Diese detaillierte Darstellung dient der Veranschaulichung der im Rahmen der zwei- bzw. dreifaktoriellen ANOVA ermittelten signifikanten Einflüsse der Faktoren Sorte, Erntezeitpunkt und Anbaujahr sowie der entsprechenden Interaktionen. Die dazugehörigen Signifikanzniveaus und die aus dem TUKEY-HSD-Test ermittelten homogenen Untergruppen sind in Tab. 3.8 sowie in Tab. 5.20 (im Anhang 5.4) aufgeführt.

Hinsichtlich der absoluten Gehalte der zellwandgebundenen FS konnten für die estergebundenen FS (FS_{est}) signifikante Sortenunterschiede in beiden statistischen Experimenten nachgewiesen werden. Dahingegen waren die Unterschiede der Gehalte der ethergebundenen FS (FS_{eth}) zwischen den Sorten nicht signifikant. Für die DFS-Gehalte ergaben sich lediglich bei der Betrachtung der drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten signifikante Unterschiede. Dabei war der DFS-Gehalt in DK 233 (A/A') gegenüber den Sorten DKc 2949 (B/B') und DK 247 (C/C') deutlich erhöht. Die estergebundene FS spiegelt lediglich den Anteil der gesamten, zellwandgebundenen FS wieder, der weder an Cross-Links zum Lignin noch in Cross-Links innerhalb der Arabinoxylanstränge beteiligt ist. Für die Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten in Hinblick auf die ruminale Verdaubarkeit ist dieser Gehalt somit nur von untergeordnetem Interesse.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zellwandpolysaccharide wurden für die zellwandgebundenen FS zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den beiden Erntezeitpunkten nachgewiesen. Dabei wurden im Rahmen der zweifaktoriellen ANOVA (sechs Sorten aus 2005) nur für die Gehalte der DFS, mit $E2 > E1$, signifikante Unterschiede über die Reife ermittelt (siehe hierzu auch Abb. 3.34). Bei der dreifaktoriellen ANOVA wurde zusätzlich auch für die Gehalte FS_{est} und FS_{eth} ein signifikanter Reifeinfluss festgestellt. Während die Gehalte der ester- und ethergebundenen, monomeren FS in E1 signifikant erhöht waren, konnten für die DFS analog zur zweifaktoriellen ANOVA erhöhte Gehalte in E2 nachgewiesen werden. Anhand der Darstellung (Abb. 3.34) wird allerdings deutlich, dass ein signifikant erhöhter DFS-Gehalt nicht allgemein für alle Untersuchungsmaterialien bestätigt werden konnte. So zeigten die Sorten B und C (DKc 2949 und DK 247) in 2004 keinen erhöhten DFS-Gehalt, wohl aber in 2005. Diese beiden Sorten zeigten somit zwischen den Anbaujahren deutlich unterschiedliche DFS-Gehalte zum zweiten Erntezeitpunkt. Die nachgewiesene signifikante Interaktion zwischen Jahr und Erntezeitpunkt bestätigt dies, wenn auch die Unterschiede zwischen den Anbaujahren, ohne Einbezug des Erntezeitpunktes, nicht signifikant (0,893) waren. Signifikante Unterschiede zwischen den Anbaujahren ergaben sich hingegen für die Gehalte estergebundener FS, die in 2004 niedriger waren als in 2005. Darüber hinaus konnten für diese Variable auch signifikante Wechselwirkungen zwischen Sorte und Erntezeitpunkt sowie zwischen allen drei Hauptfaktoren festgestellt werden, was insbesondere anhand der Ergebnisse der Sorte DK 233 (A/A') deutlich wird, deren FS_{est} -Gehalt in E2 2005 deutlich höher ist als in E1 und E2 (2004).

Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, sind die absoluten Gehalte der zellwandgebundenen FS nur bedingt für die Beurteilung des Einflusses der zellwandgebundenen FS auf die ruminale Abbaubarkeit geeignet. Es soll daher im Folgenden anhand des Dimerisierungsgrades der estergebundenen FS ($= \frac{\sum DFS}{(\sum DFS + FS_{est})} * 100$) sowie anhand des prozentualen Anteils der ethergebundenen FS ($= \frac{FS_{eth}}{(FS_{eth} + FS_{est})} * 100$) das Ausmaß der FS-Cross-Links unter dem Einfluss der Faktoren Sorte, Reife und Anbaujahr sowie der entsprechenden Interaktionen beurteilt werden.

Für den Dimerisierungsgrad der estergebundenen FS ergaben sich in beiden statistischen Experimenten signifikante Unterschiede zwischen den Sorten und den Erntezeitpunkten sowie signifikante Interaktionen zwischen den beiden genannten Faktoren. Dabei war der Dimerisierungsgrad der Sorten A und B (DK 233 und DKc 2949) signifikant höher als in den anderen vier Sorten. Der Dimerisierungsgrad der Sorte F (DK 287) war zudem signifikant niedriger als in Sorte C und E (DK 247 und DK 281). Über die Reife konnte eine signifikante Erhöhung der Dimerisierung estergebundener FS nachgewiesen werden, die für die sechs in 2005 untersuchten Sorten durchschnittlich 4,1 % betrug. Die Unterschiede zwischen den Anbaujahren waren nicht signifikant, es konnte aber eine signifikante Wechselwirkung zwischen Sorte, Erntezeitpunkt und

3 Ergebnisse und Diskussion

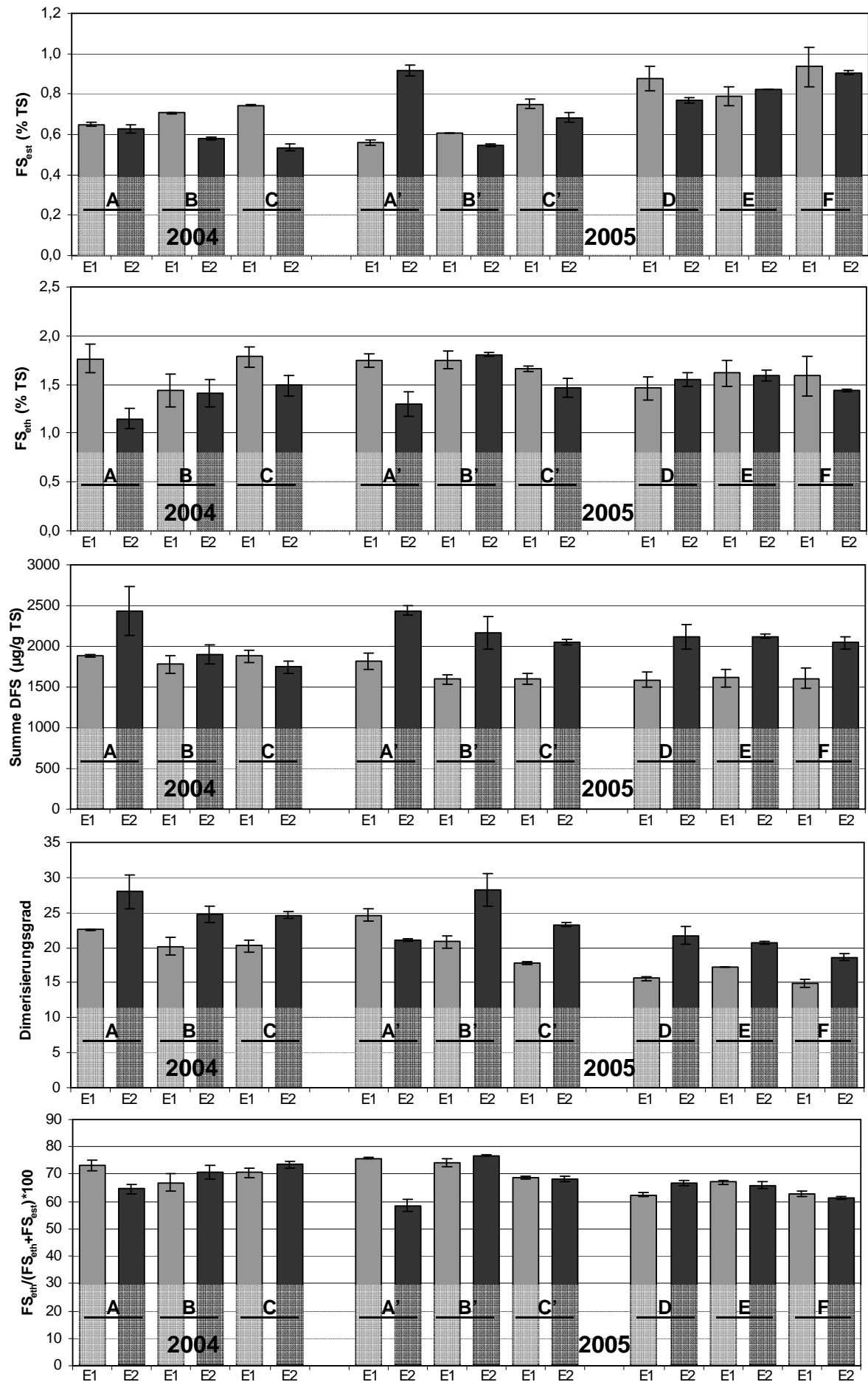


Abb. 3.34: Übersicht der Gehalte der ester- und ethergebundenen Ferulasäure (FS_{est}/FS_{eth}) (% Trockenmasse), der estergebundenen Diferulasäuren (DFS) ($\mu\text{g/g}$), dem Dimerisierungsgrad ($\sum DFS/(\sum DFS+FS_{est}) * 100$) sowie dem prozentualen Anteil der ethergebundenen Ferulasäure an der gesamten Ferulasäure ($FS_{eth}/(FS_{eth}+FS_{est}) * 100$) der untersuchten Sorten in beiden Anbaujahren (2004 und 2005) und beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D= Monumental (2005), E = DK 281 (2005), F = DK 287 (2005))

Anbaujahr nachgewiesen werden. Wie bereits für die Zellwandpolysaccharide beschrieben, konnte also auch hier eine komplexe Beeinflussung der Zellwandzusammensetzung durch die Faktoren Sorte, Anbaujahr und Erntezeitpunkt festgestellt werden. Das heißt, dass die Sorten sich zu den beiden Erntezeitpunkten in den verschiedenen Anbaujahren nicht gleich verhalten. Deutlich wird dies insbesondere anhand der Ergebnisse der Sorte A (DK 233). Aufgrund des stark erhöhten Gehaltes der estergebundenen, monomeren FS ist der Dimerisierungsgrad in E2 2005 signifikant niedriger als in E1 und E2 (2004).

Der Anteil der ethergebundenen FS an der gesamten monomeren FS kann als Maß für das Cross-Linking zwischen Polysacchariden und Lignin herangezogen werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die hier bestimmbaren ethergebundenen FS nur ein Teil der gesamten möglichen FS-Lignin Bindungstypen darstellen. Der beschriebene Anteil der ethergebundenen FS könnte somit eventuell das tatsächliche Ausmaß der Polysaccharid-Lignin-Cross-Links unterrepräsentieren (siehe hierzu auch 3.1.4.3). Für Sorte B (DKc 2949) wurde der höchste prozentuale Anteil ethergebundener FS nachgewiesen. Der Anteil war signifikant höher als in allen anderen fünf Sorten, die signifikant niedrigsten Gehalte wurden in Sorte F (DK 287) nachgewiesen. Inwieweit diese Sortenunterschiede auch den ruminalen TS- oder Polysaccharidabbau beeinflussen, wird in Abschnitt 3.3 dieser Arbeit diskutiert.

Die Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten waren ebenfalls signifikant, wobei in E1 höhere Anteile ethergebundener FS nachgewiesen wurden. Bei Betrachtung der Anteile in den einzelnen Untersuchungsmaterialien (Abb. 3.34) fällt allerdings auf, dass dieser signifikante Reifeunterschied vor allem durch die Daten der Sorte A (DK 233) verursacht wird, während die übrigen Sorten über die Reife kaum unterschiedliche Gehalte aufwiesen. Bestätigt wird dies durch die signifikante Wechselwirkung zwischen Sorte und Erntezeitpunkt, die darauf hinweist, dass sich mindestens eine der Sorten über die Reife signifikant anders verhält als die Übrigen. Die Unterschiede zwischen den Anbaujahren waren, wie bereits für die anderen Variablen der zellwandgebundenen FS (mit Ausnahme von FS_{est}) beschrieben, nicht signifikant.

Anhand der in Tab. 3.8 dargestellten Signifikanzniveaus wird deutlich, dass für einige Interaktionen zwischen den verschiedenen Haupteffekten im Rahmen der ANOVA zwar Signifikanzniveaus $< 0,05$ erreicht wurden, sich aber beim nachfolgenden TUKEY-HSD-Test keine signifikant verschiedenen Untergruppen ergaben (entsprechende Signifikanzniveaus sind mit ¹ gekennzeichnet). Diese Interaktionen wurden daher als nicht („tatsächlich“) signifikant angesehen. Auf eine alternative Anwendung des empfindlicheren LSD-Tests (least significant

difference), der in Futtermittelstudien häufig verwendet wird (JUNG, 2003, ABEDON et al., 2006, JUNG & CASLER, 2006a), wurde in dieser Arbeit bewusst verzichtet.

Tab. 3.8: Übersicht der im Rahmen der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA ermittelten Signifikanzniveaus der Haupteffekte (Sorte, Erntezeitpunkt (EZP/E) und Anbaujahr (nur bei dreifaktorieller ANOVA)) und der jeweils möglichen Interaktionen auf abhängige Variablen der zellwandgebundenen Ferulasäuren (FS_{est} = Gehalt estergebundener Ferulasäure (% Trockenmasse), FS_{eth} = Gehalt ethergebundener Ferulasäure (% Trockensubstanz), DFS = Diferulasäuren-Gehalt). Bei einem Wert unterhalb von 0,05 (*) liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ein signifikanter Unterschied zwischen den zugrunde liegenden Mittelwerten vor. Übersicht der nach dem TuKEY-HSD-Test ermittelten homogenen Untergruppen für den Faktor Sorte (a ist signifikant niedriger als b, usw.).

Zweifaktorielle ANOVA		(nur Daten aus 2005)			
	FS _{est} (%)	FS _{eth} (%)	DFS (µg/g)	Dimerisierungsgrad	Anteil ethergebundener FS (%)
Haupteffekte					
Sorte	0,000*	0,120	0,093	0,000*	0,000*
Homogene Untergruppen der Sorten aus TuKEY-HSD-Test					
DK 233 (A')	b			c	c
DKc 2949 (B')	a			c	d
DK 247 (C')	b			b	c
Monumental (D)	bc			ab	b
DK 281 (E)	bc			b	bc
DK 287 (F)	c			a	a
EZP	0,294	0,078	0,000*	0,000*	0,000*
			E1 < E2	E1 < E2	E1 > E2
Interaktion					
Sorte x EZP	0,000*	0,151	0,932	0,000*	0,000*
Homogene Untergruppen aus TuKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4					
Dreifaktorielle ANOVA		(nur Daten der Sorten A, B und C)			
	FS _{est} (%)	FS _{eth} (%)	DFS (µg/g)	Dimerisierungsgrad	Anteil ethergebundener FS (%)
Haupteffekte					
Sorte	0,000*	0,284	0,006*	0,002*	0,002*
Homogene Untergruppen der Sorten (TuKEY-HSD-Test)					
DK 233 (A/A')	b		b	b	a
DKc 2949 (B/B')	a		a	b	b
DK 247 (C/C')	b		a	a	ab
EZP	0,035*	0,010*	0,000*	0,000*	0,002*
	E1 > E2	E1 > E2	E1 < E2	E1 < E2	E1 > E2
Anbaujahr	0,002*	0,082	0,893	0,154	0,479
	2004 < 2005				
Interaktionen					
Sorte x EZP	0,000*	0,011*	0,086	0,002*	0,000*
Sorte x Jahr	0,000 ¹	0,040 ¹	0,913	0,005 ¹	0,000 ¹
Jahr x EZP	0,000 ¹	0,358	0,027*	0,112	0,007 ¹
Sorte x Jahr x EZP	0,000*	0,947	0,350	0,001*	0,131
Homogene Untergruppen aus TuKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4					

¹ Signifikanzniveau der ANOVA < 0,05, aber kein signifikanten Unterschiede in TuKEY-HSD-Test

Mit der Anzahl der zu vergleichenden Mittelwerte (Anzahl der einzelnen Tests) steigt die Wahrscheinlichkeit irrtümlicherweise eine richtige Nullhypothese zu verwerfen, d.h. einen signifikanten Unterschied zu finden, wo eigentlich keiner vorliegt. Diese Fehlerwahrscheinlichkeit wird auch als α -Wert bezeichnet (BÄRLOCHER, 1999). Der LSD-Test ist der empfindlichste aller möglichen post-hoc-Tests, das heißt er findet am ehesten signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten. Da er aber lediglich eine Vielzahl von t-Tests durchführt und keine Korrektur des α -Wertes beinhaltet, findet er „zu viele“ Signifikanzen. Der in dieser Arbeit angewendete TUKEY-Test verwendet hingegen für alle paarweisen Vergleiche dieselbe Distanz, wodurch der α -Wert und somit die Fehlerwahrscheinlichkeit einer falsch positiven Signifikanz verringert wird. Der Test wird deshalb auch als „honestly significant difference“ HSD bezeichnet (FOSTER, 1998, GEORGE & MALLERY, 1999).

Neben dem beschriebenen Dimerisierungsgrad der estergebundenen FS und dem prozentualen Anteil der ethergebundenen FS ist insbesondere der Ferulasäure-Substitutionsgrad der GAX ein wichtiges strukturelles Merkmal der pflanzlichen Zellwände. Zur Beschreibung des Ferulasäure-Substitutionsgrades wurden in Abschnitt 3.1.4.4 dieser Arbeit verschiedene molare Faktoren zwischen den zellwandgebundenen FS und dem Xylosegehalt eingeführt, wie dem Anteil der ester- bzw. ethergebundenen monomeren FS zum Xylosegehalt ($FS_{est}/Xyl*100$ bzw. $FS_{eth}/Xyl*100$) sowie dem Anteil der DFS zum Xylosegehalt ($DFS/Xyl*100$) und dem Anteil der hypothetisch vor der Dimerisierung vorhandenen estergebundenen FS zum Xylosegehalt ($(FS_{est}+2xDFS)/Xyl*100$). Abb. 3.35 enthält eine Übersicht der ermittelten Quotienten in den verschiedenen Oh-Materialien der Sorten zu beiden Erntezeitpunkten in beiden Anbaujahren. Die entsprechenden Signifikanzniveaus für die Haupteffekte (Sorte, Erntezeitpunkt und Anbaujahr) sowie die Interaktionen sind in Tab. 3.9 aufgeführt.

Für alle vier gebildeten Quotienten wurden bei beiden statistischen Experimenten signifikante Unterschiede zwischen den Sorten festgestellt. Während für die sechs in 2005 untersuchten Sorten (zweifaktorielle ANOVA) lediglich für den Quotienten DFS/Xyl mit $E1 < E2$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Erntezeitpunkten festgestellt werden konnte, zeigten sich bei der Betrachtung der drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten für alle vier Quotienten signifikante Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten. Dabei waren die Quotienten, mit Ausnahme des bereits erwähnten Anteils der DFS bezogen auf den Xylosegehalt, in E1 höher als in E2. Dies könnte durch eine vermehrte Quervernetzung der FS mit zunehmender Reife und einer damit verbundenen geringeren Freisetzung der FS mit den angewendeten analytischen Methoden begründet sein. Bei Betrachtung der einzelnen Quotienten in Abb. 3.35 fällt, wie bereits bei verschiedenen anderen Variablen der Zellwandzusammensetzung beobachtet wurde, auf, dass die Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten mit $E1 > E2$ zwar insgesamt signifikant waren, zwischen den Sorten und in den beiden Anbaujahren aber zum Teil deutliche Unterschiede erkennbar waren. Dies wird durch die Vielzahl der nachgewiesenen, signifikanten Interaktionen zwischen den verschiedenen Haupteffekten deutlich. Für die sechs in beiden

Anbaujahren untersuchten Sorten wurden für alle vier den Ferulasäure-Substitutionsgrad beschreibenden Quotienten eine signifikante Wechselwirkung zwischen Sorte und Erntezeitpunkt nachgewiesen. Für die drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten ergaben sich darüber

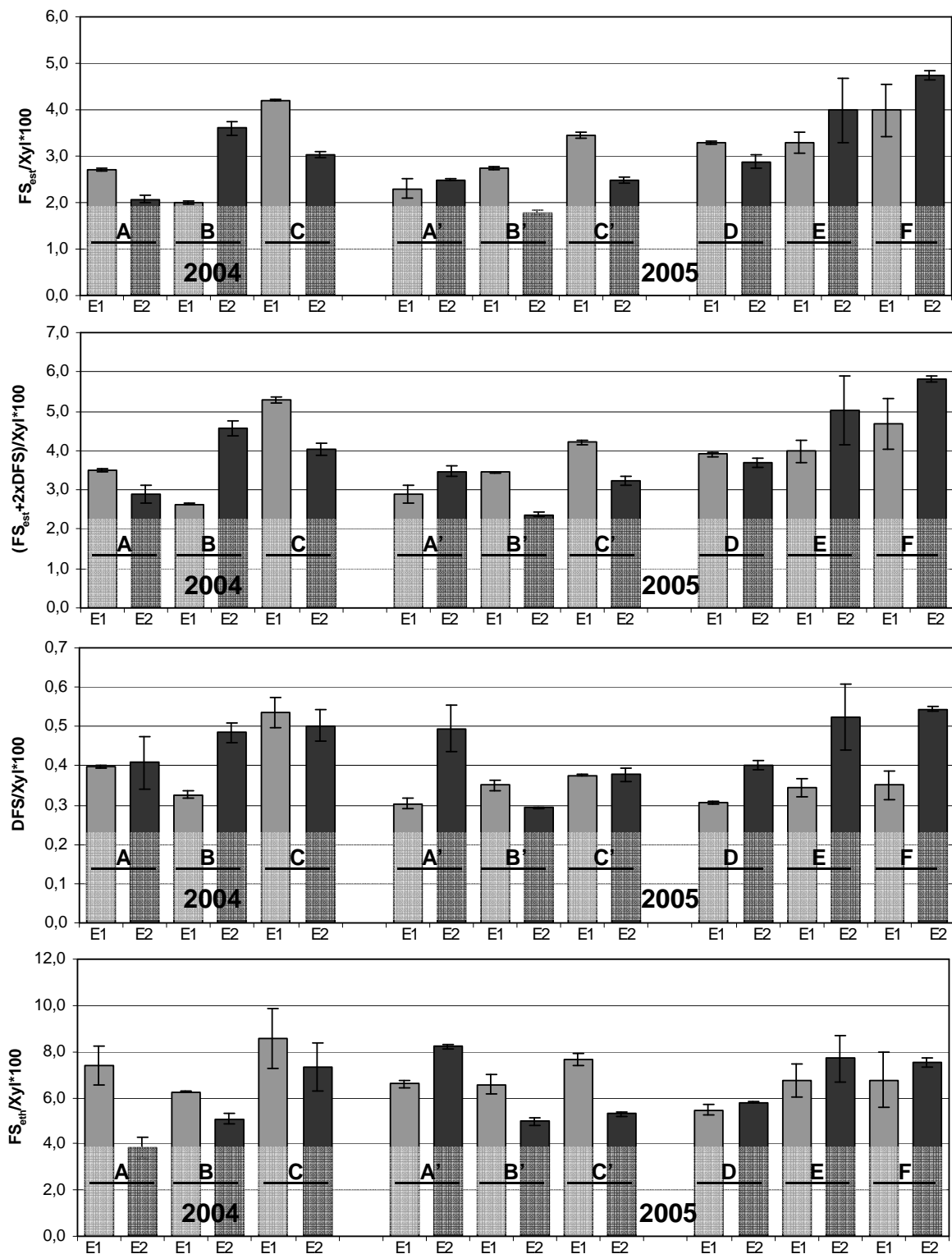


Abb. 3.35: Übersicht der verschiedenen Quotienten zum Ferulasäure-Substitutionsgrad der Glucuronoarabinoxylane der untersuchten Sorten in beiden Anbaujahren (2004 und 2005) und beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) (FS_{est} = estergebundene Ferulasäure, FS_{enth} = ethergebundene Ferulasäure, DFS = Diferulasäuren, Xyl = Xylose, A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D = Monumental (2005), E = DK 281 (2005), F = DK 287 (2005))

Tab. 3.9: Übersicht der im Rahmen der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA ermittelten Signifikanzniveaus der Haupteffekte (Sorte, Erntezeitpunkt (EZP/E) und Anbaujahr (nur bei dreifaktorieller ANOVA)) und der jeweils möglichen Interaktionen auf die Quotienten zum Ferulasäure-Substitutionsgrad der Glucuronoarabinoxylane. Bei einem Wert unterhalb von 0,05 (*) liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ein signifikanter Unterschied zwischen den zugrunde liegenden Mittelwerten vor. Übersicht der nach dem TUKEY-HSD-Test ermittelten homogenen Untergruppen für den Faktor Sorte (a ist signifikant niedriger als b, usw.). (FS_{est}/Xyl = molares Verhältnis der estergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, $FS_{est+2xDFS}/Xyl$ = molares Verhältnis der hypothetisch gesamten estergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, DFS/Xyl = molares Verhältnis der Summe der DFS zum Xylose-Gehalt, FS_{eth}/Xyl = molares Verhältnis der ethergebundenen FS zum Xylose-Gehalt)

Zweifaktorielle ANOVA (nur Daten aus 2005)				
	FS_{est}/Xyl	$FS_{est+2xDFS}/Xyl$	DFS/Xyl	FS_{eth}/Xyl
Haupteffekte				
Sorte	0,000*	0,000*	0,001*	0,001*
Homogene Untergruppen der Sorten aus TUKEY-HSD-Test				
DK 233 (A')	ab	ab	ab	b
DKc 2949 (B')	a	a	a	a
DK 247 (C')	bc	bc	ab	ab
Monumental (D)	cd	bc	a	a
DK 281 (E)	d	cd	b	b
DK 287 (F)	e	d	b	b
EZP	0,330	0,540	0,000*	0,825
			E1 < E2	
Interaktion				
Sorte x EZP	0,002*	0,001*	0,000*	0,001*
Homogene Untergruppen aus TUKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4				
Dreifaktorielle ANOVA (nur Daten der Sorten A, B und C)				
	FS_{est}/Xyl	$2xDFS+FS_{est}/Xyl$	DFS/Xyl	FS_{eth}/Xyl
Haupteffekte				
Sorte	0,000*	0,000*	0,001*	0,001*
Homogene Untergruppen der Sorten (TUKEY-HSD-Test)				
DK 233 (A/A')	a	a	a	ab
DKc 2949 (B/B')	b	a	a	a
DK 247 (C/C')	c	b	b	b
EZP	0,000*	0,001*	0,005*	0,000*
	E1 > E2	E1 > E2	E1 < E2	E1 > E2
Anbaujahr	0,000*	0,000*	0,000*	0,543
	2004 > 2005	2004 > 2005	2004 > 2005	
Interaktionen				
Sorte x EZP	0,000*	0,000*	0,011 ¹	0,403
Sorte x Jahr	0,000*	0,000*	0,004*	0,000 ¹
Jahr x EZP	0,000 ¹	0,000 ¹	0,955	0,026 ¹
Sorte x Jahr x EZP	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Homogene Untergruppen aus TUKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4				

¹ Signifikanzniveau der ANOVA < 0,05, aber kein signifikanten Unterschiede in TUKEY-HSD-Test

hinaus signifikante Wechselwirkungen zwischen allen drei Haupteffekten. Die entsprechenden homogenen Untergruppen aus dem TUKEY-HSD-Test der gemischten Effekte sind in Tab. 5.19 im Anhang 5.4 zu entnehmen. Anhand der dargestellten Ergebnisse wird somit deutlich, dass die Zellwandzusammensetzung der Maisrestpflanze auf äußerst komplexe Weise durch die verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, so dass eine allgemeingültige Interpretation hinsichtlich des Einflusses von Sorte, Erntezeitpunkt und Anbaujahr in Bezug auf die Zellwandpolysaccharide und die polysaccharidgebundenen FS kaum möglich ist.

3.2.3 Ligninassoziierte Zellwandstrukturkomponenten

Abb. 3.36 zeigt die ermittelten Ligningehalte sowie die Gehalte der größtenteils an Lignin estergebundenen *p*CS in den 0h-Materialien der verschiedenen Sorten zu beiden Erntezeitpunkten in beiden Anbaujahren. Die entsprechenden Signifikanzniveaus der zwei- bzw. dreifaktoriellen ANOVA sind in Tab. 3.10 aufgeführt.

Es fällt auf, dass die KL-Gehalte der sechs Sorten in 2005 nahezu keinerlei Schwankungen aufwiesen. Die Sortenunterschiede zwischen den ABSL-Gehalten waren insgesamt etwas größer. So konnte für DK 287 (F) der niedrigste Ligningehalt festgestellt werden, der sich signifikant von Sorte B' und D (DKc 2949 und Monumental) unterschied. Der ABSL-Gehalt der Sorte Monumental (D) war darüber hinaus auch signifikant höher als die Gehalte der Sorten A', C' und E (DK 233, DK 247 und DK 281). Der signifikant erhöhte ABSL-Gehalt der Sorte B/B' (DKc 2949 2004/2005) konnte im Rahmen der dreifaktoriellen ANOVA bestätigt werden. Zudem wurde hier auch ein signifikant erhöhter KL-Gehalt der Sorte B/B' nachgewiesen. Dieser erklärt auch die für den KL-Gehalt nachgewiesenen signifikanten Unterschiede zwischen den Anbaujahren sowie die Wechselwirkung zwischen Sorte und Anbaujahr, die auch für die ABSL-Gehalte bestätigt wurden. Dabei waren wiederum die Gehalte der Sorte DKc 2949 in 2004 (B) signifikant höher als in 2005 (B') (siehe hierzu auch die signifikanten Untergruppen der TUKEY-HSD-Tests der Interaktionen in Tab. 5.19 im Anhang 5.4). Die Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten waren, analog zu den Zellwandpolysacchariden, nur sehr gering. Zwar ergaben sich in beiden statistischen Experimenten signifikante Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten für den ABSL-Gehalt, diese waren allerdings widersprüchlich zueinander. So waren bei Betrachtung der Daten aus 2005 die Gehalte in E2 höher, während für die der in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten signifikant niedrigere ABSL-Gehalte in E2 nachgewiesen wurden.

Für die *p*CS-Gehalte wurden die insgesamt am stärksten ausgeprägten Sortenunterschiede festgestellt. Bereits anhand des Diagramms (Abb. 3.36) wird deutlich, dass die Sorten D, E und F (Monumental, DK 281 und DK 287) deutlich höhere *p*CS-Gehalte aufwiesen, als die Sorten A/A', B/B' und C/C' (DK 233, DKc 2949 und DK 247), was durch die zweifaktorielle ANOVA und den TUKEY-HSD-Test bestätigt wird. Die Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten waren nicht signifikant, es wurden aber signifikante Wechselwirkungen zwischen Sorte und Erntezeitpunkt

nachgewiesen. Die verschiedenen Sorten zeigten somit unterschiedliche Veränderungen des p CS-Gehaltes über die Reife. Während in Sorte A', C' und F der p CS-Gehalt mit der Reife tendenziell (für A' und C' signifikant) zunahm, sank dieser in den Sorten B', D und E tendenziell über die Reife. Für die Sorten A/A', B/B' und C/C', die in beiden Anbaujahren untersucht wurden (dreifaktorielle ANOVA), wurde zusätzlich (unter anderem) auch eine signifikante Wechselwirkung zwischen allen drei untersuchten Haupteffekten nachgewiesen, die wiederum auf eine komplexe Beeinflussung der Zellwandzusammensetzung durch die Faktoren Genotyp, Reife und Witterungsbedingungen hindeutet. Da die 0h-Materialien der Sorten D-F nicht in beiden Anbaujahren untersucht wurden, kann nicht abschließend beurteilt werden, inwieweit die hier nachgewiesenen deutlich abweichenden p CS-Gehalte in verschiedenen Anbaujahren reproduziert werden können.

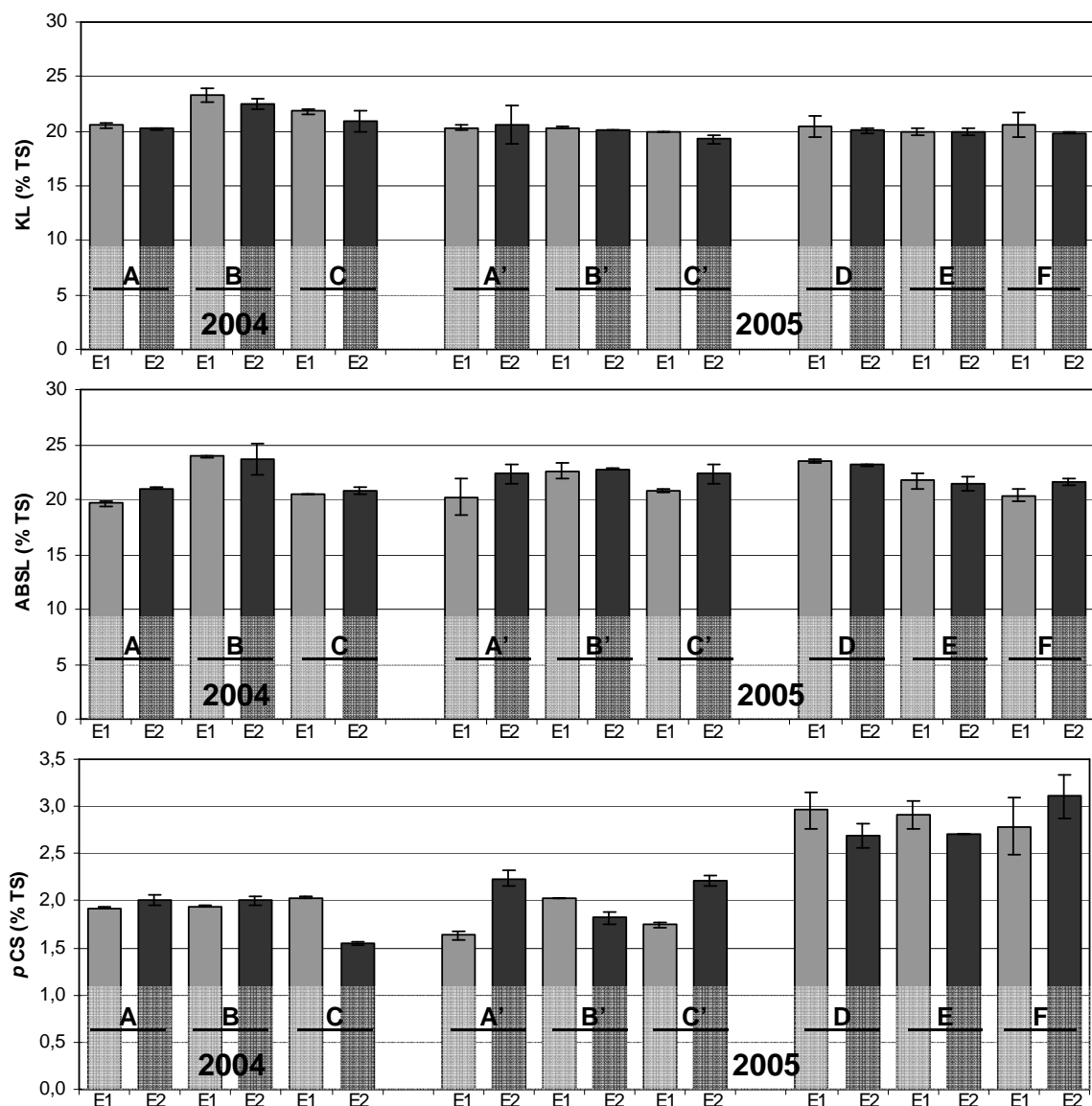


Abb. 3.36: Übersicht der Ligningehalte beider Bestimmungsmethoden (Klason-Lignin (KL) und acetyl-bromidlösliches Lignin (ABSL)) sowie der estergebundenen p -Cumarsäure (p CS) in den 0h-Materialien (% Trockensubstanz) in beiden Anbaujahren (2004 und 2005) und beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D= Monumental (2005), E = DK 281 (2005), F = DK 287 (2005))

Tab. 3.10: Übersicht der im Rahmen der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA ermittelten Signifikanzniveaus der Haupteffekte (Sorte, Erntezeitpunkt (EZP/E) und Anbaujahr (nur bei dreifaktorieller ANOVA)) und der jeweils möglichen Interaktionen auf abhängige Variablen des Lignins sowie der an Lignin gebundenen *p*-Cumarsäure. Bei einem Wert unterhalb von 0,05 (*) liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ein signifikanter Unterschied zwischen den zugrunde liegenden Mittelwerten vor. Übersicht der nach dem Tukey-HSD-Test ermittelten homogenen Untergruppen für den Faktor Sorte (a ist signifikant niedriger als b, usw.). (*p*CS (%) = Gehalt estergebundener *p*CS (% Trockensubstanz), KL (%) = Klason-Lignin Gehalt (% Trockensubstanz), ABSL (%) = Gehalt des acetylbromidlöslichen Lignins (% Trockensubstanz))

Zweifaktorielle ANOVA			
(nur Daten aus 2005)			
	<i>p</i> CS (%)	KL (%)	ABSL (%)
Haupteffekte			
Sorte	0,000*	0,637	0,004*
Homogene Untergruppen der Sorten aus Tukey-HSD-Test			
DK 233 (A')	a		ab
DKc 2949 (B')	a		bc
DK 247 (C')	a		ab
Monumental (D)	b		c
DK 281 (E)	b		ab
DK 287 (F)	b		a
EZP	0,064	0,358	0,028*
			E2 > E1
Interaktion			
Sorte x EZP	0,002*	0,908	0,127
Homogene Untergruppen aus Tukey-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4			
Dreifaktorielle ANOVA			
(nur Daten der Sorten A, B und C)			
	<i>p</i> CS (%)	KL (%)	ABSL (%)
Haupteffekte			
Sorte	0,026*	0,004*	0,000*
Homogene Untergruppen der Sorten (Tukey-HSD-Test)			
DK 233 (A/A')	a	a	a
DKc 2949 (B/B')	ab	b	b
DK 247 (C/C')	b	a	a
EZP	0,000*	0,123	0,015*
	E1 < E2		E1 < E2
Anbaujahr	0,061	0,000*	0,411
		2004 > 2005	
Interaktionen			
Sorte x EZP	0,000 ¹	0,499	0,092
Sorte x Jahr	0,000 ¹	0,003*	0,031*
Jahr x EZP	0,000 ¹	0,366	0,212
Sorte x Jahr x EZP	0,000*	0,963	0,862
Homogene Untergruppen aus Tukey-HSD-Test siehe Tab. 5.19 im Anhang 5.4			

¹ Signifikanzniveau der ANOVA < 0,05, aber kein signifikanten Unterschiede in Tukey-HSD-Test

Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse ist unter Berücksichtigung der genannten Einschränkungen zu vermuten, dass der p CS-Gehalt zur Beschreibung sortenspezifischer Unterschiede der ligninassoziierten Zellwandstrukturkomponenten besser geeignet ist als die ermittelten Ligningehalte (ABSL und KL). Als Indikator für den „wahren“ Lignin-Gehalt kann der p CS-Gehalt aufgrund der relativ hohen Sortenunterschiede bei verhältnismäßig gleich bleibendem Ligningehalt allerdings nicht genutzt werden. Inwieweit dies mit der ruminalen Abbaubarkeit der verschiedenen Sorten übereinstimmt, soll in Abschnitt 3.3 dieser Arbeit untersucht werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.5.2 beschrieben, wurde die Monolignolzusammensetzung der Maisrestpflanzenmaterialien lediglich für die drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten A - C bestimmt. Dabei konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die nachgewiesenen im Vergleich zu den Literaturdaten deutlich niedrigeren S/G-Verhältnisse methodisch bedingt waren oder auf einer tatsächlichen genotypischen Variation beruhten. Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse der estergebundenen p CS, die in den Sorten D - F signifikant höher waren als in den Sorten A - C, könnte vermutet werden, dass auch die S/G-Verhältnisse in diesen Sorten erhöht sind, da bekannt ist, dass die p CS vorwiegend in Form der p CS-S-Ester in das Lignin eingebaut werden. Die Monolignolzusammensetzung dieser Sorten sollte daher in folgenden Arbeiten näher charakterisiert werden.

3.2.4 Abschließende Diskussion zum Einfluss der Reife, des Genotyps und der Witterungsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten

Zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Erntezeitpunkten konnten insgesamt nur wenige Veränderungen der Zellwandzusammensetzung über die Reife festgestellt werden. Während sich die Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide sowie die ligninassoziierten Zellwandstrukturkomponenten zwischen den Erntezeitpunkten kaum unterschieden, waren innerhalb der zellwandgebundenen FS insbesondere für die Gehalte der estergebundenen DFS und den Dimerisierungsgrad der FS eine signifikante Zunahme über die Reife zu beobachten. Diese Veränderungen bezüglich der DFS deuten auf ein verstärktes Cross-Linking der GAX mit zunehmender Reife hin. Eine fortschreitende Lignifizierung der Zellwand zu den hier gewählten Reifestadien war anhand der untersuchten Parameter (KL-, ABSL- und p CS-Gehalt) hingegen nicht festzustellen.

Wie bereits im Allgemeinen Teil dieser Arbeit beschrieben, war ein möglichst starker Praxisbezug eine der Zielsetzungen dieser Arbeit. Das heißt, sowohl die Sorten als auch die Erntezeitpunkte wurden so gewählt, dass sie den tatsächlichen landwirtschaftlichen Bedingungen zur Herstellung von Maissilage als Wiederkäuerfuttermittel entsprechen. Die gewählten Erntezeitpunkte richteten sich dabei nach dem TS-Gehalt des Kolbens bzw. der Körner, nicht der Restpflanze. Die genauen Erntedaten sind in Tab. 2.1 aufgelistet. Es wird deutlich, dass diese im Durchschnitt

lediglich 2 Wochen auseinander lagen. Dieser kurze Zeitraum führt offensichtlich nicht zu dramatischen Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung

Verglichen mit Studien, die bewusst die Zellwandzusammensetzung der Maisrestpflanze über einen breiten Entwicklungszeitraum untersuchten, entsprechen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Erntezeitpunkte stets den spätesten Reifezeitpunkten (MORRISON et al., 1998, JUNG, 2003, JUNG & CASLER, 2006a). Während MORRISON et al. (1998) verschiedene Internodien einer Pflanze untersuchten (die unterschiedlichen Internodien entsprechen dabei verschiedenen Reifestufen), untersuchten JUNG (2003) sowie JUNG & CASLER (2006a) jeweils die vierten Internodien von Maispflanzen zu insgesamt zehn Erntezeitpunkten, beginnend vom 24. Juni bis zum 28. September und somit über nahezu die gesamte Vegetationsperiode. Dabei entsprechen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Erntezeitpunkte, soweit ein Vergleich aufgrund der unterschiedlichen klimatischen Bedingungen der Anbauorte möglich ist, in etwa dem neunten und zehnten Erntezeitpunkt in den genannten Studien. Analog zu den in dieser Arbeit nachgewiesenen, geringen Veränderungen zwischen den Erntezeitpunkten wurden auch in den genannten Studien zwischen dem neunten und zehnten Erntezeitpunkt nur noch sehr geringe Veränderungen der Zellwandpolysaccharide, des Lignins und der monomeren PCS festgestellt. DFS, die in der vorliegenden Arbeit die deutlichste Veränderung über die Reife zeigten, wurden in keiner der genannten Studien untersucht (MORRISON et al., 1998, JUNG, 2003, JUNG & CASLER, 2006a).

Wie bereits für die Erntezeitpunkte beschrieben, wurden auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sorten nach möglichst realistischen Kriterien ausgesucht. Das heißt, es wurden bewusst Sorten untersucht, die bereits seit längerem in Deutschland zur Herstellung von Silomais als Futtermittel in der Wiederkäuerernährung angebaut werden. Insgesamt waren die nachgewiesenen Unterschiede in der Zusammensetzung der untersuchten Zellwandstrukturkomponenten zwischen den sechs in dieser Arbeit untersuchten Genotypen relativ gering. Es waren zwar durchaus signifikante Sortenunterschiede zwischen den Genotypen feststellbar, anhand der Ergebnisse der in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten wurde allerdings deutlich, dass die Sortenunterschiede von den Unterschieden zwischen den Anbaujahren zum Teil deutlich überlagert wurden. Besonders deutlich wird dies z.B. anhand der Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide der Sorte B (DKc 2949). Während der Xylose-Anteil der genannten Sorte in 2004 gegenüber den anderen Sorten signifikant erniedrigt war, wurde in 2005 für diese Sorte der insgesamt höchste Xyloseanteil nachgewiesen. Inwieweit die festgestellten Sortenunterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten mit deren ruminaler TS- bzw. Polysaccharid-Abbaubarkeit korrelierten, soll in Abschnitt 3.3 dieser Arbeit näher betrachtet werden.

Die in der Landwirtschaft übliche Einteilung der Sorten in Reifegruppen anhand ihrer Siloreifezahl (siehe Abschnitt 2.1) erscheint anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wenig sinnvoll. Demnach

würden die Sorten A, B und C den frühen bis mittelfrühen Maissorten, mit Siloreifezahlen bis S 250, zugeordnet werden, während die Sorten D, E und F zu den mittelspäten bis späten Sorten (> S 260) gehören. Lediglich für die *p*CS-Gehalte konnten deutliche Unterschiede zwischen den Sorten der verschiedenen Reifegruppen festgestellt werden. Sämtliche anderen untersuchten Parameter zeigten keine eindeutigen Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten, die dieser Einteilung in Reifegruppen entsprechen. Die Siloreifezahl ist eine empirisch ermittelte Zahl, die den TS-Gehalt der Restpflanze zur optimalen Siloreife der Ganzpflanze wiedergibt (mit z.B. S 250 = 25,0 % TS). Hierbei beruht die optimale Siloreife einer Maissorte neben der Abbaubarkeit der Restpflanze vor allem auch auf einer möglichst optimalen Stärkeeinlagerung in den Kolben. Anhand der in Tab. 2.1 aufgelisteten TS-Gehalte der Restpflanzen zu den jeweiligen Erntezeitpunkten wird allerdings deutlich, dass die gewünschten Siloreifezahlen insbesondere in Anbaujahr 2005 für die meisten der untersuchten Sorten nicht erreicht wurden. Auch hier zeigen sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Anbaujahren. So betrug z.B. der TS-Gehalt der Restpflanzen der Sorte B (DKc 2949, S 230) zu E 2 in 2004 25,5 %, während er in E 2 2005 lediglich 20,1 % betrug.

Für die drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten wurden zum Teil deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten zwischen den beiden Anbaujahren nachgewiesen, die die Sortenunterschiede zum Teil deutlich überlagerten. Der Einfluss der Witterungsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten war in der vorliegenden Arbeit somit größer als der Einfluss des Genotyps.

In Abb. 3.37 sind verschiedene Wetterdaten aus den beiden Anbaujahren (2004 und 2005), die der freizugänglichen Internetdatendank des Deutschen Wetterdienstes (DWD) für die Wetterstation München Flughafen (Freising) (Nr. 10870) entnommen wurden, gegenübergestellt (DWD, 2008). Es fällt zunächst auf, dass in keinem der Jahre extreme Witterungsbedingungen herrschten. Drastische Abweichungen in der mittleren monatlichen Temperatur, der Sonnen-

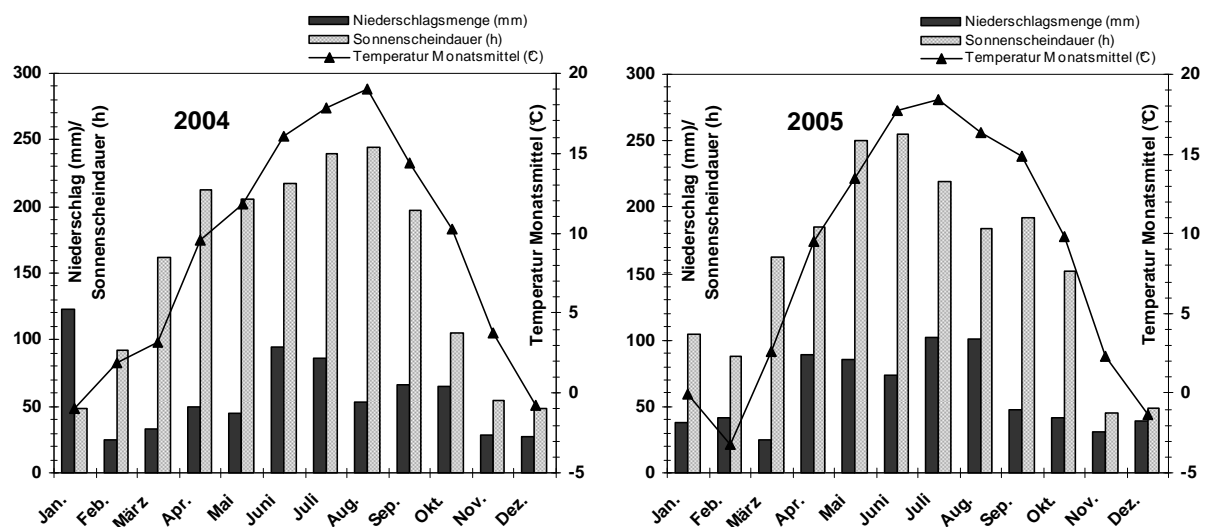


Abb. 3.37: Übersicht der Klimadaten der Wetterstation München/Flughafen (Freising) aus den beiden Anbaujahren 2004 und 2005

scheindauer sowie in der Niederschlagsmenge wurden nicht beobachtet. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den beiden Anbaujahren lagen im Temperaturmonatsmittel des Monats August. Während im August 2004 eine mittlere monatliche Temperatur von 19,0°C erreicht wurde, war die mittlere Temperatur im August 2005 um ca. 3°C niedriger (16,3°C). Im Gegensatz dazu fiel die mittlere Monatstemperatur im Herbst 2005 (September und Oktober) gegenüber 2004 etwas langsamer ab. Es könnte daher vermutet werden, dass die Stärkeeinlagerung in 2005 aufgrund der niedrigeren Temperatur im August etwas verlangsamt verlief, woraus theoretisch eine Verschiebung der Erntezeitpunkte zu späteren Daten hätte resultieren müssen. Die genauen Erntedaten der sechs in dieser Arbeit untersuchten Sorten unterschieden sich zwischen den beiden Jahren allerdings im überwiegenden Fall um maximal 2 Tage, wobei keine Regelmäßigkeit hinsichtlich einer späteren Ernte beobachtet wurde. Der zweite Erntezeitpunkt der Sorte D (Monumental) war in 2005 gegenüber dem Vorjahr sogar um 5 Tage nach vorne verschoben. Bei Betrachtung der Trockensubstanzgehalte sowohl der Körner als auch der Restpflanzen (siehe Tab. 2.1) ist allerdings ersichtlich, dass diese in beiden Erntezeitpunkten aus 2005 zum Teil deutlich niedriger waren als zu den entsprechenden Erntedaten in 2004. Es ist daher fraglich, inwieweit die untersuchten Maisrestpflanzen der beiden Erntezeitpunkte in den beiden Anbaujahren tatsächlich der gleichen physiologischen Reife entsprachen.

Eine allgemeingültige Interpretation des Witterungseinflusses auf die Zellwandzusammensetzung der Maisrestpflanze ist anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und den Vergleich zu den genannten Wetterdaten allerdings kaum möglich. Hierfür hätten mehr Genotypen über eine größere Anzahl an Anbaujahren untersucht werden müssen. Die zahlreichen, nachgewiesenen Interaktionen zwischen den Faktoren Sorte, Erntezeitpunkt und Anbaujahr deuten zudem darauf hin, dass die Zellwandzusammensetzung der Maisrestpflanze auf äußerst komplexe Weise von allen drei Faktoren beeinflusst wird. Insgesamt bleibt aber festzuhalten, dass der Einfluss der Witterungsbedingungen unter den realistischen landwirtschaftlichen Bedingungen dieser Arbeit wohl der größte Einflussparameter der Zellwandzusammensetzung ist.

Vergleichbares konnte auch in einer 30 Jahre Simulationsstudie für verschiedene Maissorten im Anbaugbiet Kiel, einem klimatischen Grenzgebiet des Maisanbaus, festgestellt werden. Anhand zweier statistischer Modelle, die auf den Wetterdaten der letzten 30 Jahre beruhen, wurden die Trockensubstanzerträge und verschiedene Futtermittelqualitätsparameter, wie NDF-Gehalt, der Sorten abgeschätzt (KRUSE, 2006, KRUSE et al., 2008). Dabei wurde festgestellt, dass der Einfluss der Witterungsbedingungen innerhalb der Reifegruppen ebenfalls größer war als der Sorteneinfluss. Dies war allerdings für die Gerüstsubstanzen weniger deutlich als für die Summe der wasserlöslichen Substanzen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass verschiedene Sorten unterschiedlich auf Veränderungen der Witterungsbedingungen reagierten, was in dieser Arbeit durch die zahlreichen nachgewiesenen signifikanten Interaktionen zwischen Sorte und Anbaujahr sowie zwischen allen drei Haupteffekten ebenfalls festgestellt wurde.

3.3 Charakterisierung des ruminal inkubierten Materials – Einfluss der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Abbaubarkeit

Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, wurde der ruminale Verdau der Probenmaterialien (Rohmaterialien) mittels *in situ* Methodik von unseren Kooperationspartnern an der TUM durchgeführt (FLAßHOFF, 2005, ZELLER, 2008). Nach 24h ruminaler Inkubation wurden die Nylonbeutel zunächst in einer handelsüblichen Waschmaschine gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Durch Rückwaage der gewaschenen und getrockneten Beutel wurde der TS-Verlust des ruminalen Verdau bestimmt. Darüber hinaus wurde die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten in den verbliebenen Restmaterialien (24h-Materialien) analog zu der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Charakterisierung der unverdauten Probenmaterialien untersucht.

3.3.1 Abbau der Zellwandtrockensubstanz nach 24 h ruminalen Verdau

Aus dem prozentualen TS-Verlust nach 24h ruminaler Inkubation und dem bereits in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen TS-Verlust nach Auswaschung der wasserlöslichen Bestandteile lässt sich der Anteil des Trockensubstanzabbaus berechnen, der allein auf dem ruminalen Abbau des wasserunlöslichen Probenmaterials beruht. Unter Vernachlässigung eventuell noch in geringem Maße in den 0h-Materialien enthaltener nicht zellwandgebundener aber wasserunlöslicher Bestandteile, wie Nicht-Struktur-Proteine oder lipophile Inhaltsstoffe, wird bei der hier gewählten Betrachtung somit nur der Anteil des ermittelten TS-Verlustes berücksichtigt, der dem tatsächlichen Abbau des Zellwandmaterials entspricht. Dieser wird daher im Folgenden als Zellwandabbau bezeichnet. Für die in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen Korrelationen der Zellwandabbaubarkeit zu den verschiedenen in der Literatur beschriebenen abbauinhibierenden Zellwandstrukturkomponenten, zellwandgebundene FS und Lignin, erscheint dieser besser geeignet als der insgesamt ermittelte TS-Verlust nach 24 h ruminaler Inkubation. Die entsprechenden, berechneten Zellwandabbauraten sind in Tab. 3.11 aufgeführt sowie in Abb. 3.38 graphisch dargestellt.

Verluste von kleinen Partikeln noch unverdauten Zellwandmaterials, bedingt durch die Porengröße der verwendeten Nylonbeutel ($50 \pm 10 \mu\text{m}$), können weder für die Auswaschung wasserlöslicher Bestandteile in der Waschmaschine (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1.1) noch für die ruminale Inkubation und das anschließende Waschen der Beutel ausgeschlossen werden. Es kann allerdings aufgrund der geringen möglichen Größe dieser Partikel ($< 50 \pm 10 \mu\text{m}$) davon ausgegangen werden, dass diese von den Pansenmikroorganismen schnell und nahezu vollständig abgebaut werden können (DEWHURST et al., 1995). So wurden für intakte Sklerenchymzellen der Maispflanze Zelllängen zwischen $520 \mu\text{m}$ bis zu $3000 \mu\text{m}$ beschrieben (JUNG et al., 2000). Bei den in dieser Arbeit eventuell verlorenen Partikeln kann es sich demnach nur um

Zellwandbruchstücke handeln, die für die Pansenmikroorganismen vollständig zugänglich und somit vergleichsweise gut abbaubar sind. Ein deutlich zu hoher ermittelter Gesamt-TS-Verlust, bedingt durch die experimentellen Voraussetzungen kann daher als unwahrscheinlich betrachtet werden.

Tab. 3.11: Übersicht der aus den Trockensubstanzverlusten der Auswaschung und der ruminalen Inkubation (Tab. 5.1 und 5.2 im Anhang 5.4) berechneten prozentualen Zellwandabbauraten (% Trockensubstanz (TS), E = Erntezeitpunkt)

Zellwandabbau (% TS) = Inkubationsverlust_{24h} (% TS) - Auswaschungsverlust_{0h} (% TS)				
Sorte	2004		2005	
	E 1	E 2	E 1	E 2
	Zellwandabbau (% TS)	Zellwandabbau (% TS)	Zellwandabbau (% TS)	Zellwandabbau (% TS)
DK 233	24,41 ± 1,45	22,48 ± 2,87	27,26 ± 0,83	26,76 ± 1,91
DKc 2949	26,53 ± 4,89	26,91 ± 3,09	28,15 ± 0,92	27,65 ± 1,46
DK 247	21,53 ± 1,70	21,31 ± 1,31	24,08 ± 1,71	25,21 ± 1,94
Monumental			22,40 ± 1,74	25,30 ± 1,37
DK 281			24,21 ± 0,66	29,03 ± 0,99
DK 287			29,88 ± 0,83	30,03 ± 0,94

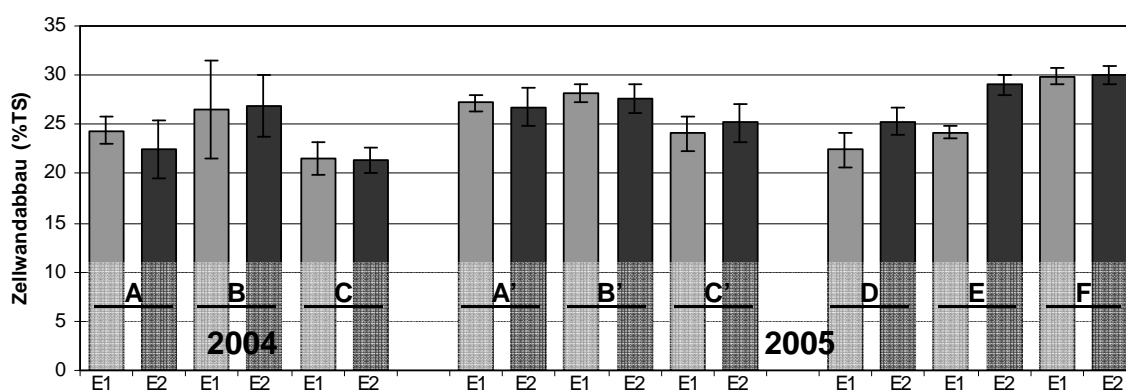


Abb. 3.38: Übersicht des Zellwandabbaus nach 24h ruminaler Inkubation der untersuchten Sorten zu beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) in beiden Anbaujahren in % der Trockensubstanz (% TS) (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D= Monumental (2005), E = DK 281 (2005), F = DK 287 (2005))

Die statistische Auswertung der berechneten Zellwandabbauraten (% TS) (Tab. 3.12) ergab kaum signifikante Einflüsse der ruminalen Zellwandabbaubarkeit durch die drei Hauptfaktoren Sorte, Reife und Anbaujahr. Während bei der Betrachtung der drei in beiden Anbaujahren untersuchten Sorten (dreifaktorielle ANOVA) keine signifikanten Unterschiede oder Interaktionen festgestellt wurden, ergab die zweifaktorielle ANOVA (Betrachtung der sechs Sorten in Anbaujahr

Tab. 3.12: Übersicht der im Rahmen der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA ermittelten Signifikanzniveaus der Haupteffekte (Sorte, Erntezeitpunkt (EZP/E) und Anbaujahr (nur bei dreifaktorieller ANOVA)) und der jeweils möglichen Interaktionen für den prozentualen ruminalen Zellwand-, Polysaccharid- und Xylanabbau. Bei einem Wert unterhalb von 0,05 (*) liegt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ein signifikanter Unterschied zwischen den zugrunde liegenden Mittelwerten vor. Übersicht der nach dem TUKEY-HSD-Test ermittelten homogenen Untergruppen für den Faktor Sorte (a ist signifikant niedriger als b, usw.).

Zweifaktorielle ANOVA (nur Daten aus 2005)			
	Zellwand- abbau (%)	Polysaccharid- abbau (%)	Xylan- abbau (%)¹
Haupteffekte			
Sorte	0,008*	0,000*	0,000*
Homogene Untergruppen der Sorten aus TUKEY-HSD-Test			
DK 233 (A')	ab	bc	cd
DKc 2949 (B')	ab	c	bc
DK 247 (C')	a	bc	cd
Monumental (D)	a	a	d
DK 281 (E)	ab	b	b
DK 287 (F)	b	bc	a
EZP	0,113	0,005*	0,000*
		E1 > E2	E1 > E2
Interaktion			
Sorte x EZP	0,346	0,001*	0,003*
Homogene Untergruppen aus TUKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.20 im Anhang 5.4			
Dreifaktorielle ANOVA (nur Daten der Sorten A, B und C)			
	Zellwand- abbau (%)	Polysaccharid- abbau (%)	Xylan- abbau (%)¹
Haupteffekte			
Sorte	0,063	0,416	0,656
EZP	0,840	0,893	0,003*
			E1 > E2
Anbaujahr	0,067	0,001*	0,107
		2004 < 2005	
Interaktionen			
Sorte x EZP	0,872	0,548	0,416
Sorte x Jahr	0,732	0,063	0,250
Jahr x EZP	0,817	0,688	0,033*
Sorte x Jahr x EZP	0,922	0,463	0,110
Homogene Untergruppen aus TUKEY-HSD-Test siehe Tab. 5.20 im Anhang 5.4			

2005) signifikante Unterschiede zwischen den Sorten. Dabei war der prozentuale Zellwandabbau in den Sorten C' und D (DK 247 und Monumental) gegenüber der Sorte F (DK 287) signifikant erniedrigt. Die übrigen Sorten unterschieden sich hingegen nicht signifikant voneinander und den Sorten C', D und F.

Die Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten waren nicht signifikant. Eine deutliche Abnahme der Zellwandabbaubarkeit mit zunehmender Reife konnte für keine der untersuchten Sorten festgestellt werden. Viel mehr wird anhand der Darstellung in Abb. 3.38 deutlich, dass der überwiegende Teil der untersuchten Sorten kaum Veränderungen der Zellwandabbaubarkeit über die Reife aufwies. Für die Sorten C' in 2005 (DK 247), D und E (Monumental und DK 281) wurde sogar eine tendenziell steigende Abbaubarkeit mit zunehmender Reife beobachtet.

Insgesamt kann somit festgestellt werden, dass zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Probenmaterialien kaum Unterschiede in der ruminalen Zellwandabbaubarkeit bestanden. Es ist daher fraglich, inwieweit Korrelationen zwischen dem prozentualen Zellwandabbau und verschiedenen Zellwandstrukturkomponenten möglich sind.

3.3.2 Charakterisierung und Abbau der Zellwandpolysaccharide nach 24 h ruminalen Verdau

Wie bereits im Allgemeinen Teil beschrieben, stellen die Zellwandpolysaccharide der Maisrestpflanze eine der Hauptenergiequellen für den Wiederkäuer dar. Darüber hinaus dient der Anteil der Restpflanze in der Maissilage insbesondere auch der Erhaltung der Pansengesundheit. Ein zu hoher Kolbenanteil würde hingegen aufgrund des schnellen Stärkeabbaus zu einer starken Absenkung des pH-Wertes im Pansen führen. Eine solche Acidose kann unter Umständen sogar zum Tod des Tieres führen. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst nur die Maisrestpflanze untersucht, um ausschließlich die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten sowie die ruminale Abbaubarkeit der faserreichen Restpflanze beurteilen zu können.

Während isolierte Strukturpolysaccharide, sowohl Cellulose als auch Hemicellulosen, durch Pansenmikroorganismen vollständig abgebaut werden (MOORE & HATFIELD, 1994, WEIMER et al., 2000), ist deren Abbaubarkeit in der komplexen pflanzlichen Zellwand durch die Zugänglichkeit der Polysaccharidstrukturen für die Enzyme der Pansenmikroorganismen begrenzt. Als limitierende Faktoren der Zellwandabbaubarkeit sind sowohl die Lignifizierung der Zellwand als auch das Ausmaß an Polysaccharid-Polysaccharid- sowie Polysaccharid-Lignin-Cross-Links durch PCS in der Literatur allgemein akzeptiert (HATFIELD et al., 1999, GRABBER et al., 2004, GRABBER, 2005). Diskutiert werden des Weiteren mögliche Einflüsse der Ligninzusammensetzung (GRABBER et al., 1997) und des Verzweigungsgrades der Arabinoxylane (GLITSØ et al., 1999). Inwieweit diese abbauinhibierenden Faktoren unter dem starkem Praxisbezug der in dieser Arbeit gewählten Sorten und Erntezeitpunkte wiederzufinden sind, soll in den nachfolgenden Abschnitten anhand der Korrelation zu dem bereits in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Zellwandabbau (% TS) sowie zum ermittelten prozentualen Polysaccharid- und Xylan-Abbau näher betrachtet werden.

Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide nach 24 h ruminalem Verdau

Analog zu der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten des unverdauten Restpflanzenmaterials sollte die Charakterisierung der nach 24h ruminaler Inkubation verbliebenen Rückstände (24h-Materialien) zunächst unabhängig vom Einfluss der Sorten, der Reife und der unterschiedlichen Witterungsbedingungen in den Anbaujahren generell charakterisiert werden. Die Ergebnisse werden daher wiederum in Form von Boxplots zusammengefasst dargestellt.

In Abb. 3.39 sind die ermittelten Gesamtkohlenhydratgehalte ebenso wie die prozentuale Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide in den 24 h-Materialien im Vergleich zu den 0h-Materialien dargestellt. Die exakten Gehalte aller untersuchten Probenmaterialien sind in Tab. 5.9 (Gesamtkohlenhydratgehalte) und Tab. 5.10 (Monosaccharidgehalte) im Anhang 5.4 aufgeführt. Die Gesamtkohlenhydratgehalte sanken über die ruminale Inkubation. Die Zellwandpolysaccharide werden demnach erwartungsgemäß durch die Pansenmikroorganismen stärker als andere Zellwandkomponenten, vor allem Lignin, abgebaut. Anhand der Darstellung (Abb. 3.39) werden zudem Veränderungen in der prozentualen Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide deutlich. Während der prozentuale Anteil der Arabinose sowie der in Summe bestimmten Uronsäuren über die ruminale Inkubation abnimmt, bleibt der Anteil der aus Cellulose stammenden Glucose weitestgehend gleich. Der prozentuale Anteil der aus dem Hauptstrang der sauren GAX stammenden Xylose in den Zellwandpolysacchariden stieg relativ gesehen an. Absolut betrachtet konnte somit für Arabinose und die Uronsäuren die stärkste Verlustrate im Verlauf der ruminalen Inkubation festgestellt werden, gefolgt von Glucose und Xylose. Diese Reihenfolge scheint unter Berücksichtigung des strukturellen Aufbaus pflanzlicher Zellwände sinnvoll und wurde bereits in verschiedenen *in vitro* Studien zur ruminalen Abbaubarkeit von Maispflanzenmaterialien beschrieben (JUNG et al., 1994, MIGNE et al., 1996, JUNG et al., 2000, JUNG & CASLER, 2006b). Während für Lignin ein eher genereller abbauinhibierender Effekt zu erwarten ist, wird durch die Ausbildung von Cross-Links durch die an die sauren GAX gebundenen FS insbesondere die Abbaubarkeit dieser Heteroxylane beeinflusst. Hierdurch kann die höhere Abbaubarkeit der aus Cellulose stammenden Glucose gegenüber der Xylose begründet werden. Die aus den Seitenketten der Heteroxylane stammende Arabinose wird hingegen am schnellsten abgebaut, da diese Verzweigungen der linearen Hauptkette stets einer höheren Angreifbarkeit durch die Enzyme der Pansenmikroorganismen unterliegen.

Wie beschrieben, kann anhand der in Summe bestimmten Uronsäuren nicht zwischen den aus den GAX-Seitenketten und den aus den Pektinen stammenden Uronsäuren unterschieden werden. Es kann allerdings für beide Ursprungsquellen von einer hohen ruminalen Abbaubarkeit der Uronsäuren ausgegangen werden. So ist zum einen bekannt, dass Pektine auch in der stark lignifizierten Zellwand noch nahezu vollständig abgebaut werden können (HATFIELD et al., 1999). Zum anderen kann für die analog zur Arabinose aus den Seitenketten der GAX stammenden

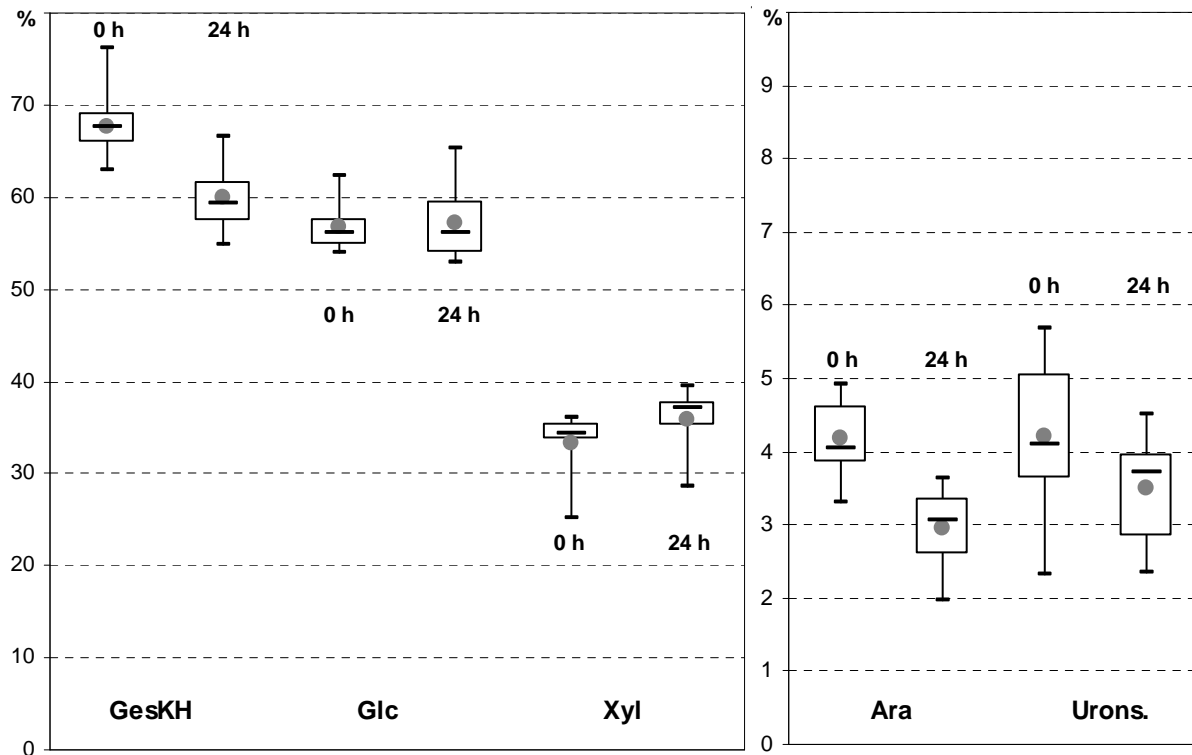


Abb. 3.39: Vergleich der Gesamtkohlenhydratgehalte (% Trockensubstanz) sowie der Monosaccharidzusammensetzung (mol %) in den unverdauten 0h- und den ruminal inkubierten 24h-Materialien (GesKH = Gesamtkohlenhydratgehalte, Glc = Glucose, Xyl = Xylose, Ara = Arabinose, Urons. = Uronsäuren)

Glucuronsäure-Einheiten aufgrund der beschriebenen höheren Angreifbarkeit ebenfalls von einer erhöhten ruminalen Abbaubarkeit ausgegangen werden.

Bestätigt wird die beschriebene höhere Abbaubarkeit der Seitenketten der sauren GAX durch die Ergebnisse der Methylierungsanalyse. Die entsprechenden Verhältnisse der in O-3-Position verknüpften Xylose-Einheiten und der insgesamt verknüpften Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4+2,4}/\sum X$ bzw. $X^{3,4}/\sum X$) in den 0h- und den ruminal inkubierten 24h-Materialien sind in Abb. 3.40 gegenübergestellt. Die zugrunde liegenden relativen molaren Gehalte der verschiedenen Bindungstypen der Xylose-Einheiten sind in Tab. 5.14 im Anhang 5.4 aufgeführt.

Für beide dargestellten molaren Verhältnisse wurde ein Abfall nach erfolgter ruminaler Inkubation festgestellt. Dabei waren die prozentualen Veränderungen für beide Verhältnisse zwischen 0h- und 24h-Material im Durchschnitt gleich. Daraus folgt, dass die unterschiedlich lokalisierten Seitenketten

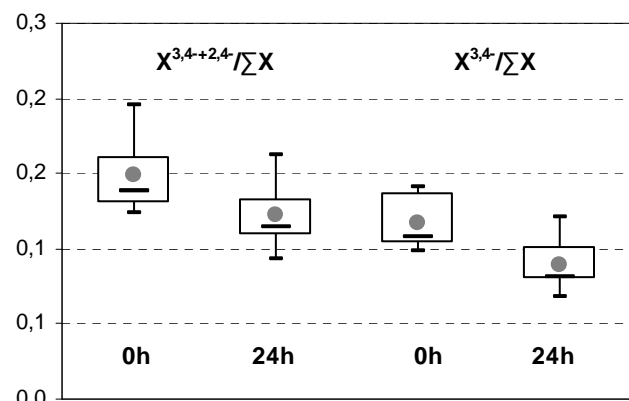


Abb. 3.40: Vergleich der molaren Verhältnisse der Summe der verzweigten Xylose-Einheiten sowie der nur in O-3-Position verzweigten Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4+2,4}/\sum X$ und $X^{3,4}/\sum X$) in den 0 h- und 24h-Materialien

des Xylanhauptstranges in etwa gleichem Maße ruminal abbaubar waren. Eine verringerte Abspaltung der in O-3-Stellung der Xylose-Einheiten gebundenen Seitenketten, die durch die Ausbildung von FS-Cross-Links hätte begründet werden können, wurde somit nicht festgestellt.

Wie in den 0h-Materialien konnten auch in den 24h-Materialien neben den terminalen Arabinofuranose-Einheiten in geringem Maße zusätzlich in O-2-Position verknüpfte Arabinose-Einheiten (2-Araf) nachgewiesen werden. Diese stammen wahrscheinlich aus komplexeren Seitenketten der GAX. Allerdings unterlagen die ermittelten relativen molaren Gehalte sowohl aufgrund der generell geringeren Präzision der Methode als auch insbesondere aufgrund der sehr geringen Anteile der verzweigten Arabinose-Einheiten, die im Bereich der Bestimmungsgrenze der Methode lagen, sehr starken Schwankungen. Die entsprechenden relativen molaren Anteile können Tab. 5.13 im Anhang 5.4 entnommen werden.

Abbau der Zellwandpolysaccharide nach 24 h ruminalem Verdau

Die nachfolgenden Korrelationen der als abbauinhibierend geltenden Zellwandstrukturkomponenten erfolgen nicht nur, wie bereits dargestellt, zum ruminalen Zellwandabbau (% TS), sondern auch zum prozentualen ruminalen Polysaccharid- und Xylanabbau. Dabei berechnet sich der Polysaccharidabbau aus den relativen Gehalten der Gesamtkohlenhydrate in den 24h-Materialien bezogen auf das 0 h-Material ($\text{Polysaccharidabbau}_{24\text{h}}(\%) = 100\% - (\text{Gesamtkohlenhydratgehalt}(24\text{h}) * (100 - \text{Zellwandabbau}(\%)) / \text{Gesamtkohlenhydratgehalt}(0\text{h}))$). Der prozentuale Xylanabbau berechnet sich analog aus den ermittelten Xylose-Gehalten. Da die Cross-Links ausbildenden FS an die sauren GAX estergebunden vorliegen, könnte über die Korrelation zum Xylanabbau eventuell eine spezifische Beeinflussung der Abbaubarkeit der verschiedenen Polysaccharide ermittelt werden.

Der Abbau der Zellwandpolysaccharide bzw. der Xylane ist in Abb. 3.41 für alle Sorten sowie für beide untersuchten Erntezeitpunkte und Anbaujahre dargestellt. Die Ergebnisse der zwei- und dreifaktoriellen ANOVA zum Polysaccharid- und Xylanabbau sind in Tab. 3.12 aufgeführt. Analog zu dem bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenen Zellwandabbau (% TS) konnten im Rahmen der zweifaktoriellen ANOVA sowohl für den Polysaccharid- als auch für den Xylanabbau signifikante Sortenunterschiede nachgewiesen werden. Dabei bestanden zwischen der Polysaccharidabbaubarkeit und der Abbaubarkeit der Xylane zum Teil deutliche Unterschiede innerhalb der Sorten, was anhand der signifikant unterschiedlichen Untergruppen (TUKEY-HSD-Test) sowie auch anhand des optischen Vergleichs der verschiedenen ermittelten Abbaubarkeiten (Abb. 3.41 und 3.39) deutlich wird. So zeigte die Sorte D (Monumental) in 2005 eine gegenüber allen anderen Sorten signifikant erniedrigte Polysaccharidabbaubarkeit, während die Xylanabbaubarkeit für diese Sorten am höchsten war. Das Gegenteil wurde für Sorte F (DK 287) beobachtet. Hier war Polysaccharidabbaubarkeit relativ hoch, die Xylanabbaubarkeit allerdings äußerst niedrig. Sie unterschied sich von allen anderen Sorten signifikant. Eine deutlich abweichende Zellwandzusammensetzung der Sorte DK 287 war anhand der untersuchten

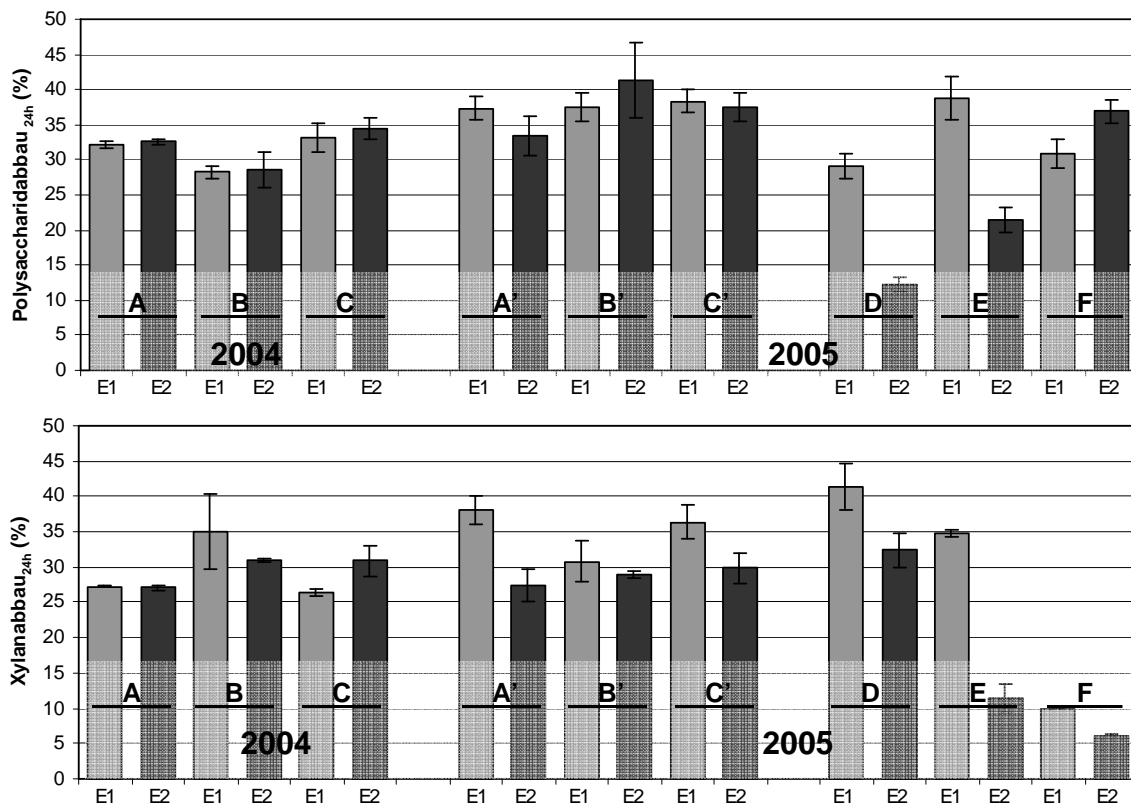


Abb. 3.41: Übersicht des Polysaccharid- sowie des Xylanabbaus zwischen den 0h und 24h-Materialien der untersuchten Sorten zu beiden Erntezeitpunkten (E1 und E2) in beiden Anbaujahren (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D = Monumental, E = DK 281 und F = DK 287)

Parameter der Zellwandzusammensetzung allerdings nicht festgestellt worden. Es kann somit nicht abschließend geklärt werden, wodurch diese deutlich abweichenden Abbaubarkeiten verursacht wurden.

Neben den beschriebenen Sortenunterschieden wurde für den Xylanabbau in beiden statistischen Experimenten und für den Polysaccharidabbau bei der Betrachtung der sechs in 2005 untersuchten Sorten (zweifaktorielle ANOVA) eine signifikante Abnahme der Abbaubarkeiten über den Reifeverlauf festgestellt. Während sich die Xylanabbaubarkeit zwischen den beiden Anbaujahren nicht signifikant unterschied, wiesen alle drei in beiden Jahren untersuchten Sorten eine signifikant erhöhte Polysaccharidabbaubarkeit in 2005 auf. Analog dazu waren die KL-Gehalte dieser drei Sorten in 2004 signifikant höher als in 2005.

Inwieweit signifikante Zusammenhänge zwischen der Zellwandzusammensetzung und den verschiedenen hier beschriebenen Abbaubarkeiten bestehen, soll in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit näher untersucht werden.

3.3.3 Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die ruminale Abbaubarkeit

Wie einleitend beschrieben, werden die physikochemischen Eigenschaften der Heteroxylane und damit verbunden auch deren Abbaubarkeit unter anderem vom Substitutionsgrad sowie von der Komplexität der Arabinoseseitenketten beeinflusst. So konnten GLITSØ et al. (1999, 2000) *in vivo* und *in vitro* (im Schwein bzw. unter Verwendung von Schweinefäzes) für Arabinoxylane, die aus verschiedenen Geweben (u.a. Endosperm, Aleuronschicht) von Roggengetreidekörnern isoliert wurden, eine steigende Abbaubarkeit mit zunehmendem Substitutionsgrad (A/X-Verhältnis) feststellen, während sich der Abbau mit zunehmender Komplexität der Arabinoxylanstruktur verlangsamte.

Im Gegensatz zu der genannten Arbeit waren die Heteroxylane der hier untersuchten Maisrestpflanzen in wesentlich geringerem Ausmaß substituiert (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1.3.3). Die Ergebnisse der PEARSON-Korrelation der verschiedenen zur Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen der GAX herangezogenen Verhältniszahlen zu den drei berechneten ruminalen Abbaubarkeiten sind in Tab. 3.13 aufgeführt. Während für die im Rahmen der Methylierungsanalyse ermittelten Verhältniszahlen der gesamten verknüpften Xylose-Einheiten sowie der in O-3-Stellung verknüpften Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose ($X^{3,4+2,4}/\sum X$ bzw. $X^{3,4}/\sum X$) kein linearer Zusammenhang zu den verschiedenen Abbaubarkeiten ermittelt wurde, konnte eine statistisch signifikante, schwach negative Korrelation zwischen dem A/X-Verhältnis und der Polysaccharidabbaubarkeit nachgewiesen werden. Entgegen den von GLITSØ et al. (1999, 2000) beschriebenen Ergebnissen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit somit auf eine tendenziell niedrigere Abbaubarkeit bei steigendem Arabinosesubstitutionsgrad hin. Dies ist möglicherweise auf den unterschiedlichen Aufbau der Seitenketten zurückzuführen. Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass Ballaststoffe der Maiskleie gegenüber dem enzymatischen Abbau resistenter sind als Ballaststoffe anderer Getreidearten (FAULDS et al., 1995). Darüber hinaus ist für die Arabinoxylane aus Roggen bekannt, dass sie überwiegend sehr einfache Arabinoseseitenketten tragen, während für Maiskleie recht komplexe Seitenketten nachgewiesen wurden (BUNZEL, 2001, ALLERDINGS, 2007). Es ist daher zu vermuten, dass bei komplexeren Seitenketten die Abbaubarkeit stärker inhibiert wird. Allerdings ist fraglich, inwieweit die für Maiskleie nachgewiesenen, komplexeren Seitenketten auch auf die GAX der Maisrestpflanze übertragbar sind. Die in Abschnitt 3.1.3.3 beschriebene Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen hatte anhand des Anteils der zusätzlich verknüpften Arabinose-Einheiten (2-Araf) nur eine geringe Komplexität der Seitenketten innerhalb der GAX der Probenmaterialien ergeben. Eine signifikante Korrelation zwischen der Komplexität der Arabinoseseitenketten zur ruminalen Abbaubarkeit ($2\text{-Araf}/\sum \text{Ara}$) konnte darüber hinaus nicht nachgewiesen werden.

Zusammengefasst konnte somit unter dem in der vorliegenden Arbeit bewusst gewählten starken Praxisbezug kein eindeutiger Einfluss der Polysaccharidstruktur auf die ruminale Abbaubarkeit festgestellt werden. Gegenüber dem Einfluss der Cross-Links ausbildenden zellwandgebundenen

FS sowie dem Einfluss des Lignins ist der Einfluss der Polysaccharidstruktur, wie bereits in Abschnitt 3.1 diskutiert, aber generell auch als eher gering einzuschätzen.

Tab. 3.13: Übersicht der Korrelation verschiedener Faktoren der Zellwandpolysaccharidstruktur der 0h-Materialien zum prozentualen Zellwand-, Polysaccharid- bzw. Xylanabbau. Bei einem Wert unterhalb von 0,05 (*) ist der ermittelte Korrelationskoeffizient (Korr.) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (Sign.) (TS = Trockensubstanz, A/X = Arabinose/Xylose-Verhältnis, $X^{3,4+2,4}/\sum X$ Verhältnis der gesamten, verknüpften Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose, $X^{3,4}/\sum X$ = Verhältnis der in O-3 verknüpften Xylose-Einheiten zur Gesamt-Xylose, $2-Araff/\sum Ara$ = Verhältnis der in O-2-verzweigten Arabinose-Einheiten zur Gesamt-Arabinose)

		A/X-Verhältnis	$X^{3,4+2,4}/\sum X$	$X^{3,4}/\sum X$	$2-Araff/\sum Ara$
Zellwandabbau (% TS)	Korr.	- 0,073	0,006	- 0,204	0,275
	Sign.	0,736	0,976	0,338	0,193
Polysaccharidabbau (%)	Korr.	- 0,673*	0,111	- 0,006	0,020
	Sign.	0,000	0,605	0,976	0,926
Xylanabbau (%)	Korr.	0,005	- 0,086	- 0,135	0,287
	Sign.	0,983	0,690	0,530	0,174

3.3.4 Einfluss der zellwandgebundenen Ferulasäuren auf die ruminale Abbaubarkeit

Die Gehalte der estergebundenen monomeren FS und der DFS nahmen in allen untersuchten Sorten entsprechend ihrer Bindung an die Heteroxylane der Zellwände im Verlauf der 24h ruminalen Inkubation ab. Die entsprechenden Gehalte der 24h-Materialien können Tab. 5.15 (monomere FS) und Tab 5.16 (DFS) im Anhang 5.4 entnommen werden. Abb. 3.42 zeigt darüber hinaus eine Gegenüberstellung der Verhältnisse der zellwandgebundenen FS/DFS zum Xylangehalt in den 0h- und 24h-Materialien, anhand derer die relative Abnahme bzw. Anreicherung der zellwandgebundenen FS/DFS über den Verlauf des ruminalen Verdaus beobachtet werden kann. Es wird deutlich, dass das Verhältnis der estergebundenen monomeren FS zum Xylan im Verlauf der ruminalen Inkubation deutlich abnahm, während das Verhältnis der estergebundenen DFS zum Xylan annähernd gleich blieb und das Verhältnis von ethergebundener FS zum Xylan anstieg.

Zellwandgebundene FS können während des ruminalen Verdaus auf verschiedene Weisen abgespalten werden. Zum einen kann es aufgrund der enzymatischen Abspaltung der Arabinosesubstituenten von der Xylanhauptkette oder auch aufgrund der Spaltung der Xylanhauptkette selbst zur Bildung von löslichen FS-(Oligo)-Saccharidbruchstücken kommen. Zum anderen ist bekannt, dass verschiedene Spezies der Pansenmikroflora, u.a. *Ruminococcus* und *Butyrivibrio* spp., FS-Esteraseaktivität aufweisen und somit die Esterbindung zwischen den

FS und den Arabinose-Einheiten der GAX spezifisch spalten können (BORNEMANN et al., 1990, MCSWEENEY et al., 1998). Festzustellen war, dass die Abnahme der monomeren ester- gebundenen FS in etwa mit der Abnahme der aus den Seitenketten der GAX stammenden Arabinose vergleichbar ist (Ergebnisse nicht dargestellt). Durch die Ausbildung von DFS oder auch TFS können Heteroxylanstränge miteinander verknüpft werden. Hierdurch ändern sich nicht nur die physikochemischen Eigenschaften der Heteroxylane, sondern auch deren Angreifbarkeit für die Enzyme der Pansenmikroorganismen wird verringert. Verdeutlicht wird dies anhand der im Vergleich zur monomeren FS deutlich verringerten Abnahme des Verhältnisses der ester- gebundenen DFS zum Xylan über den ruminalen Verdau.

Sowohl monomere FS aber auch DFS können über verschiedene Ether- und C-C-Bindungen Cross-Links zwischen den Polysacchariden und dem Lignin ausbilden. Eine ruminale Spaltung der entstehenden Ether- oder C-C-Bindungen kann im Gegensatz zu den beschriebenen Esterbindungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Zudem kann sowohl aufgrund der sterischen Hinderung, bedingt durch die Größe des Ligninkomplexes, als auch aufgrund dessen Hydrophobizität, eine zusätzlich verringerte Angreifbarkeit entsprechender Zellwandstrukturen angenommen werden. Die zu beobachtende relative Anreicherung der ethergebundenen FS im Verhältnis zum Xylan, die, wie anhand der Darstellung in Abb. 3.42 deutlich wird, allerdings starken Schwankungen unterlag, bestätigt dies.

Während die genannten DFS-Cross-Links zwischen Polysacchariden den Abbau durch mikrobielle Enzyme somit wahrscheinlich nur verlangsamen, scheint der Ausbildung von Polysaccharid-Lignin-Komplexen eine größere Rolle bei der Inhibierung des mikrobiellen Abbaus von Pflanzenzellwänden und damit der Futtermittelverwertbarkeit zuzukommen (GRABBER et al., 2004).

Dementsprechend konnte in verschiedenen Studien anhand der nach alkalischer Druckhydrolyse freigesetzten und somit analytisch bestimm- baren ethergebundenen FS (α -O-4- und β -O-4-Ether) ein negativer linearer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Polysaccharid-Lignin-Cross-Links und der ruminalen Abbaubarkeit festgestellt werden (GOTO et al., 1994,

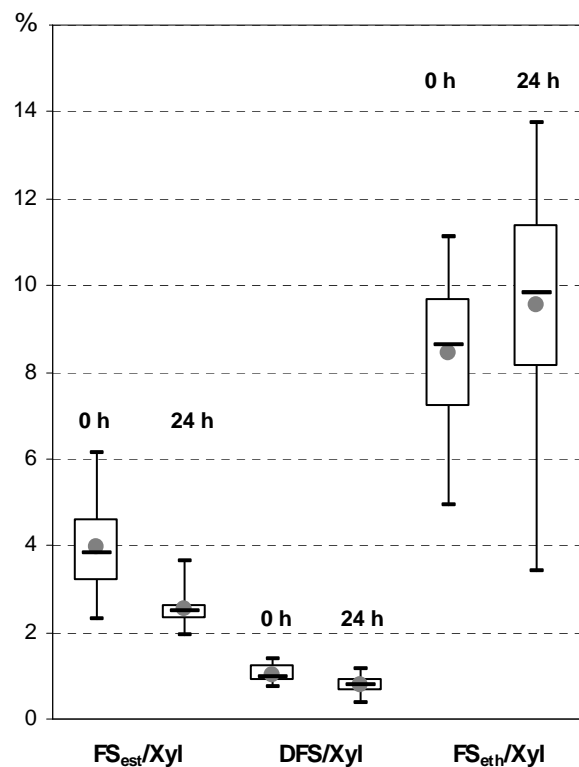


Abb. 3.42: Verhältnisse der zellwandgebundenen Ferulasäuren zum Xylangehalt in den 0h- und 24h-Materialien (FS_{est}/Xyl = Verhältnis der ester- gebundenen Ferulasäure zur Xylose (%), DFS/Xyl = Verhältnis der ester- gebundenen Diferulasäuren zur Xylose, FS_{eth}/Xyl = Verhältnis der ether- gebundenen Ferulasäure zur Xylose

ARGILLIER et al., 1996, CASLER & JUNG, 1999, MÉCHIN et al., 2000, LAM et al., 2003, JUNG & CASLER, 2006b, RIBOULET et al., 2008). Während die genannten Studien meist über einen breiten Reifezeitraum (JUNG & CASLER, 2006b) angelegt waren oder genetisch veränderte Pflanzen, wie z.B. brown midrib Mutanten, mit den entsprechenden Wildtypen verglichen wurden (GOTO et al., 1994, MÉCHIN et al., 2000), waren diese Korrelationen bei der Untersuchung von Pflanzen gleicher Reifestadien hingegen nur schwach (JUNG & BUXTON, 1994).

Wie in Abschnitt 3.2.2 ausführlich diskutiert, waren zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Maisrestpflanzenmaterialien insgesamt nur wenige Unterschiede in den Gehalten und der relativen Zusammensetzung der zellwandgebundenen Ferulasäuren zwischen den verschiedenen Sorten und Erntezeitpunkten nachweisbar. Darüber hinaus konnte eine komplexe Beeinflussung durch die drei Hauptfaktoren, aber auch durch die entsprechenden Interaktionen zwischen diesen nachgewiesen werden. Unter den gewählten Bedingungen dieser Studie hatten die Witterungsbedingungen den größten Einfluss. Negative Korrelationen zwischen den absoluten Gehalten der ethergebundenen FS, deren Anteil an der Gesamt-FS bzw. deren Verhältnis zum Xylangehalt und der ruminalen Abbaubarkeit konnten, wie anhand der in Tab. 3.14 aufgeführten Korrelationskoeffizienten ersichtlich ist, nicht nachgewiesen werden. Es wurde vielmehr ein schwach positiver Zusammenhang zwischen dem Gehalt der ethergebundenen FS und der Zellwand- sowie der Polysaccharidabbaubarkeit festgestellt. Wie bereits in Abschnitt 3.1.4.3 ausführlich beschrieben, stellt der mit der zugrunde liegenden Analytik bestimmbare Gehalt der ethergebundenen FS nur einen Teil der gesamten in Polysaccharid-Lignin-Cross-Links beteiligten FS dar, C-C- sowie β -O-4'-Styryl- und Biphenyletherbindungen können mit der angewandten Methode nicht bestimmt werden. Anhand der ermittelten Gehalte der ethergebundenen FS kann somit nicht zwangsläufig auf das tatsächliche Ausmaß von Polysaccharid-Lignin-Cross-Links geschlossen werden. Eventuell bestehende sorten- und/oder reifespezifische Unterschiede zwischen den Untersuchungsmaterialien bezüglich der verschiedenen Bindungsarten der FS-Lignin-Cross-Links können nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus können eventuell vorhandene abbauinhibierende Effekte der ethergebundenen FS von anderen zeitgleich auftretenden Effekten, wie z.B. dem Einfluss des Lignins oder der DFS, überlagert werden. Unter den Bedingungen der hier vorgestellten Studie konnte der in der Literatur beschriebene abbauinhibierende Einfluss der ethergebundenen FS somit nicht bestätigt werden.

Der in künstlich lignifizierten Maiszellwandstudien nachgewiesene abbauinhibierende Effekt der Polysaccharid-Polysaccharid-Cross-Links über DFS (GRABBER et al., 1998a, GRABBER et al., 1998b, GRABBER, 2005) ist in realen, vegetativen Pflanzenteilen bislang kaum erforscht. Wie in Abschnitt 3.1.4.2 beschrieben, existieren bislang nur sehr wenige Untersuchungen zum DFS-Gehalt in Maispflanzen bzw. Futtermitteln im Allgemeinen. Darüber hinaus wurden in den bislang

Tab. 3.14: Übersicht der Korrelation verschiedener Faktoren der zellwandgebundenen Ferulasäuren in den 0h-Materialien zum prozentualen Zellwand-, Polysaccharid- bzw. Xylanabbau. Bei einem Wert unterhalb von 0,05 (*) ist der ermittelte Korrelationskoeffizient (Korr.) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (Sign.) (TS = Trockensubstanz, FS_{eth} (%) = Gehalt ethergebundener Ferulasäure, DFS (µg/g) = Gehalt estergebundener Diferulasäuren, DFS/Xyl = Diferulasäuren/Xylose-Verhältnis, FS_{eth} = Verhältnis ethergebundener Ferulasäure zur Xylose)

		FS _{eth} (%)	DFS (µg/g)	Dimerisierungsgrad	Anteil ethergebundener FS (%)
Zellwandabbau (% TS)	Korr.	0,406*	0,214	0,152	0,246
	Sign.	0,049	0,309	0,480	0,247
Polysaccharidabbau (%)	Korr.	0,538*	0,098	0,203	0,419*
	Sign.	0,007	0,650	0,342	0,041
Xylanabbau (%)	Korr.	0,319	- 0,340	- 0,167	0,312
	Sign.	0,129	0,104	0,437	0,138
		FS _{est} +2xDFS/Xyl	DFS/Xyl	FS _{eth} /Xyl	
Zellwandabbau (% TS)	Korr.	- 0,356	- 0,330	- 0,067	
	Sign.	0,088	0,115	0,754	
Polysaccharidabbau (%)	Korr.	- 0,243	- 0,342	0,053	
	Sign.	0,253	0,102	0,804	
Xylanabbau (%)	Korr.	0,168	0,385	0,066	
	Sign.	0,431	0,063	0,779	

veröffentlichten Studien zum Teil nur wenige der insgesamt beschriebenen DFS-Isomere quantifiziert. MARITA et al. (2003) ebenso wie ABEDON et al. (2006) bestimmten mit Ausnahme der 8-8'(THF)-DFS ebenfalls alle in dieser Arbeit quantifizierten DFS in genetisch veränderten Maispflanzen bzw. -blättern und den entsprechenden Wildtypen. Ein Einfluss der DFS-Gehalte, des Dimerisierungsgrades der FS oder des DFS-Substitutionsgrades der Heteroxylane wurde in keiner der beiden Studien beschrieben bzw. untersucht. RIBOULET et al. (2008) bestimmten lediglich 2 der insgesamt 11 beschriebenen DFS-Isomere aus siloreifen Maisrestpflanzen. Für beide Isomere (5-5'- sowie 8-O-4'-DFS) konnten sie entgegen den Erwartungen eine positive Korrelation zur *in vitro* NDF-Abbaubarkeit nachweisen.

Für die in dieser Arbeit ermittelten absoluten Gehalte der DFS konnte, ebenso wie für den Dimerisierungsgrad und den DFS-Substitutionsgrad der Heteroxylane (DFS/Xyl), kein signifikanter Zusammenhang zur ruminalen Abbaubarkeit festgestellt werden. Der in der Literatur beschriebene abbauinhibierende Einfluss der DFS konnte somit, analog zur bereits beschriebenen ethergebundenen FS, unter den Bedingungen der hier vorgestellten Studie nicht bestätigt werden.

3.3.5 Einfluss der ligninassozierten Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Abbaubarkeit

Lignine sind wahrscheinlich die einzigen Komponenten der pflanzlichen Zellwand, die gegenüber dem ruminalen Abbau im Pansen des Wiederkäuers weitestgehend resistent sind (MONTIES, 1991, GRABBER et al., 2004). Daraus ergibt sich erwartungsgemäß eine Anreicherung dieser Zellwandstrukturkomponenten im Verlauf der ruminalen Inkubation. Dementsprechend konnte in den ruminal inkubierten 24h-Materialien eine prozentuale Zunahme sowohl der Ligningehalte als auch der an das Lignin estergebundenen pCS im Vergleich zum 0h-Material festgestellt werden. Eine detaillierte Auflistung der ermittelten Gehalte ist Tab. 5.15 (pCS -Gehalte) und Tab. 5.17 (Ligningehalte) im Anhang 5.4 zu entnehmen.

Negative Korrelationen zwischen dem Ligningehalt und der ruminalen Abbaubarkeit konnten in zahlreichen Studien sowohl an normalen Maisgenotypen als auch an gezielt genetisch veränderten Pflanzen, insbesondere den brown midrib Mutanten von Mais, nachgewiesen werden, weshalb der Ligningehalt als einer der primären Einflussfaktoren der ruminalen Abbaubarkeit gilt (BUXTON & RUSSELL, 1988, DEINUM & STRUIK, 1989, LUNDVALL et al., 1994, ARGILLIER et al., 1996, JUNG et al., 1998, MÉCHIN et al., 2000, BARRIÈRE et al., 2003, JUNG & CASLER, 2006b). Während die meisten der genannten Studien über ein breites Spektrum von Reifestadien angelegt waren, konnten bei Untersuchungen unterschiedlicher Sorten zu gleichen Reifestadien hingegen nur schwache Korrelationen zwischen der Zellwandabbaubarkeit und dem Ligningehalt festgestellt werden (JUNG & CASLER, 1991, JUNG & VOGEL, 1992, JUNG & BUXTON, 1994).

Vergleichbares konnte auch für die in dieser Arbeit ermittelten Ligningehalte bestätigt werden. Wie in Abschnitt 3.2.3 ausführlich beschrieben, waren zwischen den ermittelten Ligningehalten beider Bestimmungsmethoden kaum sorten- und/oder reifespezifische Unterschiede feststellbar. Analog dazu waren für die Ligningehalte auch kaum lineare Zusammenhänge zur ruminalen Abbaubarkeit nachweisbar. Die Ergebnisse der entsprechenden PEARSON-Korrelationen sind in Tab. 3.15 zusammengefasst dargestellt. Lediglich für die ermittelten KL-Gehalte ergab sich eine leicht negative Korrelation zur ruminalen Abbaubarkeit der Zellwandpolysaccharide. Korrelationen zum berechneten Zellwand- sowie Xylanabbau konnten nicht nachgewiesen werden. Für die ermittelten ABSL-Gehalte konnte ebenfalls kein linearer Zusammenhang zur ruminalen Abbaubarkeit festgestellt werden. Dieser geringe lineare Zusammenhang ist vermutlich vor allem auf die nur geringen Unterschiede sowohl in der Zellwandzusammensetzung als auch in deren Abbaubarkeit zwischen den untersuchten Sorten und Erntezeitpunkten zurückzuführen.

Für die Gehalte der an das Lignin estergebundenen pCS wurde im Gegensatz zu den Ligningehalten ein starker sortenspezifischer Einfluss nachgewiesen (siehe hierzu Abschnitt 3.2.3). Bei der Korrelation zur ruminalen Abbaubarkeit ergab sich eine schwach negative Korrelation zum Xylanabbau, zu den anderen berechneten Abbaubarkeiten konnte wiederum kein linearer Zusammenhang festgestellt werden.

Tab. 3.15: Übersicht der Korrelation verschiedener Gehalte der ligninassozierten Zellwandstrukturkomponenten in den 0h-Materialien zum prozentualen Zellwand-, Polysaccharid- bzw. Xylanabbau. Bei einem Wert < 0,05 (*) ist der ermittelte Korrelationskoeffizient (Korr.) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant (Sign.) (pCS = Gehalt estergebundener p-Cumarsäure, KL = Klason-Ligningehalt, ABSL = acetylbromidlöslicher Ligningehalt)

		pCS (%)	KL (%)	ABSL (%)
Zellwandabbau (% TS)	Korr.	0,154	0,026	0,348
	Sign.	0,472	0,905	0,096
Polysaccharidabbau (%)	Korr.	- 0,207	- 0,661*	- 0,201
	Sign.	0,331	0,000	0,346
Xylanabbau (%)	Korr.	- 0,443*	0,099	0,042
	Sign.	0,030	0,646	0,845

Neben dem Ligningehalt sowie dem als Ligninindikator verwendbaren pCS-Gehalt wird auch für die Ligninzusammensetzung ein Einfluss auf die ruminale Abbaubarkeit diskutiert (GRABBER et al., 2004, RALPH et al., 2004b, GRABBER, 2005). Es wurde angenommen, dass G-reiche Lignine durch einen höheren Anteil kondensierter Bindungen relativ stark verzweigt sind, während S-reiche Lignine, die aufgrund der zweiten Methoxygruppe in C-5-Position des Sinapylalkohols vermehrt β -O-4-Bindungen enthalten, linearere Strukturen ausbilden (TERASHIMA et al., 1993). Davon ausgehend wurde vermutet, dass durch S-reiche Lignine ein größeres Gebiet der Zellwand vor dem Angriff von Verdauungsenzymen geschützt werden könnte (JUNG & DEETZ, 1993).

In den bislang veröffentlichten Studien an Gräsern, insbesondere Maispflanzen, konnte allerdings kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Monolignolzusammensetzung des Lignins und der ruminale Abbaubarkeit nachgewiesen werden. Während die Abbaubarkeit in einigen Studien negativ zum S/G-Verhältnis korreliert war, konnten in anderen Studien positive oder keine Korrelationen beobachtet werden (BUXTON & RUSSELL, 1988, JUNG & CASLER, 1991, JUNG & VOGEL, 1992, JUNG & BUXTON, 1994, JUNG et al., 1994, JUNG et al., 1999, MÉCHIN et al., 2000). Da bei Veränderung der Ligninzusammensetzung in den Zellwänden realer Pflanzen immer auch mit Veränderungen der übrigen Zellwandstrukturkomponenten zu rechnen ist, könnten eventuell vorhandene Effekte durch diese überlagert worden sein, so dass der alleinige Einfluss der Ligninzusammensetzung in realen Futtermittelstudien kaum beurteilt werden kann. In Untersuchungen an künstlich lignifizierten, primären Maiszellwänden, bei denen gezielt nur das S/G-Verhältnis variiert wurde, wurde allerdings ebenfalls keine Beeinflussung der ruminale Abbaubarkeit durch die Ligninzusammensetzung festgestellt (GRABBER et al., 1997, GRABBER et al., 2003).

Analog dazu konnte für die in dieser Arbeit ermittelten S/G-Verhältnisse kein linearer Zusammenhang zur ruminale Abbaubarkeit nachgewiesen werden. Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, dass die für die drei untersuchten Sorten (A-C) ermittelte Monolignolzusammen-

setzung, wie bereits in Abschnitt 3.1.5.2 und Abschnitt 3.2.3 diskutiert wurde, deutlich von der bislang in anderen Studien beschriebenen Monolignolzusammensetzung der Maisrestpflanze abwich. Die Monolignolzusammensetzung der übrigen drei Sorten D-F, für die signifikant erhöhte pCS -Gehalte nachgewiesen wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Da bekannt ist, dass die pCS vorwiegend an die S-Einheiten des Lignins gebunden ist, könnte in diesen Sorten eventuell ein höheres S/G-Verhältnis vermutet werden. Eine abschließende Beurteilung des Einflusses der Ligninzusammensetzung auf die ruminale Abbaubarkeit ist somit nicht möglich.

3.3.6 Abschließende Diskussion zum Einfluss der Zellwandstrukturkomponenten auf die ruminale Abbaubarkeit

Der Vergleich der Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten in den 0h- und 24h-Materialien zeigte deutliche Veränderungen in der Zellwandzusammensetzung, verursacht durch den ruminale Verdau des Pflanzenmaterials. So wurden die Zellwandpolysaccharide den Erwartungen entsprechend ruminal abgebaut. Die Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide veränderte sich ebenfalls. Während der prozentuale Anteil der Glucose annähernd gleich blieb, wurde für Arabinose eine deutliche Abnahme und für Xylose eine Zunahme der prozentualen Anteile festgestellt. Der bevorzugte Abbau der aus den GAX-Seitenketten stammenden Monosaccharide gefolgt vom Abbau der Cellulose und des Xylanhauptstranges konnte somit bestätigt werden. Anhand der Ergebnisse der zellwandgebundenen FS konnte gezeigt werden, dass estergebundene DFS, insbesondere aber ethergebundene FS, im Vergleich zur monomeren estergebundenen FS deutlich weniger abgebaut werden. Für die ligninassoziierten Zellwandstrukturkomponenten, KL- und ABSL-Gehalt sowie dem Gehalt der estergebundenen pCS , konnte entsprechend der Erwartung eine Anreicherung über den ruminale Verdau nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund des starken Praxisbezugs der vorliegenden Studie konnte allerdings für keinen der in der Literatur beschriebenen abbauinhibierenden Einflussparameter der Zellwandstrukturkomponenten ein wirklich eindeutiger Einfluss auf die ruminale Abbaubarkeit bestätigt werden. Dies ist vermutlich hauptsächlich durch die nachweislich nur geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenmaterialien begründet. So wurden sowohl hinsichtlich der Zellwandzusammensetzung als auch hinsichtlich der Zellwand- bzw. der Polysaccharid- und Xylanabbaubarkeit insgesamt nur geringe Unterschiede zwischen den Sorten und den gewählten Erntezeitpunkten festgestellt.

4 Zusammenfassung

Die ruminale Abbaubarkeit der pflanzlichen Zellwand und somit der Maisrestpflanze wird auf komplexe Weise durch die physikochemischen Eigenschaften ihrer Gerüstsubstanzen beeinflusst. Detaillierte Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten sind daher für die Betrachtung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen unverzichtbar. Neben dem Ligningehalt werden die über Phenolcarbonsäuren gebildeten Cross-Links zwischen den Zellwandstrukturkomponenten als Haupteinflussfaktoren für die Inhibierung der ruminale Abbaubarkeit der Zellwandpolysaccharide diskutiert. Während die meisten Studien, in denen abbauinhibierende Einflüsse von Lignin und Ferulasäure-Cross-Links eindeutig nachgewiesen werden konnten, entweder über einen breiten Reifezeitraum angelegt waren oder stark unterschiedliche Genotypen untersuchten, wurden die in dieser Arbeit untersuchten Maisrestpflanzen sowohl hinsichtlich der Sorten als auch hinsichtlich der untersuchten Erntezeitpunkte bewusst praxisnah gewählt.

Es wurden in zwei Anbaujahren (2004/2005) insgesamt sechs Maissorten, die in Deutschland zur Herstellung von Silomais angebaut werden, über zwei Erntezeitpunkte (zur Siloreife der Pflanzen) hinweg untersucht. Neben der generellen Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten wurden auch die sorten- und reifespezifischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenmaterialien bestimmt. Über den Vergleich zweier Anbaujahre konnte zudem ein möglicher Einfluss der Witterungsbedingungen untersucht werden. Abschließend wurde analysiert, ob die in der Literatur beschriebenen negativen Einflussfaktoren der ruminale Abbaubarkeit unter den praxisnahen Bedingungen der zugrunde liegenden Studie von Bedeutung waren.

Die Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten unterteilte sich in die Untersuchung der Zellwandpolysaccharide, der zellwandgebundenen Phenolcarbonsäuren sowie des Lignins. Es wurde zunächst gezeigt, dass die direkt getrockneten und vermahlenden Pflanzenmaterialien nicht zur Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten geeignet sind. Die nach Extraktion wasserlöslicher Komponenten erhaltenen Rückstände (0h-Materialien) entsprachen hingegen weitgehend dem Zellwandmaterial und waren zur Charakterisierung der Zellwandstrukturkomponenten gut geeignet.

Die Zellwandpolysaccharide setzten sich überwiegend aus Cellulose und sauren Glucuronoarabinoxylanen zusammen. Dabei waren die sorten- und reifespezifischen Unterschiede sowohl der Polysaccharidgehalte als auch die der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide insgesamt gering und schienen durch die in den Anbaujahren vorherrschenden Witterungsbedingungen überlagert zu werden. Der Verzweigungsgrad der Glucuronoarabinoxylane war mit einem durchschnittlichen Arabinose/Xylose-Verhältnis von 0,13 sehr gering, was durch die Untersuchung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharideinheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Komplexität der Arabinoseseitenketten ebenfalls gering war. Nach 24h ruminale Inkubation wurden zusammengefasst betrachtet alle nachgewiesenen Monosaccharid-Einheiten der Polysaccharide zumindest teilweise abgebaut, wobei die aus den Heteroxylanseitenketten stammende Arabinose dem

stärksten ruminalen Abbau unterlag, gefolgt von Glucose (aus Cellulose) und der aus dem Xylanhauptstrang stammenden Xylose.

p-Cumarsäure und Ferulasäure konnten als die dominierenden Phenolcarbonsäuren der Maisrestpflanze bestätigt werden. Darüber hinaus konnte anhand der Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse mit Driselase die bevorzugte Bindung der Ferulasäure an die Zellwandpolysaccharide sowie der *p*-Cumarsäure an das Lignin gezeigt werden. Dies wurde bezüglich der *p*-Cumarsäure zusätzlich durch den spezifischen Nachweis von *p*-Cumarsäure-Monolignol-Estern bekräftigt. Neben der monomeren Ferulasäure wurden mit Ausnahme der 4-O-5'-DFS alle bislang beschriebenen Dehydrodiferulasäure-Isomere nachgewiesen und mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-DAD Methode quantifiziert. Darüber hinaus gelang in dieser Arbeit erstmals der Nachweis von Dehydrotriferulasäuren auch in den vegetativen Pflanzenteilen von *Gramineen*. Es konnten insgesamt vier Dehydrotriferulasäuren isoliert und eindeutig identifiziert werden (8-5'nc,8'-O-4"-, 8-8'c,8'-O-4"-, 8-O-4',8'-O-4"- und 5-5',8'-O-4"-Dehydrotriferulasäure), eine weitere Dehydrotriferulasäure (5-5',8'-5''nc-gekoppelt) wurde vorläufig identifiziert. Der Nachweis von insgesamt 18 verschiedenen Cyclobutandimeren, sowohl Homo- als auch der Heterodimeren der Ferula- und *p*-Cumarsäure, lässt darüber hinaus vermuten, dass den genannten photochemisch gekoppelten Dimeren insbesondere in vegetativen Pflanzenteilen eine größere Bedeutung hinsichtlich der Ausbildung abbauinhibierender Cross-Links zukommen könnte als bislang angenommen. Die Unterschiede bezüglich der phenolischen Säuren zwischen den untersuchten Sorten, Erntezeitpunkten und Jahren waren ebenfalls gering, wobei sich im Gegensatz zu den Zellwandpolysacchariden allerdings zum Teil deutlichere Unterschiede zwischen den Erntezeitpunkten zeigten.

Die Bestimmung der Ligningehalte erfolgte mittels zweier Analysemethoden. Die mit beiden Methoden ermittelten Gehalte waren in den 0h-Materialien annähernd gleich, so dass keine der Methoden eindeutig bevorzugt werden kann. Ebenso konnten zwischen den untersuchten Sorten, Erntezeitpunkten und Anbaujahren keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Die Bestimmung der Monolignolzusammensetzung ergab niedrigere Syringyl- zu Guaiacyl-Verhältnisse als in der Literatur beschrieben. Ob diese Abweichung auf einem tatsächlichen Unterschied der Zellwandzusammensetzung oder lediglich auf einem methodischen Unterschied beruht, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Wie beschrieben wurden, wenn überhaupt, nur wenig ausgeprägte sorten- und/oder reife-spezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten, aber auch in deren ruminaler Abbaubarkeit festgestellt. Diese wurden durch die Unterschiede zwischen den Anbaujahren zum Teil deutlich überlagert. Unter den praxisnahen Bedingungen dieser Studie hatten somit die in den Anbaujahren vorherrschenden Witterungsbedingungen den größten Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellwandstrukturkomponenten und deren Abbaubarkeit. Analog dazu waren über alle untersuchten Probenmaterialien hinweg betrachtet nur wenige aussagekräftige Korrelationen der verschiedenen abbauinhibierenden Zellwandstrukturkomponenten zur ruminalen Abbaubarkeit festzustellen. Die in der Literatur beschriebenen abbauinhibierenden Einflussfaktoren der ruminalen Zellwandabbaubarkeit konnten somit in dieser stark praxisbezogenen Studie nicht bestätigt werden.

4 Summary

The digestibility of forage cell walls is influenced in a complex manner by the physicochemical properties of its structural compounds. Therefore detailed knowledge of the cell wall molecular structures is indispensable. Generally, the cell wall polysaccharide digestibility is thought to be influenced primarily by both progressive lignification of the plant cell walls and by cross-linking of polysaccharides with each other and with lignin by *p*-hydroxycinnamates. Most studies pointing out these factors as impact factors on degradability were cell wall model studies or studies of maize internodes strongly varying in maturity. Contrary to those, the study described in this thesis had a strong practical focus. The investigated corn varieties and harvest dates were chosen under realistic economical farming conditions.

A total of six corn varieties, which have been used for the production of silage as ruminant feedstuff in Germany over many years, were investigated in a two year replicated field trial (2004/2005) at two different maturity stages. Both maturity stages were representative for the production of silage. The cell wall composition was characterised in detail and information about the general structures within the cell wall as well as about the different influences of the genotype and maturity was gathered. The two year repetition of the trial allowed for investigating the influence of the weather conditions during the harvesting years as well. An additional aim of this study was to determine whether or not the discussed degradability impact factors also influence the digestibility of corn stovers grown under the realistic economical farming conditions of the study.

The characterisation of the cell wall structures included the analysis of the cell wall polysaccharides, the cell wall bound *p*-hydroxycinnamates and lignins. As the directly dried and ball-milled plant material was not suitable for the characterisation of the cell wall components, the "0 h material" was used as starting material for this purpose. This material was obtained after extraction of water soluble compounds and well represented the plant cell wall.

Cellulose and glucuronoarabinoxylans were the most abundant polysaccharides within the cell walls of the analysed corn stover. Both genotype and maturity had little influence on the overall polysaccharide contents as well as the monosaccharide compositions of the cell wall polysaccharides. The observed variations between genotypes and maturity stages were small and seemed to be overlapped by the influence of the weather conditions under which the plants were grown. With an average arabinose/xylose-ratio of 0.13 the glucuronoarabinoxylans were only slightly branched as confirmed by methylation analysis. In addition, the complexity of the glucuronoarabinoxylan side chains was also low. Generally, all identified monosaccharides were at least partially digested during ruminal incubation (24 h). The highest decrease was observed for arabinose, which stems from the heteroxylan sidechains, followed by cellulosic glucose. Xylose, which mainly derives from the heteroxylan backbone, showed the lowest decrease.

p-Coumaric and ferulic acid were the predominant *p*-hydroxycinnamates in corn stover. Enzymatic hydrolysis with driselase confirmed that ferulic acid is primarily ester-linked to the cell wall polysaccharides while *p*-coumaric acid is mainly ester-bound to lignins. The latter was also confirmed by the specific identification of *p*-coumaric-monolignol-esters. Next to monomeric ferulic acid all known dehydrodiferulic acid isomers, with the exception of the 4-*O*-5'-dimer, were identified in corn stover cell wall material. Quantification of all dimers was accomplished using an optimised and validated HPLC-DAD method. In addition, ferulic acid trimers were identified. Although their occurrence in cereal grains was demonstrated earlier this is the first report on the existence of ferulic acid trimers in the vegetative parts of the graminaceous plants. Four dehydrotriferulic acids (8-5'*nc*,8'-*O*-4''-, 8-8'*c*,8'-*O*-4''-, 8-*O*-4',8'-*O*-4''- and 5-5',8'-*O*-4''-coupled triferulic acid) were isolated in preparative scale and unambiguously identified by NMR. An additional isomer, 5-5',8'-5'*nc*-triferulic acid, was tentatively identified. A total of 18 different cyclobutane dimers derived from either *p*-coumaric or ferulic acid as well as from mixtures of both were found in the investigated cell wall materials. These results indicate that at least in plant stovers photochemically formed dimers might have a greater impact on the cross-linking cell wall components than suggested earlier. *p*-Hydroxycinnamate contents and compositions showed little differences between the different genotypes, maturity stages and harvesting years. In contrary to the cell wall polysaccharides slightly greater variations between the two maturity stages were observed for some of the cell wall bound phenolics.

Lignin contents were determined using two different methods. Both methods showed almost equal results for the 0h-materials, leaving none of the methods in favour of the other. Additionally, no distinct differences between the investigated genotypes, maturity stages and years were observed. The monolignol composition as determined by derivatisation and reductive cleavage of the lignin polymer showed a lower syringyl/guaiacyl-ratio than expected from literature. It was not possible to unambiguously clarify whether these differences were caused by methodological variations or represent actual variations in the lignin composition.

Due to the strong practical focus of the study, only small variations of the cell wall composition between the investigated maturity stages were observed. The variations between the different varieties studied were not great either and sometimes even smaller than the differences observed among the samples harvested in different years. This indicates that weather conditions may have a more distinct influence on the cell wall composition than the genotype. Moreover, only poor correlations were found between the ruminal cell wall digestibility, which showed little variations either, and different degradability impact factors. The often discussed impact of lignin as well as of cell wall cross-linking by *p*-hydroxycinnamates on the cell wall digestibility was not confirmed under the strong practical focus of the study.

5 Anhang

5.1 Geräte- und Messparameter

5.1.1 Gaschromatographie

5.1.1.1 Bestimmung der neutralen Monosaccharide in den Polysacchariden als deren Alditolacetate mittels Gaschromatographie

<i>Gaschromatograph:</i>	Focus GC (Thermo Electron Corporation, Milan, Italy)
<i>Säule:</i>	DB-5 Fused-Silica-Kapillarsäule (Methylpolysiloxan, 5 % Phenylgruppen), 30 m Länge, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (J & W Scientific, Folsom, TX, USA)
<i>Autosampler:</i>	AI 3000
<i>Injektor:</i>	Split 1:6, 250 °C
<i>Injektionsvolumen:</i>	1 µL
<i>Detektor:</i>	FID, 290 °C
<i>Trärgas:</i>	Helium, 1,6 mL/min
<i>Make-up-Gas:</i>	Helium
<i>Brenngase:</i>	Druckluft, Wasserstoff
<i>Auswerteeinheit:</i>	PC mit Chromstar-Software Version 4.05 (SCPA, Stuhr, Deutschland)
<i>Temperaturprogramm:</i>	

Anfangstemperatur: 150 °C, Anfangszeit: 3 min

	<i>Aufheizrate (°C/min)</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	5	200	1
<i>Level 2</i>	2,5	220	5
<i>Level 3</i>	20	300	10

5.1.1.2 Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide - Methylierungsanalyse

System 1: Identifizierung der PMAA

<i>Gaschromatograph:</i>	HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Säule:</i>	HP-5-MS-Fused-Silica-Kapillarsäule (Methylpolysiloxan mit 5 % Phenylgruppen), 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Injektor:</i>	Split 1:30, 250 °C
<i>Injektionsvolumen:</i>	1 - 2 µL
<i>Trärgas:</i>	Helium, 1,0 mL/min

Massenspektrometer: HP 5972 Mass Selective Detector (Hewlett Packard, Waldbronn)
 Ionisationsenergie: 70 eV;
 Scanbereich: m/z 50 - 550
Auswerteeinheit: PC mit Chrom Station-Software (Hewlett Packard, Waldbronn)

System 2: Quantifizierung der PMAA

siehe Abschnitt 5.1.1.1

Temperaturprogramm für System 1 und 2:

<i>Anfangstemperatur: 140 °C, Anfangszeit: 2 min</i>			
	<i>Aufheizrate (°C/min)</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	1	180	5
<i>Level 2</i>	10	300	5

5.1.1.3 Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung – DFRC-Methode (derivatisation followed by reductive cleavage)

System 1: Identifizierung der Monolignole

siehe Abschnitt 5.1.1.2

System 2: Quantifizierung der Monolignole

siehe Abschnitt 5.1.1.1

Temperaturprogramm für System 1 und 2:

<i>Anfangstemperatur: 140 °C, Anfangszeit: 1 min</i>			
	<i>Aufheizrate (°C/min)</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	3	230	0
<i>Level 2</i>	30	300	10

5.1.1.4 Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte

Gaschromatograph: Trace 2000 (ThermoQuest, Thermo Scientific, Dreieich)
Säule: HP-5-MS-Fused-Silica-Kapillarsäule (Methylpolysiloxan mit 5 % Phenylgruppen), 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Hewlett Packard, Waldbronn)
Injektor: Split 1:10, 300 °C
Injektionsvolumen: 1 µL

Trägergas: Helium, 1,0 mL/min
Massenspektrometer: PolarisQ ion trap (Thermo Scientific, Dreieich)
 Ionisationsenergie: 70 eV
 Scanbereich: m/z 50 - 700
Auswerteeinheit: PC mit Xcalibur-Software (Finnigan, Austin, TX, USA)
Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur: 150 °C, Anfangszeit: 1 min

	<i>Aufheizrate (°C/min)</i>	<i>Endtemperatur</i>	<i>Haltezeit</i>
<i>Level 1</i>	3	250	0
<i>Level 2</i>	30	300	25

5.1.2 Gelpermeationschromatographie

5.1.2.1 Fraktionierung oligomerer Hydroxycimtsäuren mittels Gelpermeationschromatographie an Bio-Beads S-X3

Säule: GPC-Glassäule ECO^{Plus} (1000 x 15 mm ID) (Kronlab, Sinsheim)
Stationäre Phase: Bio-Beads S-X3 (Bio-Rad, München)
 Gelbetthöhe: ca. 95 cm
Mobile Phase: THF

Flussrate:

	<i>Flussrate (mL/min)</i>	<i>Laufzeit (min)</i>
<i>Level 1</i>	0,25	0 - 360
<i>Level 2</i>	0,50	360 - 395
<i>Level 3</i>	0,75	395 -

Temperatur: RT
Pumpe: L-6000 Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Probenaufgabe: Sixportventil Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA)
 700 µL Probenschleife
Injektionsvolumen: 500 µL
Detektor: L-7400 LaChrom UV-Detektor (Merck-Hitachi, Darmstadt)
 Detektionswellenlänge (λ): 325 nm
Auswertung: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr)

5.1.2.2 Fraktionierung/Aufreinigung mittels Sephadex LH-20-Chromatographie

Säule: GPC-Glassäule (1000 x 25 mm ID) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
Stationäre Phase: Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
 Gelbetthöhe: ca. 85 cm
Eluent: Gradientenelution mit MeOH/ 0,5 mM TFA-Gemischen

Temperatur: RT
Pumpe: L-6200A Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Probenaufgabe: Sixportventil, 25 mL Probenschleife
Injektionsvolumen: 15 - 20 mL
Detektor: L-7400 LaChrom UV-Detektor (Merck-Hitachi, Darmstadt)
 λ : 325 nm und 280 nm
Fraktionensammler: L-7655 (Merck, Darmstadt), 12 min Fraktionen
Auswertung: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr)
Elutionsgradient:

<i>Zeit (h)</i>	<i>Mobile Phase (v/v)</i>	<i>Flussrate (mL/min)</i>
Konditionierung (24 h)	0,5 mM TFA/MeOH (95/5)	1,0
0 – 72	0,5 mM TFA/MeOH (95/5)	1,5
72 – 144	0,5 mM TFA/MeOH (50/50)	1,0
144 – 209	0,5 mM TFA/MeOH (40/60)	1,0
Reinigung (24h)	0,5 mM TFA/MeOH (10/90)	1,0

5.1.3 Hochleistungsflüssigchromatographie

5.1.3.1 Fraktionierung/Aufreinigung mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und UV-spektroskopischer Detektion

System 1: Fraktionierung/Aufreinigung der aus Maiskleie isolierten Di- und Triferulasäure-Standardsubstanzen

Trennsäule: Nucleosil 100-5 C18-HD (250 x 10 mm ID) (Macherey-Nagel, Düren)
5 μ m Partikelgröße
Vorsäule: 5 μ m Nucleosil 100-5 C18-HD (50 x 10 mm ID) (Macherey-Nagel, Düren)
Säulenofen: T-6300 Column Thermostat (Merck, Darmstadt), 35 °C oder 45 °C
Mobile Phase: Gradientenelution mit 1 mM TFA/ACN/MeOH
Flussrate: 2,7 mL/min
Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Probenaufgabe: Sixportventil Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA),
100 μ L Probenschleife
Injektionsvolumen: 60 μ L
Detektor: L-7400 LaChrom UV-Detektor mit analytischer Messzelle (Merck-Hitachi, Darmstadt), λ : 325 bzw. 280 nm
Auswertung: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr)

Elutionsgradienten:

Gradient zur Isolierung von: 8-8'^c-, 8-O-4'- und 8-5'^c-DFS
 5-5',8'-O-4''- und
 8-O-4',8'-O-4''-TFS
 45 °C, λ 325 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	MeOH (%)
0	90	10
10 - 15	60	40
20 - 25	50	50
30 - 35	20	80
40	10	90
45 - 60	90	10

Gradient zur Isolierung von: 8-8'^{nc}-DFS
 8-5'^{nc}-DFS und 8-8'^c,8'-O-4''-TFS
 35 °C, λ 325 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	MeOH (%)
0	75	25
20 - 25	40	60
30 - 35	10	90
40 - 55	75	25

Gradient zur Isolierung von: 8-8'(THF)-DFS
 45 °C, λ 280 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	MeOH (%)
0 - 5	70	30
10	60	40
15	55	45
20	50	50
25 - 30	20	80
35 - 45	70	30

System 2: Fraktionierung/Aufreinigung der aus Maisrestpflanzen isolierten Triferulasäuren und Cyclobutanderivate

Trennsäule: Luna Phenyl-Hexyl (250 x 10 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg)
 5 µm Partikelgröße
Vorsäule: 5 µm Phenyl-Hexyl (10 x 10 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg)
Säulenofen: T-6300 Column Thermostat (Merck, Darmstadt), 35 °C und 45 °C
Mobile Phase: Gradientenelution mit 1 mM TFA/ACN/MeOH
Flussrate: 2,5 mL/min

Pumpe: L-6200 Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Probenaufgabe: Sixportventil Rheodyne 7725 (Cotati, CA, USA)
 100 µL Probenschleife
Injektionsvolumen: 60 µL
Detektor: L-7400 LaChrom UV-Detektor mit analytischer Messzelle (Merck-Hitachi, Darmstadt), λ : 325 bzw. 280 nm
Auswertung: PC mit Chromstar-Software, Version 4.05 (SCPA, Stuhr)
Elutionsgradienten:

Gradient zur Trennung der Dimeren-Fraktion LH 1, λ 280 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	ACN/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)	MeOH/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)
0 - 15	65	20	15
20	10	35	55
25 - 30	65	20	15

Gradient zur Trennung der Trimeren-Fraktionen LH 7, λ 325 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	ACN/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)	MeOH/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)
0 - 15	60	25	15
20 - 25	45	35	20
30 - 35	25	35	40
40	0	0	100
45 - 50	60	25	15

Gradient zur Trennung der Trimeren-Fraktionen LH 9 & LH 10, λ 325 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	ACN/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)	MeOH/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)
0 - 10	75	10	15
15 - 20	60	25	15
25 - 30	50	25	25
35 - 40	20	25	55
45 - 55	75	10	15

Gradient zur Trennung der Trimeren-Fraktionen LH 11, LH 12 & LH 13, λ 325 nm

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	ACN/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)	MeOH/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)
0 - 15	65	20	15
20 - 25	50	35	15
30	40	35	25
35 - 40	10	35	55
45	65	20	15

5.1.3.2 Identifizierung und Quantifizierung monomerer Phenolcarbonsäuren (RP-HPLC-UV)

Trennsäule: Luna Phenyl-Hexyl (250 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg)
5 µm Partikelgröße

Vorsäule: Security Guard, Phenyl-Hexyl (3 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg)

Säulenofen: LKB 2155 HPLC Column Oven (Bromma, Schweden), 45 °C

Mobile Phase: Gradientenelution mit 1 mM TFA/ACN/MeOH

Flussrate: 1 mL/min

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

Probenaufgabe: Autosampler: Spectra Series AS 100 (Thermo Separation Products, Darmstadt)

Injektionsvolumen: 20 µL

Detektor: L-7400 LaChrom UV-Detektor (Merck-Hitachi, Darmstadt), λ: 280 nm

Auswertung: PC mit hsm32-Software, Version 4.1 (Merck-Hitachi, Darmstadt)

Elutionsgradient:

Zeit (min)	TFA (1 mM) (%)	ACN/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)	MeOH/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)
0 - 10	87	13	0
20	77	20	3
25	70	25	5
30	25	50	25
35 - 45	87	13	0

5.1.3.3 Identifizierung und Quantifizierung von Diferulasäuren (RP-HPLC-DAD)

Trennsäule: Luna Phenyl-Hexyl (250 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg)
5 µm Partikelgröße

Vorsäule: 5 µm Phenyl-Hexyl (4,6 x 3 mm ID), (Phenomenex, Aschaffenburg)

Säulenofen: L-7300 Column oven (Merck-Hitachi, Darmstadt), 45 °C

Mobile Phase: Gradientenelution mit 1 mM TFA/ACN/MeOH

Flussrate: 1 mL/min

Pumpe: L-7150 Intelligent Pump (Merck-Hitachi, Darmstadt)

Probenaufgabe: Autosampler: L 7200 LaChrom (Merck-Hitachi, Darmstadt)

Injektionsvolumen: 20 µL

Detektor: L-7455 DAD LaChrom (Merck-Hitachi, Darmstadt)
λ: 280 und 325 nm

Auswertung: PC mit hsm32-Software, Version 4.1 (Merck-Hitachi, Darmstadt)

Elutionsgradient:

<i>Zeit (min)</i>	<i>TFA (1 mM) (%)</i>	<i>ACN/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)</i>	<i>MeOH/TFA (1 mM) (90/10, v/v) (%)</i>
0	85	15	0
15	82	18	0
20	80	20	0
25	72	25	3
30	70	25	5
40 - 45	65	30	5
55	55	40	5
60	10	50	40
65 - 75	85	15	0

5.1.3.4 Charakterisierung der isolierten Verbindungen (RP-HPLC-DAD/MS)

<i>Trennsäule:</i>	Luna Phenyl-Hexyl (250 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg) 5 µm Partikelgröße
<i>Vorsäule:</i>	Phenyl-Hexyl Security Guard, (3 x 4,6 mm ID) (Phenomenex, Aschaffenburg)
<i>Säulenofen:</i>	T-6300 Column Thermostat (Merck, Darmstadt), 35 °C und 45 °C
<i>Mobile Phase:</i>	Gradientenelution mit ACN/Ameisensäure (0,1 %)
<i>Flussrate:</i>	1 mL/min
<i>Pumpe:</i>	HP Series 1100, G 1312A BinPump mit Degasser G 1322A (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Probenaufgabe:</i>	Autosampler: HP Series 1100, G 1313 (Hewlett Packard, Waldbronn)
<i>Injektionsvolumen:</i>	20 µL
<i>DAD-Detektor:</i>	HP Series 1100, G 1314A (Hewlett Packard, Waldbronn), λ: 325 nm und 280 nm
<i>MS-Detektor:</i>	HP Series 1100, G 1946A (Hewlett Packard, Waldbronn) Ionenquelle: AP-ESI, Polarität: positiv & negativ Dry gas flow: 10 L/min Nebulizer pressure: 50 psig Dry gas temperature: 350 °C Capillary voltage: 4000 V Fragmentorspannung: positiv: 75 V, negativ: 90 V Scanbereich: 100 - 1000 m/z
<i>Auswertung:</i>	PC mit LC/MSD Chem Station Software, Version A05.02 (Hewlett Packard, Waldbronn)

Elutionsgradient:

Zeit (min)	Ameisensäure (0,1 %) (%)	ACN (%)
0	82	18
5	80	20
10	75	25
15	70	30
25 - 30	65	35
35	55	45
45	10	90
50 - 55	82	18

5.1.4 Kernresonanzspektroskopie

NMR-Gerät: Bruker DRX 500, DMX 750 (cryoprobe) (Rheinstetten)

Kalibrierung: Relativ zu Aceton als internen Standard mit $\delta_H = 2,04$, $\delta_C = 29,8$

Probenvorbereitung: Messung in 0,7 mL Aceton- d_6 oder Aceton- d_6 /H₂O (3/1, v/v)

5.1.5 Sonstige Geräte

Analysenwaage: Kern ABS 220-4, Maximalgewicht = 220 g
Auflösung 0,1 mg (Kern, Balingen-Frommern)

Autoklav: Sanoclav MCS-123 (Wolf, Geislingen)

Heizblock (Druckhydrolyse): DAH 406 (Berghof, Enningen)
Steuerungseinheit: BTU 842 (Berghof, Enningen)

Kjeldahl-Aufschlussblock: 1007 Digestor (Tecator, Schweden)

Kjeldahl-Destillationsapparatur: Vapodest 12 (Gerhardt, Bonn)

Magnetrührwerk: MR 3001 K mit Heizplatte (Heidolph, Schwabach)

Muffelofen: (Heraeus, Hanau)

pH-Meter: pH DIGI 520 (WTW, Weilheim),
pH-Elektrode, Hanna Instruments HI 1332

Planetenkugelmühle: Pulverisette 7, (Fritsch, Idar-Oberstein)

Präzisionswaage: Sartorius Universal, Maximalgewicht = 220 g
Auflösung = 0,01 g (Sartorius, Göttingen)

Reagenzglasschüttler: Reax top (Heidolph, Schwabach)

Rotationsverdampfer: Heidolph VV 2000 (Heidolph, Schwabach)
Vakuumcontroller: CVC II (Vacuubrand, Wertheim)

Schlagkreuzmühle mit Segmentsieb: (Nelles & Co., Braunschweig)

Schlagmessermühle: Typ A 10S (Janke & Kunkel/IKA, Staufen i. Br.)

Taumel-Rollenmischer: Assistent RM5, 35 U/min (Hecht, Sondheim)

Trockenschrank: (Heraeus, Hanau)

<i>Ultraschallbad:</i>	Transonic Digital (Elma, Singen)
<i>UV-Spektralphotometer:</i>	Perkin-Elmer Lambda 2 (Perkin-Elmer, Wiesbaden)
<i>Vakuumtrockenschrank:</i>	RVT 360, 50-180 °C (Heraeus, Hanau)
	<i>Vakuumcontroller:</i> CVC II (Vacuubrand, Wertheim)
<i>Wasserbad/Thermostat:</i>	Typ 1012 (GFL, Hannover)
<i>Zentrifuge 1:</i>	Christ Macrofuge (0-6000 U/min) (Heraeus, Hanau)
<i>Zentrifuge 2:</i>	UJIII Christ Labofuge (0-6000 U/min) (Heraeus, Hanau)

5.2 Chemikalienverzeichnis

Stoff	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26	Merck
Aceton-d ₆ , 99,8 %	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26	Deutero
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37	Acros
Acetylbromid	C	14-34	9-26-36/37/39-45	Fluka
Alcalase 2.4 L FG	-	-	-	Novozymes
Ameisensäure	C	35	23.2-26-45	Merck
Ammoniak, 25 %	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61	Merck
Ammoniumchlorid	Xn	22-36	22	Merck
L-Arabinose	-	-	-	Acros
Bio-Beads S-X3	-	-	-	Bio-Rad
BSTFA	C	10-34	26-36/37/39-45	Pierce
Cellulose	-	-	-	Acros
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37	Merck
<i>trans p</i> -Cumarsäure	Xi	36/37/38	-	Fluka
<i>o</i> -Cumarsäure	Xi	36/37/38	-	Sigma
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37	Merck
Diethylether	F ⁺ , Xn	12-19-22-66-67	9-16-29-33	Merck
Dimethylsulfoxid	-	-	-	Fluka
1,4-Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46	Merck
Driselase	-	-	-	Sigma
Erythrit	-	-	-	Merck
Essigsäure 100 %	C	10-35	23.2-26-45	Acros
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45	Acros
Ethanol, 96 %	F	11	7-16	Merck

Stoff	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Ethylacetat	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33	Merck
4,4-Ethylidenbisphenol	Xn	37-41-43-62	26-36/37/39-46	Fluka
<i>trans</i> Ferulasäure	-	-	-	Acros
D-Galactose	-	-	-	Acros
D-Galacturonsäure Monohydrat	-	-	-	Acros
D-Glucose	-	-	-	Acros
4-Hydroxybenzaldehyd	Xi	36/38	22	Merck
4-Hydroxybenzoesäure	Xi	36/37/38	-	Merck
<i>m</i> -Hydroxydiphenyl	Xi, N	22-61	36/37/38-50	Merck
Hydroxylaminhydrochlorid	Xn, N	22-36/38-43- 48/22-50	22-24-37-61	Fluka
4-Hydroxyphenyl- essigsäure	Xi	36/37/38	26-36	Sigma
4-Hydroxyphenyl- propionsäure	Xi	36/37/38	26-36	Sigma
<i>myo</i> -Inosit	-	-	-	Merck
Kaffeesäure	Xn	40	36/37	Merck
Magnesiumsulfat	-	-	-	Merck
D-Mannose	-	-	-	Merck
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45	Baker
1-Methylimidazol	C	21/22-34	26-36-45	Acros
Methyliodid	T	21-23/25-37/38- 40	36/37-38-45	Merck
Natriumbordeuterid	F, T	15-24/25-35	14.2-26- 36/37/39-43.6- 45	Fluka
Natriumborhydrid	F, T	15-24/25-35	14.2-26- 36/37/39-43.6- 45	Fluka
Natriumdihydrogen- phosphat-Dihydrat	-	-	-	Merck
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-	Merck
Natriumhydroxid	C	35	26-36/37/39-45	Merck
Natriumhypochlorit	C	31-34	26-28-36/37/39- 45-50	Merck
Natriumnitroprussid- Dihydrat	T	25	22-37-45	Merck
<i>tri</i> -Natriumphosphat- Dodecahydrat	Xi	36/37/38	26	Merck
Natriumsalicylat	Xn	22-36	22-24	Merck
Natriumsulfat	-	-	-	Merck

Stoff	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
<i>di</i> -Natriumtetraborat	-	-	-	Merck
Phenol	T, C	23/24/25-34- 48/20/21/22-68	24/25-26-28.6- 36/37/39-45	Merck
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1	Merck
Salzsäure 37 %	C	34-37	26-36/37/39-45	Merck
Schwefelsäure 95-97 %	C	35	26-30-45	Merck
Selenreaktionsgemisch (nach Wieninger)	N	52/53	61	Merck
Sephadex LH-20	-	-	-	Pharmacia
Sinapinsäure	Xi	36/37/38	-	Fluka
Syringaldehyd	Xi	36/37/38	-	Sigma
Syringasäure	-	-	-	Merck
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33	Merck
Triethanolamin	-	-	-	Merck
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1- 45-61	Merck
Vanillin	Xn	22	-	Merck
Vanillinsäure	-	-	-	Sigma
D-Xylose	-	-	-	Acros
Zinkstaub	N	50/53	60-61	Merck

5.3 Arbeitsvorschriften

Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich bei Wasser um demineralisiertes Wasser.

5.3.1 Kohlenhydratanalytik

5.3.1.1 Bestimmung der Gesamtkohlenhydratgehalte

Probenvorbereitung:

- 40-50 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas mit Glasperlen (1,25-1,55 mm Durchmesser, Füllhöhe ca. 4 mm) einwiegen
- 1,5 mL 12 M Schwefelsäure zugeben und sofort kräftig vortexen
- 30 min in Eisbad stehen lassen, alle 5 min vortexen
(auf komplette Benetzung des Probenmaterials achten)
- 2 h bei RT stehen lassen, alle 10 min vortexen
- mit 9,75 mL Wasser auf ca. 2 M Schwefelsäure verdünnen, membranfiltrieren
- 100 µL des Filtrats in 10 mL Messkolben, mit Wasser auf 10 mL auffüllen

Umsetzung und photometrische Bestimmung

- 500 μL der Probenlösung in Reagenzglas geben
- 500 μL Phenol-Lösung (5 % in Wasser w/v) zugeben, vortexen
- 2,5 mL konz. Schwefelsäure (95-97 %) zugeben, sofort vortexen
- Nach Abkühlen der Lösungen (60 min), photometrisch vermessen bei 480 und 490 nm

Kalibrierfunktionen

- Herstellung von Glucose und Xylose Standardreihen, Konzentrationen: 0,05 - 0,5 mmol/L
- 500 μL der Standardlösung in je ein Reagenzglas geben
- Umsetzung und photometrische Bestimmung wie beschrieben durchführen
- Messung gegen Blindwert mit Wasser

5.3.1.2 Bestimmung der Gehalte an freier Glucose in den Ausgangsmaterialien**Probenvorbereitung**

- 10-15 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas einwiegen
- 1 mL Wasser zugeben
- 30 min unter Rühren extrahieren (Verwendung von Miniaturrührstäbchen) und anschließend membranfiltrieren
- 100 μL des Filtrats werden zur enzymatischen Umsetzung eingesetzt

Enzymatische Umsetzung (Boehringer Enzymtestkit) und photometrische Bestimmung

- 1 mL Pufferlösung (Triethanolamin-Puffer, NADP, ATP, Magnesiumsulfat) in Quarzküvette pipettieren
- 1,9 mL Wasser zugeben (2,0 mL für den Blindwert)
- 100 μL Probenlösung zugeben
- mischen, nach ca. 3 min bei 340 nm Extinktionen der Lösungen messen
- 20 μL Enzymlösung zugeben (Hexokinase und D-Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)
- mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 15 min) und Extinktionen bei 340 nm messen

5.3.1.3 Bestimmung der neutralen Monosaccharide in den Polysacchariden mittels Gaschromatographie als deren Alditolacetate**Hydrolyse**

- 90-100 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas mit Glasperlen (1,25-1,55 mm Durchmesser, Füllhöhe ca. 4 mm) einwiegen
- 1,5 mL 12 M Schwefelsäure zugeben und sofort kräftig vortexen

- 30 min in Eisbad stehen lassen, alle 5 min vortexen (auf komplette Benetzung des Probenmaterials achten)
- 2 h bei RT stehen lassen, alle 10 min vortexen
- mit 9,75 mL Wasser auf ca. 2 M Schwefelsäure verdünnen
- 3 h bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysieren, dabei alle 20 min umschwenken
- Hydrolysat nach Abkühlen im Eiswasserbad filtrieren
- 2,5 mL des Filtrates in 10 mL Messkolben überführen, mit 900 µL 25 %iger Ammoniaklösung schwach alkalisch einstellen und mit bidest. Wasser zur Marke auffüllen

Reduktion

- 100 µL des alkalischen Hydrolysats in ein Pyrexglas überführen
- 1 mL 2 % Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid zugeben
- 60 min bei 60 °C im Wasserbad rühren (Verwendung von Miniaturrührstäbchen)
- nach dem Abkühlen 100 µL 80 %ige Essigsäure, die die internen Standardsubstanzen Erythrit und *myo*-Inosit (je 0,8 mg/mL) enthält, zugeben

Acetylierung und Extraktion der Alditolacetate

- 2 mL Essigsäureanhydrid und 200 µL 1-Methylimidazol zugeben
- 10 min bei RT reagieren lassen
- unter Eiskühlung 5 mL Wasser zugeben
- nach Abkühlen mit 2 mL Chloroform extrahieren, wässrige Phase verwerfen
- organische Phase zweimal mit Wasser waschen
- Wasserreste bei -18 °C ausfrieren
- gaschromatographische Analyse der Chloroformphase

Behandlung der Standardsubstanzen

- 100 µL einer wässrigen Standardlösung mit je 0,5 mg/mL D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Galactose und D-Mannose in ein Pyrexglas überführen
- Wasser im Stickstoffstrom entfernen
- Rückstand in 100 µL 0,1 M Ammoniak aufnehmen
- Reduktion und Acetylierung wie beschrieben durchführen

5.3.1.4 Bestimmung der Uronsäuren

Hydrolyse

- 75-100 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas mit Glasperlen (1,25-1,55 mm Durchmesser, Füllhöhe ca. 4 mm) einwiegen
- 1,5 mL 12 M Schwefelsäure zugeben und sofort kräftig vortexen

- 30 min in Eisbad stehen lassen, alle 5 min vortexen (auf komplette Benetzung des Probenmaterials achten)
- 2 h bei RT stehen lassen, alle 10 min vortexen
- mit 9,75 mL Wasser verdünnen, membranfiltrieren
- 1 mL des Filtrats in 10 mL Messkolben überführen und mit bidest. Wasser zur Marke auffüllen

Umsetzung und photometrische Bestimmung

- je 600 µL der verdünnten Probenlösung in zwei Pyrexgläser geben
- unter Kühlung im Eisbad 3,6 mL der schwefelsauren Natriumtetraboratlösung (0,0125 M in 18 M H₂SO₄) vorsichtig zugeben, 3x vortexen
- exakt 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubieren
- anschließend sofort im Eisbad abkühlen
- in je ein Pyrexglas 60 µL *m*-Hydroxydiphenyllösung (0,15 % in 0,5 %iger Natriumhydroxidlösung) bzw. 60 µL 0,5 %ige Natriumhydroxidlösung (Hintergrundabsorption) zugeben und umgehend vortexen
- nach 20 min bei 520 nm vermessen (Blindwert: Wasser)

Kalibrierfunktion

- Herstellung einer Galacturonsäurestandardreihe in Konzentrationen von 10-100 mg/L
- Umsetzung und photometrische Bestimmung, wie beschrieben, durchführen

5.3.1.5 Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide - Methylierungsanalyse

Methylierung (2x)

- 5-6 mg Probenmaterial in Pyrexglas einwiegen
- über Nacht bei 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen
- in 2 mL DMSO lösen (Ultraschallbad 30 min)
- 100 mg frisch unter dem Stickstoffstrom gepulverte NaOH (2-3 Löffelspatel) hinzugeben
- Reaktionszeit: 90 min im Ultraschallbad und 90 min bei RT
- unter Eiskühlung 1 mL Methyliodid hinzugeben
- Reaktionszeit: 30 min im Ultraschallbad und 30 min bei RT
- 3 mL Dichlormethan hinzugeben
- organische Phase 1x mit 5 mL 0,1 M Natriumthiosulfatlösung in Wasser waschen
- organische Phase 2x mit Wasser waschen
- Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernen
- über Nacht bei 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen

Hydrolyse

- Rückstand in 200 µL konzentrierter TFA quellen lassen, 3 min
- mit 200 µL Wasser verdünnen
- Probenlösungen für 15 min bei 100°C im Wasserbad hydrolysieren
- nach Abkühlen-mit weiteren 800 µL Wasser verdünnen
- Probenlösungen für 2 h bei 120°C im Autoklaven hydrolysieren
- nach Abkühlen Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernen

Reduktion

- 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 mL Ammoniak (2 M) hinzugeben
- Reaktionszeit: bei RT 1 h stehen lassen
- zum Abbruch der Reaktion 0,1 mL Eisessig hinzugeben

Acetylierung

- unter Eiskühlung 0,45 mL 1-Methylimidazol und 3 mL Essigsäureanhydrid zugeben
- Reaktionszeit: 30 min bei RT reagieren lassen
- unter Eiskühlung 3 mL Wasser hinzufügen
- nach Abkühlen mit 5 mL Dichlormethan extrahieren
- organische Phase 3x mit Wasser waschen
- Wasserreste bei -18°C ausfrieren
- gaschromatographische Analyse der Dichlormethanphase

5.3.2 Analytik der Phenolcarbonsäuren

5.3.2.1 Präparative Isolierung und Aufreinigung von Di- und Triferulasäure-Standardsubstanzen aus unlöslichen Maiskleie-Ballaststoffen

Alkalische Hydrolyse und Etherextraktion

- 6x 5 g unlösliche Maiskleie-Ballaststoffe (Isolierung nach BUNZEL et al. 2004a) in 200 mL Pyrexgläser einwiegen
- 100 mL mit Stickstoff entgaste 2 M NaOH zugeben
- Pyrexgläser nach Begasen des Kopfraumes mit Stickstoff verschließen
- unter Lichtausschluss für 18 h bei RT unter Rühren (Magnetrührer) hydrolysieren
- Hydrolysat mit 19 mL konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern
- 3x mit je 40 mL Diethylether extrahieren, zur besseren Phasentrennung jeweils für 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- vereinigte Etherextrakte am Vakuumrotationsverdampfer bei RT auf ca. 50 mL einengen
- Etherphase 3x mit je 25 mL 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahieren

-
- vereinigte wässrige Phasen mit konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern
 - 3x mit je 30 mL Diethylether extrahieren, zentrifugieren wie beschrieben
 - vereinigte Etherextrakte über Natriumsulfat trocknen
 - am Vakuumrotationsverdampfer bei RT zur Trockne einengen
 - Rückstand in 15 mL MeOH/H₂O (50/50, v/v) lösen

Fraktionierung/Aufreinigung mittels Sephadex LH 20 Chromatographie

- gereinigten Etherextrakt gemäß den in Abschnitt 5.1.2.2 beschriebenen Chromatographiebedingungen fraktionieren (12 min Fraktionen)
- Fraktionen in Abhängigkeit vom Chromatogramm vereinigen
- am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen
- ausgewogene Rückstände in MeOH/H₂O (50/50, v/v) lösen (Ultraschallbad, eventuell Zugabe weniger Tropfen Aceton) (Konzentrationen ~ 20 - 30 mg/mL)

Fraktionierung/Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

- Sephadex LH 20 Fraktionen gemäß den in Abschnitt 5.1.3.1 (System 1) beschriebenen Chromatographiebedingungen aufreinigen und manuell fraktionieren
- Vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen
- Rückstände in Aceton gelöst in 4 mL Braunglasfläschchen überführen, nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom auswiegen
- Reinheit der isolierten DFS und TFS-Standards mittels ¹H-NMR in Aceton-d₆ überprüfen (siehe 5.1.4)

Aufreinigung von 5-5'-DFS mittels Umkristallisation

- Rückstand der 5-5'-DFS enthaltenen Sephadex LH 20 Fraktion unter Rückfluss in 15 mL MeOH erhitzen
- Lösung auf RT abkühlen lassen und anschließend mehrere Tage im Kühlschrank lagern
- Niederschlag abfiltrieren mit wenig MeOH waschen
- Filtrückstand in Aceton gelöst in 4 mL Braunglasfläschchen überführen, nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom auswiegen
- Reinheit mittels HPLC-DAD (siehe 5.1.3.3) oder ¹H-NMR in Aceton-d₆ überprüfen (siehe 5.1.4)

5.3.2.2 Isolierung von 8-8'(THF)-DFS aus einer veresterten Vorstufe

Zweistufige alkalische Hydrolyse und Etherextraktion

Deacetylierung der phenolischen Hydroxylgruppen

- diacetylierte Vorstufe (ca. 30 mg) in ein 50 mL Pyrexglas einwiegen
- in 5 mL Dioxan lösen
- 20 mL mit N₂ entgaste 2 M NaOH und weitere 5 mL Dioxan zugeben
- Pyrexglas nach Begasen des Kopfraumes mit Stickstoff verschließen
- unter Lichtausschluss für 16 h bei RT unter Rühren (Magnetrührer) hydrolysieren
- Hydrolysat mit konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern
- 2x mit je 40 mL Diethylether und je 10 mL gesättigter NaCl-Lösung extrahieren, zur besseren Phasentrennung 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- nach Trocknen über Natriumsulfat Lösungsmittel am Vakuumrotationsverdampfer entfernen

Demethylierung der Carboxylgruppen

- Rückstand in 20 mL mit N₂ entgaster 2 M NaOH aufnehmen
- nach Begasen des Kopfraumes mit Stickstoff, verschließen
- unter Lichtausschluss für 24 h bei RT unter Rühren (Magnetrührer) hydrolysieren
- Etherextraktion, wie oben beschrieben
- Rückstand in 1 mL MeOH/H₂O (70/30, v/v) lösen (10 min Ultraschallbad)

Fraktionierung bzw. Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

- Fraktionierung bzw. Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC-UV (siehe 5.1.3.1)
- Vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen
- Rückstände in Aceton gelöst in 4 mL Braunglasfläschchen überführen, nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom auswiegen
- Reinheit mittels HPLC-DAD (siehe 5.1.3.3) oder ¹H-NMR in Aceton-d₆ überprüfen (siehe 5.1.4)

5.3.2.3 Identifizierung und Quantifizierung von estergebundenen, monomeren Phenolcarbonsäuren, Dehydrodimeren (und Dehydrotrimeren)

Alkalische Hydrolyse und Etherextraktion

- 75 mg Probenmaterial in ein 20 mL Pyrexglas einwiegen
- 5 mL mit N₂ entgaste 2 M NaOH zugeben
- Pyrexgläser nach Begasen des Kopfraumes mit Stickstoff verschließen

- unter Lichtausschluss für 18 h bei RT unter Rühren (Taumelrollenmischer) hydrolysieren
- Hydrolysat mit 0,95 mL konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern
- Zugabe der internen Standardsubstanzen:
200 µL IS 1 (Kaffeensäure 5 mg/mL THF/H₂O (50/50, v/v))
100 µL IS 2 (5,5'-Me-DFS 0,1 mg/mL in THF/H₂O (50/50, v/v))
- 3x mit je 4 mL Diethylether extrahieren, zur besseren Phasentrennung 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- vereinigte Etherphasen im Stickstoffstrom zur Trockne einengen
- Rückstand in 500 µL THF/H₂O (50/50, v/v) lösen (**DFS/TFS-Extrakt**)
- 100 µL des DFS/TFS-Extraktes mit 900 µL THF/H₂O (50/50, v/v) verdünnen (**Monomeren-Extrakt**)

5.3.2.4 Identifizierung und Quantifizierung ethergebundener monomerer Phenolcarbonsäuren

Alkalische Hydrolyse und Etherextraktion

- 100 mg Probenmaterial in ein Teflonaufschlussgefäß einwiegen
- 5 mL mit Stickstoff entgaste 4 M NaOH zugeben
- Bei 170 °C unter Druck für 2 h hydrolysieren
- Zugabe des internen Standards:
500 µL IS 1 (Kaffeensäure 5 mg/mL THF/H₂O (50/50, v/v))
- Hydrolysat mit Wasser quantitativ in ein 25 mL Schliffstopfenreagenzglas überführen
- mit konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern (ca. 4 mL)
- 3x mit je 8 mL Diethylether extrahieren, zur besseren Phasentrennung 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- vereinigte Etherphasen im Stickstoffstrom zur Trockne einengen
- Rückstand in 500 µL THF/H₂O (50/50, v/v) lösen
- 100 µL des Extraktes mit 900 µL THF/H₂O (50/50, v/v) verdünnen

5.3.2.5 Präparative Isolierung und Identifizierung von estergebundenen oligomeren Phenolcarbonsäuren aus Maisstroh

Probenvorbereitung

- 284 g Maisstroh (DK 233 (2004) E 2) auf eine Partikelgröße von < 0,5 mm vermahlen (Schlagmessermühle, Janke & Kunkel/IKA, Staufen i. Br.)

- 5x mit je 3 L Wasser waschen (10 min bei 1000 U/min rühren (Magnetrührwerk) und anschließend 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren)
- Rückstand 8 h mit Ethanol in einer Soxhlet-Apparatur extrahieren
- anschließend 6 h mit Aceton in einer Soxhlet-Apparatur extrahieren
- Rückstand zunächst bei RT vortrocknen, anschließend über Nacht bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen

Enzymatischer Proteinabbau - Isolierung der unlöslichen Faserbestandteile

- 10x 20 g gereinigtes Maisstroh in einem 500 mL Rundkolben einwiegen
- mit 300 mL Phosphatpuffer (0,08 M; pH = 6,0) versetzen und gut suspendieren
- pH-Wert mit ca. 60 mL 0,275 M NaOH auf einen pH von $7,5 \pm 0,1$ einstellen
- 600 µL Alcalase 2.4 L FG zugeben
- Reaktionsansatz 30 min bei 60 °C unter ständiger Bewegung (Rotieren am Rotationsverdampfer) inkubieren
- Suspension auf RT abkühlen lassen, anschließend 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- Rückstand nacheinander je 2x mit 80 mL 70 °C heißem Wasser, 60 mL 95 %igem Ethanol und 60 mL Aceton waschen, jeweils 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- vereinigte Rückstände zunächst bei RT vortrocknen, anschließend über Nacht bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank trocknen

Alkalische Hydrolyse und Etherextraktion

- 33x 5 g der isolierten unlöslichen Faserbestandteile in 200 mL Pyrexgläser einwiegen
- 100 mL mit Stickstoff entgaste 2 M NaOH zugeben
- Pyrexgläser nach Begasen des Kopfraumes mit Stickstoff verschließen
- unter Lichtausschluss für 18 h bei RT unter Rühren (Magnetrührer) hydrolysieren
- Hydrolysat mit 19 mL konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern
- 3x mit je 40 mL Diethylether extrahieren, zur besseren Phasentrennung jeweils für 10 min bei 3000 U/min zentrifugieren
- vereinigte Etherextrakte am Vakuumrotationsverdampfer bei RT auf ca. 50 mL einengen
- Etherphase 3x mit je 25 mL 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahieren
- vereinigte wässrige Phasen mit konzentrierter HCl auf pH < 2 ansäuern
- 3x mit je 30 mL Diethylether extrahieren, zentrifugieren wie beschrieben
- vereinigte Etherextrakte über Natriumsulfat trocknen
- am Vakuumrotationsverdampfer bei RT zur Trockne einengen
- Rückstand in 10 mL THF lösen (Konzentration: ~ 200 mg/500µL)

Fraktionierung mittels Bio-Beads SX-3 Gelpermeationschromatographie

- gereinigten Etherextrakt gemäß den in Abschnitt 5.1.2.1 beschriebenen Chromatographiebedingungen in Abhängigkeit vom Chromatogramm manuell fraktionieren

- Dimeren- und Trimeren-Fraktion am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen
- vereinigte Rückstände in 30 mL MeOH/H₂O (50/50, v/v) lösen (Ultraschallbad, eventuell Zugabe weniger Tropfen Aceton)

Fraktionierung/Aufreinigung mittels Sephadex LH 20 Chromatographie

- Dimeren- und Trimeren-GPC-Extrakte jeweils gemäß den in Abschnitt 5.1.2.2 beschriebenen Chromatographiebedingungen fraktionieren (12 min Fraktionen)
- Fraktionen in Abhängigkeit vom Chromatogramm vereinigen
- am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen
- ausgewogene Rückstände in MeOH/H₂O (50/50, v/v) lösen (Ultraschallbad, eventuell Zugabe weniger Tropfen Aceton) (Konzentrationen ~ 20 - 30 mg/mL)

Fraktionierung/Aufreinigung mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

- Sephadex LH 20 Fraktionen gemäß den in Abschnitt 5.1.3.1 (System 2) beschriebenen Chromatographiebedingungen aufreinigen und manuell fraktionieren
- vereinigte Fraktionen am Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen

5.3.2.6 Screening auf estergebundene Cyclobutanderivate und Ferulasäure-Monolignol-Kreuzprodukte mittels Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion

- die zu untersuchende Extrakte/Fraktionen in Bördelkappenvials mit Mikroeinsatz pipettieren (100 µL der nach Abschnitt 5.3.2.3 gewonnenen Etherextrakte (Bestimmung der estergebundenen PCS) bzw. 50 µL einer verdünnten Lösung der Dimeren-GPC-Fraktion (~ 0,3 mg) und des isolierten Cyclobutandimers (~ 0,1 mg) (siehe Abschnitt 5.3.2.5)
- Lösungsmittel im Stickstoffstrom zur Trockne einengen

Derivatisierung

- zu den Trocknungsrückständen 10 µL Pyridin und 40 µL BSTFA hinzufügen
- verschlossene Vials 30 min bei 60 °C im Heizblock erhitzen
- gaschromatographische Analyse (silylierte Substanzen bei RT nur einige Stunden stabil, Aufbewahrung im Kühlschrank für 24 h möglich)

5.3.3 Ligninanalytik

5.3.3.1 Bestimmung des Klason-Lignin Gehaltes

Hydrolyse

- 75-100 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas mit Glasperlen (1,25-1,55 mm Durchmesser, Füllhöhe ca. 4 mm) einwiegen
- 1,5 mL 12 M Schwefelsäure zugeben und sofort kräftig vortexen
- 30 min in Eisbad stehen lassen, alle 5 min vortexen (auf komplette Benetzung des Probenmaterials achten)
- 2 h bei RT stehen lassen, alle 10 min vortexen
- mit 9,75 mL Wasser auf ca. 2 M Schwefelsäure verdünnen
- 2 h bei 100 °C im Trockenschrank hydrolysieren, dabei alle 20 min umschwenken

Gravimetrische Bestimmung des Klason-Lignins

- Probenhydrolysat nach Abkühlen quantitativ über einen getrockneten und gewogenen Glasfaserfilter GF 6 Porengröße 2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel) filtrieren (Filtriereinheit mit Saugflasche, Wasserstrahlpumpe und Filtrieraufsatz (Duran))
- Pyrexglas 5 x mit 5 mL Wasser waschen
- Glasfaserfilter 5 x mit 10 mL Wasser säurefrei waschen
- Glasfaserfilter 15 min bei RT unter Anlegen eines Vakuums vortrocknen
- 48 h bei 55 °C trocknen, anschließend auswiegen
- Glasfaserfilter 5 h bei 500 °C veraschen und erneut auswiegen

5.3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes im Klason-Lignin

Gewinnung des Klason-Lignins

Die Gewinnung des Klason-Lignins erfolgt, wie unter 5.3.3.1 beschrieben, mit einer Einwaage von 250 mg Probenmaterial.

Kjeldahl-Aufschluss

- das gewonnene Klason-Lignin mitsamt Glasfaserfilter in Kjeldahl-Kolben geben
- 0,5 g Selenreaktionsgemisch und 5 mL konz. Schwefelsäure zugeben
- im Kjeldahl-Aufschlussblock 5 h (bis zur klaren Lösung) erhitzen (Heiz-Stufe 5)
- nach Abkühlen der Lösungen 10 mL Wasser zugeben
- Lösungen quantitativ in 50 mL Messkolben überführen, 3x mit je 5 mL Wasser spülen

Umsetzung und photometrische Bestimmung

- 200 µL der verdünnten Aufschlusslösungen in ein Schliffstopfenreagenzglas geben
- 4 mL Farbreagenz zugeben und kräftig schütteln (3,2 g Natriumsalicylat, 8,0 g Trinatriumphosphat und 0,05 g Natriumnitroprussid in 100 mL Wasser)
- 1 mL 0,25 %ige Natriumhypochloritlösung zugeben und kräftig schütteln
- nach 15 min bei 560 nm vermessen (Blindwert: Wasser)

Kalibrierfunktion

- Herstellung einer Ammoniumchloridstandardreihe in Konzentrationen von 4 - 44 µg/mL
- Umsetzung und photometrische Bestimmung wie beschrieben durchführen

5.3.3.3 Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignin Gehaltes**Umsetzung und photometrische Bestimmung**

- etwa 30 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas einwiegen
- 2,5 mL 25 %ige Acetylbromidlösung in Essigsäure zugeben
- 2 h bei 50 °C inkubieren, alle 20 min kurz rühren (Verwendung von Miniaturrührstäbchen)
- nach Abkühlen in Eiswasser, 5 min bei 5000 U/min zentrifugieren
- 100 µL des klaren Überstandes in einen 10 mL Messkolben überführen und mit einer Lösung aus Essigsäure, 2 M Natronlauge und 0,5 M Hydroxylaminhydrochloridlösung (130/35/7, v/v/v) auffüllen
- nach 15 min erfolgt die Messung gegen einen Blindwert (Wasser) bei 280 nm

5.3.3.4 Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung - DFRC-Methode**Lösung und Acetylierung**

- etwa 30 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas einwiegen
- 7,5 mL 20 %ige Acetylbromidlösung in Essigsäure zugeben
- 3 Stunden bei 50 °C im Wasserbad rühren (Verwendung von Miniaturrührstäbchen)
- Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernen

Reduktive Spaltung und Extraktion

- Rückstand in 7,5 mL Dioxan, Essigsäure und Wasser (5/4/1, v/v/v) aufnehmen
- ca. 50 mg Zinkstaub zugeben
- 40 min bei RT rühren (Verwendung von Miniaturrührstäbchen)
- 200 µL interne Standardlösung zugeben

(0,6 mg/mL 4,4'-Ethylidenbisphenol in Dioxan/Wasser (1/1, v/v))

- Lösung in einen Scheidetrichter überführen, 5 x mit 2 mL Dichlormethan nachspülen
- 10 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung zugeben
- wässrige Phase mit Salzsäure auf pH < 3 einstellen
- organische Phase abtrennen, wässrige Phase erneut mit 10 mL Dichlormethan extrahieren
- vereinigte organische Phasen über Natriumsulfat trocknen, filtrieren und am Rotationsverdampfer zur Trockne einengen

Acetylierung und Festphasenextraktion

- Rückstand in 1,5 mL Dichlormethan lösen
- 0,2 mL Essigsäureanhydrid und 0,2 mL Pyridin zugeben
- über Nacht bei RT acetylieren
- Lösungsmittel 3x mit Ethanol als Schlepper am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne einengen
- Rückstand in 500 µL Dichlormethan lösen und auf eine mit 2 mL Dichlormethan konditionierte Silica-SPE-Kartusche (3 mL, 500 mg, Varian) geben
- Elution mit 9 mL Chloroform/Ethylacetat (10/1, v/v)
- Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernen
- Rückstand in 500 µL Dichlormethan lösen und zur gaschromatographischen Bestimmung einsetzen

Externer Standard

- bestehend aus den acetylierten Monolignolen *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, sowie dem acetylierten internen Standard 4,4'-Ethylidenbisphenol
- Gehalt: ca. 0,6 mg/mL, Zusammensetzung: (1,331 mol/ 1,000 mol/ 0,661 mol/ 0,487 mol)

5.3.3.5 Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Phenolcarbonsäuren

Enzymatische Hydrolyse mit Driselase

- 100 mg Probenmaterial (DK 233 (2004), E 1, 0 h) in ein 20 mL Pyrexglas einwiegen und mit 9 mL bidest. Wasser suspendieren
- 10 mg Driselase zugeben
- 48 h bei 37 °C unter Rühren lichtgeschützt inkubieren
- durch 10 min Erhitzen auf 100 °C Enzyme inaktivieren
- Suspension 20 min zentrifugieren und Überstand durch einen Faltenfilter abfiltrieren
- Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bei vermindertem Druck und 40 °C zur Trockne einengen
- Zentrifugationsrückstand 16 h bei 40 °C im Vakuum trockenschrank trocknen

Alkalische Hydrolyse und Etherextraktion

- 20 mg des getrockneten Zentrifugationsrückstandes, wie in Abschnitt 5.3.2.3 zur Bestimmung der estergebundenen monomeren PCS beschrieben, mit 2M NaOH für 18 h bei RT hydrolysieren und anschließend nach Ansäuern mit Diethylether extrahieren
- getrockneten Überstand der enzymatischen Hydrolyse wie in Abschnitt 5.3.2.3 zur Bestimmung der estergebundenen monomeren PCS beschrieben, mit 2M NaOH und einer verkürzten Hydrolysezeit von 4 h bei RT hydrolysieren und anschließend nach Ansäuern mit Diethylether extrahieren
- vereinigte Etherphasen des Rückstandes sowie des Überstandes der enzymatischen Hydrolyse im Stickstoffstrom zur Trockne einengen
- Trocknungsrückstände in je 500 µL THF/H₂O (50/50, v/v) lösen
- Extrakt des Überstandes der enzymatischen Hydrolyse direkt zur HPLC-Bestimmung (Abschnitt 5.1.3.2) einsetzen
- Extrakt des Rückstandes der enzymatischen Hydrolyse mit THF/H₂O (50/50, v/v) 1:10 verdünnt zur HPLC-Bestimmung (Abschnitt 5.1.3.2) einsetzen

5.4 Tabellen

Tab. 5.1: Inkubationsverluste der Rohmaterialien der untersuchten Maissorten (ZELLER, 2008) (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz)

Sorte	2004		2005	
	E 1	E 2	E 1	E 2
	Inkubations- verluste (% TS)	Inkubations- verluste (% TS)	Inkubations- verluste (% TS)	Inkubations- verluste (% TS)
DK 233	57,58 ± 1,43	49,31 ± 2,83	61,80 ± 0,81	56,9 ± 1,91
DKc 2949	60,61 ± 4,85	54,25 ± 3,08	62,42 ± 0,89	56,72 ± 1,44
DK 247	59,58 ± 1,53	57,14 ± 1,29	62,31 ± 1,70	57,33 ± 1,94
Monumental			54,50 ± 1,22	55,21 ± 1,35
DK 281			51,41 ± 0,50	53,13 ± 0,90
DK 287			56,59 ± 0,76	53,39 ± 0,80

Tab. 5.2: Auswaschverluste der Rohmaterialien der untersuchten Maissorten (ZELLER, 2008) (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz)

Sorte	2004		2005	
	E 1	E 2	E 1	E 2
	Auswasch- verluste (% TS)	Auswasch- verluste (% TS)	Auswasch- verluste (% TS)	Auswasch- verluste (% TS)
DK 233	33,17 ± 0,26	26,83 ± 0,50	34,54 ± 0,20	30,11 ± 0,11
DKc 2949	34,09 ± 0,62	27,34 ± 0,13	34,27 ± 0,23	29,08 ± 0,23
DK 247	38,06 ± 0,75	35,83 ± 0,23	38,22 ± 0,21	32,13 ± 0,11
Monumental			32,11 ± 1,23	29,91 ± 0,23
DK 281			27,20 ± 0,43	24,10 ± 0,42
DK 287			26,71 ± 0,34	23,36 ± 0,50

Tab. 5.3: Rohprotein- und Rohaschegehalte in den Rohmaterialien der untersuchten Maissorten (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz)

Sorte	2004				2005			
	E 1		E 2		E 1		E 2	
	Roh-Protein (% TS)	Roh-Asche (% TS)	Roh-Protein (% TS)	Roh-Asche (% TS)	Roh-Protein (% TS)	Roh-Asche (% TS)	Roh-Protein (% TS)	Roh-Asche (% TS)
DK 233	6,3	5,4	4,7	5,3	6,6	5,3	5,6	5,9
DKc 2949	6,2	5,6	5,5	6,0	7,2	6,8	4,9	6,7
DK 247	5,0	6,1	5,1	6,4	5,8	6,3	4,9	6,1
Monumental	4,9	4,9	4,5	5,3	4,6	5,1	4,7	5,2
DK 281	5,3	4,6	4,7	5,1	4,8	5,4	4,9	5,7
DK 287	5,2	5,2	4,8	5,3	4,5	5,2	4,4	5,8

Tab. 5.4: Verfahrenskennndaten zur Bestimmung monomerer Phenolcarbonsäuren mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und UV-spektroskopischer Detektion (4-HBS = 4-Hydroxybenzoesäure, 4-HPES = 4-Hydroxyphenylelessigsäure, KS (IS 1) = Kaffeesäure – interner Standard 1, VS = Vanillinsäure, SyS = Syringasäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzaldehyd, *tr-pCS* = *trans p*-Cumarsäure, VA = Vanillin, *cis-pCS* = *cis p*-Cumarsäure, SyA = Syringaldehyd, *tr-FS* = *trans* Ferulasäure, SS = Sinapinsäure, *cis-FS* = *cis* Ferulasäure, CV = Verfahrensvariationskoeffizient, NWG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze, GK = Grundkalibrierung, MK = Matrixkalibrierung, WDF = Wiederfindungsrate)

	Arbeitsbereich (µg/mL)	CV (GK) (%)	CV (MK) (%)	NWG (µg/mL)	BG (µg/mL)	WDF (%)
4-HBS	2,5 - 12,5	2,1	3,2	0,06	0,18	102,6
4-HPES	2,5 - 12,5	3,0	4,2	0,69	2,06	80,1
KS (IS 1)	2,5 - 12,5	4,8	3,9	0,04	0,12	105,9
VS	2,5 - 12,5	2,3	2,2	0,06	0,18	105,9
SyS	2,5 - 12,5	3,0	2,5	0,05	0,15	101,5
4-HBA	2,5 - 12,5	2,7	2,0	0,03	0,08	104,5
<i>tr-pCS</i>	25 - 125	3,6	4,6	0,52	1,55	108,4
VA	2,5 - 12,5	2,5	5,3	0,06	0,17	104,5
<i>cis-pCS</i>	2,5 - 12,5	2,8	2,0	0,09	0,27	103,7
SyA	2,5 - 12,5	2,8	5,4	0,06	0,18	101,8
<i>tr-FS</i>	25 - 125	2,4	3,0	0,07	0,20	107,3
SS	2,5 - 12,5	2,7	2,1	0,08	0,24	99,7
<i>cis-FS</i>	2,5 - 12,5	3,3	3,3	0,15	0,46	109,1

Tab. 5.5: Verfahrenskennndaten zur Bestimmung von Di- und Triferulasäuren mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Diodenarray Detektion (c = cyclische Form, nc = nicht cyclische Form, THF = Tetrahydrofuranform, Me = methyliert, IS 2 = interner Standard 2, dc = decarboxylierte Form, CV = Verfahrensvariationskoeffizient, NWG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze, GK = Grundkalibrierung, MK = Matrixkalibrierung, WDF = Wiederfindungsrate)

	Arbeitsbereich (µg/mL)	CV (GK) (%)	CV (MK) (%)	NWG (µg/mL)	BG (µg/mL)	WDF (%)
8-8' c	2,5-12,5	3,6	7,6	0,25	1,02	90,4
8-8' nc	2,5-12,5	7,5	47,5	0,18	0,72	80,5
8-8'(THF)	2,5-12,5	16,2	45,5	0,37	1,46	76,1
8-5' nc	5,0-25,0	2,9	18,2	0,22	0,87	81,0
5-5'	5,0-25,0	3,2	24,8	0,18	0,72	86,3
8-8',8'-O-4''	2,5-12,5	8,4	80,1	0,87	3,47	33,8
8-O-4'	5,0-25,0	1,1	24,4	0,17	0,70	89,0
8-5' c	5,0-25,0	1,3	13,6	0,32	1,29	52,8
5-5',8'-O-4''	2,5-12,5	9,2	65,5	0,38	1,52	44,8
5-5'(Me) (IS 2)	5,0-25,0	3,1	11,5	0,15	0,62	86,0
8-O-4',8'-O-4''	1,0-5,0	3,3	-	0,13	0,40	-
8-5' dc	2,5-12,5	2,1	57,4	0,11	0,45	62,4

Tab. 5.6: Relative Retentionszeiten (RRT) und Korrekturfaktoren (KF) der Standardsubstanzen bei 280 nm (4-HBS = 4-Hydroxybenzoesäure, 4-HPES = 4-Hydroxyphenylelessigsäure, KS = Kaffeesäure, VS = Vanillinsäure, SyS = Syringasäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzaldehyd, *tr-pCS* = *trans p*-Cumarsäure, VA = Vanillin, *cis-pCS* = *cis p*-Cumarsäure, SyA = Syringaldehyd, *tr-FS* = *trans* Ferulasäure, SS = Sinapinsäure, *cis-FS* = *cis* Ferulasäure, c = cyclische Form, nc = nicht cyclische Form, THF = Tetrahydrofuranform, Me = methyliert, dc = decarboxylierte Form, IS = interner Standard, MK = Matrixkalibrierung)

Monomere PCS	RRT	KF (MK)	DFS/TFS	RRT	KF (MK)
4-HBS	0,83	1,672	8-8' c	0,54	4,350
4-HPES	0,89	5,458	8-8' nc	0,58	1,936
KS (IS 1)	1,00	1,000	8-8'(THF)	0,59	6,040
VS	1,06	1,316	8-5' nc	0,60	1,509
SyS	1,18	0,799	5-5'	0,74	1,514
4-HBA	1,32	0,320	8-8',8'-O-4''	0,85	3,591
4-HPES		5,255	8-O-4'	0,86	0,845
<i>tr-pCS</i>	1,46	0,444	8-5' c	0,91	4,597
V	1,70	0,565	5-5',8'-O-4''	0,98	2,089
<i>cis-pCS</i>	1,76	0,774	5-5'(Me) (IS 2)	1,00	1,000
SyA	1,86	1,145	8-O-4',8'-O-4''	1,12	4,191 ^{GK}
<i>tr-FS</i>	2,00	0,754	8-5' dc	1,14	1,341
SS	2,09	1,845			
<i>cis-FS</i>	2,14	1,111			

Tab. 5.7: Übersicht der ermittelten Gehalte estergebundener, monomerer Phenolcarbonsäuren und -aldehyde in den Probenmaterialien (mg/g) (n = 2) (4-HBS = 4-Hydroxybenzoesäure, 4-HPES = 4-Hydroxyphenylelessigsäure, KS = Kaffeesäure, VS = Vanillinsäure, SyS = Syringasäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzaldehyd, *tr-pCS* = *trans p*-Cumarsäure, VA = Vanillin, *cis-pCS* = *cis p*-Cumarsäure, SyA = Syringaldehyd, *tr-FS* = *trans* Ferulasäure, SS = Sinapinsäure, *cis-FS* = *cis* Ferulasäure, UBS = unlösliche Ballaststoffe)

	Maisrest- pflanze ¹	Maiskleie UBS	Weizen UBS	Roggen UBS	Wildreis UBS	Zucker- rübe UBS	Spargel UBS
4-HBS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-HPES	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
VS	n.n.	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	n.n.	n.n.
SyS	n.n.	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	n.n.	n.n.
4-HBA	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	n.n.	< 0,1
4-HPPS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>tr-pCS</i>	18,8	2,0	0,1	0,2	0,1	< 0,1	0,6
V	0,3	0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>cis-pCS</i>	0,5	n.n.	< 0,1	< 0,1	n.n.	n.n.	< 0,1
SyA	n.n.	n.n.	< 0,1	n.n.	< 0,1	n.n.	n.n.
<i>tr-FS</i>	6,1	23,9	6,0	6,7	2,3	8,9	0,2
SS	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,7	n.n.	n.n.
<i>cis-FS</i>	0,4	0,3	0,4	0,7	0,1	0,2	< 0,1

¹ mittlerer Gehalt in den 0 h-Materialien (DK 233, DKc 2949, DK 247, E1 und E2, 2004 und 2005)

Tab. 5.8: Gehalte freier Glucose in den Ausgangsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz) (n = 2)

	<i>freie Glucose (% TS)</i>			
	2004		2005	
	E 1	E 2	E 1	E 2
DK 233	5,18 ± 0,13	3,26 ± 0,11	4,91 ± 0,04	3,62 ± 0,11
DKc 2949	8,38 ± 0,06	4,99 ± 0,04	6,22 ± 0,17	5,01 ± 0,03
DK 247	5,53 ± 0,02	4,95 ± 0,33	7,05 ± 0,07	5,19 ± 0,15
Monumental	6,99 ± 0,01	4,00 ± 0,10	4,49 ± 0,03	3,38 ± 0,13
DK 281	5,27 ± 0,05	3,80 ± 0,08	3,74 ± 0,02	3,44 ± 0,13
DK 287	5,87 ± 0,06	3,61 ± 0,02	4,39 ± 0,05	2,30 ± 0,06

Tab. 5.9: Gesamtkohlenhydratgehalte der Untersuchungsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz) (n = 2)

		Gesamtkohlenhydratgehalte (% TS)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	61,2 ± 2,4	64,0 ± 0,7	57,5 ± 0,3	58,4 ± 2,1	63,7 ± 2,1	54,8 ± 0,2
	E 2	59,4 ± 0,4	66,5 ± 0,1	57,8 ± 1,2	57,2 ± 2,2	62,9 ± 3,2	57,2 ± 4,4
DKc 2949	E 1	62,0 ± 0,4	69,0 ± 0,6	66,6 ± 2,9	61,5 ± 1,3	70,2 ± 2,5	60,9 ± 1,0
	E 2	61,2 ± 2,4	69,4 ± 3,8	63,3 ± 4,3	58,4 ± 1,6	76,1 ± 6,9	61,5 ± 0,6
DK 247	E 1	62,0 ± 0,1	68,4 ± 2,9	62,3 ± 1,8	64,8 ± 1,7	66,9 ± 0,1	57,4 ± 4,2
	E 2	61,8 ± 2,6	68,7 ± 2,1	61,6 ± 0,8	60,9 ± 8,2	66,8 ± 1,7	57,8 ± 4,0
Monumental	E 1	59,7 ± 0,4			64,2 ± 2,3	78,2 ± 3,2	73,0 ± 1,1
	E 2	59,8 ± 0,0			60,1 ± 0,0	70,5 ± 7,9	60,0 ± 0,8
DK 281	E 1	68,5 ± 0,7			63,3 ± 5,3	64,6 ± 0,6	57,2 ± 7,9
	E 2	67,8 ± 0,9			57,9 ± 2,4	71,1 ± 0,1	62,6 ± 3,8
DK 287	E 1	65,5 ± 3,6			56,6 ± 1,1	75,3 ± 1,1	67,0 ± 6,1
	E 2	62,1 ± 1,6			61,1 ± 1,7	72,0 ± 0,9	60,8 ± 4,3

Tab. 5.10: Uronsäuren-Gehalte in den Probenmaterialien (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz) (n = 2)

		Uronsäuren-Gehalte (% TS)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	2,2 ± 0,1	2,8 ± 0,0	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0
	E 2	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0
DKc 2949	E 1	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,0
	E 2	2,7 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0
DK 247	E 1	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
	E 2	2,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,0
Monumental	E 1	2,5 ± 0,1			2,3 ± 0,1	3,3 ± 0,0	2,0 ± 0,1
	E 2	2,4 ± 0,1			2,5 ± 0,0	2,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0
DK 281	E 1	2,5 ± 0,0			2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1
	E 2	2,5 ± 0,1			2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1
DK 287	E 1	2,2 ± 0,0			2,0 ± 0,0	2,6 ± 0,0	1,9 ± 0,1
	E 2	2,1 ± 0,1			2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1

Tab. 5.11: Gehalte der neutralen Monosaccharide in den Polysaccharide (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		<i>Glucose-Gehalte in (% TS)</i>					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	27,4 ± 0,9	29,0 ± 0,0	25,5 ± 0,0	35,7 ± 0,9	35,3 ± 3,1	30,6 ± 1,6
	E 2	33,2 ± 0,2	37,0 ± 1,1	31,7 ± 0,1	29,9 ± 3,4	33,7 ± 3,1	33,3 ± 0,3
DKc 2949	E 1	32,7 ± 2,0	31,3 ± 2,5	30,6 ± 1,6	32,1 ± 0,5	31,6 ± 2,3	29,4 ± 0,6
	E 2	32,9 ± 3,2	33,9 ± 0,8	29,0 ± 2,1	29,5 ± 1,0	25,9 ± 1,6	22,6 ± 1,6
DK 247	E 1	28,6 ± 0,0	32,5 ± 0,0	30,2 ± 0,1	35,7 ± 4,7	29,1 ± 1,7	22,0 ± 2,5
	E 2	29,8 ± 2,1	35,8 ± 2,4	30,1 ± 0,6	36,3 ± 0,1	35,5 ± 2,1	34,4 ± 0,5
Monumental	E 1	35,0 ± 0,6			30,7 ± 0,6	38,4 ± 1,4	24,6 ± 1,8
	E 2	33,6 ± 0,4			29,2 ± 3,1	37,8 ± 1,9	34,6 ± 1,5
DK 281	E 1	33,4 ± 0,4			31,0 ± 3,6	32,0 ± 0,6	36,8 ± 2,3
	E 2	34,0 ± 0,5			26,4 ± 3,8	26,4 ± 2,6	32,5 ± 2,0
DK 287	E 1	31,5 ± 2,6			29,8 ± 2,8	33,2 ± 1,4	32,7 ± 2,4
	E 2	31,8 ± 2,8			34,1 ± 1,0	27,4 ± 0,8	34,1 ± 1,7
		<i>Xylose-Gehalte (% TS)</i>					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	13,4 ± 0,3	18,5 ± 0,1	17,8 ± 0,1	15,4 ± 0,8	21,7 ± 0,8	18,5 ± 1,1
	E 2	17,2 ± 0,3	23,3 ± 0,2	22,0 ± 0,1	13,3 ± 1,1	19,7 ± 1,2	19,5 ± 0,5
DKc 2949	E 1	11,0 ± 0,5	13,0 ± 0,1	14,8 ± 1,6	16,3 ± 0,7	20,6 ± 1,4	19,8 ± 1,3
	E 2	13,5 ± 0,2	14,8 ± 0,0	13,0 ± 0,5	14,2 ± 0,3	17,0 ± 0,1	16,6 ± 1,4
DK 247	E 1	13,5 ± 0,4	20,9 ± 0,3	21,0 ± 0,5	13,3 ± 0,5	16,8 ± 0,7	14,9 ± 3,2
	E 2	15,9 ± 0,4	23,2 ± 1,1	21,9 ± 0,2	15,5 ± 1,5	21,4 ± 1,1	20,7 ± 0,6
Monumental	E 1	12,8 ± 0,5			14,1 ± 0,2	20,6 ± 1,2	15,9 ± 0,9
	E 2	12,7 ± 1,2			14,8 ± 1,4	20,7 ± 1,1	18,7 ± 2,2
DK 281	E 1	13,2 ± 0,3			15,4 ± 1,9	18,5 ± 0,2	17,4 ± 0,2
	E 2	13,9 ± 0,3			14,3 ± 0,1	16,2 ± 2,0	20,7 ± 1,1
DK 287	E 1	12,4 ± 1,5			13,6 ± 0,0	18,1 ± 0,1	21,0 ± 0,9
	E 2	12,5 ± 0,5			20,2 ± 0,2	14,8 ± 0,4	20,6 ± 1,1
		<i>Arabinose-Gehalte (% TS)</i>					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	2,0 ± 0,1	2,6 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,1 ± 0,0
	E 2	2,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,0
DKc 2949	E 1	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	E 2	2,3 ± 0,0	2,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,2 ± 0,2
DK 247	E 1	2,0 ± 0,0	2,9 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,0 ± 0,1
	E 2	2,3 ± 0,0	3,2 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,0	2,2 ± 0,3
Monumental	E 1	1,7 ± 0,1			1,6 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0
	E 2	1,5 ± 0,1			1,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2
DK 281	E 1	1,9 ± 0,1			1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2
	E 2	2,0 ± 0,0			1,7 ± 0,0	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,1
DK 287	E 1	1,2 ± 0,1			1,6 ± 0,0	2,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1
	E 2	1,7 ± 0,2			2,4 ± 0,0	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2

Tab. 5.12: Bestimmung der Glucose-Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide (T-Glcp = terminale Glucopyranose, 4-Glcp = 1→4 glykosidisch verknüpfte Glucopyranose, E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		T-Glcp (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	11,3 ± 2,5	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,0	23,0 ± 4,5	2,2 ± 0,6	1,6 ± 0,2
	E 2	10,1 ± 0,7	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,0	18,1 ± 3,9	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,0
DKc 2949	E 1	21,7 ± 0,4	2,7 ± 0,1	1,3 ± 0,4	19,2 ± 0,0	2,0 ± 0,6	1,6 ± 0,0
	E 2	18,3 ± 0,5	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,0	13,3 ± 0,9	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,0
DK 247	E 1	18,3 ± 3,6	5,0 ± 4,5	1,8 ± 0,0	31,5 ± 1,5	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,0
	E 2	10,8 ± 1,2	1,3 ± 0,0	2,1 ± 0,2	22,6 ± 3,5	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Monumental	E 1				11,7 ± 1,0	1,6 ± 0,1	0,8 ± 0,5
	E 2				12,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,1
DK 281	E 1				10,1 ± 0,0	1,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	E 2				6,7 ± 0,2	1,5 ± 0,0	0,7 ± 0,2
DK 287	E 1				11,8 ± 1,0	1,7 ± 0,0	2,7 ± 2,9
	E 2				6,0 ± 0,2	1,4 ± 0,8	0,6 ± 0,4
		4-Glcp (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	53,0 ± 1,6	53,6 ± 4,6	48,9 ± 0,0	43,4 ± 1,2	50,4 ± 11,4	50,5 ± 1,0
	E 2	53,4 ± 0,3	56,7 ± 2,8	57,4 ± 0,1	49,4 ± 4,0	51,1 ± 5,5	50,9 ± 1,5
DKc 2949	E 1	34,0 ± 0,5	48,1 ± 3,4	49,2 ± 0,3	48,2 ± 0,1	45,9 ± 5,8	54,2 ± 0,5
	E 2	38,0 ± 0,2	55,6 ± 2,4	54,5 ± 0,7	47,9 ± 1,9	56,5 ± 0,4	50,3 ± 4,1
DK 247	E 1	39,9 ± 5,7	50,7 ± 3,8	50,9 ± 0,0	41,8 ± 2,0	57,3 ± 0,3	53,0 ± 1,1
	E 2	48,9 ± 1,7	52,9 ± 0,0	50,6 ± 1,1	43,3 ± 6,6	53,2 ± 0,3	51,4 ± 1,9
Monumental	E 1				42,8 ± 0,5	52,6 ± 1,4	53,1 ± 2,0
	E 2				43,9 ± 1,4	52,3 ± 3,9	47,3 ± 0,4
DK 281	E 1				46,1 ± 1,2	51,2 ± 2,2	48,3 ± 1,4
	E 2				47,2 ± 1,0	51,5 ± 0,4	45,8 ± 1,9
DK 287	E 1				46,8 ± 1,7	51,2 ± 2,0	40,5 ± 3,7
	E 2				49,6 ± 0,8	51,1 ± 0,2	41,0 ± 2,4

Tab. 5.13: Bestimmung der Arabinose-Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide (T-Araf = terminale Arabinofuranose, 2-Araf = 1→2 glykosidisch verknüpfte Arabinofuranose, E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		T-Araf (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	2,1 ± 1,1	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,0	3,7 ± 0,1	2,6 ± 1,3	2,8 ± 0,2
	E 2	1,8 ± 0,3	2,7 ± 1,4	1,8 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,7	2,8 ± 0,1
DKc 2949	E 1	3,7 ± 0,1	5,5 ± 0,6	3,3 ± 0,3	3,7 ± 0,1	5,0 ± 0,6	3,5 ± 0,2
	E 2	3,5 ± 0,0	4,4 ± 0,1	3,7 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,1
DK 247	E 1	3,9 ± 0,4	6,1 ± 1,6	3,4 ± 0,0	3,0 ± 0,5	4,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1
	E 2	4,2 ± 0,2	3,7 ± 0,0	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,1	4,4 ± 0,0	3,6 ± 0,3
Monumental	E 1				4,3 0,1	4,1 0,1	3,5 0,3
	E 2				4,2 0,0	4,7 0,0	3,4 0,0
DK 281	E 1				3,6 0,1	3,7 0,4	3,7 0,4
	E 2				4,2 0,1	4,1 0,3	3,3 0,7
DK 287	E 1				4,0 0,1	3,6 0,2	2,8 0,8
	E 2				4,2 0,1	3,6 0,3	2,6 0,4
		2-Araf (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,5
	E 2	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0
DKc 2949	E 1	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,2
	E 2	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1
DK 247	E 1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	E 2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,9	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Monumental	E 1				0,6 0,0	0,5 0,0	0,4 0,0
	E 2				0,7 0,0	0,9 0,1	0,4 0,1
DK 281	E 1				0,7 0,2	0,6 0,0	0,5 0,0
	E 2				1,0 0,0	0,7 0,0	0,7 0,2
DK 287	E 1				0,7 0,1	0,7 0,0	0,8 0,0
	E 2				0,5 0,0	0,9 0,2	0,9 0,0

Tab. 5.14: Bestimmung der Xylose-Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide (T-Xylp = terminale Xylopyranose, 4-Xylp (+ 2-Xylp) = 1→4 (+ 1→2) glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 3,4-Xylp = 1→4 und 3→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 2,4-Xylp = 1→4 und 2→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		T-Xylp (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,0
	E 2	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2
DKc 2949	E 1	0,8 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,0
	E 2	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,1
DK 247	E 1	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	E 2	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,2 ± 0,1
Monumental	E 1				1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,0
	E 2				1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1
DK 281	E 1				1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	E 2				1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2
DK 287	E 1				1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	0,8 ± 0,5
	E 2				1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
		4-Xylp (+2-Xylp) (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	23,8 ± 2,8	28,9 ± 2,4	35,9 ± 0,0	22,8 ± 2,9	32,7 ± 7,9	36,7 ± 0,5
	E 2	24,9 ± 0,2	27,9 ± 0,9	29,7 ± 0,5	21,9 ± 0,3	32,9 ± 4,2	37,5 ± 1,4
DKc 2949	E 1	31,4 ± 0,4	33,0 ± 2,8	39,6 ± 1,6	22,7 ± 0,3	37,1 ± 5,5	34,1 ± 0,3
	E 2	31,7 ± 0,0	29,0 ± 2,1	33,0 ± 0,2	28,3 ± 1,1	27,9 ± 0,1	37,1 ± 2,8
DK 247	E 1	27,9 ± 6,9	27,0 ± 0,8	33,7 ± 0,0	17,4 ± 1,7	28,0 ± 0,0	34,9 ± 0,7
	E 2	25,8 ± 0,6	33,3 ± 0,0	33,2 ± 0,4	23,5 ± 1,6	31,0 ± 0,0	35,9 ± 1,8
Monumental	E 1				31,8 ± 0,1	32,2 ± 1,3	34,1 ± 1,1
	E 2				30,3 ± 1,7	29,3 ± 3,0	36,8 ± 0,3
DK 281	E 1				30,8 ± 0,2	32,3 ± 1,7	34,7 ± 0,7
	E 2				31,3 ± 0,5	31,5 ± 0,0	35,5 ± 2,2
DK 287	E 1				28,0 ± 1,2	31,5 ± 1,5	37,8 ± 1,2
	E 2				31,3 ± 0,4	32,7 ± 0,9	39,4 ± 3,1
		3,4-Xylp (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	4,1 ± 0,2	5,1 ± 0,3	4,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	5,4 ± 1,8	4,0 ± 1,8
	E 2	4,3 ± 0,4	5,0 ± 0,2	4,4 ± 0,5	2,7 ± 0,0	4,6 ± 0,9	3,4 ± 0,1
DKc 2949	E 1	3,7 ± 0,1	4,2 ± 0,4	3,0 ± 0,4	2,7 ± 0,0	4,4 ± 0,0	3,1 ± 0,1
	E 2	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,4	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,3
DK 247	E 1	4,0 ± 1,0	4,9 ± 0,7	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,2	3,6 ± 0,0	3,2 ± 0,1
	E 2	3,9 ± 0,1	4,3 ± 0,0	4,3 ± 0,2	2,5 ± 0,1	3,8 ± 0,0	3,3 ± 0,1
Monumental	E 1				4,0 ± 0,4	3,8 ± 0,0	3,9 ± 0,1
	E 2				3,9 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,1 ± 0,4

Fortsetzung Tab. 5.14: Bestimmung der Xylose-Bindungsverhältnisse der Monosaccharid-Einheiten innerhalb der Zellwandpolysaccharide (T-Xylp = terminale Xylopyranose, 4-Xylp (+ 2-Xylp) = 1→4 (+ 1→2) glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 3,4-Xylp = 1→4 und 3→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 2,4-Xylp = 1→4 und 2→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		3,4-Xylp (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 281	E 1				4,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,3 ± 0,4
	E 2				4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,0	6,0 ± 0,1
DK 287	E 1				3,5 ± 0,4	5,3 ± 0,0	7,3 ± 1,7
	E 2				3,5 ± 0,0	6,0 ± 1,1	6,4 ± 0,6

		2,4-Xylp (mol %)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,6	1,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	2,2 ± 1,5	1,4 ± 0,0
	E 2	1,6 ± 0,0	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1
DKc 2949	E 1	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,2
	E 2	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,5
DK 247	E 1	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,0	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,0
	E 2	1,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Monumental	E 1				1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,1
	E 2				1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,8 ± 0,3
DK 281	E 1				1,3 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,4 ± 0,2
	E 2				1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,0	1,9 ± 0,0
DK 287	E 1				1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,8
	E 2				1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,7	2,4 ± 0,1

Tab. 5.15: Gehalte estergebundener *p*-Cumarsäure sowie ester- und ethergebundener Ferulasäure in den Untersuchungsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		estergebundene <i>p</i> -Cumarsäure (% TS)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	1,40 ± 0,00	1,92 ± 0,01	2,39 ± 0,09	1,16 ± 0,01	1,63 ± 0,04	3,11 ± 0,00
	E 2	1,99 ± 0,00	2,01 ± 0,06	3,41 ± 0,02	1,90 ± 0,00	2,23 ± 0,08	2,73 ± 0,06
DKc 2949	E 1	1,39 ± 0,08	1,94 ± 0,01	2,44 ± 0,02	1,37 ± 0,01	2,03 ± 0,01	2,37 ± 0,02
	E 2	1,59 ± 0,03	2,00 ± 0,05	2,40 ± 0,05	1,45 ± 0,01	1,82 ± 0,06	2,55 ± 0,00
DK 247	E 1	2,07 ± 0,10	2,03 ± 0,00	2,59 ± 0,07	1,41 ± 0,03	1,75 ± 0,03	3,26 ± 0,39
	E 2	1,25 ± 0,00	1,55 ± 0,03	2,45 ± 0,16	1,64 ± 0,03	2,21 ± 0,05	3,03 ± 0,25
Monumental	E 1	1,76 ± 0,02			2,17 ± 0,00	2,96 ± 0,20	3,58 ± 0,02
	E 2	1,94 ± 0,02			2,07 ± 0,03	2,69 ± 0,13	3,42 ± 0,19
DK 281	E 1	1,83 ± 0,13			2,48 ± 0,17	2,92 ± 0,15	3,93 ± 0,00
	E 2	1,98 ± 0,09			2,30 ± 0,00	2,71 ± 0,01	3,55 ± 0,17
DK 287	E 1	2,08 ± 0,03			2,24 ± 0,02	2,79 ± 0,30	3,61 ± 0,17
	E 2	2,00 ± 0,04			2,43 ± 0,05	3,11 ± 0,23	3,39 ± 0,15

Fortsetzung Tab. 5.15: Gehalte estergebundener *p*-Cumarsäure sowie ester- und ethergebundener Ferulasäure in den Untersuchungsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

<i>estergebundene Ferulasäure (% TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
DK 233	E 1	0,47 ± 0,00	0,65 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,56 ± 0,01	0,45 ± 0,01
	E 2	0,66 ± 0,00	0,63 ± 0,02	0,56 ± 0,00	0,69 ± 0,00	0,92 ± 0,03	0,43 ± 0,00
DKc 2949	E 1	0,54 ± 0,03	0,71 ± 0,01	0,43 ± 0,00	0,49 ± 0,01	0,61 ± 0,00	0,39 ± 0,00
	E 2	0,48 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,46 ± 0,00	0,55 ± 0,01	0,42 ± 0,00
DK 247	E 1	0,76 ± 0,05	0,74 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,75 ± 0,02	0,54 ± 0,05
	E 2	0,44 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,68 ± 0,02	0,53 ± 0,03
Monumental	E 1	0,65 ± 0,00			0,68 ± 0,00	0,88 ± 0,06	0,48 ± 0,04
	E 2	0,61 ± 0,02			0,68 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,48 ± 0,02
DK 281	E 1	0,76 ± 0,06			0,72 ± 0,04	0,79 ± 0,05	0,46 ± 0,05
	E 2	0,68 ± 0,03			0,71 ± 0,01	0,82 ± 0,00	0,49 ± 0,02
DK 287	E 1	0,80 ± 0,02			0,72 ± 0,02	0,93 ± 0,10	0,51 ± 0,02
	E 2	0,66 ± 0,01			0,72 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,51 ± 0,03
<i>ethergebundene Ferulasäure (% TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
DK 233	E 1	1,62 ± 0,04	1,77 ± 0,15	1,47 ± 0,03	1,19 ± 0,09	1,75 ± 0,07	1,85 ± 0,01
	E 2	0,86 ± 0,13	1,15 ± 0,11	0,75 ± 0,04	0,89 ± 0,01	1,30 ± 0,12	1,58 ± 0,04
DKc 2949	E 1	1,23 ± 0,12	1,44 ± 0,16	1,94 ± 0,04	1,24 ± 0,09	1,75 ± 0,09	2,15 ± 0,17
	E 2	1,19 ± 0,02	1,41 ± 0,14	1,70 ± 0,12	1,22 ± 0,14	1,81 ± 0,02	2,28 ± 0,04
DK 247	E 1	1,21 ± 0,09	1,78 ± 0,11	1,24 ± 0,05	1,16 ± 0,10	1,66 ± 0,03	1,97 ± 0,09
	E 2	0,95 ± 0,10	1,49 ± 0,10	1,18 ± 0,09	1,04 ± 0,02	1,47 ± 0,09	1,58 ± 0,09
Monumental	E 1	0,78 ± 0,07			1,15 ± 0,04	1,46 ± 0,12	1,84 ± 0,12
	E 2	0,88 ± 0,05			1,14 ± 0,17	1,55 ± 0,07	1,89 ± 0,02
DK 281	E 1	0,75 ± 0,06			1,29 ± 0,05	1,62 ± 0,14	1,76 ± 0,06
	E 2	0,84 ± 0,05			1,53 ± 0,16	1,59 ± 0,05	2,00 ± 0,12
DK 287	E 1	0,69 ± 0,10			1,47 ± 0,18	1,59 ± 0,20	1,86 ± 0,13
	E 2	0,78 ± 0,04			1,13 ± 0,04	1,44 ± 0,01	1,83 ± 0,19

Tab. 5.16: Gehalte estergebundener Diferulasäuren in den Untersuchungsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, TS = Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

<i>8-8'-DFS (µg/g TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
DK 233	E 1	386 ± 87	505 ± 2	574 ± 77	434 ± 4	450 ± 39	421 ± 55
	E 2	539 ± 13	674 ± 78	424 ± 29	488 ± 53	481 ± 68	593 ± 28
DKc 2949	E 1	368 ± 32	401 ± 51	264 ± 15	446 ± 3	444 ± 5	239 ± 1
	E 2	377 ± 22	425 ± 38	312 ± 13	473 ± 34	600 ± 34	351 ± 32
DK 247	E 1	335 ± 7	503 ± 23	519 ± 44	365 ± 6	406 ± 46	500 ± 84
	E 2	349 ± 36	344 ± 57	459 ± 52	432 ± 25	525 ± 20	353 ± 30

Fortsetzung Tab. 5.16: Gehalte estergebundener Diferulasäuren in den Untersuchungsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, TS = Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

<i>8-8'-DFS (µg/g TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
Monumental	E 1	270 ± 15			427 ± 6	419 ± 32	302 ± 24
	E 2	310 ± 9			574 ± 19	541 ± 28	381 ± 18
DK 281	E 1	328 ± 47			484 ± 14	423 ± 37	305 ± 40
	E 2	315 ± 2			578 ± 32	542 ± 4	404 ± 11
DK 287	E 1	290 ± 13			476 ± 13	422 ± 43	296 ± 5
	E 2	306 ± 1			543 ± 45	523 ± 8	409 ± 0
<i>8-5'-DFS (µg/g TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
DK 233	E 1	651 ± 64	899 ± 0	773 ± 266	709 ± 55	1004 ± 96	1397 ± 128
	E 2	885 ± 163	1127 ± 191	686 ± 124	873 ± 91	1268 ± 17	1189 ± 12
DKc 2949	E 1	759 ± 16	942 ± 44	632 ± 26	814 ± 42	787 ± 36	522 ± 36
	E 2	815 ± 6	934 ± 80	651 ± 19	780 ± 121	997 ± 169	965 ± 286
DK 247	E 1	617 ± 14	979 ± 32	926 ± 250	657 ± 57	842 ± 6	667 ± 123
	E 2	624 ± 63	905 ± 11	882 ± 17	808 ± 10	1011 ± 20	720 ± 103
Monumental	E 1	856 ± 1			901 ± 99	821 ± 15	403 ± 40
	E 2	1056 ± 54			1075 ± 14	1043 ± 73	777 ± 81
DK 281	E 1	990 ± 171			1022 ± 96	830 ± 23	407 ± 61
	E 2	1074 ± 7			1081 ± 10	1046 ± 11	823 ± 69
DK 287	E 1	974 ± 1			1004 ± 96	828 ± 35	394 ± 14
	E 2	1024 ± 63			1015 ± 38	1008 ± 34	833 ± 46
<i>5-5'-DFS (µg/g TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
DK 233	E 1	151 ± 11	216 ± 6	120 ± 11	136 ± 7	121 ± 18	81 ± 6
	E 2	246 ± 19	325 ± 35	109 ± 11	312 ± 32	307 ± 0	206 ± 28
DKc 2949	E 1	150 ± 1	179 ± 6	91 ± 6	182 ± 9	150 ± 17	68 ± 2
	E 2	195 ± 5	222 ± 3	106 ± 1	173 ± 27	222 ± 2	92 ± 6
DK 247	E 1	157 ± 1	168 ± 14	84 ± 7	156 ± 3	156 ± 5	71 ± 6
	E 2	223 ± 22	219 ± 6	187 ± 7	201 ± 2	230 ± 6	99 ± 6
Monumental	E 1	123 ± 3			181 ± 11	164 ± 28	43 ± 0
	E 2	162 ± 6			268 ± 10	238 ± 27	107 ± 2
DK 281	E 1	157 ± 24			205 ± 16	166 ± 30	44 ± 2
	E 2	192 ± 5			269 ± 4	238 ± 13	113 ± 0
DK 287	E 1	153 ± 1			202 ± 16	165 ± 33	42 ± 3
	E 2	196 ± 2			253 ± 3	230 ± 18	115 ± 3
<i>8-O-4'-DFS (µg/g TS)</i>							
		AM	2004 0 h	24 h	AM	2005 0 h	24 h
DK 233	E 1	179 ± 20	264 ± 6	194 ± 4	160 ± 8	236 ± 16	229 ± 3
	E 2	231 ± 11	312 ± 2	191 ± 7	306 ± 7	385 ± 0	278 ± 5

Fortsetzung Tab. 5.16: Gehalte estergebundener Diferulasäuren in den Untersuchungsmaterialien (E = Erntezeitpunkt, TS = Trockensubstanz, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation) (n = 2)

		8-O-4'-DFS ($\mu\text{g/g TS}$)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DKc 2949	E 1	194 \pm 1	254 \pm 11	175 \pm 3	161 \pm 25	215 \pm 2	147 \pm 5
	E 2	260 \pm 5	320 \pm 10	206 \pm 2	277 \pm 39	347 \pm 7	174 \pm 1
DK 247	E 1	184 \pm 1	227 \pm 10	323 \pm 25	165 \pm 3	195 \pm 5	154 \pm 11
	E 2	219 \pm 6	275 \pm 7	214 \pm 11	218 \pm 0	284 \pm 2	167 \pm 14
Monumental	E 1	198 \pm 5			208 \pm 13	187 \pm 11	93 \pm 2
	E 2	249 \pm 11			291 \pm 7	293 \pm 24	180 \pm 8
DK 281	E 1	224 \pm 33			236 \pm 11	189 \pm 13	94 \pm 3
	E 2	257 \pm 9			293 \pm 1	294 \pm 6	191 \pm 5
DK 287	E 1	202 \pm 0			232 \pm 11	189 \pm 16	91 \pm 7
	E 2	253 \pm 2			275 \pm 7	284 \pm 12	194 \pm 1

Tab. 5.17: Ligningehalte der Untersuchungsmaterialien (% TS \pm SD (n = 2)) (KL = Klason-Lignin, ABSL = acetylbromidlösliches Lignin, E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, SD = Standardabweichung, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation)

		KL-Gehalte (% TS)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	15,5 \pm 0,1	20,5 \pm 0,2	26,8 \pm 0,1	15,1 \pm 0,8	20,3 \pm 0,2	25,8 \pm 0,4
	E 2	16,9 \pm 0,4	20,2 \pm 0,1	25,9 \pm 0,1	15,4 \pm 0,4	20,5 \pm 1,8	25,7 \pm 0,2
DKc 2949	E 1	19,0 \pm 1,7	23,3 \pm 0,7	28,6 \pm 0,1	14,8 \pm 0,3	20,3 \pm 0,2	25,5 \pm 0,8
	E 2	20,0 \pm 0,0	22,6 \pm 0,5	30,2 \pm 1,8	15,7 \pm 0,1	20,2 \pm 0,0	26,4 \pm 0,9
DK 247	E 1	16,5 \pm 0,8	21,8 \pm 0,2	27,3 \pm 0,5	13,2 \pm 0,1	19,9 \pm 0,0	25,2 \pm 0,4
	E 2	15,4 \pm 0,4	20,9 \pm 0,9	25,7 \pm 0,2	14,2 \pm 0,5	19,3 \pm 0,4	25,0 \pm 0,5
Monumental	E 1	14,6 \pm 0,7			14,2 \pm 0,3	20,4 \pm 1,0	25,4 \pm 0,3
	E 2	16,1 \pm 0,4			14,9 \pm 0,2	20,1 \pm 0,2	25,3 \pm 0,5
DK 281	E 1	14,8 \pm 0,3			15,4 \pm 0,5	20,0 \pm 0,3	26,2 \pm 1,3
	E 2	16,0 \pm 0,2			17,0 \pm 0,2	20,0 \pm 0,3	25,7 \pm 0,3
DK 287	E 1	13,8 \pm 0,5			17,3 \pm 0,7	20,6 \pm 1,1	24,7 \pm 1,0
	E 2	15,6 \pm 0,6			17,0 \pm 0,0	19,9 \pm 0,1	24,2 \pm 0,2

		ABSL-Gehalte (% TS)					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
DK 233	E 1	23,4 \pm 0,2	19,6 \pm 0,3	24,1 \pm 0,4	25,8 \pm 1,0	20,2 \pm 1,6	26,7 \pm 0,9
	E 2	22,4 \pm 0,2	21,0 \pm 0,1	24,2 \pm 0,9	23,7 \pm 0,2	22,3 \pm 0,8	25,7 \pm 0,6
DKc 2949	E 1	19,7 \pm 0,5	23,9 \pm 0,1	23,4 \pm 0,3	23,6 \pm 1,3	22,6 \pm 0,7	25,5 \pm 0,2
	E 2	19,9 \pm 0,5	23,6 \pm 1,4	23,9 \pm 0,4	24,3 \pm 0,4	22,8 \pm 0,1	25,6 \pm 0,4
DK 247	E 1	24,1 \pm 0,4	20,5 \pm 0,0	24,2 \pm 0,2	24,9 \pm 0,2	20,8 \pm 0,2	26,1 \pm 0,0
	E 2	23,4 \pm 0,2	20,8 \pm 0,3	24,0 \pm 0,1	24,3 \pm 0,1	22,3 \pm 0,9	25,7 \pm 0,6

Fortsetzung Tab. 5.17: Ligningehalte der Untersuchungsmaterialien (% TS \pm SD (n = 2)) (KL = Klason-Lignin, ABSL = acetylbromidlösliches Lignin, E = Erntezeitpunkt, % TS = % der Trockensubstanz, SD = Standardabweichung, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation)

		<i>ABSL-Gehalte (% TS)</i>					
		2004			2005		
		AM	0 h	24 h	AM	0 h	24 h
Monumental	E 1	20,2 \pm 1,4			24,0 \pm 0,3	23,5 \pm 0,2	27,5 \pm 0,1
	E 2	23,1 \pm 0,9			24,6 \pm 0,5	23,1 \pm 0,1	27,6 \pm 0,5
DK 281	E 1	22,0 \pm 0,7			21,7 \pm 0,6	21,7 \pm 0,7	26,7 \pm 0,1
	E 2	22,9 \pm 0,3			20,9 \pm 0,8	21,4 \pm 0,6	27,4 \pm 0,3
DK 287	E 1	23,8 \pm 0,4			21,8 \pm 0,1	20,4 \pm 0,5	25,8 \pm 0,1
	E 2	22,8 \pm 0,2			21,2 \pm 0,8	21,6 \pm 0,3	26,0 \pm 0,6

Tab. 5.18: molare Syringyl/Guaiacyl-Verhältnisse in den Untersuchungsmaterialien (S/G \pm SD (n = 2)) (S/G = Syringyl/Guaiacyl, SD = Standardabweichung, E = Erntezeitpunkt, AM = Ausgangsmaterial, 0 h = wasserunlöslicher Pflanzenrückstand, 24 h = Rückstand nach 24 h ruminaler Inkubation)

		<i>molares S/G-Verhältnis</i>			
		2004		2005	
		0 h	24 h	0 h	24 h
DK 233	E 1	0,21 \pm 0,00	0,22 \pm 0,02	0,26 ¹	0,27 ¹
	E 2	0,24 \pm 0,02	0,26 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	0,36 \pm 0,02
DKc 2949	E 1	0,26 \pm 0,01	0,31 ¹	0,24 \pm 0,03	0,22 ¹
	E 2	0,25 \pm 0,01	0,36 ¹	0,24 \pm 0,02	0,18 ¹
DK 247	E 1	0,20 \pm 0,01	0,20 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00	0,27 ¹
	E 2	0,20 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,25 ¹

¹ n = 1

Tab. 5.19: Übersicht der aus den TUKEY-HSD-Tests der Faktoreninteraktionen erhaltenen signifikanten, homogenen Untergruppen für verschiedene abhängige Variablen der Zellwandzusammensetzung mit b signifikant höher als a usw. (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D = Monumental, E = DK 281, F = DK 287, EZP/E = Erntezeitpunkt, (Urons. % = Uronsäuregehalt (% Trockensubstanz), FS_{est} (%) = Gehalt estergebundener Ferulasäure (% Trockensubstanz), FS_{eth} (%) = Gehalt ethergebundenen Ferulasäure (% Trockensubstanz), Dimerisierungsgrad ($\frac{\sum DFS}{\sum DFS + FS_{est}} \cdot 100$), % Anteil FS_{eth} = prozentualer Anteil der ethergebundenen Ferulasäure an der gesamten Ferulasäure ($\frac{FS_{eth}}{FS_{eth} + FS_{est}} \cdot 100$), FS_{est}/Xyl = molares Verhältnis der estergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, $FS_{est} + 2xDFS/Xyl$ = molares Verhältnis der hypothetisch gesamten estergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, DFS/Xyl = molares Verhältnis der Summe der Diferulasäuren (DFS) zum Xylose-Gehalt, FS_{eth}/Xyl = molares Verhältnis der ethergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, pCS = *p*-Cumarsäuregehalt (% Trockensubstanz), Glc (%), Xyl (%), Ara (%) = prozentuale Anteile von Glucose, Xylose, Arabinose an der Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide, KL (%) = Klason-Lignin-Gehalt (% Trockensubstanz), ABSL (%) = Gehalt acetylbromidlöslichen Lignins (% Trockensubstanz))

Zweifaktorielle ANOVA									
(nur Daten 2005)									
	Urons. (%)	FS_{est} (%)	Dimerisierungsgrad	% Anteil FS_{eth}	FS_{est}/Xyl	$FS_{est} + 2xDFS/Xyl$	DFS/Xyl	FS_{eth}/Xyl	pCS (%)
Sorte X EZP									
A' E1	a	a	f	e	ab	ab	a	abcd	a
A' E2	a	d	cde	a	abc	abc	bcd	d	bc
B' E1	ab	ab	cde	e	abc	abc	a	abcd	ab
B' E2	def	a	g	e	a	a	a	a	ab
C' E1	def	abcd	abc	d	cd	bcd	ab	cd	ab
C' E2	abc	abc	ef	d	abc	ab	ab	a	bc
D E1	ef	cd	ab	abc	bcd	bcd	a	abcd	c
D E2	bcd	bcd	def	d	abcd	abc	abc	abc	bc
E E1	abc	bcd	ab	d	bcd	bcd	a	abcd	c
E E2	f	cd	cde	cd	de	de	cd	cd	bc
F E1	cde	e	a	bc	de	bcd	a	abcd	c
F E2	f	e	bcd	ab	e	e	d	bcd	c
Dreifaktorielle ANOVA									
(nur Daten der Sorten A, B und C)									
Sorte X EZP									
	FS_{est} (%)	FS_{eth} (%)	Dimerisierungsgrad	% Anteil FS_{eth}	FS_{est}/Xyl	$2xDFS + FS_{est}/Xyl$	FS_{eth}/Xyl		
A E1	ab	b	abc	b	a	a	ab		
A E2	b	a	bc	a	a	a	ab		
B E1	ab	ab	ac	b	a	a	ab		
B E2	a	ab	cd	b	ab	ab	a		
C E1	ab	b	a	b	b	b	b		
C E2	ab	ab	abc	b	ab	ab	ab		
Sorte X Jahr									
	Glc (%)	Xyl (%)	Ara (%)	Urons. (%)	FS_{est}/Xyl	$2xDFS + FS_{est}/Xyl$	DFS/Xyl	KL (%)	ABSL (%)
A 2004	a	bc	cd	cd	ab	ab	ab	ab	a
A 2005	a	bc	a	ab	ab	ab	ab	ab	ab
B 2004	b	a	bc	d	ab	ab	ab	c	c
B 2005	a	c	ab	bc	a	a	a	ab	bc
C 2004	a	c	d	a	b	b	b	b	ab
C 2005	a	b	a	bc	ab	ab	ab	a	ab
Jahr X EZP									
	DFS ($\mu g/g$)								
E1 2004	ab								
E2 2004	ab								
E1 2005	a								
E2 2005	b								

Fortsetzung Tab. 5.19: Übersicht der aus den TUKEY-HSD-Tests der Faktoreninteraktionen erhaltenen signifikanten, homogenen Untergruppen für verschiedene abhängige Variablen der Zellwandzusammensetzung mit b signifikant höher als a usw. (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D = Monumental, E = DK 281, F = DK 287, EZP/E = Erntezeitpunkt, (Urons. % = Uronsäuregehalt (% Trockensubstanz), FS_{est} (%) = Gehalt estergebundener Ferulasäure (% Trockensubstanz), Dimerisierungsgrad ($\frac{\sum DFS}{\sum DFS + FS_{est}} \cdot 100$), FS_{est}/Xyl = molares Verhältnis der estergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, $FS_{est} + 2xDFS/Xyl$ = molares Verhältnis der hypothetisch gesamten estergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, DFS/Xyl = molares Verhältnis der Summe der Diferulasäuren (DFS) zum Xylose-Gehalt, FS_{eth}/Xyl = molares Verhältnis der ethergebundenen FS zum Xylose-Gehalt, pCS = p-Cumarsäuregehalt (% Trockensubstanz))

Sorte X Jahr X EZP

	Urons. (%)	FS_{est} (%)	Dimerisierungsgrad	FS_{est}/Xyl	$FS_{est} + 2xDFS/Xyl$	DFS/Xyl	FS_{eth}/Xyl	pCS (%)
A E1 2004	cd	cde	b	de	d	ab	cde	cde
A E2 2004	b	bcde	cd	ab	abc	ab	a	e
A E1 2005	b	ab	bcd	bc	bc	a	bcde	ab
A E2 2005	b	g	ab	cd	d	bc	de	f
B E1 2004	d	ef	ab	ab	ab	a	bcd	de
B E2 2004	cd	abc	bcd	f	f	bc	abc	e
B E1 2005	b	abcde	ab	de	d	a	bcde	e
B E2 2005	c	ab	d	a	a	a	ab	cd
C E1 2004	a	f	ab	g	g	c	e	e
C E2 2004	a	a	bcd	e	e	bc	cde	a
C E1 2005	c	f	a	f	e	ab	de	bc
C E2 2005	b	def	bc	cd	cd	ab	abc	f

Tab. 5.20: Übersicht der aus den TUKEY-HSD-Tests der Faktoreninteraktionen erhaltenen signifikanten, homogenen Untergruppen für die ermittelte ruminale Zellwandabbaubarkeit sowie für die Polysaccharid- bzw. Xylanabbaubarkeit mit b signifikant höher als a usw. (A/A' = DK 233 (2004/2005), B/B' = DKc 2949 (2004/2005), C/C' = DK 247 (2004/2005), D = Monumental, E = DK 281, F = DK 287, EZP/E = Erntezeitpunkt)

Zweifaktorielle ANOVA		(nur Daten 2005)		Dreifaktorielle ANOVA		(nur Daten der Sorten A, B und C)	
Zellwandabbau (%)		Polysaccharidabbau (%)	Xylanabbau (%)	Xylanabbau (%)			
Sorte X EZP				EZP X Jahr			
A' E1	ab	c	bc	E1 2004	ab		
A' E2	ab	bc	b	E2 2004	ab		
B' E1	ab	c	bc	E1 2005	b		
B' E2	ab	c	b	E2 2005	a		
C' E1	ab	c	bc				
C' E2	ab	c	bc				
D E1	a	bc	c				
D E2	ab	a	bc				
E E1	ab	c	bc				
E E2	ab	ab	a				
F E1	ab	bc	a				
F E2	b	c	a				

5.5 Chromatogramme

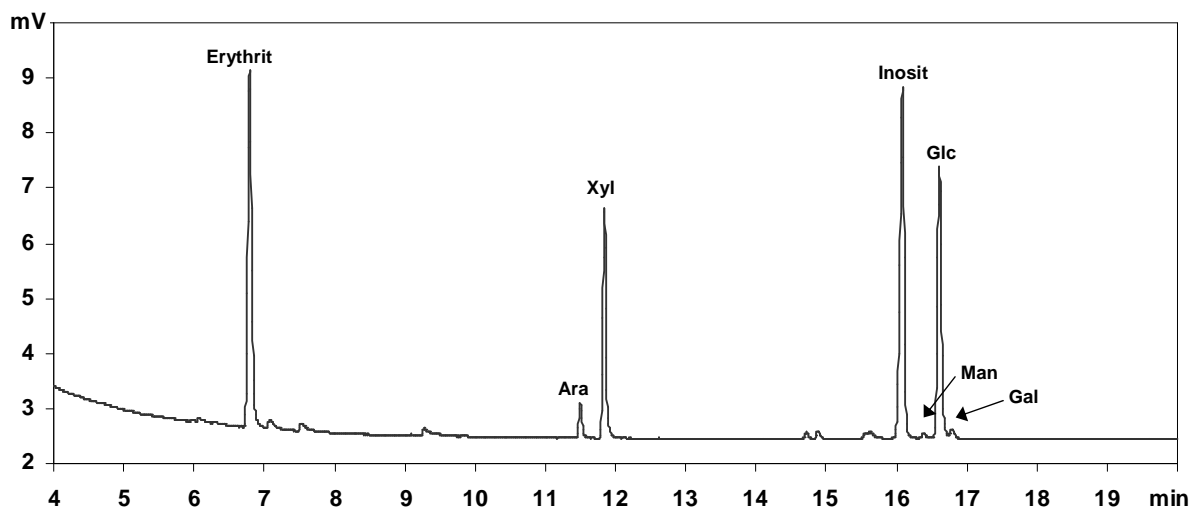


Abb. 5.1: GC-FID Probenchromatogramm zur Bestimmung der neutralen Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide als deren Alditolacetate (Beispiel: DK 247 (2005) E 1, 24 h) (Erythrit/Inosit = interne Standards, Ara = Arabinose, Xyl = Xylose, Glc = Glucose, Man = Mannose, Gal = Galactose)

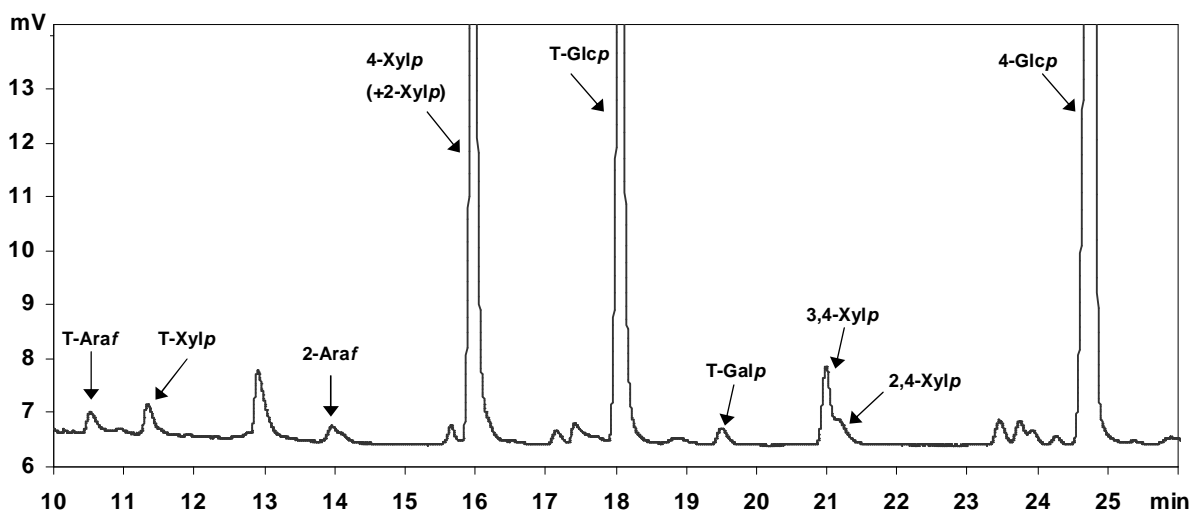


Abb. 5.2: GC-FID Probenchromatogramm der Methylierungsanalyse (Beispiel: DK 247 (2005) E 1, 0 h) (T-Araf = terminale Arabinofuranose, T-Xylp = terminale Xylopyranose, 2-Araf = O-2 glykosidisch verknüpfte Arabinofuranose, 4-Xylp (+2-Xylp) = 1→4 (+1→2) glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, T-Glcp = terminale Glycopyranose, T-Galp = terminale Galactopyranose, 3,4-Xylp = 1→4 und 3→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 2,4-Xylp = 1→4 und 2→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 4-Glcp = 1→4 glykosidisch verknüpfte Glucopyranose)

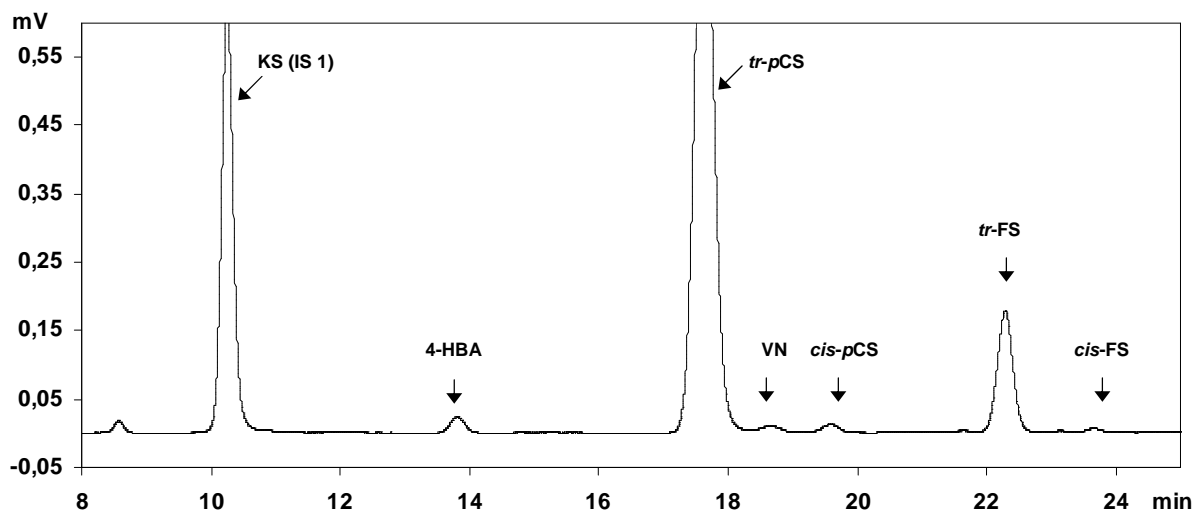


Abb. 5.3: HPLC-UV Probenchromatogramm der Bestimmung estergebundener, monomerer Phenolcarbonsäuren, Detektionswellenlänge 280 nm (Beispiel: DK 247 (2005) E 1, 0 h) (KS (IS1) = Kaffeesäure –interner Standard 1, 4-HBA = 4-Hydroxybenzaldehyd, *tr-pCS* = *trans p*-Cumarsäure, VN = Vanillin, *cis-pCS* = *cis p*-Cumarsäure, *tr-FS* = *trans* Ferulasäure, *cis-FS* = *cis* Ferulasäure)

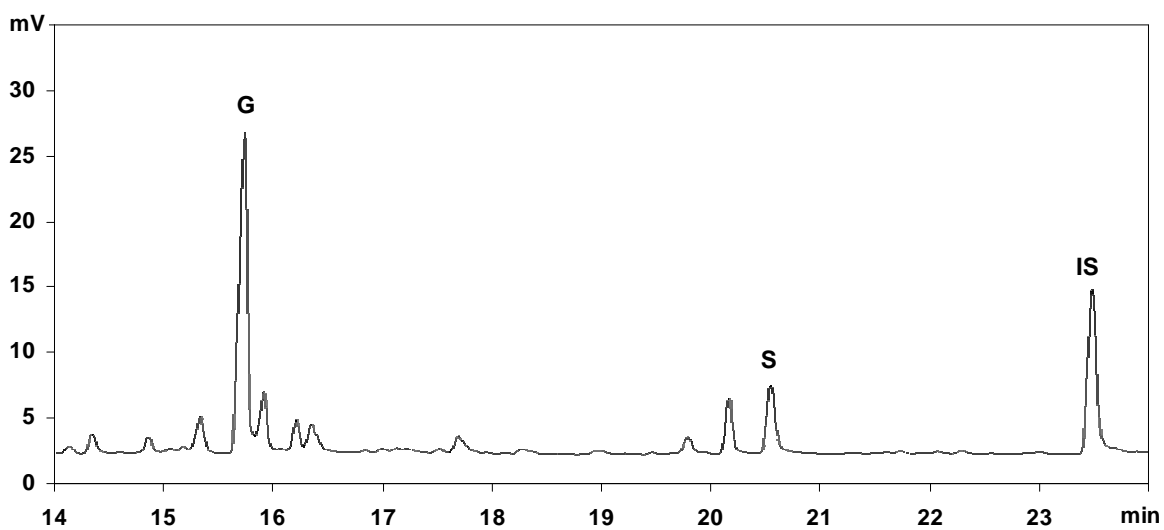


Abb. 5.4: GC-FID Probenchromatogramm der Bestimmung der Monolignolzusammensetzung mittels DFRC-Methode (derivatisation followed by reductive cleavage) (Beispiel: DK 247 (2004), E 1, 24 h) (G = Guaiacyl-Einheit, S = Syringyl-Einheit, IS = interner Standard (4,4-Ethylidenbisphenol))

5.6 Spektren

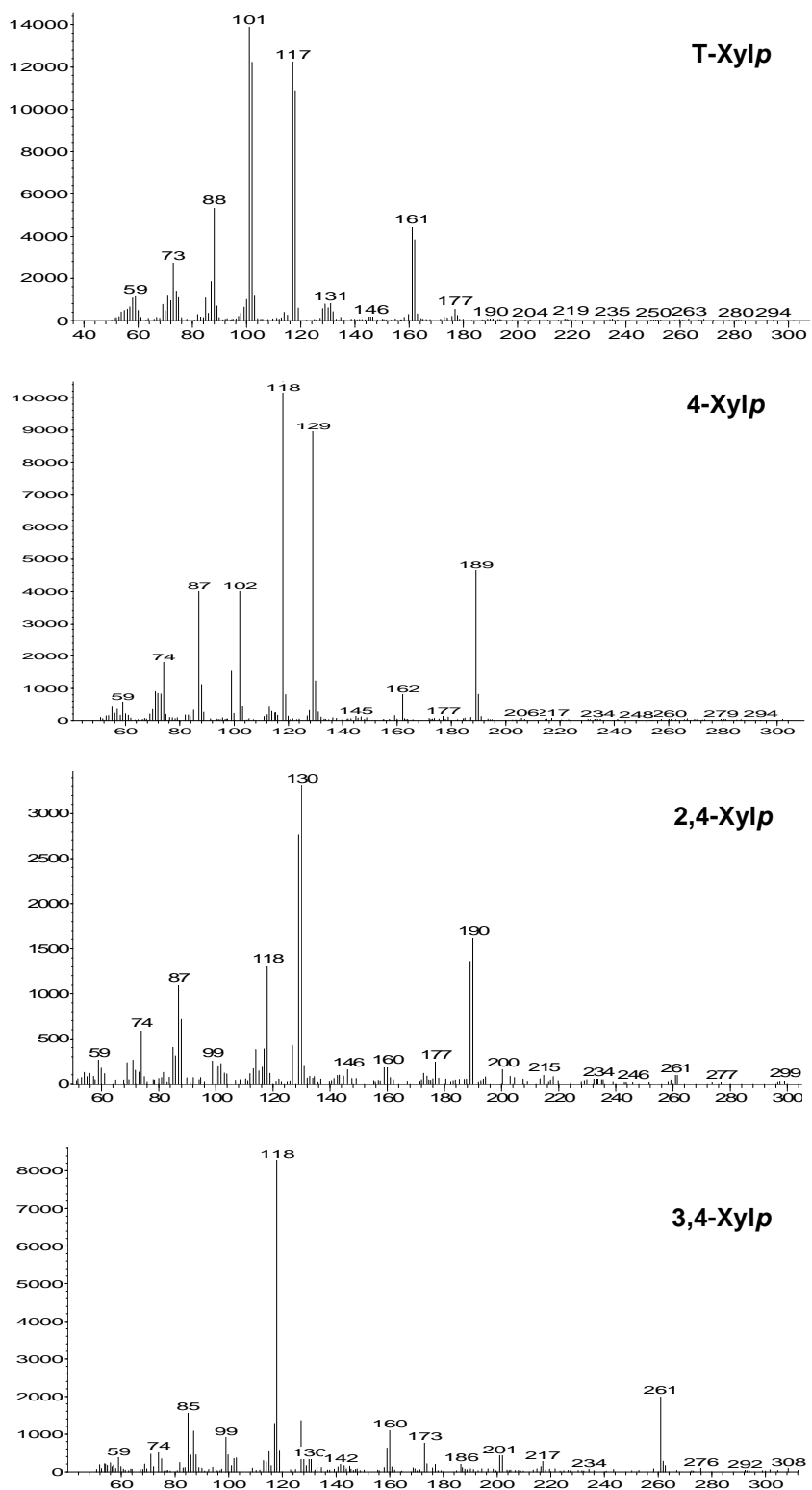


Abb. 5.5: GC-EI-Massenspektren der identifizierten permethylierten Alditolacetat-Derivate der Xylose (T-Xylp = terminale Xylopyranose, 4-Xylp = 1→4 glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 3,4-Xylp = 1→4 und 3→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose, 2,4-Xylp = 1→4 und 2→ glykosidisch verknüpfte Xylopyranose)

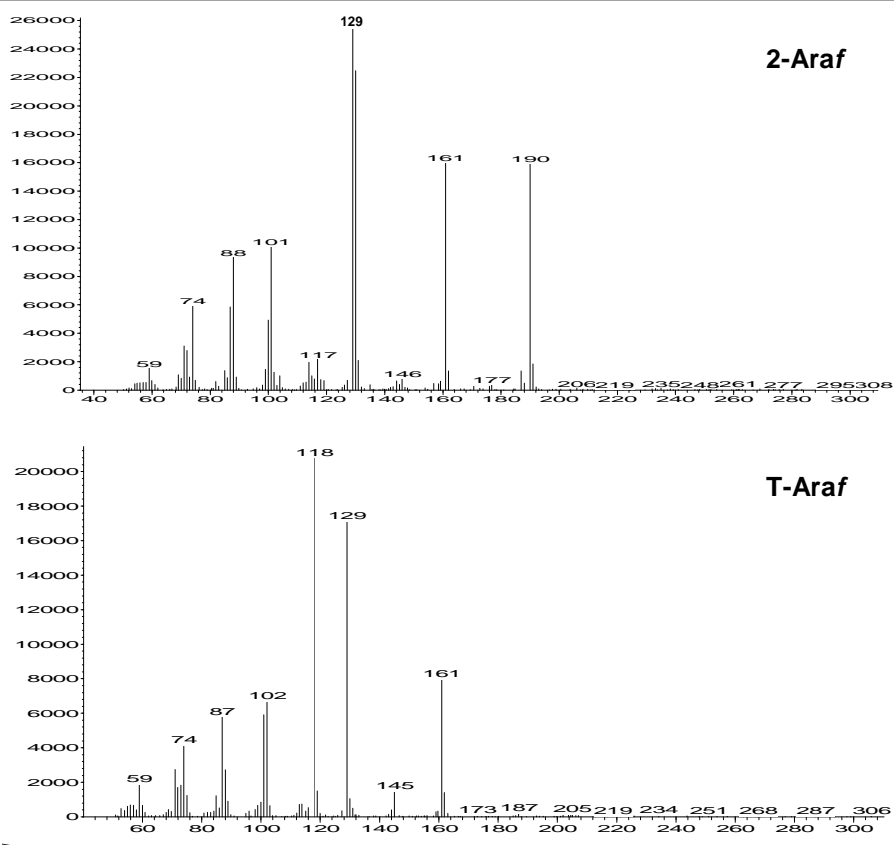


Abb. 5.6: GC-EI-Massenspektren der identifizierten permethylierten Alditolacetat-Derivate der Arabinose (T-Araf = terminale Arabinofuranose, 2-Araf = 1→2 glykosidisch verknüpfte Arabinofuranose)

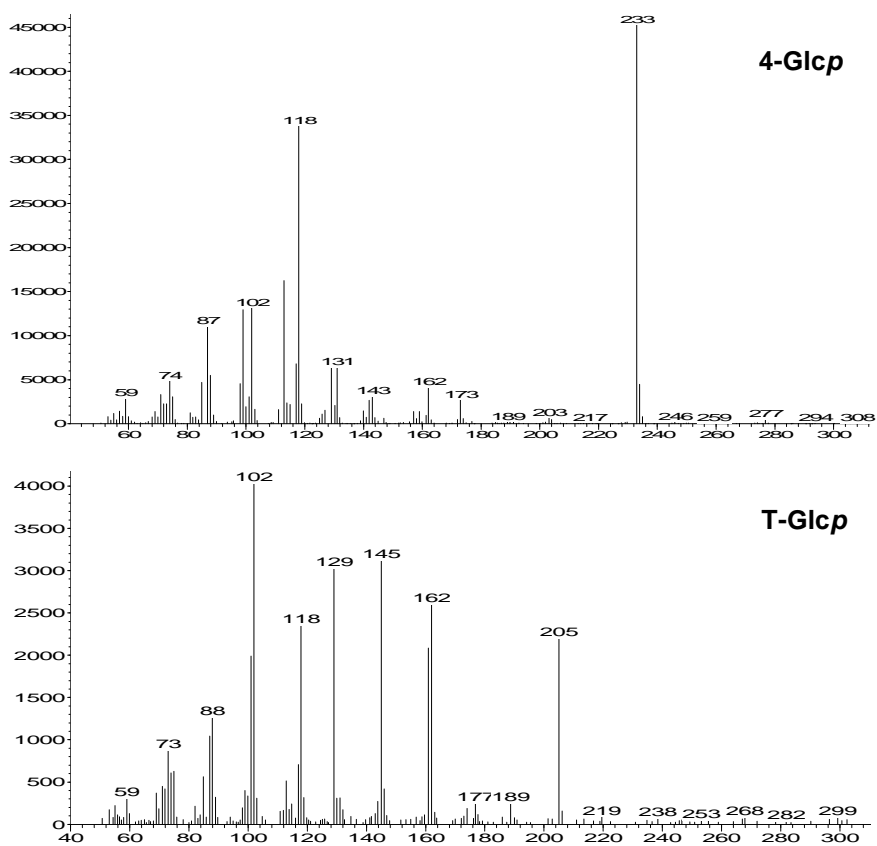


Abb. 5.7: GC-EI-Massenspektren der identifizierten permethylierten Alditolacetat-Derivate der Glucose (T-Glcp = terminale Glucopyranose, 4-Glcp = 1→4 glykosidisch verknüpfte Glucopyranose)

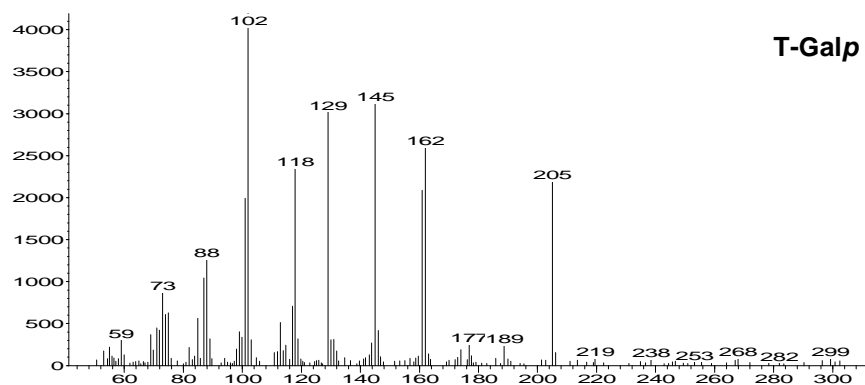


Abb. 5.8: GC-EI-Massenspektren der identifizierten permethylierten Alditolacetat-Derivate der Galactose (T-Galp = terminale Galactopyranose)

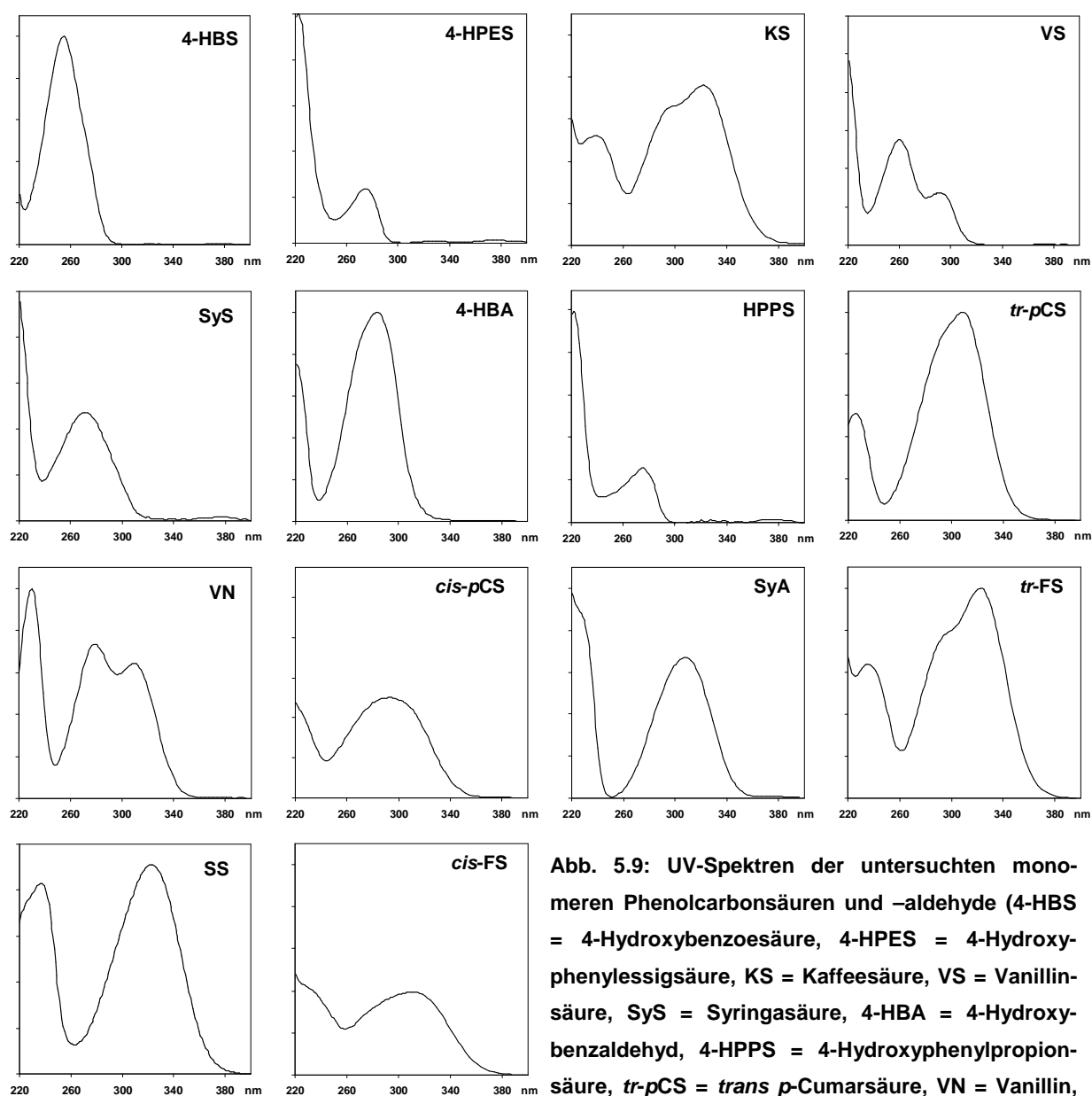


Abb. 5.9: UV-Spektren der untersuchten mono-meren Phenolcarbonsäuren und -aldehyde (4-HBS = 4-Hydroxybenzoesäure, 4-HPES = 4-Hydroxyphenylessigsäure, KS = Kaffeesäure, VS = Vanillinsäure, SyS = Syringasäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-HPPS = 4-Hydroxyphenylpropionsäure, *tr-pCS* = *trans p*-Cumarsäure, VN = Vanillin, *cis-pCS* = *cis p*-Cumarsäure, SyA = Syringaldehyd, *tr-FS* = *trans* Ferulasäure, SS = Sinapinsäure, *cis-FS* = *cis* Ferulasäure)

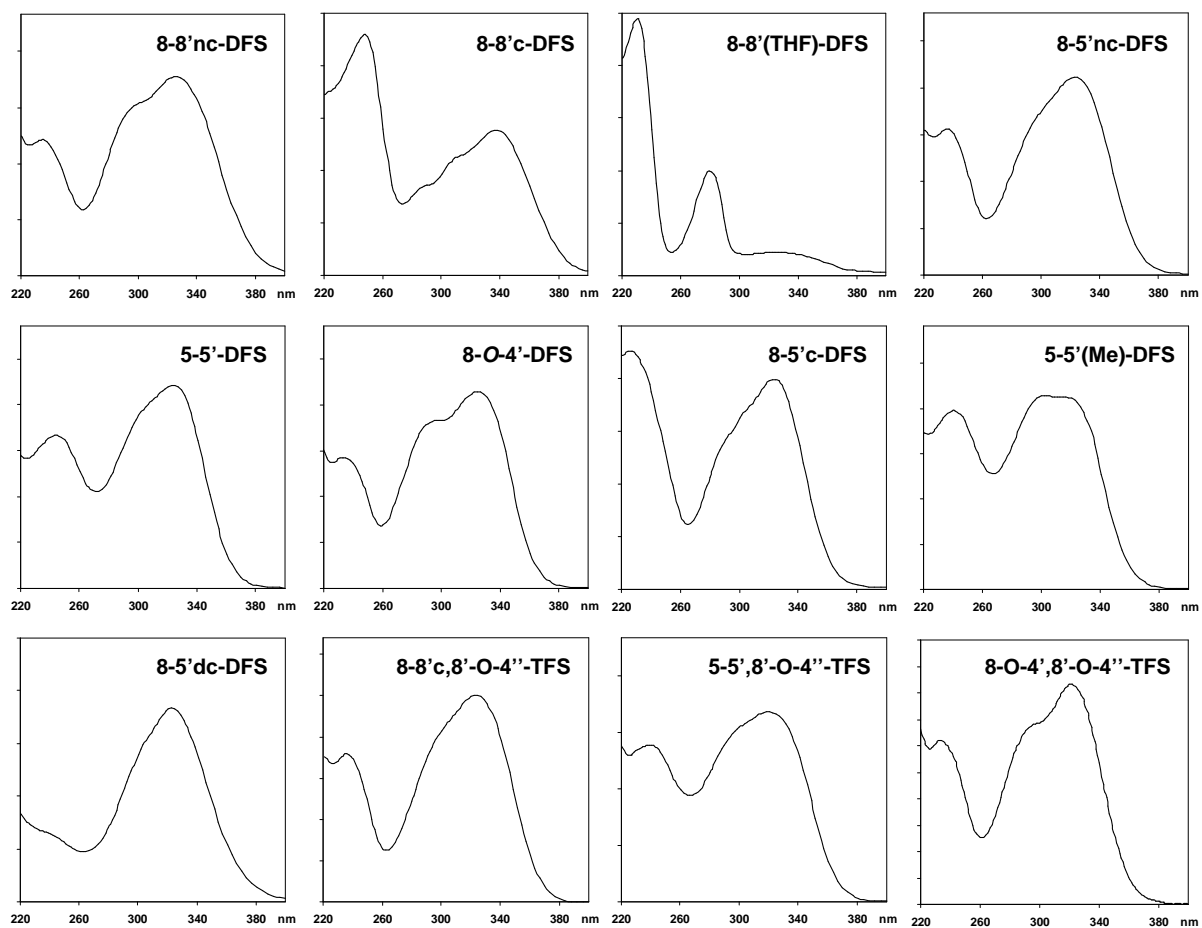


Abb. 5.10: UV-Spektren der zur HPLC-Bestimmung eingesetzten Di- (DFS) und Triferulasäuren (TFS) (c = cyclisch, nc = nicht cyclisch, THF = Tetrahydrofuranform, Me = methyliert, dc = decarboxyliert)

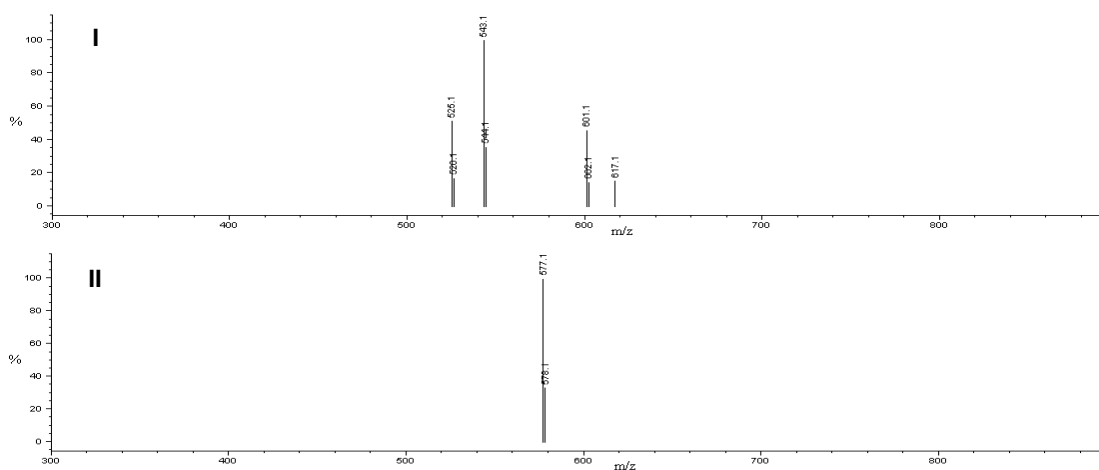


Abb. 5.11: LC-ESI-Massenspektren der aus LH^{Tri}7 isolierten und identifizierten 8-5'nc,8'-O-4''-Triferulasäure (I = positiver Modus, II = negativer Modus)

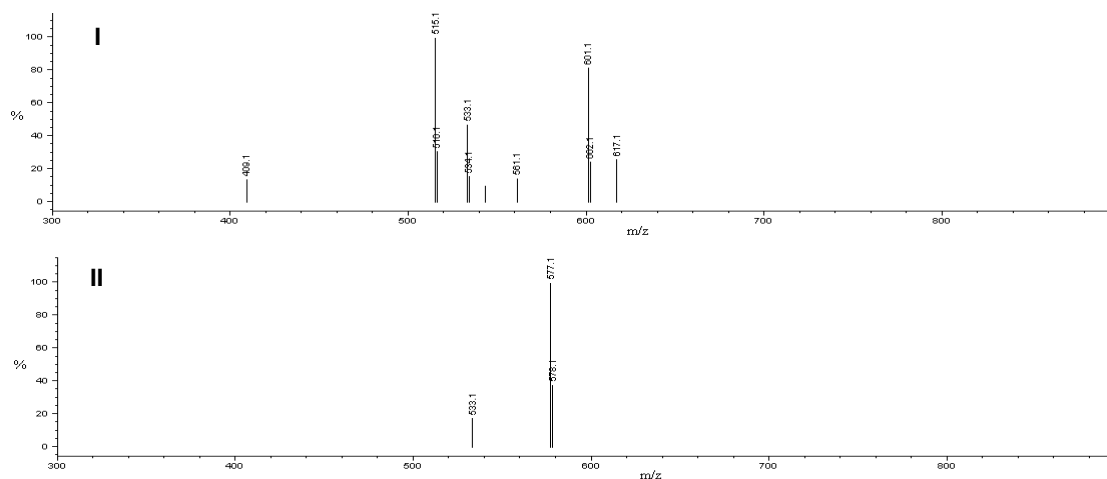


Abb. 5.12: LC-ESI-Massenspektren der aus LH^{Tri7} isolierten und identifizierten 8-8'*c*,8'-O-4''-Triferulasäure (I = positiver Modus, II = negativer Modus)

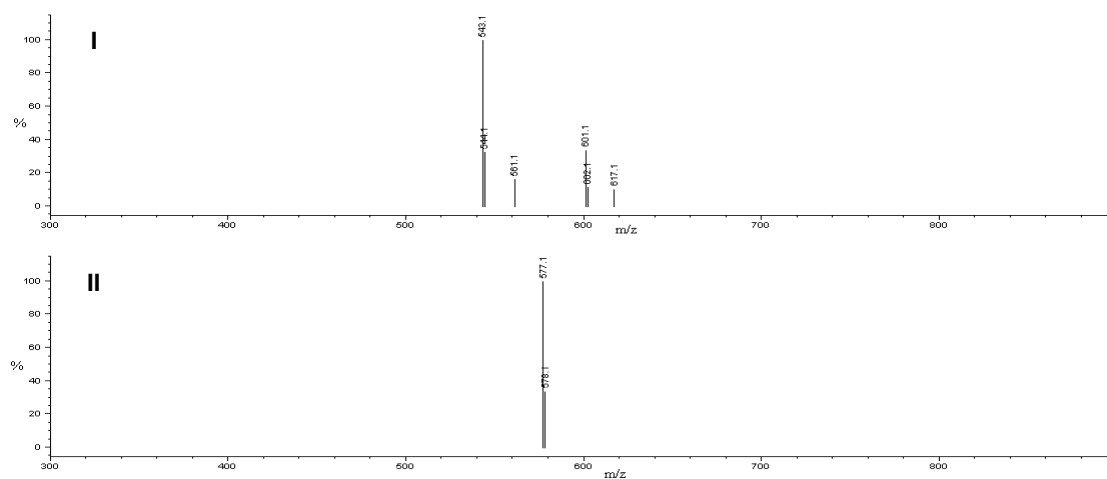


Abb. 5.13: LC-ESI-Massenspektren der aus LH^{Tri9} isolierten und identifizierten 8-O-4',8'-O-4''-Triferulasäure (I = positiver Modus, II = negativer Modus)

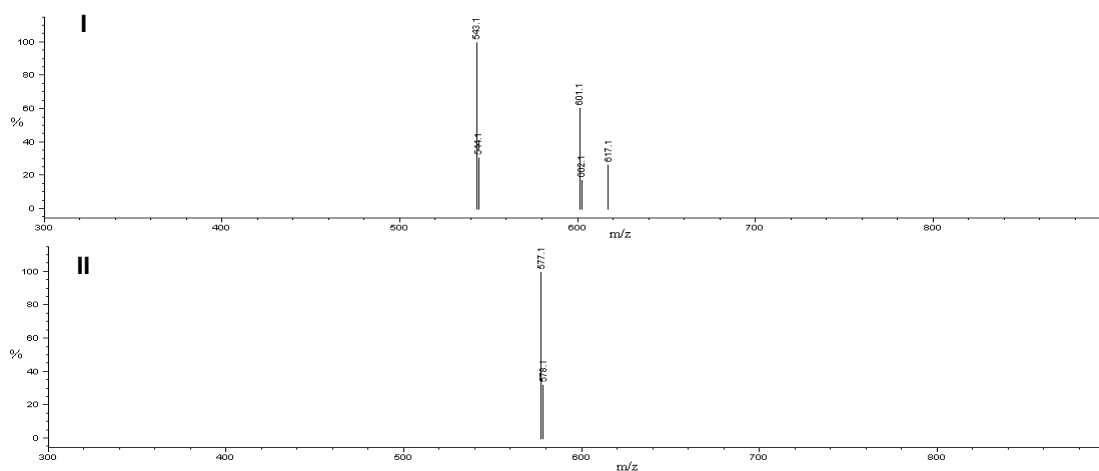


Abb. 5.14: LC-ESI-Massenspektren der aus LH^{Tri13} isolierten und identifizierten 5-5',8'-O-4''-Triferulasäure (I = positiver Modus, II = negativer Modus)

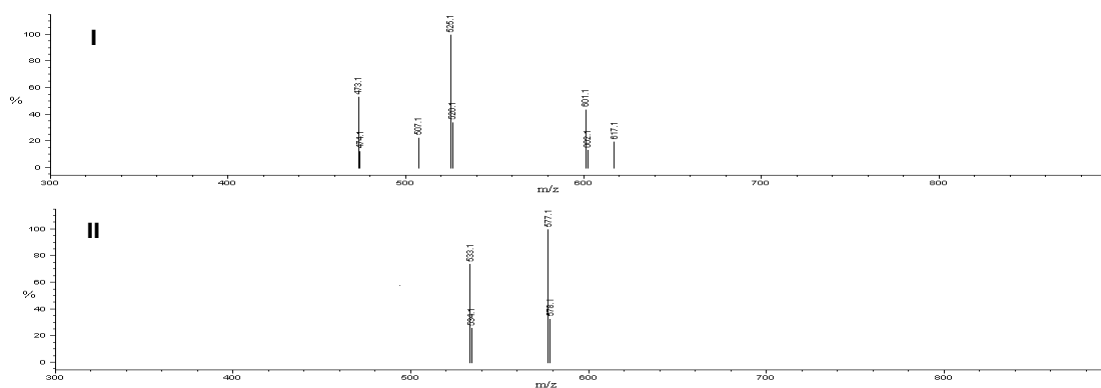


Abb. 5.15: LC-ESI-Massenspektren der aus LH^{Tri}₁₂ isolierten und vorläufig identifizierten 5-5',8'-5''nc-Triferulasäure (I = positiver Modus, II = negativer Modus)

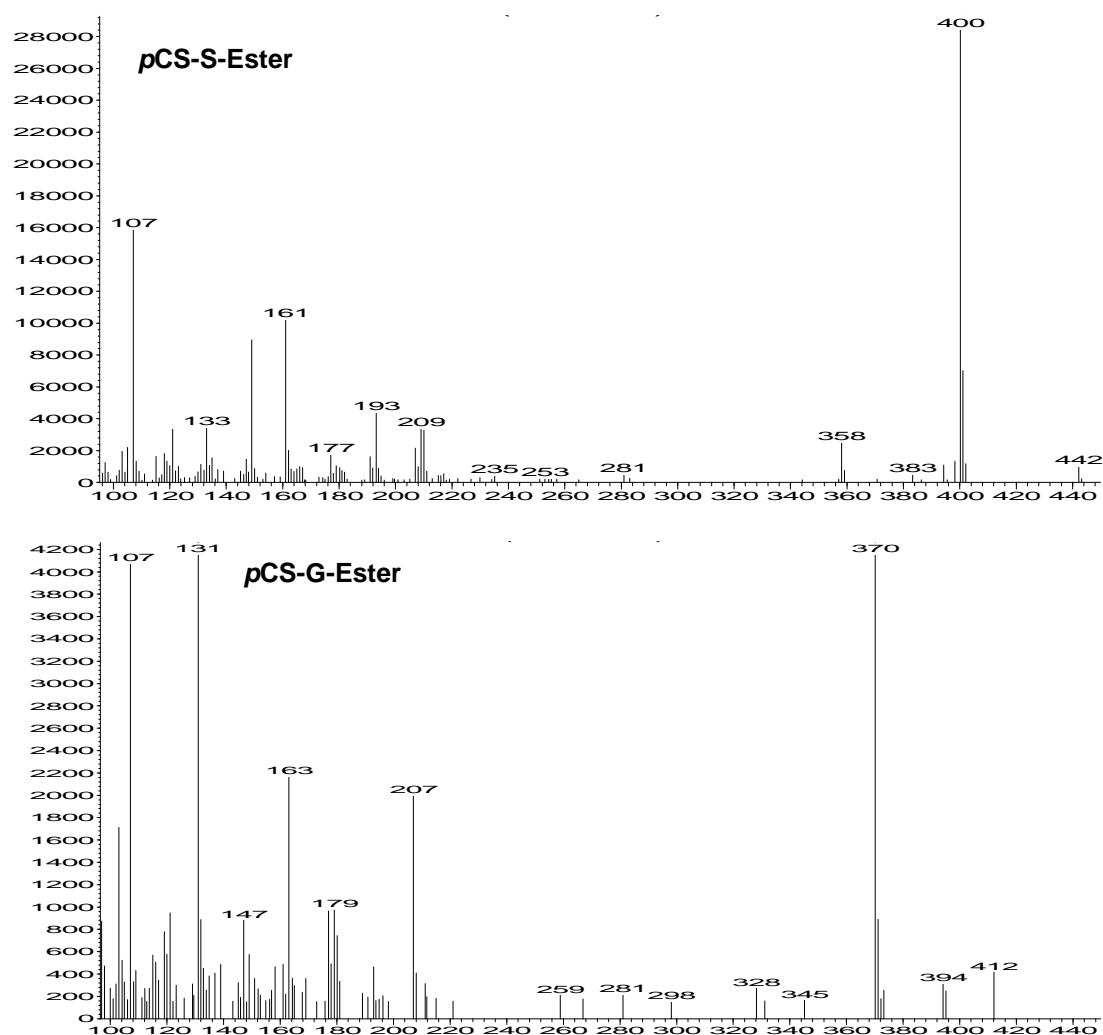


Abb. 5.16: GC-EI-Massenspektren der mittels DFRC-Methode (derivatisation followed by reductive cleavage) nachgewiesenen *p*-Cumarsäure-Monolignol-Ester (*p*CS-S-Ester = *p*-Cumarsäure-Syringyl-Ester, *p*CS-G-Ester = *p*-Cumarsäure-Guaiacyl-Ester)

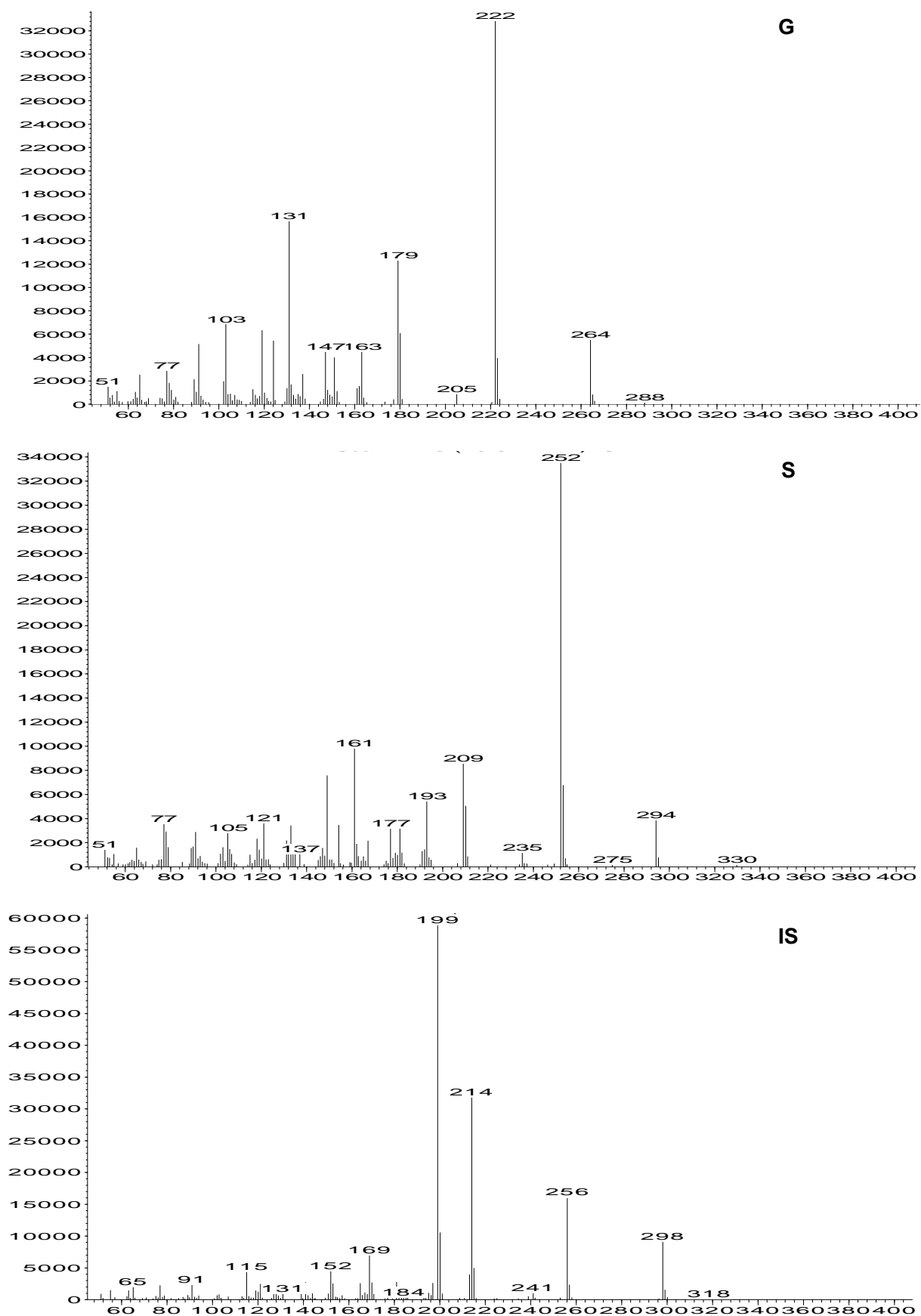


Abb. 5.17: GC-EI-Massenspektren der mittels DFRC-Methode (derivatisation followed by reductive cleavage) nachgewiesenen Monolignolderivate (S = Syringyl-Einheit, G = Guaiacyl-Einheit, IS = interner Standard (4,4'-Ethylidenbisphenol))

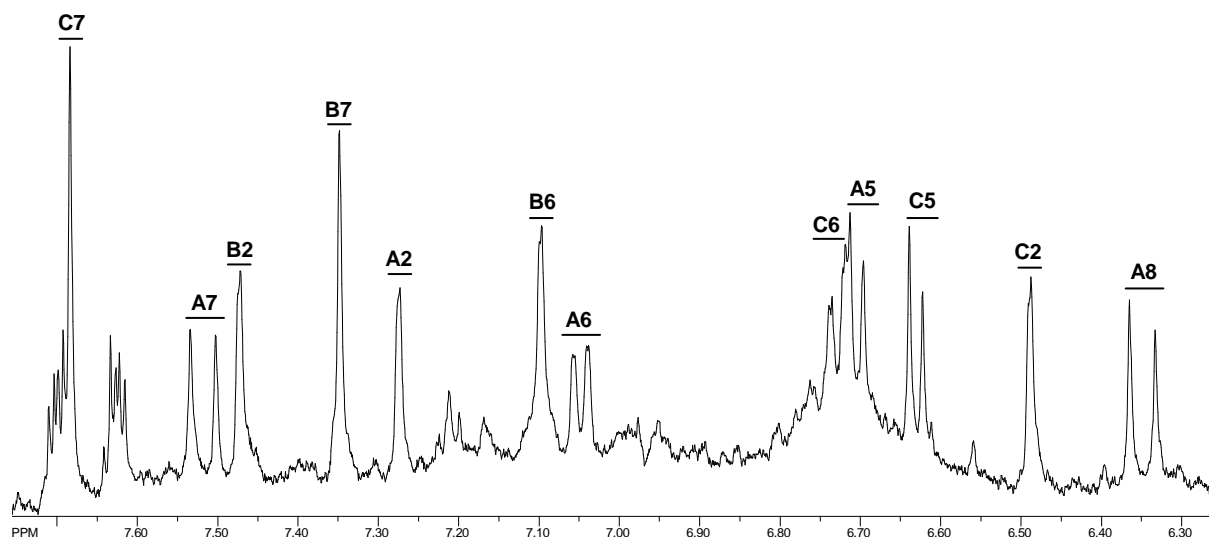


Abb. 5.18: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum (phenolischer Bereich) der isolierten und identifizierten 8-5'nc,8'-O-4''-Triferulasäure in Aceton- d_6

Tab. 5.21: Vergleich der NMR-Daten der identifizierten 8-5'nc, 8'-O-4''-Triferulasäure mit den entsprechenden Referenzdaten (BUNZEL et al. 2005) (δ in ppm, J in Hz)

Trimeren Einheit	^1H	
	in Aceton- d_6	Referenzdaten in Aceton- d_6
A2	7.27 (1H, <i>d</i> , 1.7)	7.35 (1H, <i>d</i> , 1.8)
A5	6.71 (1H, <i>d</i> , 8.4)	6.78 (1H, <i>d</i> , 8.2)
A6	7.05 (1H, <i>dd</i> , 8.3, 1.7)	7.09 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.8)
A7	7.52(1H, <i>d</i> , 16.0)	7.57(1H, <i>d</i> , 15.9)
A8	6.35 (1H, <i>d</i> , 15.8)	6.41 (1H, <i>d</i> , 15.9)
A3-OMe	nicht zu zuordnen	3.94 (3H, <i>s</i>)
B2	7.47 (1H, <i>d</i> , 1.8)	7.57 (1H, <i>d</i> , 1.9)
B6	7.10 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.19 (1H, <i>d</i> , 1.9)
B7	7.35 (1H, <i>s</i>)	7.42 (1H, <i>s</i>)
B3-OMe	nicht zu zuordnen	3.78 (3H, <i>s</i>)
C2	6.49 (1H, <i>bs/d</i> , ca. 1.9)	6.57 (1H, <i>d</i> , 1.9)
C5	6.63 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.68 (1H, <i>d</i> , 8.2)
C6	6.73 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.1)	6.81 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)
C7	7.68 (1H, <i>s</i>)	7.75 (1H, <i>s</i>)
C3-OMe	nicht zu zuordnen	3.29 (3H, <i>s</i>)

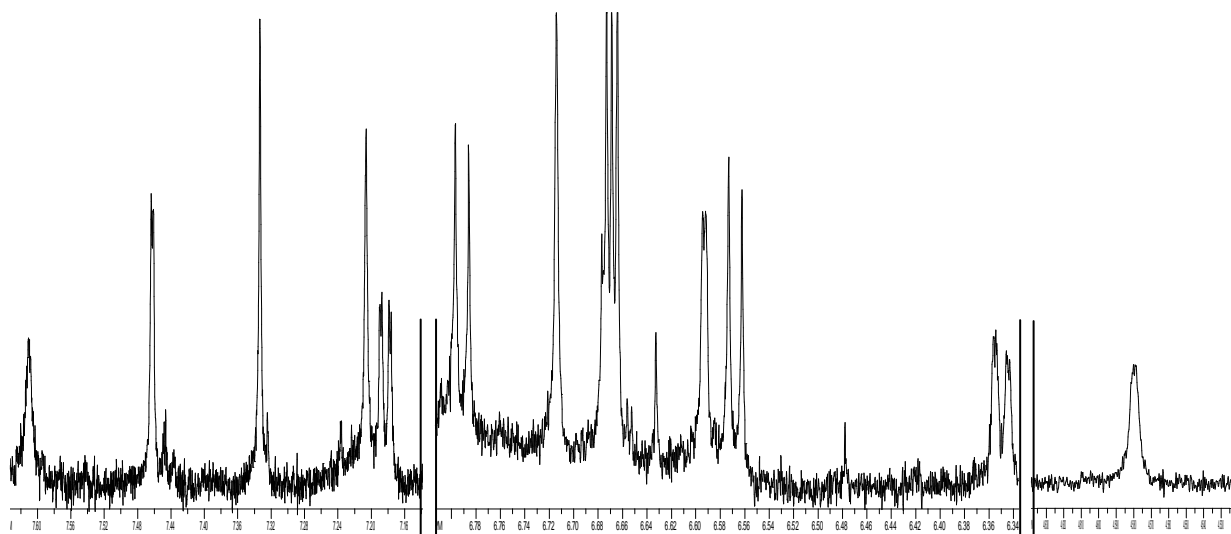


Abb. 5.19: Ausschnitte aus dem ^1H -Spektrum (phenolischer Bereich) der isolierten und identifizierten 8-8'c,8'-O-4''-Triferulasäure in Aceton-d₆

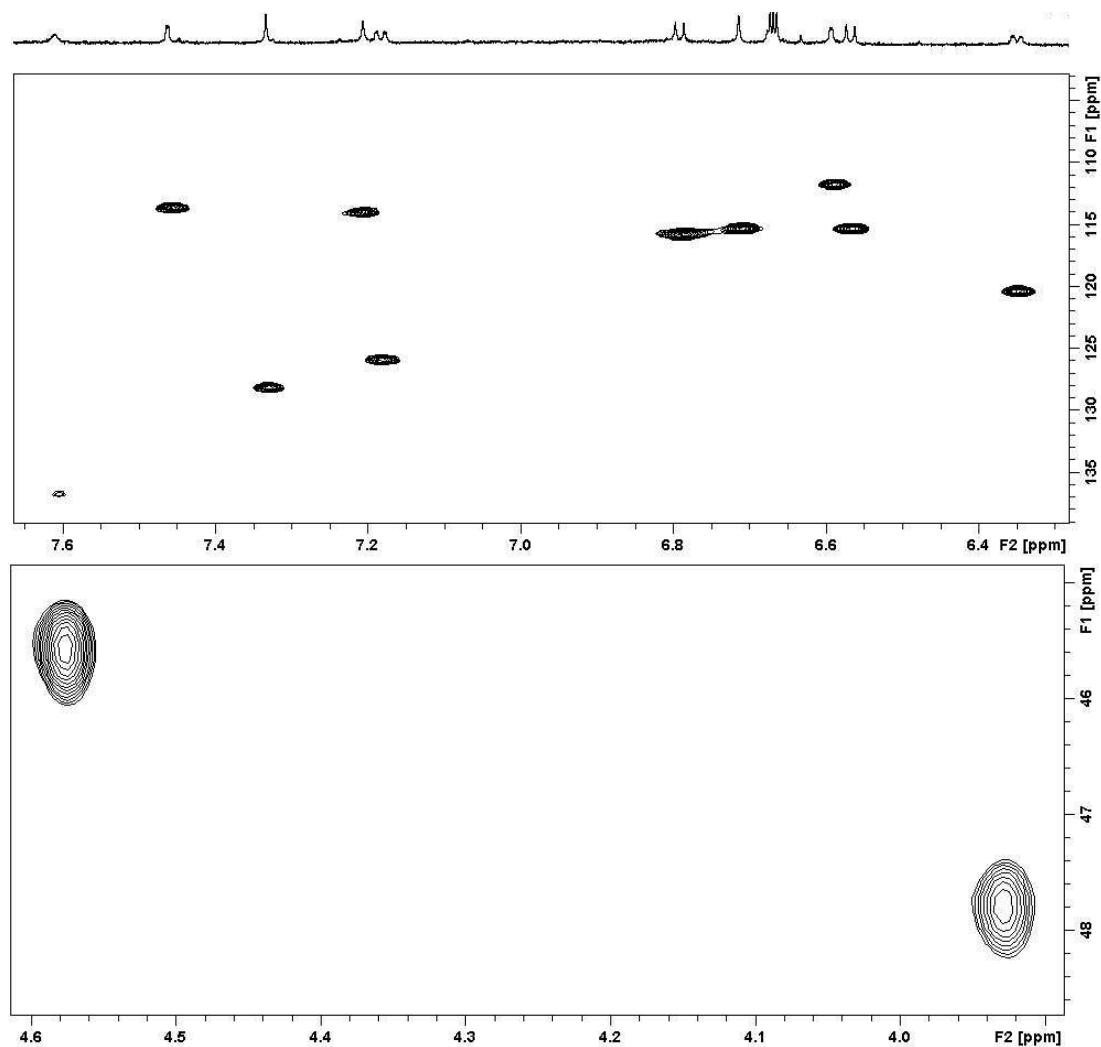


Abb. 5.20: Ausschnitte aus dem HMQC-Spektrum (phenolischer Bereich) der isolierten und identifizierten 8-8'c,8'-O-4''-Triferulasäure in Aceton-d₆

Tab. 5.22: Vergleich der NMR-Daten der identifizierten 8-8'*c*,8'-O-4''-Triferulasäure mit den entsprechenden Referenzdaten (FUNK et al. 2005) (δ in ppm, *J* in Hz)

Trimeren Einheit	¹ H		¹³ C	
	in Aceton-d ₆	Referenzdaten in Aceton-d ₆	in Aceton-d ₆	Referenzdaten in Aceton-d ₆
A2	6.59 (1H, <i>d</i> , 1.8)	6.79 (1H, <i>d</i> , 2.0)	111.8	111.9
A5	6.57 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.57 (1H, <i>d</i> , 8.2)	115.3	115.4
A6	6.35 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)	6.36 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.1)	120.4	120.4
A7	4.58 (1H, <i>d</i> , 1.8)	4.57(1H, <i>d</i> , 1.9)	45.6	45.7
A8	3.93 (1H, <i>d</i> , 15.9)	3.97 (1H, <i>d</i> , 1.9)	47.8	47.5
A3-OMe	3.61 (3H, <i>s</i>)	3.61 (3H, <i>s</i>)	55,9	56.9
B2	7.20 (1H, <i>s</i>)	7.23 (1H, <i>s</i>)	114.0	114.2
B5	6.71 (1H, <i>s</i>)	6.71(1H, <i>s</i>)	115.3	115.4
B7	7.61 (1H, <i>s</i>)	7.66 (1H, <i>s</i>)	136.7	137.4
B3-OMe	3.96 (3H, <i>s</i>)	3.97 (3H, <i>s</i>)	56.5	56.6
C2	7.46 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.46 (1H, <i>d</i> , 1.9)	113.6	113.8
C5	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2)	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2)	115.8	115.9
C6	7.18 (1H, <i>dd</i> , 8.3, 2.0)	7.18 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)	125.8	126.0
C7	7.33 (1H, <i>s</i>)	7.36 (1H, <i>s</i>)	128.2	128.3
C3-OMe	3.69 (3H, <i>s</i>)	3.69 (3H, <i>s</i>)	55.9	56.0

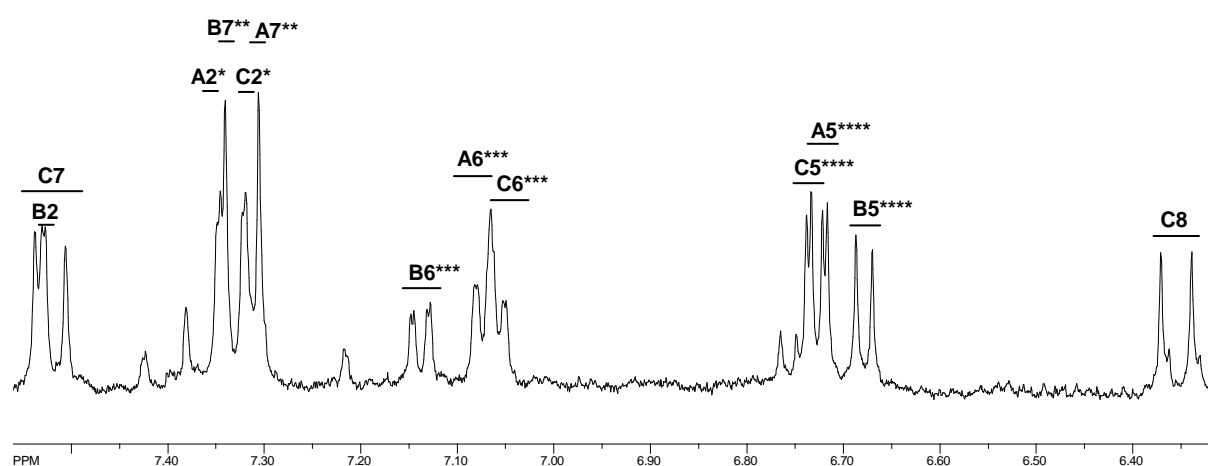


Abb. 5.21: Ausschnitt aus dem ¹H-Spektrum (phenolischer Bereich) der isolierten und identifizierten 8-O-4',8'-O-4''-Triferulasäure in Aceton-d₆/D₂O (9/1, v/v)(*/**/**/*/* Zuordnung kann vertauscht sein)

Tab. 5.23: Vergleich der NMR-Daten der identifizierten 8-O-4',8'-O-4''-Triferulasäure mit den entsprechenden Referenzdaten (FUNK et al. 2005) (δ in ppm, J in Hz)

Trimeren Einheit	^1H	
	in Aceton- d_6 /D $_2$ O (9/1, v/v)	Referenzdaten in Aceton- d_6
A2	7.35 (1H, <i>d</i> , 1.9)*	7.45 (1H, <i>d</i> , 1.9)
A5	6.68 (1H, <i>d</i> , 8.2)****	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2)
A6	7.08 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)***	7.19 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)
A7	7.31 (1H, <i>s</i>)**	7.38 (1H, <i>s</i>)
A3-OMe	3.56 (3H, <i>s</i>)	3.65 (3H, <i>s</i>)
B2	7.53 (1H, <i>d</i> , 1.9)	7.63 (1H, <i>d</i> , 1.9)
B5	6.72 (1H, <i>d</i> , 8.5)****	6.78 (1H, <i>d</i> , 8.5)
B6	7.14 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.9)***	7.23 (1H, <i>dd</i> , 8.5, 1.9)
B7	7.34 (1H, <i>s</i>)**	7.42 (1H, <i>s</i>)
B3-OMe	3.75 (3H, <i>s</i>)	3.82 (3H, <i>s</i>)
C2	7.32 (1H, <i>d</i> , 1.9)*	7.44 (1H, <i>d</i> , 1.9)
C5	6.73 (1H, <i>d</i> , 8.2)****	6.82 (1H, <i>d</i> , 8.2)
C6	7.05 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)***	7.12 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.9)
C7	7.52 (1H, <i>d</i> , 16.0)	7.59 (1H, <i>d</i> , 16.0)
C8	6.36. (1H, <i>d</i> , 16.0)	6.44 (1H, <i>d</i> , 16.0)
C3-OMe	3.92 (3H, <i>s</i>)	3.99 (3H, <i>s</i>)

*/**/****/***** Zuordnung kann vertauscht sein

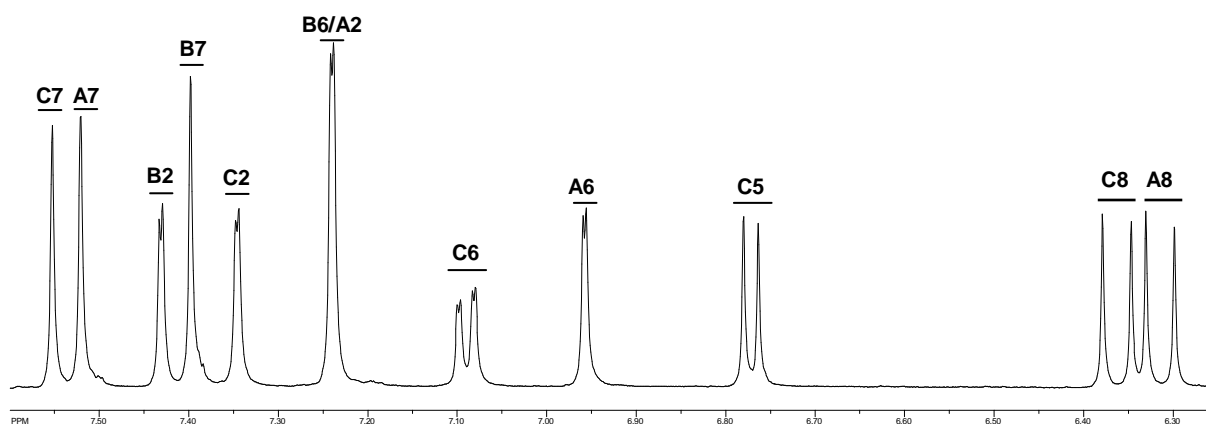


Abb. 5.22: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum (phenolischer Bereich) der isolierten und identifizierten 5-5',8'-O-4''-Triferulasäure in Aceton- d_6 /D $_2$ O (3/1, v/v)

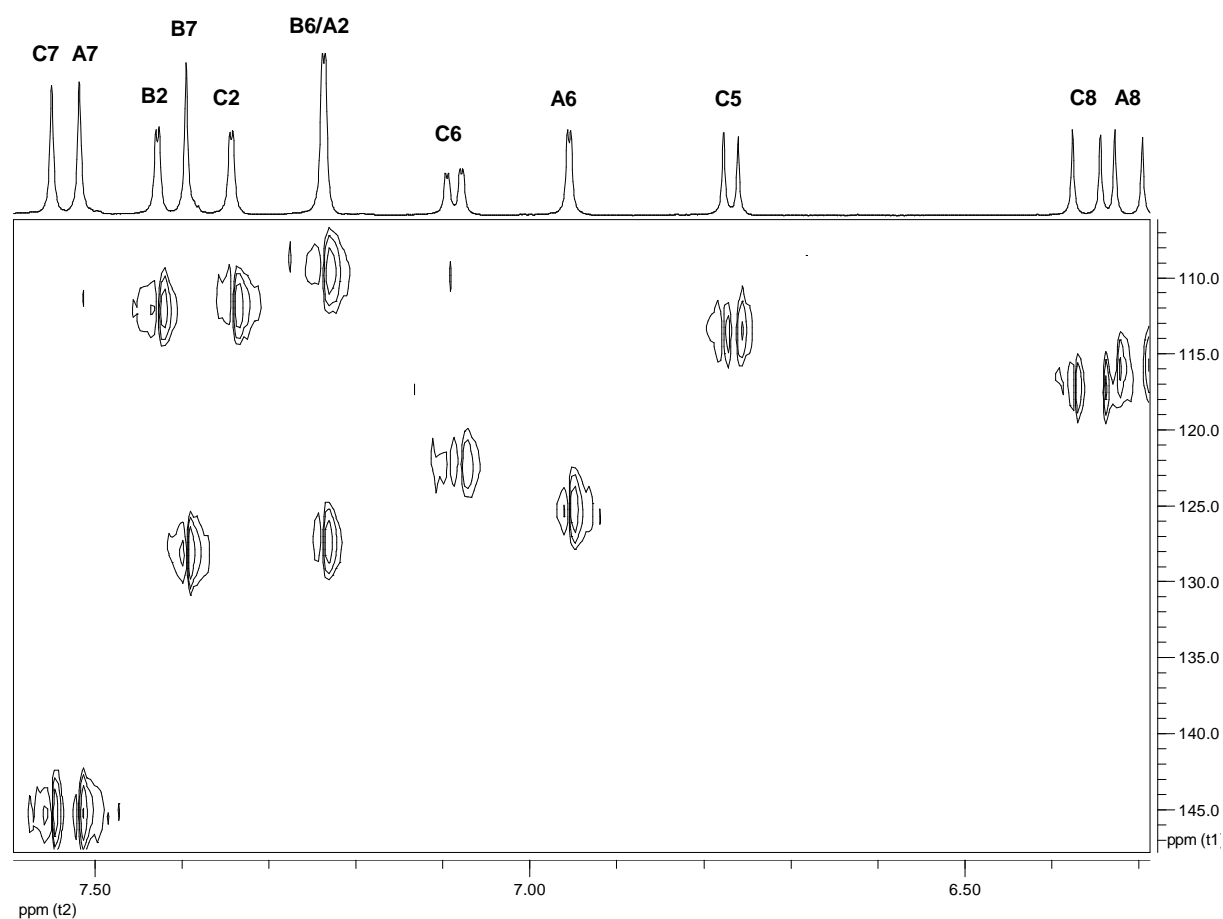


Abb. 5.23: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (phenolischer Bereich) der isolierten und identifizierten 5-5',8'-O-4''-Triferulasäure in Aceton-d₆/D₂O (3/1, v/v)

Tab. 5.24: Vergleich der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der identifizierten 5-5',8'-O-4''-Triferulasäure mit dem entsprechenden Referenzdaten (BUNZEL et al 2003a) (δ in ppm, J in Hz)

Trimeren Einheit	¹ H		¹³ C	
	in Aceton-d ₆ /D ₂ O (3/1)	Referenzdaten in Aceton-d ₆ /D ₂ O (3/1)	in Aceton-d ₆ /D ₂ O (3/1)	Referenzdaten in Aceton-d ₆ /D ₂ O (3/1)
A2	7.24 (1H, d, 2.0)	7.21 (1H, d, 2.0)	109.6	109.8
A6	6.96 (1H, d, 2.0)	6.90 (1H, d, 2.0)	125.5	125.5
A7	7.54 (1H, d, 15.9)	7.51 (1H, d, 15.9)	145.3	145.9
A8	6.31 (1H, d, 15.9)	6.29 (1H, d, 15.9)	116.5	115.9
A3-OMe	3.89 (3H, s)	3.87 (3H, s)	56.3	56.4
B2	7.43 (1H, d, 2.0)	7.37 (1H, d, 2.0)	112.2	112.5
B6	7.24 (1H, d, 2.0)	7.21 (1H, d, 2.0)	127.6	127.3
B7	7.40 (1H, s)	7.36 (1H, s)	128.0	127.8
B3-OMe	3.73 (3H, s)	3.72 (3H, s)	55.9	56.0
C2	7.34 (1H, d, 2.0)	7.31 (1H, d, 2.0)	112.2	112.0
C5	6.77 (1H, d, 8.4)	6.75 (1H, d, 8.3)	113.5	113.9
C6	7.09 (1H, dd, 8.4, 2.0)	7.06 (1H, dd, 8.3, 2.0)	122.9	122.7
C7	7.54 (1H, d, 16.0)	7.51 (1H, d, 15.9)	145.3	145.2
C8	6.36 (1H, d, 16.0)	6.34 (1H, d, 15.9)	117.7	117.3
C3-OMe	3.87 (3H, s)	3.84 (3H, s)	56.3	56.2

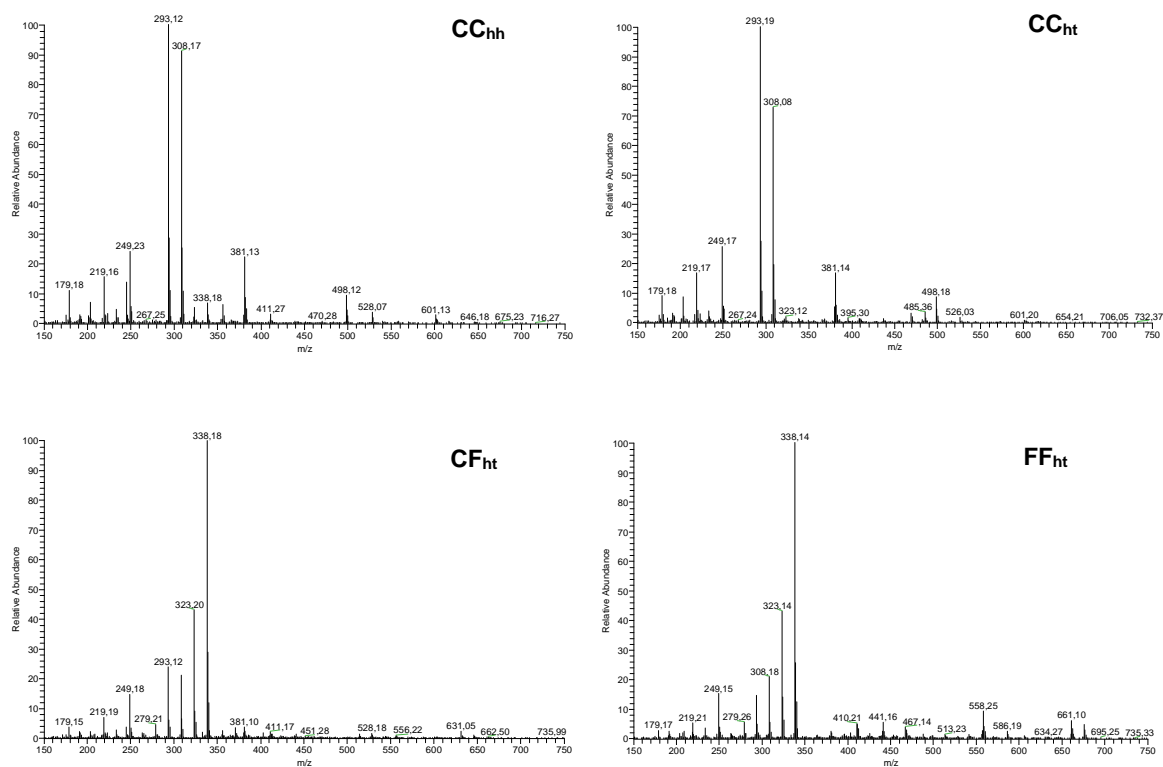


Abb. 5.24: Exemplarische Darstellung der Massenspektren der verschiedenen vorläufig identifizierten Cyclobutenderivate (Ion-Trap-MS, TIC, Massenbereich m/z 150 - 750) (CC_{hh} = head-to-head *p*-Cumarsäure-*p*-Cumarsäure-Cyclobutandimer, CC_{ht} = head-to-tail *p*-Cumarsäure-*p*-Cumarsäure-Cyclobutandimer, CF_{ht} = head-to-tail *p*-Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimer, FF_{ht} = head-to-tail Ferulasäure-Ferulasäure-Cyclobutandimer)

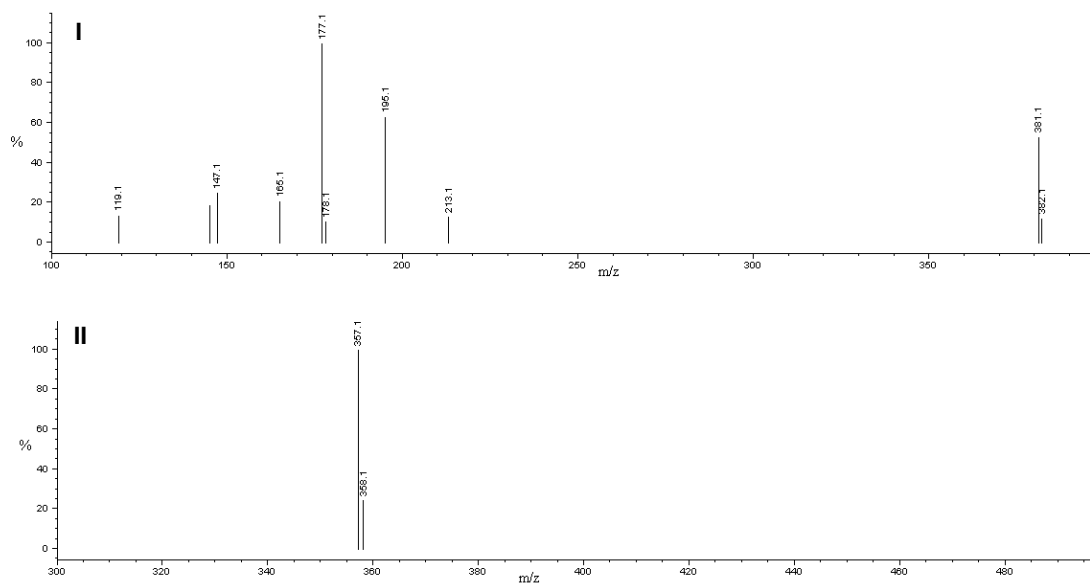


Abb. 5.25: LC-ESI-Massenspektren des aus LH^{Di}1 isolierten und identifizierten *p*-Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimers (I = positiver Modus, II = negativer Modus)

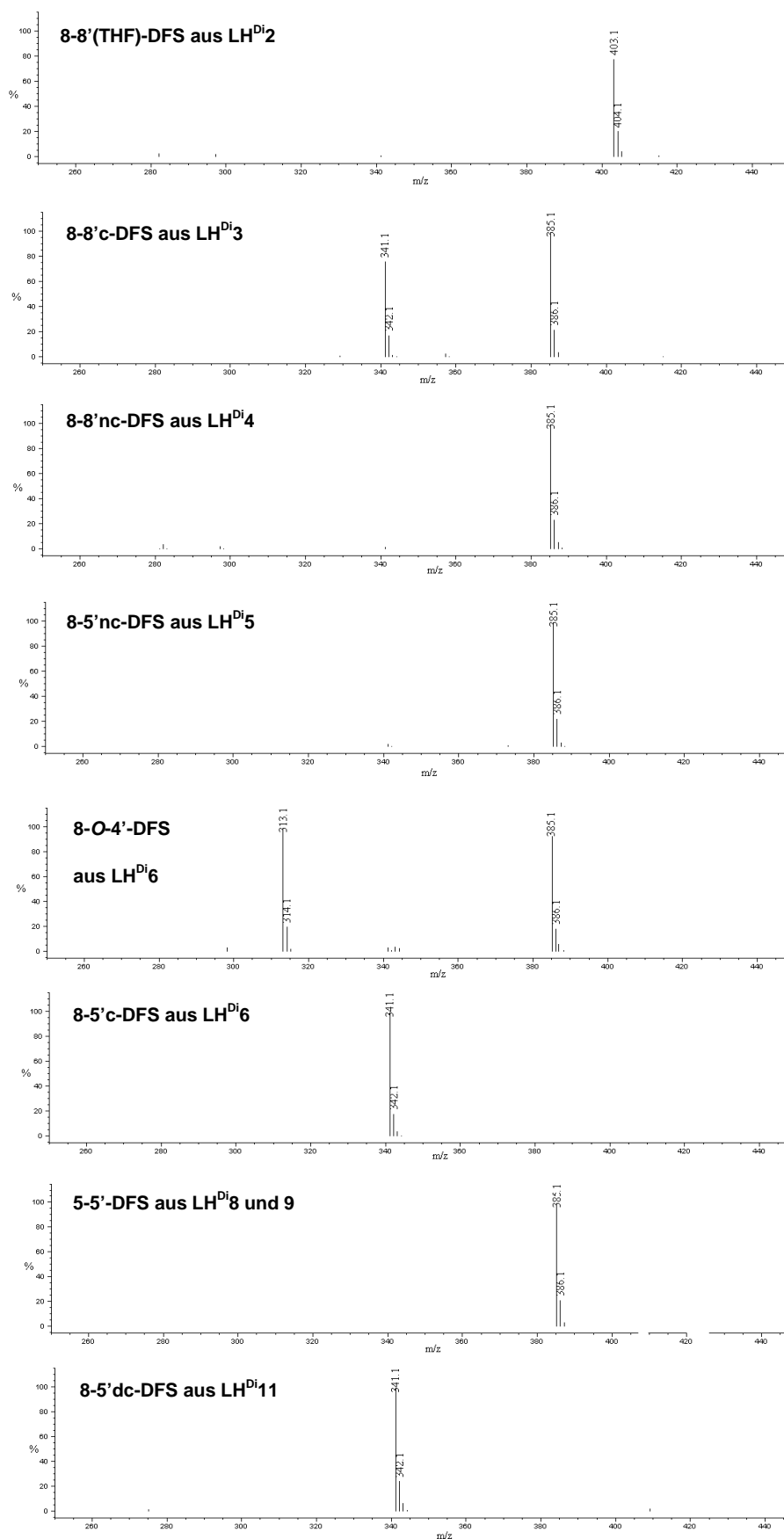


Abb. 5.26: LC-ESI-Massenspektren (negativer Modus) der aus den Sephadex LH-20 Dimeren-Fractionen identifizierten Diferulasäuren (DFS) (c = cyclisch, nc = nicht cyclisch, THF = Tetrahydrofuranform, dc = decarboxyliert)

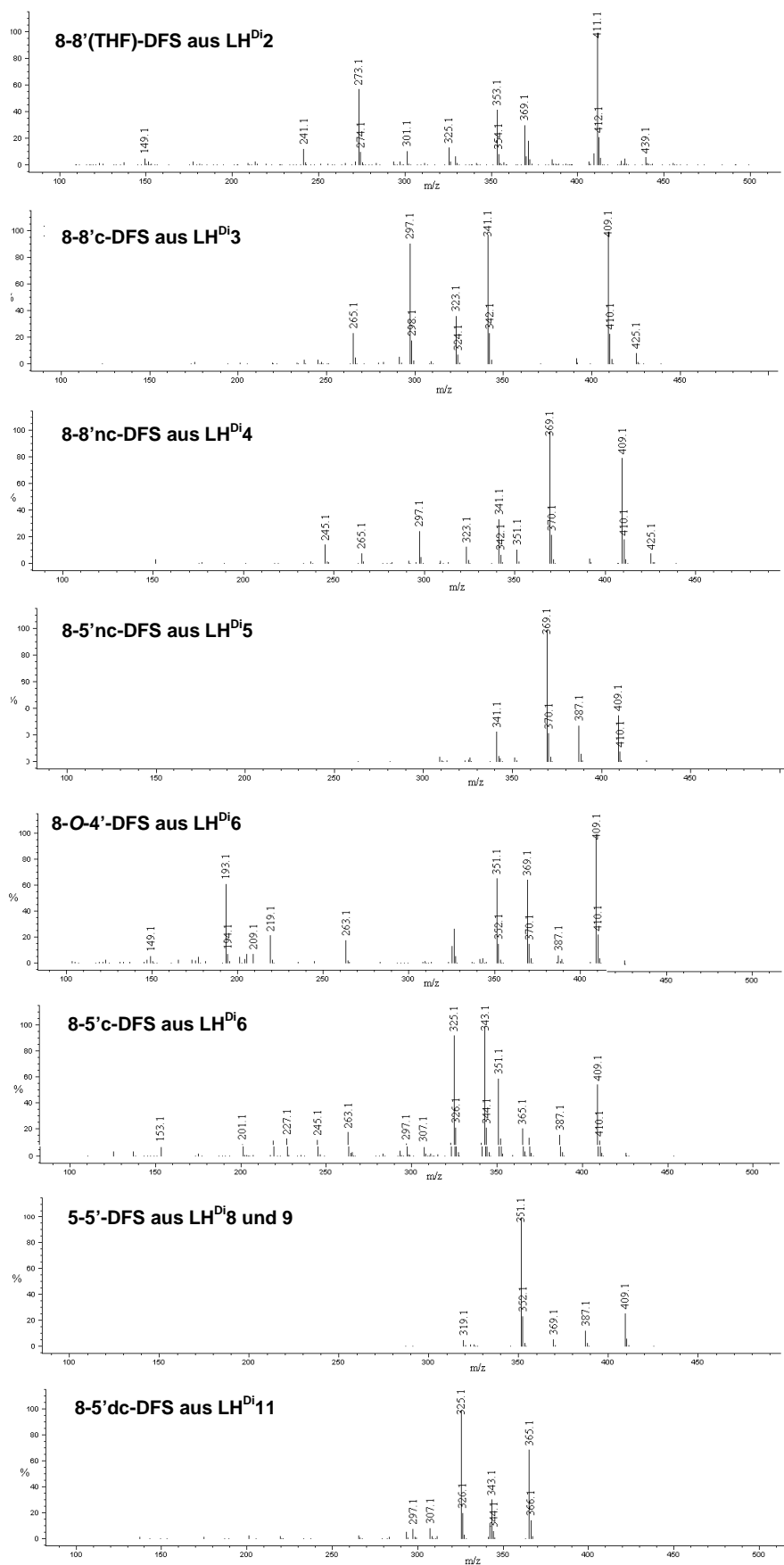


Abb. 5.27: LC-ESI-Massenspektren (positiver Modus) der aus den Sephadex LH-20 Dimeren-Fractionen identifizierten Diferulasäuren (DFS) (c = cyclisch, nc = nicht cyclisch, THF = Tetrahydrofuranform, dc = decarboxyliert)

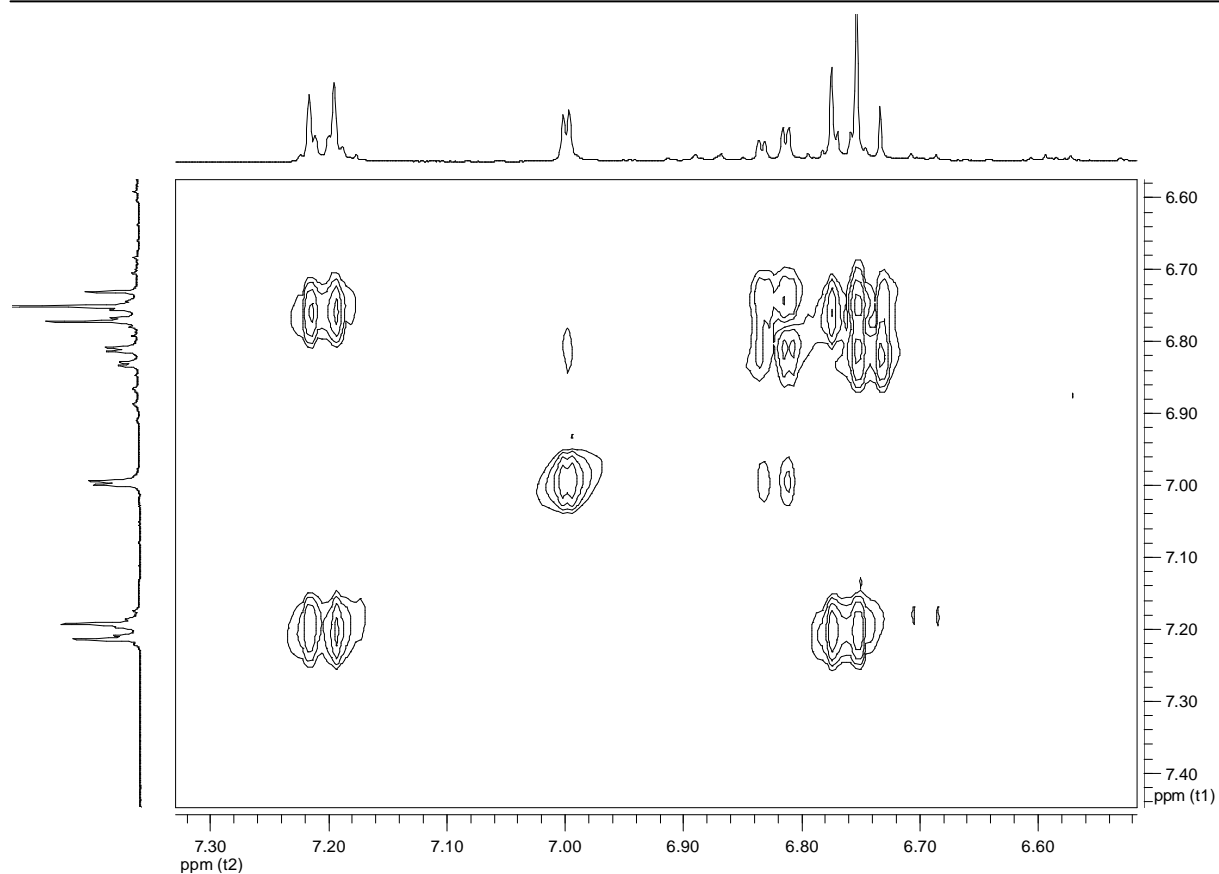


Abb. 5.28: Ausschnitt aus dem $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum des isolierten und identifizierten *p*-Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimers in Aceton- d_6

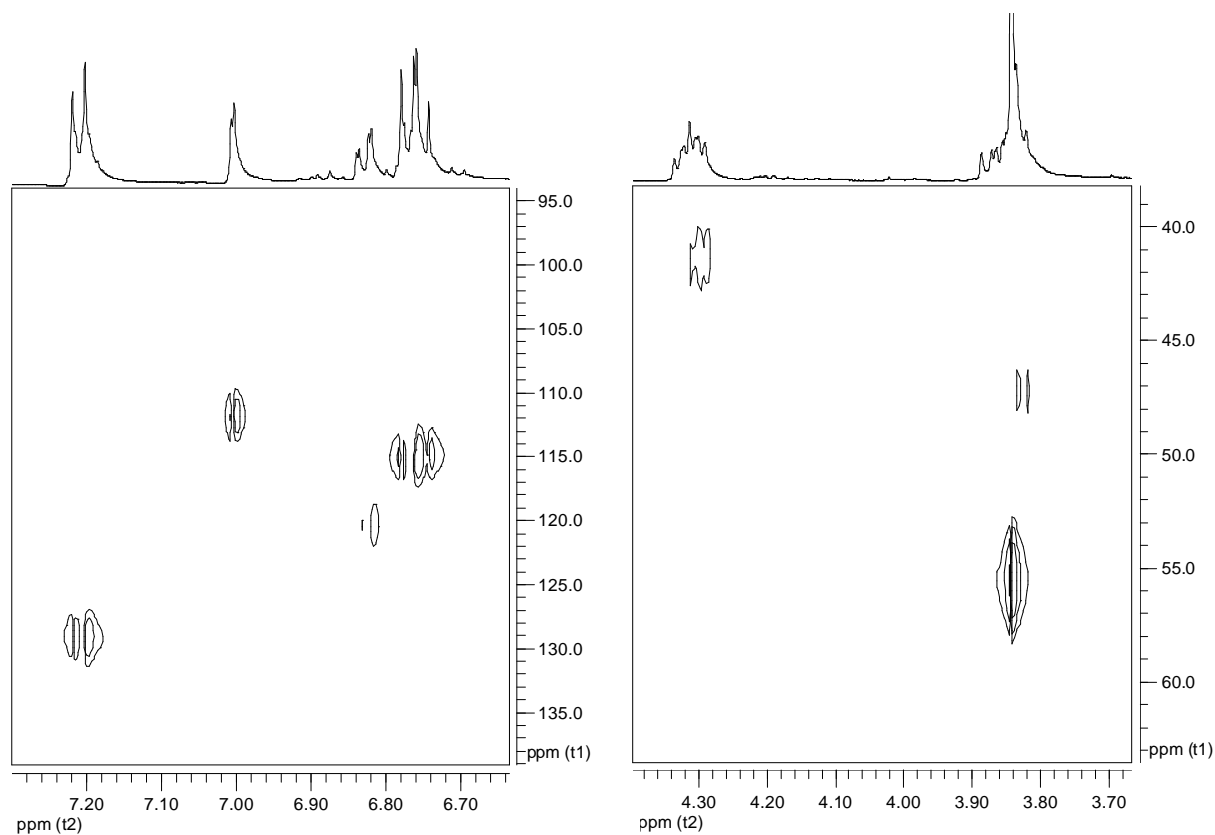


Abb. 5.29: Ausschnitte aus dem HMQC-Spektrum des isolierten und identifizierten *p*-Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimers in Aceton- d_6

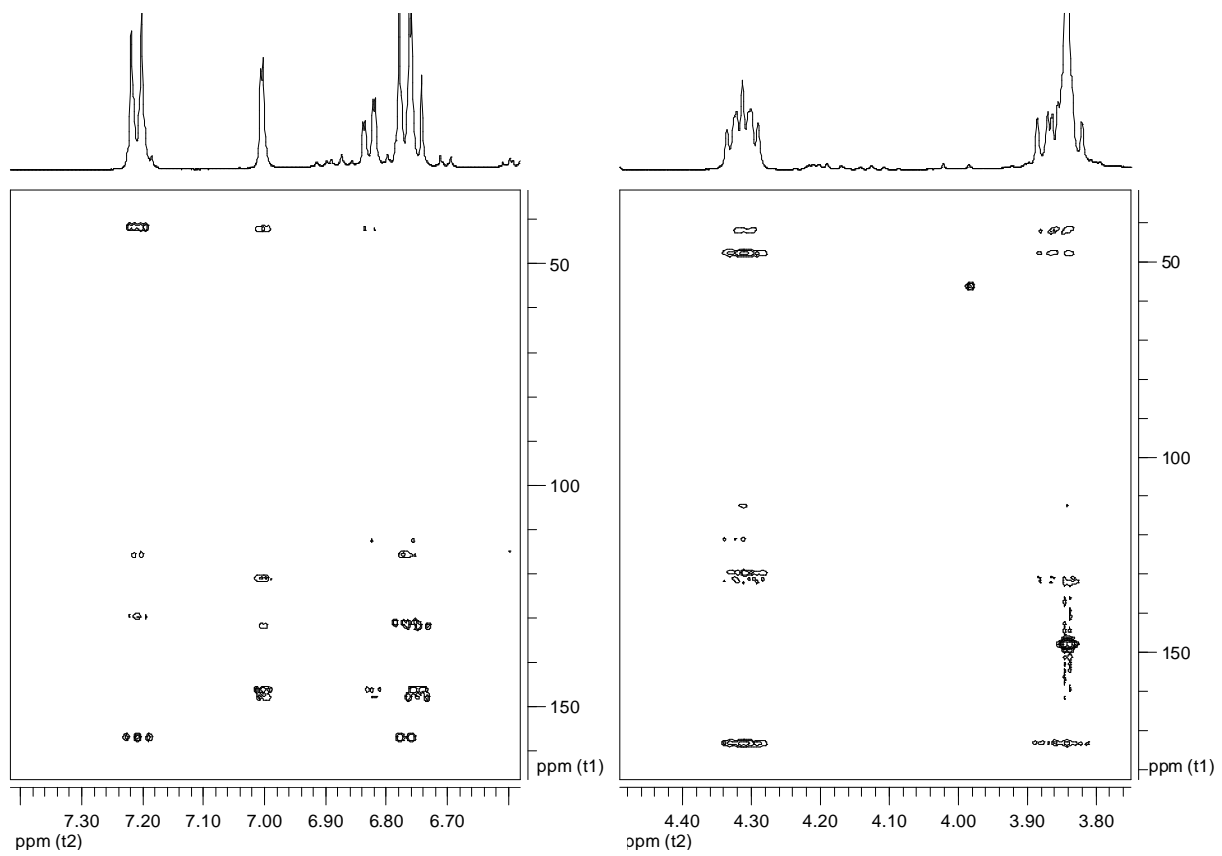


Abb. 5.30: Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum des isolierten und identifizierten *p*-Cumarsäure-Ferulasäure-Cyclobutandimers in Aceton- d_6

6 Literatur

ABEDON, B.G.; HATFIELD, R.D.; TRACY, W.F.: Cell wall composition in juvenile and adult leaves of maize (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3896-3900.

ADLER, E.: Lignin chemistry - past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **1977**, 11, 169-218.

AHMED, A.E.R.; LABAVITCH, J.M.: A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *J. Food Biochem.* **1977**, 1, 361-365.

ALBERSHEIM, P.; DEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A.: A method for the analysis of sugar in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **1967**, 5, 340-345.

ALLERDINGS, E.; RALPH, J.; STEINHART, H.; BUNZEL, M.: Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry* **2006**, 67, 1276-1286.

ALLERDINGS, E.: Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Komponenten in Maisballaststoffen und ihr Einfluss auf den mikrobiellen Abbau. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **2007**.

ÅMAN, P.: Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In: *Forage cell wall structure and digestibility*, JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J., Eds. ASA-CSSA-SSSA: Madison, **1993**; pp 183-199.

ANDREASEN, M.F.; CHRISTENSEN, L.P.; MEYER, A.S.; HANSEN, A.: Ferulic acid dehydrodimers in rye (*Secale cereale* L.). *J. Cereal Sci.* **2000**, 31, 303-307.

ANTOINE, C.; PEYRON, S.; LULLIEN-PELLERIN, V.; ABECASSIS, J.; ROUAU, X.: Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers. *J. Cereal Sci.* **2004**, 39, 387-393.

ARGILLIER, O.; BARRIÈRE, Y.; LILA, M.; JEANNETEAU, F.; GELINET, K.; MENANTEAU, V.: Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks. *Agronomie* **1996**, 16, 123-130.

BARBEROUSSE, H.; ROISEUX, O.; ROBERT, C.; PAQUOT, M.; DEROANNE, C.; BLECKER, C.: Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, 88, 1494-1511.

BÄRLOCHER, F.: Biostatistik. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1999**; pp 17-18.

BARRIÈRE, Y.; ARGILLIER, O.: Brown-midrib genes of maize: a review. *Agronomie (Paris)* **1993**, 13, 865-876.

BARRIÈRE, Y.; GUILLET, C.; GOFFNER, D.; PICHON, M.: Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. *Anim. Res.* **2003**, 52, 193-228.

BARRIÈRE, Y.: Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *C.R. Biologies* **2004**, 327, 847-860.

BEAUGRAND, J.; CRONIER, D.; THIEBEAU, P.; SCHREIBER, L.; DEBEIRE, P.; CHABBERT, B.: Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7108-7117.

BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S.: Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* **1967**, 5, 433-440.

BLAKENEY, A.B.; HARRIS, P.J.; HENRY, R.J.; STONE, B.A.: A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* **1983**, 113, 291-299.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **1973**, 54, 484-489.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M.: Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, 54, 519-546.

BORNEMANN, W.S.; HARTLEY, R.D.; HIMMELSBACH, D.S.; LJUNGDAHL, L.G.: Assay for trans-*p*-coumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. *Anal. Biochem.* **1990**, 190, 129-133.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; MARITA, J.; STEINHART, H.: Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3166-3169.

BUNZEL, M.: Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **2001**.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R.D.; STEINHART, H.: Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81, 653-660.

BUNZEL, M.; ALLERDINGS, E.; SINNWELL, V.; RALPH, J.; STEINHART, H.: Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. *Eur. Food Res. Technol.* **2002a**, 214, 482-488.

BUNZEL, M.; STEINHART, H.; RALPH, J.: Strukturbildende phenolische Verbindungen in Getreideballaststoffen am Beispiel löslicher und unlöslicher Roggenballaststoffe. *Getreide, Mehl und Brot* **2002b**, 56, 281-286.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; FUNK, C.; STEINHART, H.: Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* **2003a**, 217, 128-133.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; KIM, H.; LU, F.; RALPH, S.A.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R.D.; STEINHART, H.: Sinapate dehydrodimers and sinapate-ferulate heterodimers in cereal dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, 51, 1427-1434.

BUNZEL, M.; STEINHART, H.: Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten. *Chem. Unserer Zeit* **2003**, 37, 188-196.

BUNZEL, M.; FUNK, C.; STEINHART, H.: Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *J. Sep. Sci.* **2004a**, 27, 1080-1086.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; LU, F.; HATFIELD, R.D.; STEINHART, H.: Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* **2004b**, 52, 6496-6502.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; STEINHART, H.: Phenolic compounds as cross-links of plant derived polysaccharides. *Czech J. Food Sci.* **2004c**, 22, 64-67.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; FUNK, C.; STEINHART, H.: Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* **2005a**, 46, 5845-5850.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; STEINHART, H.: Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005b**, 49, 551-559.

BUNZEL, M.; SEILER, A.; STEINHART, H.: Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* **2005c**, 53, 9553-9559.

BUNZEL, M.; RALPH, J.; BRÜNING, P.; STEINHART, H.: Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6409-6418.

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.* **2008**, 47, 29-40.

BUXTON, D.R.; RUSSELL, J.R.; WEDIN, W.F.: Structural neutral sugars in legume and grass stems in relation to digestibility. *Crop Sci.* **1987**, 27, 1279-1285.

BUXTON, D.R.; RUSSELL, J.R.: Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.* **1988**, 28, 553-558.

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.; ANDERSON, J.W., Eds. Plenum Press: New York, **1990**; pp 15-30.

CARPITA, N.C.; MCCANN, M.C.: The cell wall. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*, BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L., Eds. American Society of Plant Physiologists: Waldorf, MD, USA, **2000**; pp 52-108.

CARPITA, N.C.; DEFERNEZ, M.; FINDLAY, K.; WELLS, B.; SHOUE, D.A.; CATCHPOLE, G.; WILSON, R.H.; MCCANN, M.C.: Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol.* **2001**, 127, 551-565.

CASLER, M.D.; JUNG, H.G.: Selection and evaluation of smooth bromegrass clones with divergent lignin and etherified ferulic acid concentration. *Crop Science* **1999**, 39, 1866-1873.

CCRC. CCRC Spectral database - PMAA. <http://www.ccrc.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html> (21.10.2008).

CHABANNES, M.; BARAKATE, A.; LAPIERRE, C.; MARITA, J.M.; RALPH, J.; PEAN, M.; DANOUN, S.; HALPIN, C.; GRIMA-PETTENATIA, J.; BOUDET, A.-M.: Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J.* **2001**, 28, 257-270.

CHEN, S.-F.; MOWERY, R.A.; SCARLATA, J.; CHAMBLISS, C.K.: Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 5912-5918.

CHERNEY, J.H.; ANLIKER, K.S.; ALBRECHT, K.A.; WOOD, K.V.: Soluble phenolic monomers in forage crops. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, 345-350.

CIUCANU, I.; KEREK, F.: A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1984**, 131, 209-217.

CYRAN, M.R.; SAULNIER, L.: Cell wall fractions isolated from outer layers of rye grain by sequential treatment with alpha-amylase and proteinase: Structural investigation of polymers in two ryes with contrasting breadmaking quality. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9213-9224.

DE BOEVER, J.L.; VANACKER, J.M.; DE BRABANDER, D.L.: Rumen degradation characteristics of nutrients in maize silages and evaluation of laboratory measurements and NIRS as predictors. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2002**, 101, 73-86.

DEINUM, B.; STRUIK, P.C.: Genetic variation in digestibility of forage maize (*Zea mays* L.) and its estimation by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). An analysis. *Euphytica* **1989**, 42, 89-98.

DEWHURST, R.J.; HEPPEL, D.; WEBSTER, A.J.F.: Comparison of *in sacco* and *in vitro* techniques for estimating the rate and extent of rumen fermentation of a range of dietary ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1995**, 51, 211-229.

DIXON, R.A.; CHEN, F.; GUO, D.; PARVATHI, K.: The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **2001**, 57, 1069-1084.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350-356.

DWD. Klimadaten Deutschland - Monatswerte Wetterstation Nr. 10870 München/Flughafen (Freising). Deutscher Wetterdienst 2008 (06.11.2008).

ETTLE, T.; LEBZIEN, P.; FLACHOWSKY, G.; SCHWARZ, F.J.: Effect of harvest date and variety on ruminal degradability of ensiled maize grains in dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.* **2001**, 55, 69-84.

FAULDS, C.B.; KROON, P.A.; SAULNIER, L.; THIBAUT, J.F.; WILLIAMSON, G.: Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. *Carbohydr. Polym.* **1995**, 27, 187-190.

FAULDS, C.B.; WILLIAMSON, G.: The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 393-395.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; HEIZMANN, A.; PRZYKLENK, M.: Trifluoressigsäure zur schnellen und schonenden Hydrolyse von Cellulose und anderen Polysacchariden. *Holzforschung* **1977**, 31, 65-71.

FLACHOWSKY, G.; PEYKER, W.; SCHNEIDER, A.; HENKEL, K.: Fibre analyses and *in sacco* degradability of plant fractions of two varieties harvested at various times. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1993**, 43, 41-50.

FLAßHOFF, F.: Zum Einfluss von Genotyp und physiologischer Reife auf den Futterwert von Mais, dargestellt anhand der ruminalen Abbaubarkeit und der enzymlöslichen organischen Substanz der Restpflanze. Diplomarbeit, TU München, Freising-Weihenstephan, **2005**.

FORD, C.W.; HARTLEY, R.D.: GC/MS characterisation of cyclodimers from *p*-coumaric and ferulic acids by photodimerisation - a possible factor influencing cell wall biodegradability. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, 46, 301-310.

FORD, C.W.; HARTLEY, R.D.: Cyclodimers of *p*-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, 50, 29-43.

FOSTER, J.J.: Data analysis using SPSS for Windows. SAGE Publications Inc.: Thousand Oaks, CA, **1998**.

FRIEBOLIN, H.: Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **1998**.

FRY, S.C.; WILLIS, S.C.; PATERSON, A.E.J.: Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta* **2000**, 211, 679-692.

FUKUSHIMA, R.S.; HATFIELD, R.D.: Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3133-3139.

FUKUSHIMA, R.S.; HATFIELD, R.D.: Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3713-3720.

FUNK, C.; RALPH, J.; STEINHART, H.; BUNZEL, M.: Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry* **2005**, 66, 363-371.

GEISSMANN, T.; NEUKOM, H.: Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxydative phenolische Kupplung. *Helv. Chim. Acta* **1971**, 54, 1108-1112.

GEORGE, D.; MALLERY, P.: SPSS for Windows step by step. Allyn & Bacon: Needham Heights, MS, **1999**; pp 1-357.

GIBEAUT, D.M.; CARPITA, N.C.: Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* **1994**, 8, 904-915.

GLITSØ, L.V.; GRUPPEN, H.; SCHOLS, H.A.; HOJSGAARD, S.; SANDSTROM, B.; KNUDSEN, K.E.B.: Degradation of rye arabinoxylans in the large intestine of pigs. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 961-969.

GLITSØ, L.V.; JENSEN, B.B.; KNUDSEN, K.E.B.: *In vitro* fermentation of rye carbohydrates including arabinoxylans of different structure. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1211-1218.

GOTO, M.; MATSUOKA, J.; SATO, T.; EHARA, H.; MORITA, O.: Brown midrib mutant maize with reduced levels of phenolic acids ether-linked to the cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1994**, 48, 27-38.

GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; ZON, J.; AMRHEIN, N.: Ferulate cross-linking in cell-walls isolated from maize cell-suspensions. *Phytochemistry* **1995**, 40, 1077-1082.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D.; QUIDEAU, S.: *p*-Hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2530-2532.

GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J.: Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* **1998a**, 77, 193-200.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D.: Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *J. Agric. Food Chem.* **1998b**, 46, 2609-2614.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D.: Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 6106-6113.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D.: Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: Implications for lignification in grasses. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6008-6016.

GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J.: Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4984-4989.

GRABBER, J.H.; RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y.: Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall interactions. *C.R. Biologies* **2004**, 327, 455-465.

GRABBER, J.H.: How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci.* **2005**, 45, 820-831.

HAKOMORI, S.: A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* **1964**, 55, 205-208.

HARTLEY, R.D.; MORRISON, W.H.; BALZA, F.; TOWERS, G.H.N.: Substituted truxillic and truxinic acids in cell walls of cynodon dactylon. *Phytochemistry* **1990a**, 29, 3699-3703.

HARTLEY, R.D.; MORRISON, W.H.; HIMMELSBACH, D.S.; BORNEMAN, W.S.: Cross-linking of cell-wall phenolic arabinoxylans in gramineous plants. *Phytochemistry* **1990b**, 29, 3705-3709.

HATFIELD, R.D.; JUNG, H.-J.G.; RALPH, J.; BUXTON, D.R.; WEIMER, P.J.: A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, 65, 51-58.

HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J.H.: Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Sci.* **1999**, 39, 27-37.

HATFIELD, R.D.; FUKUSHIMA, R.S.: Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* **2005**, 45, 832-839.

HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J.H.: A potential role for sinapyl *p*-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation. *Planta* **2008**, 228.

HEIMS, H.: Bestimmung der Struktur der wasserunlöslichen Nahrungsfaser aus Getreide. Doktorarbeit, Universität Hamburg, Hamburg, **1990**.

HENNEBERG, W.; STOHMANN, F.: Über das Erhaltungsfutter volljährigen Rindviehs. *J. Landwirtschaft.* **1859**, 3, 485-551.

HEREDIA, A.; JIMENEZ, A.; GUILLEN, R.: Composition of plant-cell walls. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, 200, 24-31.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme Verlag: Stuttgart, New York, **2005**; 7.Auflage.

HOLTMAN, K.M.; CHANG, H.-M.; JAMEEL, H.; KADLA, J.F.: Elucidation of lignin structure through degradative methods: Comparison of modified DFRC and thioacidolysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 3535-3540.

HÖNER, K.: Einfluss von Silagen aus unterschiedlichen Maishybriden auf die Umsetzungen im Verdauungstrakt von Milchkühen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, **2001**.

HÖNER, K.; LEBZIEN, P.; ETTLE, T.; SCHWARZ, F.-J.; FLACHOWSKY, G.: Einfluss von Silagen aus unterschiedlichen Maishybriden auf die Umsetzungen im Verdauungstrakt von Kühen. *Lanbauforsch. Völkenrode* **2002**, 52, 149-156.

HUHTANEN, P.; NOUSIAINEN, J.; RINNE, M.: Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* **2006**, 15, 293-323.

HUNTINGTON, J.A.; GIVENS, D.I.: The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)* **1995**, 65, 63-81.

IYAMA, K.; LAM, T.B.T.; STONE, B.A.: Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* **1990**, 29, 733-737.

ISHII, T.: Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* **1997**, 127, 111-127.

ISOGAI, A.; ISHIZU, A.; NAKANO, J.; EDA, S.; KATO, K.: A new facile methylation method for cell-wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **1985**, 138, 99-108.

IZYDORCZYK, M.S.; BILIADERIS, C.G.: Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **1995**, 28, 33-48.

JACQUET, G.; POLLET, B.; LAPIERRE, C.; MHAMDI, F.; ROLANDO, C.: New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2746-2751.

JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; LIEGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J., A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. In *Chem. Commun.*, Stockholm, 1976; pp 1-74.

JARAMILLO, S.; RODRIGUEZ, R.; JIMENEZ, A.; GUILLEN, R.; FERNANDEZ-BOLANOS, J.; HEREDIA, A.: Effects of storage conditions on the accumulation of ferulic acid derivatives in white asparagus cell walls. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, 82, 286-296.

- JOSELEAU, J.P.; RUEL, K.: Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes - An investigation by Fourier transform infrared cross-polarization magic angle spinning C-13-nuclear magnetic resonance spectroscopy and immunocytochemical transmission electron microscopy. *Plant Physiology* **1997**, 114, 1123-1133.
- JUNG, H.G.; CASLER, M.D.: Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth bromegrass fibre. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1991**, 32, 63-68.
- JUNG, H.G.; VOGEL, K.P.: Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 59, 169-176.
- JUNG, H.G.; DEETZ, D.A.: Cell wall lignification and degradability. In: *Forage cell wall structure and digestibility*, JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J., Eds. ASA-CSSA-SSSA: Madison, **1993**; pp 315-346.
- JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.: Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and *in-vitro* degradability for stem internodes *J. Sci. Food Agr.* **1994**, 66, 313-322.
- JUNG, H.G.; SMITH, R.R.; ENDRES, C.S.: Cell wall composition and degradability of stem tissue from lucerne divergently selected for lignin and in vitro dry-matter disappearance. *Grass and Forage Sci.* **1994**, 49, 295-304.
- JUNG, H.G.: Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. *J. Nutr.* **1997**, 127, 810-813.
- JUNG, H.G.; MERTENS, D.R.; BUXTON, D.R.: Forage quality variation among maize inbreds: *In vitro* fiber digestion kinetics and prediction with NIRS. *Crop Science* **1998**, 38, 205-210.
- JUNG, H.G.; NI, W.; CHAPPLE, C.C.S.; MEYER, K.: Impact of lignin composition on cell-wall degradability in an *Arabidopsis* mutant. *J. Sci. Food Agr.* **1999**, 79, 922-928.
- JUNG, H.G.; JORGENSEN, M.A.; LINN, J.G.; ENGELS, F.M.: Impact of accessibility and chemical composition on cell wall polysaccharide degradability of maize and lucerne stems. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 419-427.
- JUNG, H.G.: Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochemistry* **2003**, 63, 543-549.
- JUNG, H.G.; SHEAFFER, C.C.: Influence of Bt transgenes on cell wall lignification and digestibility of maize stover for silage. *Crop Sci.* **2004**, 44, 1781-1789.
- JUNG, H.G.; CASLER, M.D.: Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. *Crop Sci.* **2006a**, 46, 1793-1800

JUNG, H.G.; CASLER, M.D.: Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability. *Crop Sci.* **2006b**, 46, 1801-1809.

KINTNER, P.K.I.; VAN BUREN, J.P.: Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. *J. Food Sci.* **1982**, 47, 756-759.

KIRCHGESSNER, M.: Tierernährung. DLG-Verlag: Frankfurt am Main, **1997**.

KIWITT-HASCHEMIE, K.: Hydrokolloide - Beitrag zur strukturellen Charakterisierung von Nichtstärke-Polysacchariden und ihrem Nachweis in Lebensmitteln. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **1994**.

KROON, P.A.; WILLIAMSON, G.: Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 355-361.

KRUSE, S.: Charakterisierung und Modellierung des Abreifeverhaltens von Silomaisgenotypen mittels futterwertbestimmender Parameter. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, **2006**.

KRUSE, S.; HERRMANN, A.; KORNER, A.; TAUBE, F.: Genotypic and environmental variation in water soluble carbohydrate content of silage maize. *Field Crops Res.* **2008**, 106, 191-202.

LAM, T.B.T.; IYAMA, K.; STONE, B.A.: Determination of etherified hydroxycinnamic acids in cell-walls of grasses. *Phytochemistry* **1994**, 36, 773-775.

LAM, T.B.T.; IYAMA, K.; STONE, B.A.: Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. *Phytochemistry* **2003**, 64, 603-607.

LAPIERRE, C.; TOLLIER, M.T.; MONTIES, B.: A new type of constitutive unit in lignins from the corn *bm3* mutant. *C. R. Acad. Sci., Ser. 3* **1988**, 307, 723-728.

LAPIERRE, C.: Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: *Forage cell wall structure and digestibility*, JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J., Eds. ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, **1993**; pp 133-166.

LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E.: Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, 41, 455-496.

LINDBERG, B.: Methylation analysis of polysaccharides. In: *Methods in Enzymology*, GINSBURG, V., Ed. Academic Press: New York, London, **1972**; 28, pp 178-195.

LU, F.; RALPH, J.: Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. *J. Agric. Food Chem.* **1997a**, 45, 2590-2592.

LU, F.; RALPH, J.: The DFRC method for lignin analysis. Part 1. A new method for β -aryl ether cleavage: lignin model studies. *J. Agric. Food Chem.* **1997b**, 45, 4655-4660.

LU, F.; RALPH, J.: Efficient ether cleavage in lignins: the derivatization followed by reductive cleavage procedure as a basis for new analytical methods. In: *Lignin and lignan biosynthesis*, LEWIS, N.G.; SARKANEN, S., Eds. American Chemical Society: Washington, DC, **1998a**; pp 294-322.

LU, F.; RALPH, J.: The DFRC method for lignin analysis. Part 2. Monomers from isolated lignins. *J. Agric. Food Chem.* **1998b**, 46, 547-552.

LU, F.; RALPH, J.: Detection and determination of p-coumaroylated units in lignins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1988-1992.

LU, F.; RALPH, J.: Applications of the "DFRC" method. Grenoble workshop on advanced methods for lignocellulosics and paper products characterization: Post-symposium workshop of the 11th international symposium on wood and pulping chemistry, Grenoble, France, CERMAV, Grenoble, France, June 18-19, **2001**; pp 107-114.

LUNDEVALL, J.P.; BUXTON, D.R.; HALLAUER, A.R.; GEORGE, J.R.: Forage quality variation among maize inbreds: *in vitro* digestibility and cell-wall components. *Crop Sci.* **1994**, 34, 1672-1678.

MADSEN, J.; HVELPLUND, T.: Prediction of *in situ* protein degradability in the rumen. Results of an european ringtest. *Livestock Prod. Sci.* **1994**, 39, 201-212.

MARITA, J.M.; VERMERRIS, W.; RALPH, J.; HATFIELD, R.D.: Variations in the cell wall composition of maize brown midrib mutants. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1313-1321.

MARKWALDER, H.U.; NEUKOM, H.: Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* **1976**, 15, 836-837.

MCALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A.; CHENG, K.J.: Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* **1994**, 72, 3004-3018.

MCALLISTER, T.A.; CHENG, K.J.: Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1996**, 62, 29-36.

MCDUGALL, G.J.; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; HILLMAN, J.R.: Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, 70, 133-150.

MCSWEENEY, C.S.; DULIEU, A.; BRUNCH, R.: *Butyrivibrio* spp. and other xylanatic microorganisms from the rumen have cinnamoyl esterase activity. *Anaerobe* **1998**, 4, 57-65.

MÉCHIN, V.; ARGILLIER, O.; MENANTEAU, V.; BARRIÈRE, Y.; MILA, I.; POLLET, B.; LAPIERRE, C.: Relationship of cell wall composition to *in vitro* cell wall digestibility of maize inbred line stems. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 574-580.

MÉCHIN, V.; ARGILLIER, O.; YANNICK, H.; EMMANUELLE, G.; LAURENCE, M.; CHARCOSSET, A.; BARRIÈRE, Y.: Genetic analysis and QTL mapping of cell wall digestibility and lignification in silage maize. *Crop Sci.* **2001**, 41, 690-697.

MÉCHIN, V.; ARGILLIER, O.; ROCHER, F.; HÉBERT, Y.; MILA, I.; POLLET, B.; BARRIÈRE, Y.; LAPIERRE, C.: In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 5872-5881.

MIGNE, C.; PRENSIER, G.; CORNU, A.; GRENET, E.: Immunocytochemical localization of arabinoxylans in the cell wall of maize apical internode after microbial degradation in the rumen. *Biol Cell* **1996**, 88, 137-144.

MONTIES, B.L.: Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites - Relations with lignin structure and function. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1991**, 32, 159-175.

MOORE, K.J.; HATFIELD, R.D.: Carbohydrates and forage quality. In: *Forage quality, evaluation, and utilization*, FAHEY, G.C.J.; COLLINS, M.; MERTENS, D.R.; MOSER, L.E., Eds. American Society of Agronomy: Madison, WI, **1994**; pp 229-280.

MORRISON, T.A.; JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.: Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Sci.* **1998**, 38, 455-460.

MOSER, L.E.: Quality of forage as affected by post-harvest storage and processing. In: *Crop quality, storage, and utilization*, HOVELAND, C.S., Ed. ASA: Madison, WI, **1980**; pp 227-260.

NUNES, F.M.; 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.* **2001**, 49, 1773-1782.

O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R.: Methylation analysis of cell-wall material from parenchymatous tissues of *phaseolus vulgaris* and *phaseolus coccineus*. *Carbohydr. Res.* **1980**, 79, 115-124.

OBEL, N.; PORCHIA, A.C.; SCHELLER, H.V.: Intracellular feruloylation of arabinoxylan in wheat: evidence for feruloyl-glucose as precursor. *Planta* **2003**, 216, 620-629.

PACKERT, M.: Analytik und Bedeutung gebundener aromatischer Carbonsäuren der Nahrungsfaser aus Getreide und anderen Nutzpflanzen. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **1993**.

PIBER, M.; KOEHLER, P.: Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 5276-5284.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I.; LEE, S.C.: Determination of soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. AOAC Int.* **1994**, 77, 690-694.

PROVAN, G.J.; SCOBIE, L.; CHESSON, A.: Determination of phenolic-acids in plant-cell walls by microwave digestion. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, 64, 63-65.

QUIDEAU, S.; RALPH, J.: Lignin-ferulate cross-links in grasses. Part 4. Incorporation of 5–5-coupled dehydrodiferulate into synthetic lignin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2351-2358.

RALPH, J.; HELM, R.F.; QUIDEAU, S.: Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 2. Model compound syntheses. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992a**, 2971-2980.

RALPH, J.; HELM, R.F.; QUIDEAU, S.; HATFIELD, R.D.: Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992b**, 2961-2969.

RALPH, J.; HATFIELD, R.D.; QUIDEAU, S.; HELM, R.F.; GRABBER, J.H.; JUNG, H.G.: Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1994a**, 116, 9448-9456.

RALPH, J.; QUIDEAU, S.; GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D.: Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994b**, 3485-3498.

RALPH, J.; GRABBER, J.H.; HATFIELD, R.D.: Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* **1995**, 275, 167-178.

RALPH, J.; HATFIELD, R.D.; GRABBER, J.H.; JUNG, H.G.; QUIDEAU, S.; HELM, R.F.: Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: *Lignin and lignan biosynthesis*, LEWIS, N.G.; SARKANEN, S., Eds. American Chemical Society: Washington, DC, **1998**; ACS Symposium Series, No 697, pp 209-236.

RALPH, J.; BUNZEL, M.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R.D.; LU, F.; KIM, H.; GRABBER, J.H.; RALPH, S.A.; JIMENEZ-MONTEON, G.; STEINHART, H.: Diferulates analysis: new diferulates and disinapates in insoluble cereal fibre. *Polyphénols Actualités* **2000**, 13-17.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; MARITA, J.; KIM, H.; LU, F.; HATFIELD, R.D.; RALPH, S.A.; CHAPPELLE, C.; FRANKE, R.; HEMM, M.R.; VAN DOORSSELAERE, J.; SEDEROFF, R.R.; O'MALLEY, D.M.; SCOTT, J.T.; MACKAY, J.J.; YAHIAOUI, N.; BOUDET, A.-M.; PEAN, M.; PILATE, G.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W.: Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochem.* **2001**, 57, 993-1003.

RALPH, J.; BUNZEL, M.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R.D.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P.F.; GRABBER, J.H.; STEINHART, H.: Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* **2004a**, 3, 79-96.

RALPH, J.; GUILLAUMIE, S.; GRABBER, J.H.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y.: Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Towards a forage grass ideotype. *C.R. Biologies* **2004b**, 327, 467-479.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P.F.; MARITA, J.M.; HATFIELD, R.D.; RALPH, S.A.; CHRISTENSEN, J.H.; BOERJAN, W.: Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* **2004c**, 3, 29-60.

RALPH, S.A.; LANDUCCI, L.L.; RALPH, J.: NMR database of lignin and cell wall model compounds. USDA DFRC 2004d www.dfrc.ars.usda.gov/software.html (25.04.2007).

RENGER, A.: Phenolische Carbonsäuren als Cross-Links in unlöslicher Getreidenahrungsfaser unter besonderer Berücksichtigung von technologischen Prozessen. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **1999**.

RENGER, A.; STEINHART, H.: Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, 211, 422-428.

RIBOULET, C.; LEFÈVRE, B.; DÉNOUE, D.; BARRIÈRE, Y.: Genetic variation in maize cell wall for lignin content, lignin structure, *p*-hydroxycinnamic acid content, and digestibility in set of 19 lines at silage harvest maturity. *Maydica* **2008**, 53, 11-19.

ROUAU, X.; CHEYNIER, V.; SURGET, A.; GLOUX, D.; BARRON, C.; MEUDEEC, E.; LOUIS-MONTERO, J.; CRITON, M.: A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* **2003**, 63, 899-903.

SAEMAN, J.F.; BUBL, L.J.; HARRIS, E.E.: Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Industr. Engin. Chem.* **1954**, 17, 35-37.

SANTIAGO, R.; BUTRÓN, A.; REID, L.M.; ARNASON, J.T.; SANDOYA, G.; SOUTO, X.C.; MALVAR, R.A.: Diferulate content of maize sheaths is associated with resistance to the mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 9140-9144.

SANTIAGO, R.; REID, L.M.; ARNASON, J.T.; ZHU, X.Y.; MARTINEZ, N.; MALVAR, R.A.: Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to *Giberella* stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 5186-5193.

SANTIAGO, R.; SANDOYA, G.; BUTRÓN, A.; BARROS, J.; MALVAR, R.A.: Changes in phenolic concentrations during recurrent selection for resistance to the mediterranean corn borer (*Sesamia nonagrioides* Lef.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8017-8022.

SARKANEN, K.V.; LUDWIG, C.H.: Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience: New York, **1971**.

SAULNIER, L.; VIGOUROUX, J.; THIBAULT, J.F.: Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydr. Res.* **1995**, 272, 241-253.

SAULNIER, L.; THIBAULT, J.F.: Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 396-402.

SCALBERT, A.; MONTIES, B.; ROLANDO, C.; SIERRA-ESCUADERO, A.: Formation of ether linkage between phenolic acids and *Gramineae* lignin: a possible mechanism involving quinone methides. *Holzforschung* **1986**, 40, 191-195.

SCHATZ, P.F.; RALPH, J.; LU, F.; GUZEI, I.A.; BUNZEL, M.: Synthesis and identification of 2,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-tetrahydrofuran-3,4-dicarboxylic acid, an unanticipated ferulate 8-8-coupling product acylating cereal plant cell walls. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2801-2806.

SETÄLÄ, H.; PAJUNEN, A.; RUMMAKKO, P.; SIPILÄ, J.; BRUNOW, G.: A novel type of spiro compound formed by oxidative cross coupling of methyl sinapate with a syringyl lignin model compound. A model system for the β -1 pathway in lignin biosynthesis. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 461-464.

SMITH, D.: The nonstructural carbohydrates. In: *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, BUTLER, G.W.; BAILEY, R.W., Eds. Academic Press: London and New York, **1973**; 1, pp 106-155.

SPANN, B.: Grundlagen der Fütterung. In: *Landwirtschaft - Band 2: Tierische Erzeugung*, SCHWAB, W.; ADAM, F., Eds. BLV Verlagsgesellschaft mbH - Landwirtschaftsverlag: München, **1999**; 11. Auflage, pp 46-54.

STATISTISCHES_BUNDESAMT; DEUTSCHLAND. Bodennutzung - Ackerland nach Hauptfruchtgruppen und Fruchtarten. 2008 <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/LandForstwirtschaft/Bodennutzung/Tabellen/Content75/AckerlandHauptfruchtgruppenFruchtarten,templateId=renderPrint.psm1> (12.09.2008).

SWEET, D.P.; SHAPIRO, R.H.; ALBERSHEIM, P.: Quantitative analysis by various G.L.C. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* **1975**, 40, 217-225.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L.-F.; TAKABE, H.: Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: *Forage cell wall structure and digestibility*, JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D., Eds. ASA-CSSA-SSSA: Madison, **1993**; pp 247-270.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E.: Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 330-336.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E.; AMAN, P.: Structure and components of dietary fiber. *Cereal Foods World* **1993**, 38, 135-138.

TOVAR-GÓMEZ, M.R.; EMILE, J.C.; MICHALET-DOREAU, B.; BARRIÈRE, Y.: *In situ* degradation kinetics of maize hybrid stalks. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1997**, 68, 77-88.

TUKEY, J.W.: Exploratory data analysis. Addison Wesley: **1977**; 1. Auflage.

TURNER, L.B.; MUELLER-HARVEY, I.; MC ALLAN, A.B.: Light-induced isomerization and dimerization of cinnamic acid-derivatives in cell-walls. *Phytochemistry* **1993**, 33, 791-796.

USDA. Corn Area, Yield, and Production <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx> (3/11/2008).

VAILHÉ, M.A.B.; PROVAN, G.J.; SCOBIE, L.; CHESSON, A.; MAILLOT, M.P.; CORNU, A.; BESLE, J.M.: Effect of phenolic structures on the degradability of cell walls isolated from newly extended apical internode of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 618-623.

VALENTIN, S.F.; WILLIAMS, P.E.V.; FORBES, J.M.; SAUVANT, D.: Comparison of the *in vitro* gas production technique and the nylon bag degradability technique to measure short- and long-term processes of degradation of maize silage in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1999**, 78, 81-99.

VAN SOEST, P.J.: Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass. Offic. Agr. Chem.* **1963**, 49, 829-835.

VDLUFA: Methodenbuch, Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln; VDLUFA-Verlag: Bonn, **2004**.

WALDRON, K.W.; PARR, A.J.; NG, A.; RALPH, J.: Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem. Anal.* **1996**, 7, 305-312.

WARD, G.; HADAR, Y.; BILKIS, I.; KONSTANTINOVSKY, L.; DOSORETZ, C.G.: Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 18734-18741.

WEIMER, P.J.: Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* **1996**, 79, 1496-1502.

WEIMER, P.J.; HACKNEY, J.M.; JUNG, H.G.; HATFIELD, R.D.: Fermentation of a bacterial cellulose/xylan composite by mixed ruminal microflora: implications for the role of polysaccharide matrix interactions in plant cell wall biodegradability. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1727-1733.

WILLIS, R.B.; MONTGOMERY, M.E.; ALLEN, P.R.: Improved method for manual, colorimetric determination of total kjeldahl nitrogen using salicylate. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1804-1807.

YAMAMOTO, H.; HOSHINO, T.; UCHIYAMA, T.: Convenient preparation and quantification of 5,5'-diferulic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 390-394.

ZELLER, F.: Zum Einfluss von Genotyp und physiologischer Reife von Mais auf die chemische Zusammensetzung und Abbaubarkeit der Restpflanze vor und nach ruminaler Inkubation. Dissertation, TU München, Freising-Weihenstephan, **2008**.

Publikationen

Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen

DOBBERSTEIN, D., STEINHART, H., BUNZEL, M.: Bestimmung mono-, di- und trimerer Phenolcarbonsäuren pflanzlicher Herkunft, Regionaltagung Nord/Nord-Ost der lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, Oldenburg 2006.

DOBBERSTEIN, D., STEINHART, H., BUNZEL, M.: Von der Holzfaser zur differenzierten Erfassung pflanzlicher Gerüstsubstanzen – Chemische Charakterisierung pflanzlicher Gerüstsubstanzen, 119. VDLUFA-Kongress, Göttingen 2007.

DOBBERSTEIN, D., ZELLER, F., SCHWARZ, F.J., STEINHART, H., BUNZEL, M.: Hydroxycinnamic acids and lignin in maize stem cell walls of varying maturity, variety and cultivation year - Impact on cell wall degradability, Ferulate '08, An international conference on hydroxycinnamates and related plant phenolics, Minneapolis/St. Paul, USA, August 2008.

Poster auf wissenschaftlichen Tagungen

DOBBERSTEIN, D., BUNZEL, M., FLAßHOFF, F., SCHWARZ, F.J., STEINHART, H.: Zellwandzusammensetzung der Maisrestpflanze – mögliche Indikatoren für die Futtermittelabbaubarkeit. 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden 2006.

DOBBERSTEIN, D., FLAßHOFF, F., SCHWARZ, F.J., STEINHART, H., BUNZEL, M.: Einfluss von Lignin, Hydroxizimtsäuren und der Kohlenhydratzusammensetzung auf die Futtermittelverdaubarkeit von Maisrestpflanzen. 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg-Erlangen 2007.

FLAßHOFF, F., DOBBERSTEIN, D., BUNZEL, M., STEINHART, H., SCHWARZ, F.J.: Cell wall composition and ruminal degradability of maize stover, Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Göttingen 2007.

BUNZEL, M., DOBBERSTEIN, D., HEUERMAN, B., BRÜNING, P., FUNK, C., STEINHART, H., KIM, H., RALPH, J.: Ferulate trimers and tetramers in cereal grains, Euro Food Chem XIV, Paris 2007.

Beiträge in Tagungsbänden

BUNZEL, M., DOBBERSTEIN, D., HEUERMAN, B., BRÜNING, P., FUNK, C., STEINHART, H., KIM, H., RALPH, J.: Ferulate trimers and tetramers in cereal grains, In: Food quality, an issue of molecule based science, THIS, H., EKLUND, T. Eds., Proceedings of Euro Food Chem XIV, Paris 2007, 173 - 176.

DOBBERSTEIN, D., STEINHART, H., BUNZEL, M.: Von der Holzfaser zur differenzierten Erfassung pflanzlicher Gerüstsubstanzen – Chemische Charakterisierung pflanzlicher Gerüstsubstanzen, In: VDLUFA-Schriftenreihe zum 119. VDLUFA-Kongress, Göttingen 2007, Proc. Soc. Nutr. Physiol, 16 - 20.