# Chemische Charakterisierung von Klason-Ligninen aus unlöslichen Ballaststoffen

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**
**des Departments Chemie**
**der Universität Hamburg**

**aus dem**
**Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie**
**der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Gérard Tchetseubu Saha**
**aus Bamendjou**

**Hamburg 2010**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2006 bis März 2009 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart
2. Gutachter: Prof. Bernward Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2010

**Danksagungen**

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Betreuung und die Unterstützung meiner Arbeit bedanken.
Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Bisping dafür bedanken, dass er kurzfristig die Zweitbegutachtung meiner Doktorarbeit übernommen hat.

Prof. Dr. Mirko Bunzel möchte ich hier meinen besonderen Dank aussprechen. Ich möchte ihm vor allem für die freundschaftliche und sehr engagierte Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeitszeit, aber auch für die unbeschreibliche Unterstützung und wissenschaftliche Lehre danken. Trotz der Entfernung hatte er immer ein offenes Ohr für mich, wenn Schwierigkeiten aufgetreten sind.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Dr. Carola Funk, Dr. Diana Gniechwitz, Dr. Diane Dobberstein, Reiko Yonekura und Andreas Heinze bedanken.
Ich bedanke mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen der Abteilung Lebensmittelchemie; insbesondere gilt meinen Laborkollegen Dr. Nils Hinrichsen, Ljudmila Neumann, Daniel Schwarck sowie Bettina Jacobsen mein bester Dank.

Für ihre Unterstützung, die schöne Zeit und das großartige Engagement möchte ich meine DiplomandInnen Barbara Duwe, Caterina Hünniger, Lena Vollersen, Franziska Vaagt, Marlies Stein und Max Reichert meinen besonderen Dank

aussprechen. Es war für mich eine große Ehre sechs DiplomandInnen betreuen zu dürfen.

Den Korrektur-Lesern meiner Doktorarbeit (Ernst Meiß, Marie Bildstein) gilt mein bester Dank.

Herzlich bedanke ich mich schließlich bei meiner Frau und meiner ganzen Familie für die seelische Unterstützung und dafür, dass sie mich jeden Tag in ihre Gebete einschließen.

## Meinen Eltern

**Papa Robert, Mama Elise und Tata Yvette**

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

| | |
|---|---|
| ABSL: | acetylbromidlösliches Lignin |
| AACC: | American Association of Cereal Chemists |
| ADL: | acid detergent lignin |
| AGP: | Arabinogalaktan-Protein |
| AOAC: | Association of Official Analytical Chemists |
| AUBS: | angereicherte unlösliche Ballaststoffe |
| Ba: | Banane (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| Bi: | Birne (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| BiFF: | Fruchtfleisch der Birne (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| BiSch: | Birnenschale (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| BS: | Ballaststoffe |
| BSTFA: | N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid |
| CA: | Coniferylalkohol (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| CAD: | Zimtalkohol Dehydrogenase |
| CCoAOMT: | Kaffeoyl CoA O-Methyltransferase |
| CCR: | Cinnamoyl CoA Reduktase |
| C4H: | Zimtsäure 4-Hydroxylase |
| C3H: | *p*-Cumarsäure 3-Hydroxylase |
| 4CL: | 4-(Hydroxy)cinnamoyl:CoA-Ligase |
| COMT: | Kaffeesäure/5-Hydroxy-Ferulasäure O-Methyltransferase |
| Cyt: | Cytochrom |

| | |
|---|---|
| DC: | Dünnschichtchromatographie |
| DFRC: | derivatization followed by reductive cleavage |
| DL: | Dioxan-Lignin |
| 4,4‘-EBP: | 4,4’-Ethylidenbisphenol (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| EC: | enzymatisch-chemisch (in Tabellen) |
| EG: | enzymatisch-gravimetrisch (in Tabellen) |
| EI: | Elektronenstoßionisation |
| F5H: | Ferulasäure 5-Hydroxylase |
| G: | Guaiacyl-Einheit |
| GBS: | Gesamtballaststoffe |
| GC: | Gaschromatographie |
| GK: | Grünkohl (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| GRP: | glycinreiches Protein |
| HCT: | *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA:Chinasäure Shikimisäure p-Hydroxyzimtsäure-Transferase |
| HPLC: | high performance liquid chromatography |
| HRGP: | hydroxyprolinreiches Protein |
| IR: | Infrarot |
| IS: | interner Standard |
| K: | Kiwi (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| KCo: | Columella der Kiwi (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| KFF: | Fruchtfleisch der Kiwi (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| KL: | Klason-Lignin |
| KOMe: | Kaliummethanolat |
| korr.: | korrigiert |
| KSa: | Samen der Kiwi (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| KSM: | Kutin und Suberinmonomere |
| LBS: | lösliche Balaststoffe |
| LDL: | low density lipoprotein |
| LFGB: | Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch |
| M: | Möhre (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| $[M]^+$: | Molekülion |
| MD: | Monolignolderivate |
| MeOH: | Methanol |

| | |
|---|---|
| MFF: | Fruchtfleisch der Möhre (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| min: | Minute |
| MS: | Massenspektrometrie |
| MSch: | Möhrenschale (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| MZ: | Zylinder der Möhre (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| m/z: | Masse-Ladungs-Verhältnis |
| NaOMe: | Natriummethanolat |
| NIRS: | Nahinfrarotspektroskopie |
| NMR: | nuclear magnetic resonance spectroscopy |
| P: | *p*-Hydroxyphenyl-Einheit |
| PAL: | Phenylalanin-Ammoniak-Lyase |
| PRP: | prolinreiche Proteine |
| R: | Roggen (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| RG: | Rhamnogalakturonane |
| RRt: | relative Retentionszeit |
| Rt: | Retentionszeit |
| RT: | Raumtemperatur |
| S: | Syringyl-Einheit |
| SA: | Sinapylalkohol (teilweise in Abbildungen verwendet) |
| SAD: | Sinapylalkohol Dehydrogenase |
| SCFA: | short-chain fatty acid |
| SL: | Säure-Lignin |
| SPAD: | polyaliphatische Domäne des Suberins |
| SPE: | solid phase extraction |
| SPPD: | polyphenolische Domäne des Suberins |
| Sy: | Standardabweichung |
| TAL: | Tyrosin-Ammoniak-Lyase |
| TBME: | tert.-Butylmethyl-Ether |
| TMCS: | Trimethylchlorsilan |
| TMSi: | Trimethylsilyl |
| UBS: | unlösliche Ballaststoffe |
| unkorr.: | unkorrigiert |
| UV: | ultra-violett |
| W: | Weizen (teilweise in Abbildungen verwendet) |

WFR: Wiederfindungsrate

WFB: Wachs- und Fettbestandteile

## Inhaltsverzeichnis


**1 EINLEITUNG UND ALLGEMEINER TEIL 1**

**1.1 Ballaststoffe 1**

1.1.1 Definition 1

1.1.2 Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Ballaststoffen 2

**1.2 Die pflanzliche Zellwand 4**

1.2.1 Struktur und Chemie der Pflanzenzellwand 4

1.2.2 Bestandteile der Pflanzenzellwand 7

1.2.2.1 Zellwandpolysaccharide 7

1.2.2.2 Strukturproteine 13

1.2.2.3 Lignin 14

1.2.2.4 Suberin 20

1.2.2.5 Kutin 22

1.2.2.6 Wachse 27

**1.3 Problemstellung 29**

**2 MATERIAL UND METHODEN 31**

**2.1 Untersuchungsmaterialien, Probenvorbereitung und Probenfraktionierung 31**

2.1.1 Untersuchungsmaterial 31

2.1.2 Probenvorbereitung und –fraktionierung 32
**2.2 Trockengewichtbestimmung von Getreiden 32**
**2.3 Bestimmung und Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe 33**
**2.4 Restprotein- und Aschekorrektur der unlöslichen Ballaststoffe 35**
**2.5 Isolierung und Bestimmung von Klason-Ligninen 36**
**2.6 Photometrische Untersuchung der Klason-Lignin-Waschlösung 37**
**2.7 Gravimetrische Bestimmung des Aschegehalts und des Restproteingehalts im Klason-Lignin 38**
**2.8 Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung von unlöslichen Ballaststoffen und Klason-Ligninen 38**

**2.9 Charakterisierung und Bestimmung von Wachs- und Fettbestandteilen in Klason-Ligninen 39**
2.9.1 Extraktion und gravimetrische Bestimmung 39
2.9.2 Gaschromatographische Charakterisierung der Wachs- und Fettbestandteile 40
**2.10 Charakterisierung und Bestimmung von Kutin- und Suberin-Monomeren in Klason-Ligninen 41**
2.10.1 Depolymerisierung, Extraktion und gravimetrische Bestimmung 41
2.10.2 Charakterisierung von Kutin- und Suberinmonomeren mittels Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion 44
**2.11 Partielle Depolymerisierung von Kutin- und Suberin in Klason-Ligninen 44**
**2.12 Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin 46**
**2.13 Ermittlung molarer Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin 47**
2.13.1 Enzymatische Anreicherung der unlöslichen Ballaststoffe 47
2.13.2 Gewinnung von Dioxan- und Säure-Ligninen 48
2.13.3 Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten 49
**2.14 Bestimmung der Ligninzusammensetzung nach reduktiver Spaltung 49**

**3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 52**

**3.1 Bestimmung der korrigierten unlöslichen Ballaststoffgehalte 52**
**3.2 Bestimmung und Korrektur der Klason-Lignin-Gehalte 53**
3.2.1 Isolierung und Bestimmung der Klason-Lignine 53
3.2.2 Charakterisierung und Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile in Klason-Ligninen 53
3.2.2.1 Charakterisierung 53
3.2.2.2 Gravimetrische Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile in den Klason-Ligninen 60
3.2.3 Charakterisierung und Bestimmung der Kutin- und Suberinmonomere in den Klason-Ligninen 61
3.2.3.1 Charakterisierung von Kutin- und Suberinmonomeren nach totaler Depolymerisierung 61
3.2.3.2 Charakterisierung von Kutin- und Suberinoligomeren nach partieller Depolymerisierung 69
3.2.3.3 Gravimetrische Bestimmung der Kutin- und Suberinmonomeren in den Klason-Ligninen 71
3.2.4 Bestimmung der Asche- und Proteingehalte in den Klason-Ligninen 72
3.2.5 Korrektur der Klason-Lignin-Gehalte 73
**3.3 Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin in den Klason-Ligninen pflanzlicher Proben 77**
**3.4 Lokalisierung des Lignin-Polymers und Bestimmung des Lignin-gehaltes in den untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen 79**
3.4.1 Ermittlung von molaren Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin 79
3.4.1.1 Enzymatische Anreicherung der unlöslichen Ballaststoffe 80
3.4.1.2 Gewinnung der Dioxan- und Säure-Lignine 80
3.4.2 Ligningehalte der untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen 83
3.4.3 Ligninzusammensetzung der untersuchten Pflanzen und Pflanzen-Fraktionen 86

**4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 94**

**5 ANHANG 97**

**5.1 Geräte und Hilfsmittel 97**
5.1.1 Gaschromatographie 97
5.1.1.1 Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile 97
5.1.1.2 Bestimmung der Kutin- und Suberinmonomere sowie –oligomere 97
5.1.1.3 Bestimmung der Kohlenhydrate als Alditolacetate 98
5.1.1.4 Charakterisierung der Lignine nach reduktiver Spaltung 98
5.1.2 Photometrie 98
5.1.3 Kernresonanz-Spektroskopie 98
5.1.4 Sonstige Geräte 98
**5.2 Verwendete Chemikalien 99**
**5.3 Arbeitsvorschriften 101**
5.3.1 Gewinnung der unlöslichen Ballaststoffe 101
5.3.1.1 Probenvorbereitung und Wassergehaltsbestimmung 101
5.3.1.2 Enzymatischer Abbau 102
5.3.1.3 Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe 103
5.3.2 Enzymatische Anreicherung der unlöslichen Ballaststoffe 103
5.3.3 Photometrische Bestimmung der Stickstoffgehalte 103
5.3.4 Gravimetrische Bestimmung der Aschegehalte 104
5.3.5 Gewinnung und gravimetrische Bestimmung der Klason-Lignine 104
5.3.6 Untersuchung der Klason-Lignin-Filtrate 105
5.3.7 Bestimmung der Kohlenhydratgehalte als Alditolacetate 105

5.3.8 Gaschromatographische Identifizierung und Quantifizierung der Wachs- und Fettbestandteile 107
5.3.9 Gaschromatographische Identifizierung und Bestimmung von Kutin- und Suberinmonomeren nach totaler Depolymerisierung 108
5.3.10 Partielle Depolymerisierung mit methanolischem Natrium-Methanolat 108
5.3.11 Photometrische Bestimmung des Ligningehaltes als acetyl-bromidlösliches Lignin 110
5.3.12 Gewinnung der Dioxan-Lignine 110
5.3.13 Gewinnung der Säure-Lignine 111
5.3.14 Photometrische Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten

der Säure- und Dioxan-Lignine 112
5.3.15 Charakterisierung der Ligninzusammensetzung nach reduktiver Spaltung 112
5.3.16 Charakterisierung der acetylierten Dioxan-Lignine mittels Kern-resonanz-Spektroskopie 113
**5.4 Tabellen 114**
5.4.1 Gehalte an unlöslichen Ballaststoffen in den untersuchten Trockenproben 114
5.4.2 Gehalte an korrigierten Klason-Ligninen in den untersuchten Trockenproben 114
5.4.3 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der untersuchten Klason-Lignine 115
5.4.4 Gehalte an angereicherten unlöslichen Ballaststoffen 115
5.4.5 Acetylbromidlösliche Ligningehalte 116
5.4.6 Dioxan- und Säure-Ligningehalte 117
5.4.7 Monosaccharidzusammensetzung der Dioxan- und Säure-Lignine 117
5.4.8 Monolignolzusammensetzung der angereicherten unlöslichen Ballaststoffe 118
**5.5 Chromatogramme und Spektren 118**
5.5.1 Chromatogramme 118
5.5.1.1 Bestimmung der Kohlenhydrate als Alditolacetate 118
5.5.1.2 Charakterisierung und Bestimmung der Wachs-und Fettbestandteile 119
5.5.1.3 Charakterisierung und Bestimmung von Kutin- und Suberin-monomeren 120
5.5.1.4 Charakterisierung und Bestimmung von Lignin nach reduktiver Spaltung 121
5.5.2 Spektren 123
5.5.2.1 UV-Spektrum des Ethylacetatextrakts des Klason-Lignin-Filtrates 123
5.5.2.2 Massenspektren 123
5.5.2.2.1 Massenspektren der Monolignole 123
5.5.2.2.2 Massenspektren der Wachs- und Fettbestandteile 124
5.5.2.2.3 Massenspektren von Kutinmonomeren und –oligomeren sowie Suberinmonomeren und –oligomeren 127

**6. LITERATUR 131**

# 1 Einleitung und allgemeiner Teil

## 1.1 Ballaststoffe

### 1.1.1 Definition

Die Nachfrage nach Lebensmittelzusätzen mit positiven Effekten auf die Gesundheit ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Ballaststoffe (BS) gehören neben Vitaminen, ungesättigte Fettsäuren, Mineralstoffen und Probiotika zu den Lebensmittelinhaltstoffen, die sogenannten „Functional Foods“ am häufigsten zugesetzt werden. Dies ist auf die besondere ernährungsphysiologische Bedeutung dieser Lebensmittelkomponenten zurückzuführen.

In unserer Ernährung stammt der größte Anteil an BS aus den Zellwänden von Obst, Gemüse, Samen und vor allem Getreide (MARTÍN-CABREJAS et al., 1995; HARRIS und FERGUSON, 1999; McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001).

Mehrere Definitionen für den Begriff „Ballaststoff“ wurden in den letzten 50 Jahren unter Beteiligung verschiedener Autoren erarbeitet (HIPSLEY, 1953; TROWELL, 1972; TROWELL, 1976; DEVRIES et al., 1999; AACC REPORT, 2001).

BS werden gemäß der American Association of Cereal Chemists (AACC) wie folgt definiert: „Ballaststoffe bestehen aus essbaren Pflanzenteilen oder analogen Kohlenhydraten, die gegenüber der Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden. Ballaststoffe beinhalten Polysaccharide, Oligosaccharide, **Lignin und assoziierte Pflanzensubstanzen**. Sie unterstützen gesundheitsfördernde Prozesse wie die Senkung des Cholesterinspiegels und/oder die Regulierung des Blutzuckerspiegels und/oder besitzen abführende Eigenschaften“ (AACC REPORT, 2001).

Der erste Teil dieser Definition geht auf die Zusammensetzung des Ballaststoffkomplexes ein. Zu den Ballaststoffkomponenten werden unverdauliche Poly- und Oligosaccharide natürlicher Herkunft wie Cellulose, Hemicellulosen, Pektine, Oligofructane, polymere Fructane, Pflanzengummis und Pflanzenschleime gezählt. Hinzu kommen sog. „analoge Kohlenhydrate“ wie modifizierte Cellulosen (zum Beispiel Methylcellulose), Polydextrose oder resistente Stärke, die ähnliche Verdauungsresistenz, Fermentierbarkeit und physiologische Eigenschaften wie

natürlich vorkommende Ballaststoffpolysaccharide besitzen, aber häufig synthetischer Herkunft sind. Als „assoziierte Pflanzensubstanzen“ werden **Wachse, Kutin, Suberin** und Tannine bezeichnet (AACC REPORT, 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003). Ein wichtiger Grund für die positive Wirkung von BS auf die Gesundheit ist ihre teilweise oder vollständige Fermentation durch die Mikroorganismenflora im Dickdarm. Das Ausmaß der Fermentation ist abhängig von der chemischen Struktur, der Löslichkeit sowie dem Ligningehalt der Ballaststoffkomponenten (ASP et al., 1993; HARRIS und FERGUSON, 1999; MONGEAU und BROOKS, 2001; FUNK et al., 2008).

Die Unterteilung der Gesamtballaststoffe (GBS) kann nach ihrer Löslichkeit in einer pH-kontrollierten Enzymlösung in lösliche (LBS) und unlösliche Ballaststoffe (UBS) erfolgen (BUNZEL und STEINHART, 2003). Zu den UBS von Lebensmitteln zählen neben bestimmten Nicht-Stärke-Polysacchariden auch **Lignin, Kutin und Suberin.** Die Anwesenheit von Lignin bzw. Suberin soll von Bedeutung für den positiven Einfluss von UBS auf die Inhibierung von Dickdarmkrebs sein (HARRIS und FERGUSON, 1999).

### 1.1.2 Ernährungsphysiologische Eigenschaften von Ballaststoffen

Bereits in der Ballaststoffdefinition werden einige positive Einflüsse der BS auf die Gesundheit des Menschen berücksichtigt. Eine unzureichende Aufnahme von BS steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer Reihe von Krankheiten, wie zum Beispiel Obstipation, Hämorrhoiden, Dickdarmkrebs, Diabetes, Fettsucht, koronaren Herzerkrankungen und der Bildung von Gallensteinen. Eine ballaststoffreiche Ernährung ist mit verringerter Energieaufnahme und erhöhtem Sättigungsgefühl verbunden, wodurch Fettleibigkeit vorgebeugt wird (McDOUGALL et al., 1996). Als wissenschaftlich bewiesen gilt, dass ein erhöhter Verzehr von BS das Risiko herabsetzt, an koronaren Herzerkrankungen und Diabetes zu erkranken. Ebenso wird Obstipation vorgebeugt (AACC REPORT, 2001).

LBS, vor allem viskose lösliche Ballaststoffkomponenten, beeinflussen die **Regulierung des Blutzuckerspiegels**. Durch die Erhöhung der Viskosität des Nahrungsbreis kommt es zu einer verlangsamten Magenentleerung, was zu einer verzögerten intestinalen Absorption von zum Beispiel Kohlenhydraten und somit zu einer verzögerten Blutglucosebereitstellung führt (BUNZEL und STEINHART, 2003).

Ebenso tragen LBS zu der **Senkung des Blutcholesterinspiegels bei** (PLAAMI, 1997). Die Senkung des Gesamtcholesterinspiegels sowie die Senkung des in Form von „low density lipoprotein“ (LDL) vorliegenden Cholesterins dienen dabei als Messgrößen zur Beurteilung des Risikos, an koronaren Herzleiden zu erkranken. Zwei Mechanismen werden diskutiert, wie LBS den Blutcholesterinspiegel beeinflussen können:

i) Durch die Bindung/Adsorption von Gallensäuren an BS und Ausscheidung mit dem Stuhl wird der Gallensäurenpool verringert. Hierdurch wird Cholesterin benötigt, um neue Gallensäuren zu synthetisieren. So kommt es zu einer messbaren Senkung des Cholesterinspiegels (BUNZEL und STEINHART, 2003; LIA et al., 1995).

ii) Die kurzkettigen Fettsäuren, v. a. Propionsäure, die durch die Fermentation von BS im Dickdarm entstehen, sollen die hepatische Cholesterinsynthese hemmen (PLAAMI, 1997).

Der zweite Mechanismus erscheint nach neuen Studien jedoch eher als unwahrscheinlich. Die teilweise oder vollständige Fermentation der BS im Dickdarm wird bereits in deren Definition genannt. Allerdings ist die Bedeutung des Bakterienwachstums für die menschliche Gesundheit, v. a. aufgrund der komplexen Beschaffenheit der Mikroorganismenflora im Dickdarm, nur unzureichend erforscht. Es wurden Zusammenhänge zwischen der **Fermentation der BS** durch Mikroorganismen des Kolons und der Struktur, der Löslichkeit und dem Ligningehalt der BS beobachtet (ASP et al., 1993; HARRIS und FERGUSON, 1999, FUNK et al., 2008). Bei der Fermentation entstehen neben Kohlendioxid und Wasserstoff auch kurzkettige Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFA), wobei Acetat, Propionat und Butyrat von Bedeutung sind. Die Produktion von SCFA erniedrigt den pH-Wert im Kolon. Dies führt zu einer verminderten Umsetzung primärer zu sekundären Gallensäuren. Zudem wird die Löslichkeit sekundärer Gallensäuren herabgesetzt. Es wird angenommen, dass diese im gelösten Zustand co-karzinogene Wirkung aufweisen (SCHEPPACH, 1996; BUNZEL und STEINHART, 2003). Es wird des Weiteren diskutiert, dass Butyrat Tumorwachstum entgegenwirkt, indem es Apoptose induziert (WISKER et al., 2000; BUNZEL und STEINHART, 2003). Durch einen gesteigerten Verzehr von BS kann Obstipation durch **Erhöhung des Stuhlgewichtes und Verkürzung der Transitzeit** im Dickdarm vorgebeugt werden (AACC REPORT 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003). Die Zunahme des Stuhlgewichtes und –volumens wird überwiegend auf die UBS zurückgeführt, da sie

teilweise ein hohes Wasserbindungsvermögen besitzen und von der Darmflora oft nicht vollständig fermentiert werden. Auch LBS führen zu einer Zunahme, da ihre gute Fermentierbarkeit das Bakterienwachstum steigert und somit das Stuhlgewicht und –volumen erhöht wird (BUNZEL und STEINHART, 2003). Einige nicht bzw. wenig fermentierbare Ballaststoffkomponenten, besonders **Lignin**, sollen eine vorbeugende Wirkung in Hinsicht auf Darmkrebserkrankungen aufweisen. Hydrophobe Kanzerogene können an Lignin adsorbiert und aus dem Organismus transportiert werden (FERGUSON und HARRIS, 1996; FUNK et al., 2006). FUNK et al. (2006) konnten zeigen, dass sowohl Ligningehalt als auch Ligninzusammensetzung von Pflanzenzellwänden als BS einen bedeutenden Einfluss auf die Adsorption verschiedener heterozyklischer aromatischer Amine haben. Des Weiteren verzögert Lignin die Fermentation von Ballaststoffpolysacchariden, sodass diese das distale Kolon erreichen und dort fermentiert werden können. Das distale Kolon ist häufigster Ort von Darmerkrankungen, eventuell da dort nicht mehr ausreichend Ballaststoffpolysaccharide zur Fermentation zur Verfügung stehen (FUNK et al., 2007). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Lignine antioxidative Eigenschaften besitzen (DIZHBITE et al., 2004). Auch können aus Ligninen durch mikrobielle Transformation die Mammalian-Lignane Enterodiol und Enterolacton gebildet werden (BEGUM, 2004). Diese sollen einen Beitrag zur Prävention von verschieden Krebsarten, Osteoperose und kardiovaskulären Erkrankungen leisten.
Die mit der Nahrung aufgenommenen Ballaststoffkomponenten sind überwiegend unverdauliche Zellwandbestandteile (ausgenommen Strukturproteine).

## 1.2 Die pflanzliche Zellwand

### 1.2.1 Struktur und Chemie der Pflanzenzellwand

Die Pflanzenzellen sind durch eine dynamische, strukturgebende Zellwand abgegrenzt (GIBEAUT UND CARPITA, 1994; JAMET et al:, 2008). Sie stellt ein Syntheseprodukt der Zellen dar und ist in permanenter Wechselwirkung mit dem Cytoplasma. Die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Zellwand sind abhängig von der betrachteten Pflanze, dem Gewebe, dem Organ und dem Entwicklungsstand der Pflanze. So unterscheiden sich z. B. die Zellwände dikotyler

und monokotyler Pflanzen erheblich (ISHII, 1997). Pflanzliche Zellwände bestehen von außen nach innen aus der Mittellamelle, der primären und der sekundären Zellwand (Abb. 1).

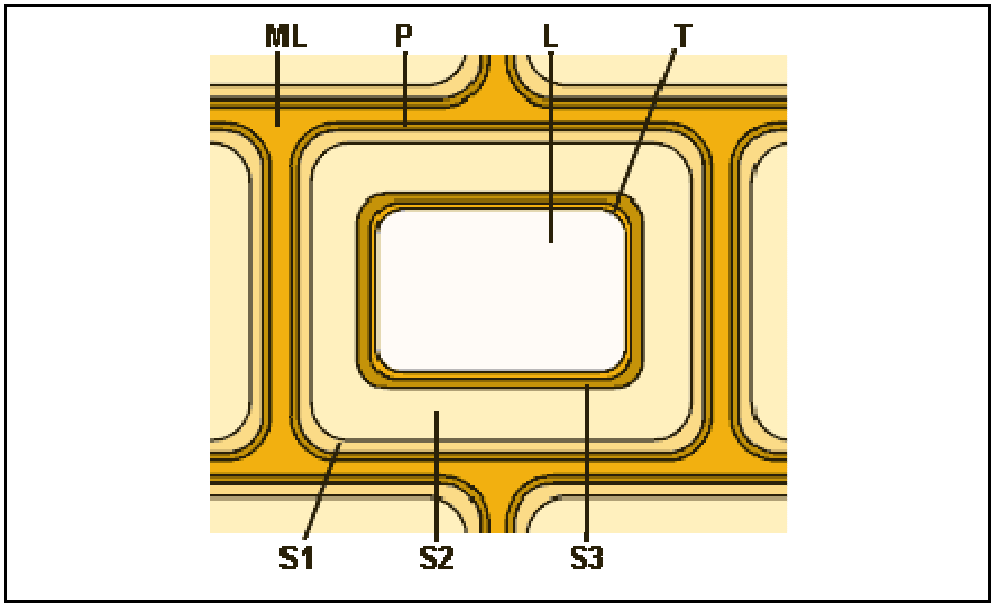



**Abb. 1: Schematischer Aufbau der Pflanzenzellwand mit Mittellamelle (ML), primärer Zellwand (P) und den drei Schichten ($S_1$, $S_2$ und $S_3$) der sekundären Zellwand (Quelle: Wächtershäuser, 2009)**

Die Mittellamelle entsteht bereits bei der Zellteilung aus der Zellplatte durch Zusammenlagerung von mit Pektin gefüllten Golgi-Vesikeln und schließt nach vollständiger Entwicklung die räumliche Zellteilung ab. Die Mittellamelle dient als abgrenzende Struktur zwischen den Zellen und hält diese zusammen. Sie besteht hauptsächlich aus Ca- und Mg-Pektinen sowie zu geringem Anteil aus Proteinen. Bei dem Flächenwachstum der pflanzlichen Zellwand werden Pektine und Hemicellulosen von beiden Seiten der Mittellamelle angelagert, wodurch die Matrix der primären Zellwand entsteht. Außer Pektinen und Hemicellulosen enthält die primäre Zellwand Zellwandproteine und Phenolcarbonsäuren sowie v. a. Cellulose-Mikrofibrillen als Strukturelemente. In der Primärwand werden die Cellulose-Mikrofibrillen überwiegend strukturlos in die amorphe Matrix aus Pektinen und Hemicellulosen eingelagert. Die nicht ausgerichteten, über Wasserstoff-Brücken gebundenen Cellulose-Mikrofibrillen sind für die Elastizität der primären Zellwand mitverantwortlich. Mit etwa 65 % machen Hemicellulosen den größten Anteil am Trockengewicht der primären Zellwand monokotyler Pflanzen aus, der Anteil an Cellulose beträgt etwa 20-30 % (GIBEAUT UND CARPITA, 1994; McDOUGALL

UND SELVENDRAN, 2001). Die Phenolcarbonsäuren, vor allem Ferula- und *p*-Cumarsäure, liegen in der primären Zellwand einiger Pflanzen zu einem geringen Anteil vor; in Gräsern ist ihr Anteil allerdings wesentlich höher. Für die Vernetzung der Hemicellulosen, Pektine und vermutlich Proteine sind diese von großer Bedeutung (GIBEAUT UND CARPITA, 1994).

Nach Beendigung des Zellwachstums kann abhängig von der Funktion der Zellen im Gewebe (zum Beispiel Festigung, Wassertransport) eine sekundäre Zellwand gebildet werden. Eine Übergangslamelle verbindet primäre und sekundäre Zellwand miteinander; sie leitet zur parallelen Anordnung der Cellulose-Mikrofibrillen in den folgenden Schichten über. Diese Paralleltextur der Fibrillen in einer Matrix bestehend aus Hemicellulosen ist ein charakteristisches Merkmal von Sekundärwänden.

Die Sekundärwand besteht aus bis zu drei Schichten, wobei die äußere als S1, die mittlere als S2 und die zum Zellinneren gerichtete Schicht als S3 bezeichnet wird (BOERJAN et al., 2003).

Die interfibrillären Räume der Sekundärwand können mit Mineralstoffen oder sekundären Pflanzenstoffen wie z. B. Tanninen, vor allem aber mit Ligninen (Lignifizierung oder Verholzung) ausgefüllt sein. Durch die Lignifizierung verliert die Zellwand einen großen Teil ihrer Elastizität und damit ihre Wachstumsfähigkeit, gewinnt dafür aber an Festigkeit (BOERJAN et al., 2003). Die Lignifizierung findet in den S1 und S2 Schichten der sekundären Zellwand sowie in der primären Zellwand und der Mittellamelle statt, selten in der S3. In den Pflanzenzellwänden von Monokotyledonen kann der Gehalt an Lignin bis zu 25 % des Trockengewichtes betragen, bei einigen Bäumen sogar bis zu 40 % (QUIDEAU, 1994). Die hohen Gehalte an kristalliner Cellulose und Lignin sowie die Dicke der sekundären Zellwand verleihen der Zelle Stabilität, daher wird die Sekundärwand vermehrt in Festigungsgeweben und Gefäßen ausgebildet (QUIDEAU, 1994). Gemüse, welches häufig Pflanzenteile umfasst, die zur Lignifizierung neigen, wird üblicherweise geerntet, bevor die Lignifizierung zur Verholzung der Gewebe führt (McDOUGALL UND SELVENDRAN, 2001).

Aufgrund ihrer abdichtenden Eigenschaften können lignifizierte Sekundärwandschichten die Passierbarkeit des Wassers in Abschluss- und Leitgeweben (Xylem und Phloem) unterbinden, wobei ein Schutz vor Austrocknung gewährleistet wird (BERNARDS, 2002). Weitere Funktionen dieser Sekundärwände sind der Schutz der Pflanze vor Insekten, mikrobiellem Befall und Verwundung

(BERNARDS et al., 1995; MCDOUGALL UND SELVENDRAN, 2001; BERNARDS, 2002). Suberin und Kutin können Bestandteile der pflanzlichen Zellwand sein. Diese werden durch Inkrustierung bzw. Akkrustierung mit Suberin und Kutin wasserundurchlässig. Die Bildung von Suberin ist auch eine Folge von Verletzung von Geweben, gut zu erkennen bei zum Beispiel der Kartoffel.

### 1.2.2 Bestandteile der Pflanzenzellwand

#### 1.2.2.1 Zellwandpolysaccharide

Zu den wichtigsten Polysacchariden der Zellwand zählen Pektine, Hemicellulosen und Cellulose (GIBEAUT UND CARPITA, 1994). Obwohl in der Natur mehr als hundert unterschiedliche Monosaccharide beschrieben werden, kommen im Allgemeinen nur die zehn in Abb. 2 dargestellten Monosaccharide als Monomere der Zellwandpolysaccharide vor: L-Arabinose, D-Xylose, D-Mannose, D-Glucose, D-Galaktose, L-Rhamnose, L-Fucose sowie die Uronsäuren D-Glucuronsäure, 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure (BUNZEL UND STEINHART, 2003).

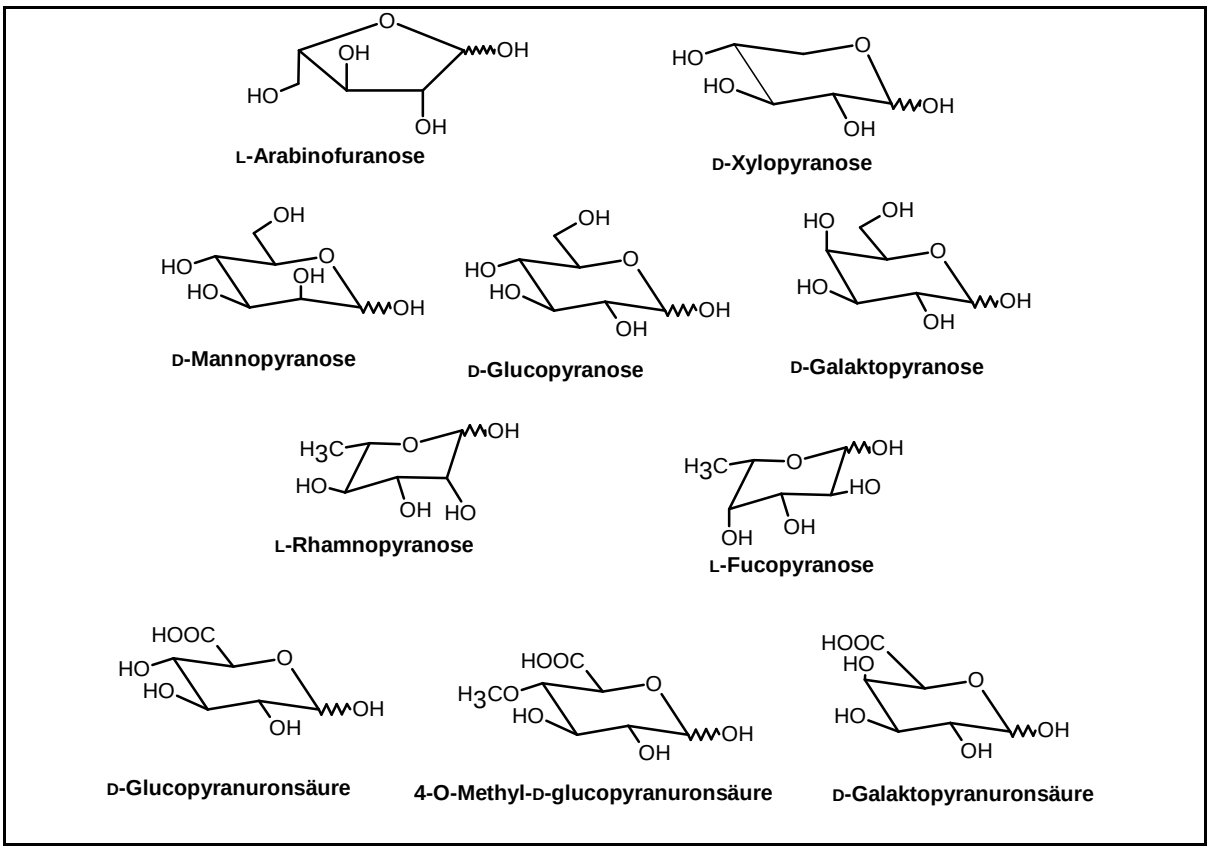



**Abb. 2: Monomere pflanzlicher Zellwandpolysaccharide**

**Pektine**

Pektine bestehen hauptsächlich aus den Monomeren D-Galakturonsäure sowie L-Rhamnose, D-Galaktose und L-Arabinose. Ein aus α-D-Galakturonsäure unter (1→4)-Verknüpfung gebildetes lineares Polymer (Homogalakturonan) dominiert für gewöhnlich die Pektinfraktion (GIBEAUT UND CARPITA, 1994; BUNZEL UND STEINHART, 2003). In den Homogalakturonanen ist ein Teil der Carboxyl-Gruppen mit Methylgruppen verestert (MCDOUGALL UND SELVENDRAN, 2001; PEÑA et al., 2001; BUNZEL UND STEINHART, 2003). Die teilweise veresterten Carboxyl-Gruppen werden zur reversiblen Verknüpfung von Galakturonanketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk genutzt (PEÑA et al., 2001).

Neben Homogalakturonanen zählen die Rhamnogalakturonane I (RGI) zu den Hauptbestandteilen der Pektine (CARPITA UND MCCANN, 2002). Die Hauptkette der RGI besteht aus alternierend (1→2)-gebundenen α-L-Rhamnose- und (1→4)-gebundenen α-D-Galakturonsäure-Einheiten. Auch im RGI können die Säuregruppen in variierenden Anteilen als Methylester und zusätzlich acetyliert vorkommen (PEÑA et al., 2001). 20-80 % der L-Rhamnose-Einheiten sind in O-4-Position mit Seitenketten bestehend aus D-Galaktose, L-Arabinose und geringen Mengen L-Fucose substituiert (MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003). Die Seitenketten sind möglicherweise blockartig entlang der Hauptkette angeordnet, so dass Teilabschnitte des Moleküls substituiert, andere jedoch unsubstituiert sind (PEÑA et al., 2001). Die aus Arabinose und Galaktose bestehenden Seitenketten werden als Arabinane bzw. Arabinogalaktane beschrieben. Weitere Pektinbausteine wie zum Beispiel RGII, Apiogalakturonan und Xylogalakturonan sind häufig nur in geringen Anteilen vertreten (GIBEAUT und CARPITA, 1994).

**Hemicellulosen**

Hemicellulosen gehören zu den Hauptkomponenten der Zellwand, wo sie zusammen mit Pektinen die Matrix bilden, in die Cellulosefibrillen eingebettet sind (PEÑA et al., 2001; CARPITA und MCCANN, 2002; BUNZEL und STEINHART, 2003). Allgemein sind Hemicellulosen heterogene Gemische aus Polysacchariden, die vor allem aus Pentosanen mit den Grundbausteinen D-Xylose und L-Arabinose sowie Hexosanen mit den Grundbausteinen D-Mannose, D-Galaktose und D-Glucose bestehen. Dabei wird die Hauptkette aus einem Mononsaccharid-Typ gebildet, andere

Monosaccharide bilden die Seitenketten. Hauptvertreter sind Arabinoxylane, Xyloglucane und mixed-linked-β-Glucane (CARPITA und MCCANN, 2002; BUNZEL und STEINHART, 2003).

Arabinoxylane

Arabinoxylane bestehen aus β-(1→4)-gebundenen D-Xylopyranose-Einheiten, die in O-2- und/oder O-3-Stellung mit L-Arabinofuranose mono- oder disubstituiert sind (Abb. 3).

An die Arabinosesubstituenten können teilweise zusätzliche Xylose- und/oder Galaktoseeinheiten gebunden sein, außerdem können in geringem Maße (1→2)-, (1→3)- oder (1→5)-verknüpfte Arabinoseoligomere Seitenketten bilden (BUNZEL und STEINHART, 2003). In den äußeren Schichten des Getreidekorns, aber auch in den sekundären Zellwänden von dikotylen Pflanzen finden sich ferner saure Glucuronoarabinoxylane, bei denen zusätzlich D-Glucuronsäure- (v.a. in Getreiden) und 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure-Einheiten (v.a. in Dikotyledonen) an die Xylanhauptkette gebunden sind (GIBEAUT und CARPITA, 1994; MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; CARPITA und MCCANN, 2002).

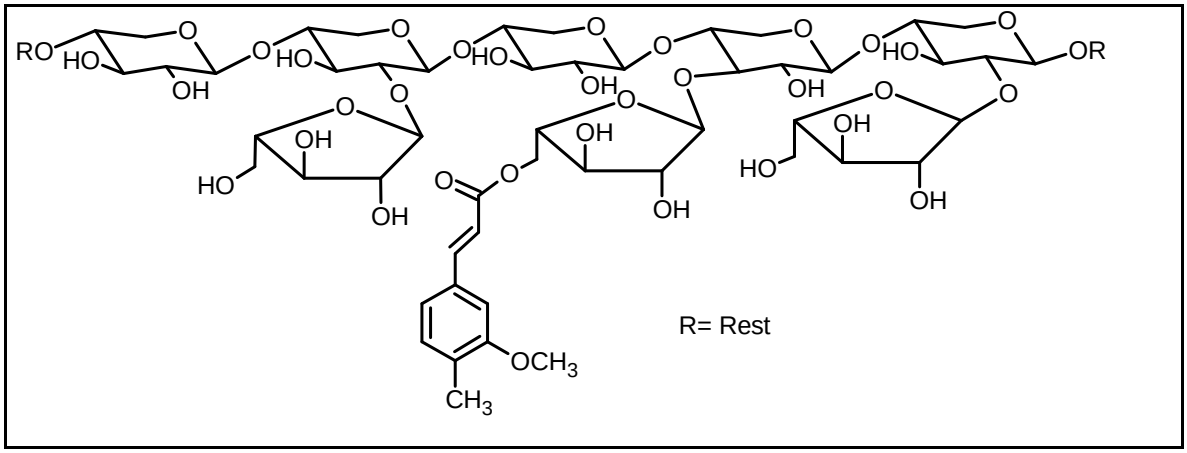



**Abb. 3: Schematischer Ausschnitt eines Arabinoxylans mit einer Hauptkette aus Xylopyranose-Einheiten, an die Arabinofuranose-Einheiten (teilweise mit Ferulasäure substituiert) gebunden sind.**

Arabinoxylane weisen strukturelle Heterogenität auf. Variabel sind der Arabinosesubstitutionsgrad (GIBEAUT und CARPITA, 1994; PEÑA et al., 2001), die Verteilung der Substituenten und der Grad der Polymerisation (IZYDORCZYK und BILIADERIS, 1992; BUNZEL und STEINHART, 2003). Die Löslichkeit der Arabinoxylane hängt zum Beispiel vom Arabinosesubstitutionsgrad ab; bei einem

niedrigen Arabinose/Xylose-Verhältnis zeigen die Arabinoxylane normalerweise eine schlechtere Löslichkeit als bei einem höheren Verhältnis (BUNZEL und STEINHART, 2003).

Da Arabinoxylane auch mit Ferulasäure verestert sind (Abb. 3), können einzelne Arabinoxylanketten durch radikalische Kopplungsreaktionen zweier oder mehrerer Ferulasäuresubstituenten verknüpft werden. Dadurch wird gleichzeitig eine höhere Stabilität der Arabinoxylane gegenüber exogenen Enzymen erreicht (RALPH et al., 1994a; RALPH et al., 1994b; SAULNIER et al., 1999; CARPITA und McCANN, 2002; BUNZEL et al., 2000; BUNZEL et al., 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003). Außerdem ist über die Ferulasäure eine Verknüpfung der Arabinoxylane mit dem Ligninpolymer möglich (RALPH et al., 1998; McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; MONGEAU und BROOKS, 2001; GRABBER et al., 2002; BUNZEL und STEINHART, 2003).

Xyloglucane

Xyloglucane bilden in der Primärwand dikotyler Pflanzen den Hauptbestandteil der Hemicellulosen (GIBEAUT und CARPITA, 1994; McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001), ihr Anteil an der Zellwand-Trockenmasse kann bis zu 25 % betragen. Tab. 1 stellt die Bestandteile des Grundgerüsts eines Xyloglucans dar, welches aus einer linearen Hauptkette aus β-D-(1→4)-verknüpften D-Glucose-Einheiten besteht. Mehr als die Hälfte der Glucose-Einheiten kann α-D-Xylosesubstituenten in O-6-Position tragen (GIBEAUT und CARPITA, 1994; McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003). Diese Seitenketten bestehen teilweise aus mehreren Einheiten und enthalten dann außer D-Xylose auch L-Arabinose, D-Galaktose oder L-Fucose (GIBEAUT und CARPITA, 1994; McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001). Sowohl die Galaktose-Einheiten der Seitenketten als auch die Glucose-Einheiten der Hauptkette können acetyliert vorliegen (PEÑA et al., 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003).

Mixed-linked β-Glucane

Mixed-linked β-Glucane werden in wachsende Zellen eingelagert und sind damit in der primären Zellwand lokalisiert (GIBEAUT und CARPITA, 1994). Ihr Vorkommen ist auf Gräser beschränkt (PEÑA et al., 2001; CARPITA und McCANN, 2002; BUNZEL und STEINHART, 2003). Aufgebaut sind die unverzweigten Polymere aus β-D-

Glucopyranose-Einheiten, die, wie Abb. 4 zeigt, (1→4)- und (1→3)-verknüpft (Verhältnis ca. 7:3) vorliegen (McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003).

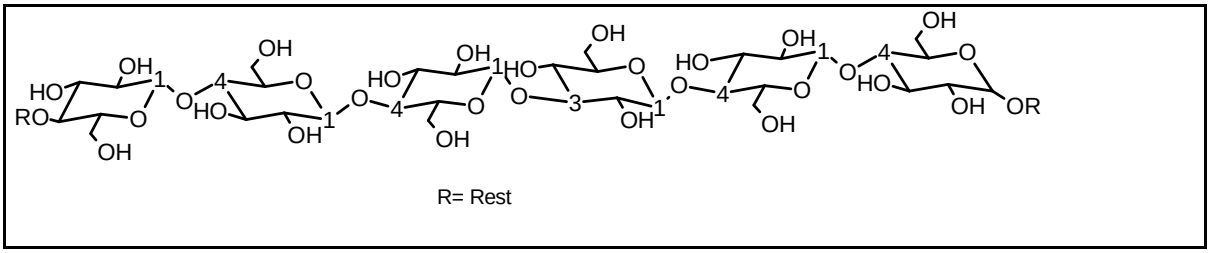



**Abb. 4: Ausschnitt eines mixed-linked β-Glucans**

Die (1→4)-gebundenen β-D-Glucopyranose-Monomere bilden dabei hauptsächlich Cellotriosyl- und Cellotetraosyl-Einheiten aus (GIBEAUT und CARPITA, 1994; PEÑA et al., 2001; BUNZEL und STEINHART, 2003).

## Cellulose

Cellulose stellt das in der Natur häufigste Polysaccharid dar. In der Primärwand besteht das wasserunlösliche, nur wenig quellfähige Molekül aus etwa 1000-4000 (1→4)-linear-verknüpften β-D-Glucopyranose-Einheiten (Abb. 5). In der Sekundärwand setzten sich die Celluloseketten aus bis zu 12000 Einheiten zusammen.

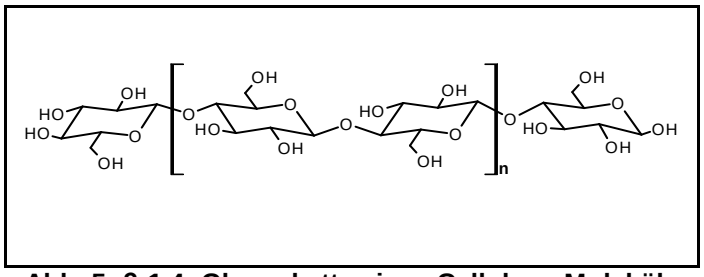


**Abb. 5: β-1,4- Glucankette eines Cellulose-Moleküls**

Die β-D-Glucose-Einheiten bilden lineare Ketten. Wegen der starken Assoziationstendenz lagern sich die Moleküle leicht unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aneinander, wodurch sich zunächst Elementarfibrillen und schließlich dickere Makrofibrillen bilden (Abb. 6) (McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001).

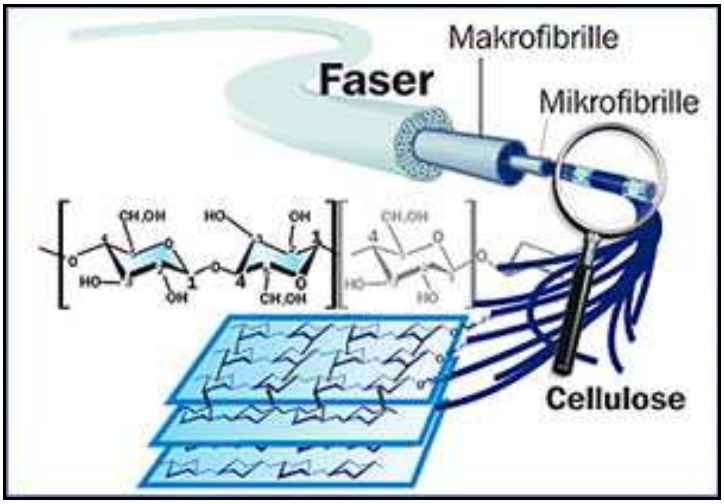



**Abb. 6: Aufbau der Cellulose-Fasern: eine Mikrofibrille besteht aus dicht gepackten Elementarfibrillen (Quelle: jrs, 2009).**

Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Strukturmerkmale der oben beschriebenen Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand wieder.

**Tab. 1: Bindungstypen, Hauptketten und Seitenketten von Zellwandpolysacchariden**

| **Substanz** | **Hauptkette** | | **Substitution** | |
|---|---|---|---|---|
| | **Verknüpfung** | **Einheit** | **Position** | **Einheit** |
| **Cellulose** | (1→4) | β-D-Glucose | **-** | **-** |
| **Pektine** | | | | |
| Homogalakturonane | (1→4) | α-D-Galakturonsäure | **-** | **-** |
| Rhamno-galakturonane I | (1→2)<br>(1→4) | α-L-Rhamnose<br>α-D-Galakturonsäure | O-4 (Rhamnose) | β-D-Galaktose<br>α -L-Arabinose<br>α -L-Fucose |
| Arabinane | (1→5) | α-L-Arabinose | | |
| **Hemicellulosen** | | | | |
| Xyloglucane | (1→4) | β-D-Glucose | O-6 | α-D-Xylose |
| Arabinoxylane | (1→4) | β-D-Xylose | O-2, O-3 | α-L-Arabinose |
| Mixed-linked β-Glucane | 70 % (1→4)<br>30 % (1→3) | β-D-Glucose | **-** | **-** |

#### 1.2.2.2 Strukturproteine

Etwa 2-5 % der Zellwandtrockenmasse besteht aus Proteinen. Die Zellwandproteine bestehen hauptsächlich aus Polypetidketten mit einem besonders hohen Anteil an Hydroxyprolin und Seitenketten aus Kohlenhydraten, den sogenannten hydroxyprolinreichen Proteinen (HRGP). Andere Strukturproteine der Zellwand sind prolinreiche Proteine (PRP), glycinreiche Proteine (GRP) bzw. Arabinogalaktan-Proteine (AGP) (GIBEAUT und CARPITA, 1994; PEÑA et al., 2001).

Die Biosynthese der Proteine erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum. Von dort werden sie über Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert, zu Glykoproteinen umgewandelt und nach Abgliederung in Golgi-Vesikel von diesen zum Bestimmungsort gebracht. Zu den gut untersuchten HRGP gehört das Extensin (GIBEAUT und CARPITA, 1994). Extensin besitzt eine stabförmige Struktur und besteht hauptsächlich aus zwei sich wiederholenden Sequenzen: eine hydrophobe Sequenz aus Tyrosin und Valin und eine hydrophile Sequenz, die ein Pentapeptid bestehend aus einem Serin- und vier Hydroxyprolin-Molekülen darstellt (PEÑA et al., 2001). Für die Vernetzung von hydroxyprolinreichen Glykoproteinen untereinander wird vermutet, dass zwei Tyrosin-Reste unter Ausbildung einer phenolischen Bindung zu Isodityrosin verknüpft werden. Des Weiteren wird die Bildung von Komplexen zwischen HRGP und Pektinen über kovalente Bindungen beschrieben (JAMET et al., 2008). Auch Verknüpfungen mit anderen Polysacchariden, mit Ligninen sowie Proteinen über Phenolcarbonsäuren bzw. phenolische Aminosäuren werden diskutiert (GIBEAUT und CARPITA, 1994; MONGEAU und BROOKS, 2001; GRABBER et al., 2002).

Die Strukturen der PRP sind noch weitestgehend unbekannt, werden aber in Anlehnung an Extensin als ebenfalls stabförmig angenommen (PEÑA et al., 2001). GRP können bis zu 70 % Glycin enthalten und haben vermutlich eine β-Faltblatt Struktur mit einer linearen Anordnung von aromatischen Aminosäuren an den Außenseiten, über die eine Vernetzung des Proteins mit der Zellwand erfolgt (PEÑA et al., 2001). AGP (siehe Abb. 7) bestehen zu über 90 % aus Kohlenhydraten, vor allem Galaktose und Arabinose, und werden daher auch als Proteoglycane bezeichnet (PEÑA et al., 2001).

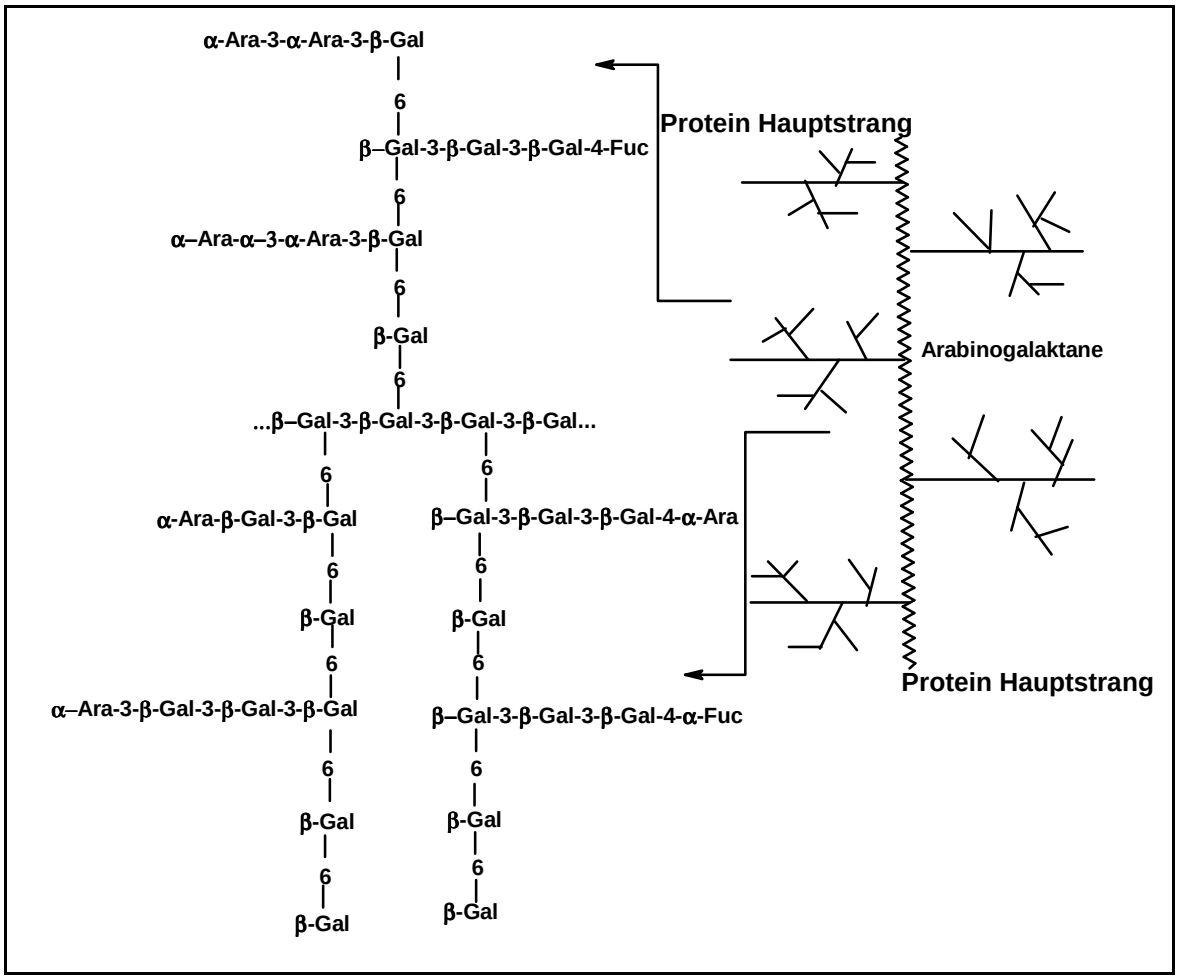



**Abb. 7: Schematische Darstellung eines Arabinogalaktanproteins**

### 1.2.2.3 Lignin

Der Begriff „Lignin“ wurde erstmals 1819 von De Candolle eingeführt. Eine Definition für diesen Begriff wurde über Jahre erarbeitet und wird weiterhin kontrovers diskutiert. Vereinfacht ist Lignin „ein polymeres Naturprodukt, das durch enzymatisch initiierte Dehydrogenierungs-Polymerisation dreier primärer Vorstufen, *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol, entsteht“ (SARKANEN und LUDWIG, 1971; LU und RALPH, 1999; HARKIN, 1967; FREUDENBERG und NEISH, 1968; BUNZEL und STEINHART, 2003; BUNZEL et al., 2005; QUIDEAU, 1994). In der Definition werden nur die drei Hauptmonolignole (Abb. 8) aufgeführt, allerdings sind weitere phenolische Minorkomponenten wie 5-Hydroxyconiferylalkohol, phenolische Aldehyde und Säuren als Monolignole bekannt (BUNZEL et al., 2005; LEWIS und YAMAMOTO, 1990; QUIDEAU, 1994; BOERJAN et al., 2003). Die Hauptmonolignole werden im Ligninpolymer nach ihrem aromatischen Kern auch als Guaiacyl (G)-, Syringyl (S)- bzw. *p*-Hydroxyphenyl (P)-Einheiten bezeichnet und deren Anteile in

Ligninen verschiedener Pflanzen können stark variieren (LEWIS und YAMAMOTO, 1990; QUIDEAU, 1994; MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; MONGEAU und BROOKS, 2001; BOERJAN et al., 2003; RALPH et al., 2004).

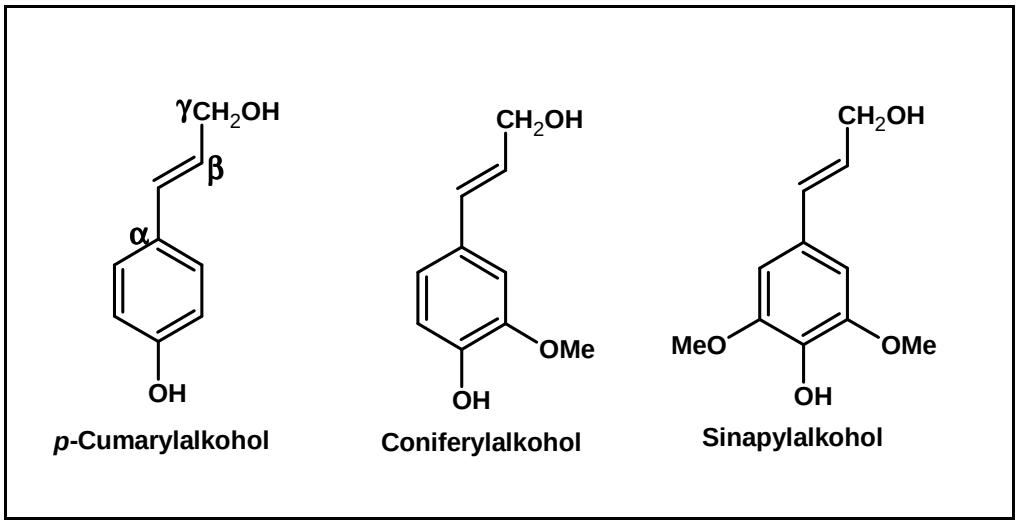



**Abb. 8: Hauptmonolignole zur Ligninbiosynthese**

Die Monolignole sind Produkte des Shikimisäure-Wegs und des sich anschließenden Phenylpropanstoffwechsels. Die bei der Glykolyse entstehenden Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat leiten den Shikimisäure-Weg ein, wobei die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet werden. Im Phenylpropanstoffwechsel werden die Monolignole aus den Phenolcarbonsäuren (Kaffeesäure, Ferulasäure, 5-Hydroxyferulasäure, *p*-Cumarsäure und Sinapinsäure) gebildet. Dabei dienen die aktivierten Acetyl-Coenzym-A- und/oder die Aldehyd-Strukturen als Zwischenstufen. Die Bildung von Monolignolen aus den genannten Vorstufen sind biochemisch regulierte Prozesse, wie in Abb. 9 dargestellt.

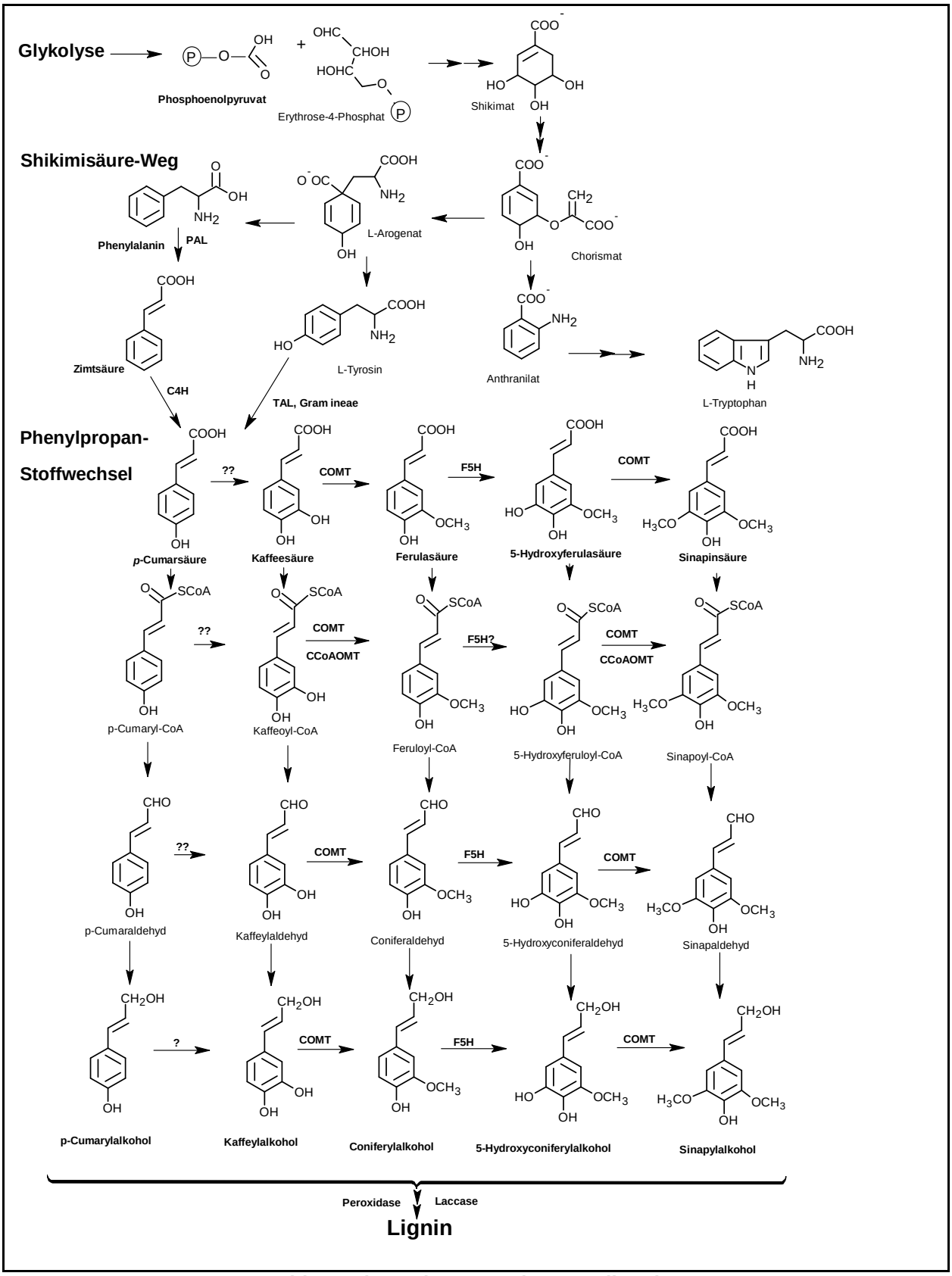



**Abb. 9: Biosyntheseweg der Monolignole.**

**PAL, Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; TAL: Tyrosin-Ammoniak-Lyase; CAD, Zimtalkohol Dehydrogenase; 4CL, 4-(Hydroxy)cinnamoyl:CoA-ligase; C3H, *p*-Cumarsäure-3-hydroxylase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; CCoAOMT, Kaffeoyl CoA O-Methyltransferase; CCR, Cinnamoyl CoA Reduktase; COMT, Kaffeesäure/5-Hydroxy-Ferulasäure O-methyltransferase;**

**Fortsetzung Abb. 9:**

**HCT, *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA:Chinasäure Shikimisäure p-Hydroxyzimtsäure-Transferase; F5H, Ferulasäure 5-Hydroxylase; SAD, Sinapylalkohol Dehydrogenase; ?, Umsetzung nicht nachgewiesen; ??, direkte Umsetzung nicht eindeutig nachgewiesen.**

Wie die in dem Phenylpropanstoffwechsel gebildeten Ligninmonomere transportiert werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass Letztere als deren Glycoside in die Pflanzenzellwände transportiert und erst dort polymerisert werden (BOERJAN et al., 2003; RALPH et al., 2004c). Durch die Peroxidasen und/oder Laccasen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) bzw. Sauerstoff wird die Ligninbiosynthese aus den Monolignolen initiiert (LEWIS und YAMAMOTO, 1990; QUIDEAU, 1994; RALPH et al., 2004). Dabei werden die in Abb. 10 dargestellten mesomeriestabilisierten Monolignol-Radikale gebildet, die im Zuge von komplexen radikalischen Kopplungsreaktionen das Ligninpolymer ausbilden (QUIDEAU, 1994; MONGEAU und BROOKS, 2001; BOERJAN et al., 2003; RALPH et al., 2004).

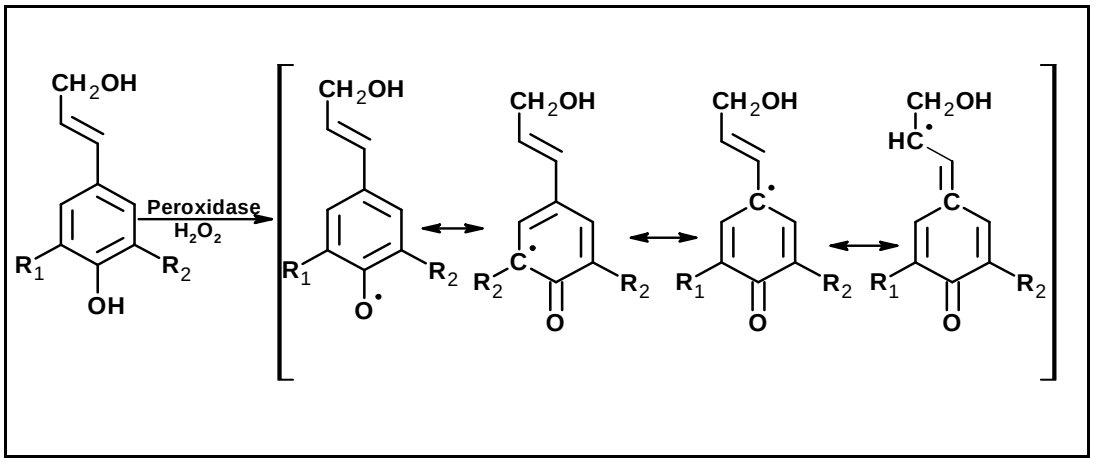



**Abb.10: Bildung von mesomeriestabilisierten Monolignol-Radikalen während der Ligninbiosynthese, $R_1$, $R_2$ = H oder OMe**

Bedingt durch die verschiedenen Kopplungsmöglichkeiten der Phenoxyradikale ist eine Vielzahl von Kombinationen zwischen den Monolignolen möglich, wobei sowohl Ether- als auch C-C-Bindungen gebildet werden (Abb. 11). Die Kopplung der Monomere zu Polymeren scheint chemisch kontrolliert zu sein (BOERJAN et al., 2003; RALPH et al., 2004c) und nicht durch sog. „dirigent Proteins“ beeinflusst wie ebenfalls vorgeschlagen (Davin et al., 1997). Die häufigsten Bindungstypen stellen

dabei β-O-4-, β-5-, β-β-, 5-5-, Dibenzodioxocin [5-5/β-O-4(α-O-4)]-, 4-O-5- und Spirodienon (β-1(α-O-α))-Bindungen dar (DAVIN et al., 1997; BOERJAN et al., 2003; RALPH et al., 2004c). Der vorherrschende Bindungstyp in einem Lignin hängt u.a. von dem Entwicklungsstadium des Lignins ab (RALPH et al., 2004c). Zu Beginn des Lignifizierungsprozesses spielen die β-β-Bindungen eine wesentliche Rolle, während in späteren Entwicklungsstadien die β-O-4-Bindung zwischen den Ligninmonomeren mit über 50 % dominiert. Es wurde vermutet, dass die Ausbildung von β-1-Bindungen den Lignifizierungsprozess terminiert. Dies scheint sich jedoch nach weiteren Untersuchungen nicht zu bestätigen (Ralph et al., 2004c). Dazu kann der Bindungstyp vom Verhältnis der Monolignole, welche unterschiedliche Bindungsarten bevorzugen, beeinflusst werden (BOERJAN et al., 2003; BUNZEL und STEINHART, 2003; GRABBER et al., 2002; LEWIS und YAMAMOTO, 1990; MONGEAU und BROOKS, 2001; RALPH et al., 2004c; QUIDEAU, 1994).

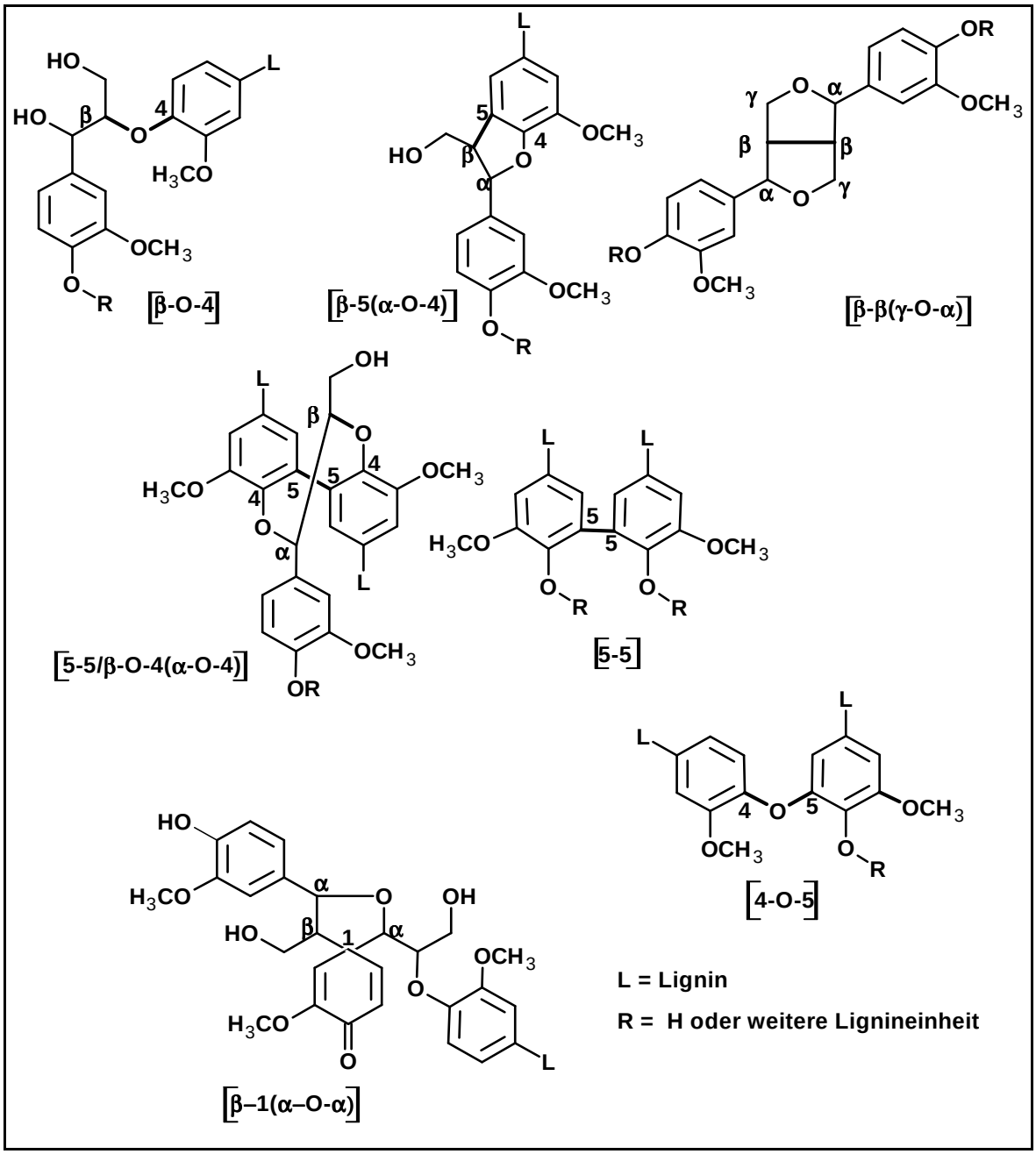



**Abb. 11: Vorherrschende Bindungen im Ligninpolymer**

Als Zellwandbestandteile erfüllen Lignine wichtige Aufgaben in Pflanzen: Lignin ist widerstandsfähig und weitestgehend resistent gegenüber chemischen und mikrobiellen Abbau (Schutzfunktion), es versteift die Zellwand (Stützfunktion) und dient zur Vernetzung der verschiedenen Polymere in der Zellwand (QUIDEAU, 1994; McDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; BOERJAN et al., 2003). Neben pflanzenphysiologischen Eigenschaften werden Ligninen auch ernährungsphysiologische Eigenschaften, u.a. die Herabsetzung der Fermentierbarkeit von Ballaststoffen im Darm und ein möglicher Beitrag zur Senkung

des Darmkrebsrisikos durch Bindung von heterocyclischen aromatischen Aminen zugeschrieben (FUNK et al., 2006; FUNK et al., 2007).
Lignin ist nicht als isolierte Struktur in der Zellwand zu betrachten, da es durch Ferulasäure und Ferulasäurederivate über Ester- und Etherbindungen eng mit Polysacchariden sowie eventuell Strukturproteinen und Suberin der Zellwand verknüpft ist (GIBEAUT und CARPITA, 1994; MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; MONGEAU und BROOKS, 2001; GRABBER et al., 2002; BOERJAN et al., 2003; RALPH et al., 2004c). Monolignole sind auch Bestandteile von Suberin, einem weiteren hochmolekularen Biopolymer, welches vielfältige Funktionen in der pflanzlichen Zellwand erfüllt.

#### 1.2.2.4 Suberin

Suberin ist ein komplexes Biopolymer in spezialisierten Zellwänden. Suberin befindet sich hauptsächlich im Periderm von Pflanzen, wie den Korkzellen von Bäumen (Phellem), und auf der Oberfläche von Wurzeln (Exodermis). Neben dem Periderm und der Exodermis ist Suberin auch in der Endodermis im Inneren pflanzlicher Organe zu finden. Die mit dem Abwehrhormon Abscisinsäure angereicherten Gewebe von fallenden Blättern und die Narbengewebe verwundeter Pflanzen enthalten ebenfalls suberinisierte Zellen (BERNARDS, 2002; GRAÇA und PAREIRA, 2000; GRAÇA et al., 2007). In suberinisierten Zellwänden sind die aromatischen und aliphatischen Bereiche von Suberin zwischen primärer Zellwand und Plasmalemma lokalisiert, wobei die polyphenolische Domäne ausschließlich in der primären Zellwand vorliegt. In den Pflanzen übernimmt das Suberin-Polymer wichtige Aufgaben als Wasserbarriere, Schutz vor Verwundung und Eindringen von mikrobiellen Pathogenen sowie in der Ausbildung einer Schicht zum Wundverschluss (BERNARDS, 2002; GRAÇA und SANTOS, 2006; GRAÇA und SANTOS, 2007; GHANATI et al., 2005).
Basierend auf den Erkenntnissen der letzten 10 Jahre wurde ein überarbeitetes Modell des Suberin-Polymers vorgeschlagen. Das frühere Modell, welches Suberin als ein Polyester-Netzwerk beschreibt, das einen Kern aus Lignin als phenolischen Bereich enthält und von veresterten Wachsschichten sowie Hydroxyzimtsäuren durchsetzt ist, wurde progressiv durch ein neues Modell ersetzt (BERNARDS, 1995; BERNARDS, 2002). Neuere Erkenntnisse präsentieren Suberin als ein komplexes dreidimensionales Netzwerk, bestehend aus einer polyaliphatischen (SPAD) und

einer polyphenolischen Domäne (SPPD) (BERNARDS, 2002; GRAÇA und SANTOS, 2006; GRAÇA und SANTOS, 2007). Dabei enthält die SPPD zum größten Teil Hydroxyzimtsäure-Derivate (v.a. Kaffeesäure und Ferulasäure), die über C-C- und Esterbindungen dreidimensional miteinander vernetzt sind (s. Abb. 12). Des Weiteren sind *p*-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin und nur geringere Anteile an Monolignolen in der SPPD enthalten, die sich somit deutlich von Lignin unterscheidet (BERNARDS et al., 1995; BERNARDS, 2002; GRAÇA und SANTOS, 2006).

Die SPAD besteht aus unterschiedlichen Fettsäuren und -alkoholen, die nicht, wie früher angenommen, miteinander ein ungeordnetes Polyester-Netzwerk bilden, sondern, wie in Abb. 12 dargestellt, über Glycerol-Brücken zu einem strukturierten dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind (BERNARDS, 2002; GRAÇA und SANTOS, 2006). Zu den Hauptbestandteilen in der SPAD gehören Glycerol, langkettige Monocarbonsäuren, α,ω-Dicarbonsäuren sowie ω-Hydroxycarbonsäuren. Geringe Anteile an gesättigten Fettalkoholen (1-Alkanole) sind ebenso vorhanden (s. Abb. 13) (BERNARDS et al., 1995; BERNARDS, 2002; GRAÇA und SANTOS, 2006; GRAÇA und SANTOS, 2007). Die Monomere sind kovalent über Esterbindungen zu einer linearen Kette verknüpft. Quervernetzungen kommen vor, wobei Verzweigungen zu einem dreidimensionalen Netzwerk zustande kommen. Eine strukturelle Abgrenzung zwischen Suberin und Kutin (siehe Kap. 1.2.2.5) erfolgt durch die Anwesenheit von langkettigen α,ω-Dicarbonsäuren im Suberin und durch die SPPD. Ein genauer Biosyntheseweg vieler Suberinmonomere und die Polymerbildung des Suberins sind noch nicht abschließend geklärt (GRAÇA und SANTOS, 2006; GRAÇA und SANTOS, 2007). Die Ordnung des SPAD-Polymers, die durch die lamellare Struktur vorgegeben ist, lässt vermuten, dass der Aufbau der SPAD ein sorgfältig durchgeführter, enzymgesteuerter und keinesfalls ein zufälliger Prozess ist. Für die SPPD wird vermutet, dass die Polymerisation mit der von Lignin vergleichbar ist. Diese verläuft über eine in der Zellwand enthaltene Peroxidase unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und lässt aus den im Zellumen gebildeten phenolischen Vorstufen ein dreidimensionales Polymer entstehen (BERNARDS, 2002; BERNARDS et al., 2004).

Allgemein gilt Suberin als ein geordnetes und kompartimentiertes Netzwerk, in dem die SPPD räumlich von der SPAD getrennt vorliegt und mit der Zellwand über Zellwandpolysaccharide kovalent verknüpft ist (siehe Abb. 12). Dabei wirkt das Glycerol als strukturgebende Komponente und Brücke zwischen den

Monomereinheiten in der SPAD, aber auch zwischen SPAD und SPPD, und sorgt außerdem für eine lineare Anordnung der Säureeinheiten innerhalb des dreidimensionalen Polymers (GRAÇA und SANTOS, 2006; GRAÇA und SANTOS, 2007).

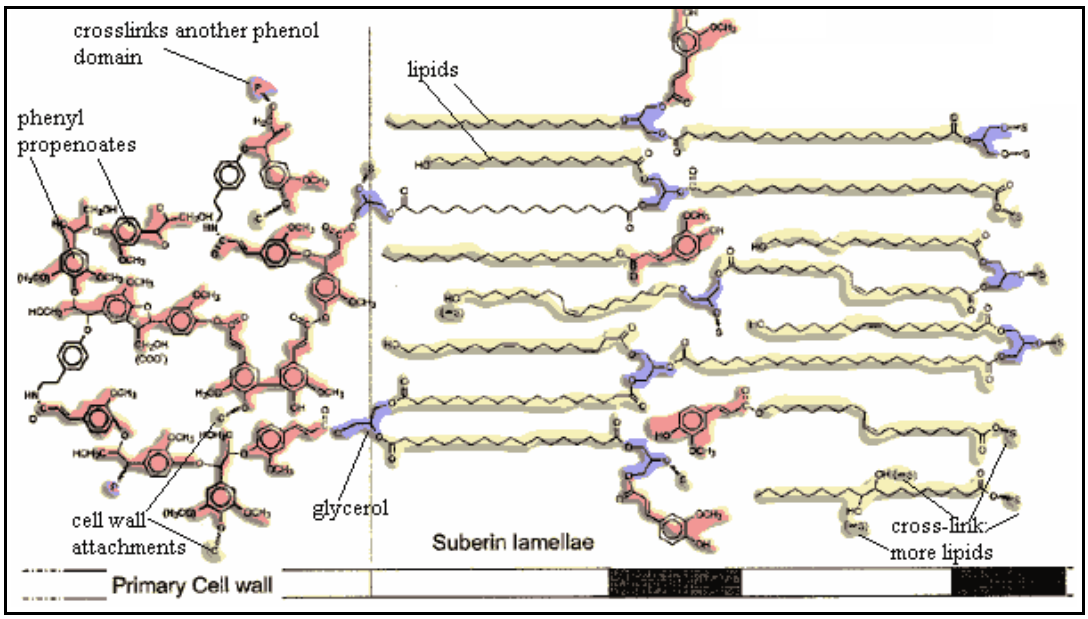



**Abb. 12: Vorgeschlagene Struktur des Suberins (aus: BERNARDS, 2002). Die SPPD und SPAD sind räumlich getrennt und über Glycerolbrücken miteinander verbunden. In der SPAD werden die Fettsäuren und Fettsäurederivate über Glycerol und Phenolcarbonsäuren verknüpft.**

Um den Bildungsprozess des Suberin-Polymers vollständig zu verstehen, müssen jedoch noch viele Fragen beantwortet werden, u.a. wie die Monomere der SPAD (Dicarbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren, Glycerol) auf makromolekularer Ebene zusammengesetzt werden.

### 1.2.2.5 Kutin

Oberirdische Pflanzenteile werden allgemein durch eine wachsartige Barriere, die Kutikula, abgegrenzt (MÜLLER und RIEDERER, 2005; SUH et al., 2005). Die Pflanzenkutikula ist nach außen mit einer Schicht aus Oberflächenwachsen überzogen und nach innen mit den äußeren Epidermiszellen über eine Pektinschicht verbunden. Da die Kutikula nicht nur als Barriere zur Außenwelt dient, sondern auch wichtige physiko-biochemische Funktionen (zum Beispiel Schutz vor Pathogenen

und vor unkontrolliertem Wasserverlust) ausübt, ist das Verständnis ihres Aufbaus von besonderer Relevanz.

Die Pflanzenkutikula besteht hauptsächlich aus löslichen Wachsen, unlöslichem Kutin und nicht abbaubarem Kutan. In Spuren kommen auch phenolische Bestandteile, Polysaccharide und Aminosäuren vor. Kutin ist normalerweise der Hauptbestandteil der Kutikula und kann bis zu 80 % der Trockenmasse ausmachen. Gelegentlich ist jedoch auch kein Kutin in Kutikulas nachzuweisen (DESHMUKH et al., 2005). Manche Kutikulas enthalten nur Kutin (*Lycopersicon esculentum*), andere nur Kutan (*Beta vulgaris*), wiederum andere beide Polymere (*Agave american*).

Kutin ist ein komplexes Polyesterpolymer, das vor allem aus veresterten oxidierten Fettsäuren (v.a. ω-Hydroxycarbonsäuren) mit einer Kettenlänge von 16 und 18 Kohlenstoffen besteht (DESHMUKH und SIMPSON, 2003; KALLIO et al., 2006; BLÉE und SCHUBER, 1993; HEREDIA, 2003; GRAÇA et al., 2002). Die hydroxylierten Fettsäuren besitzen teilweise zusätzliche funktionelle Gruppen (Hydroxyl-, Carboxyl- oder Epoxyl-Gruppen) (DESHMUKH et al., 2005; MÜLLER und RIEDERER, 2005; KALLIO et al., 2006), wodurch Quervernetzungen entstehen können. Besonders häufig kommen die Monomeren der Hydroxyhexadecan- und Hydroxyoctadecansäuren sowie deren Isomere vor, seltener langkettige Monomere ($C_{20}$-$C_{26}$), phenolische Verbindungen (Ferulasäure, Kaffeesäure) und Glycerol (MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; DESHMUKH et al., 2005; MÜLLER und RIEDERER, 2005). Einige Monomere von Kutin sind in Abb. 13 aufgeführt.

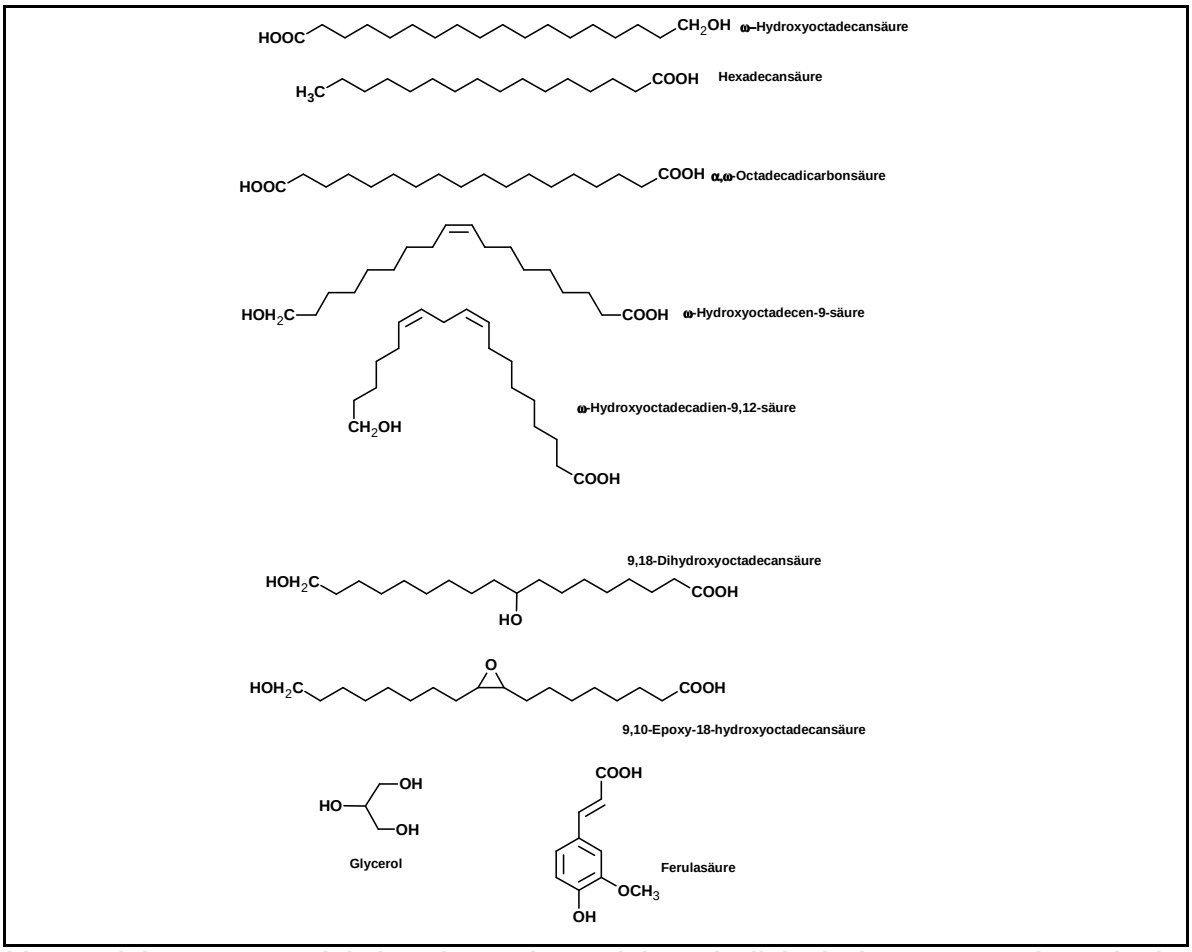



**Abb. 13: Einige Monomereinheiten des Kutins und der polyaliphatischen Domäne des Suberins**

Durch Verknüpfung der primären und sekundären Hydroxyl-Gruppen und der Carboxyl-Gruppen bilden die Monomere von Kutin ein komplexes, ausgedehntes, dreidimensionales Netzwerk. Dabei sind alle primären Hydroxyl-Gruppen und Carboxyl-Gruppen für die Kettenfortpflanzung verantwortlich, etwa die Hälfte der sekundären Hydroxyl-Gruppen sowie Epoxy-Gruppen sind in der Quervernetzung („Cross-links“) involviert, wobei Verzweigungen des Polymers zu einem dreidimensionalen Netzwerk entstehen (MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; PEÑA et al., 2001; KALLIO et al., 2006). Auch das anwesende Glycerol und die phenolischen Verbindungen können mit den Hydroxycarbonsäuren oder untereinander über Esterbindungen verknüpft vorkommen (GRAÇA et al., 2002; SUH et al., 2005).

Trotz vielfältiger Untersuchungen ist die exakte Beschaffenheit der Verknüpfungen und der Struktur im dreidimensionalen Polymer noch nicht geklärt (MCDOUGALL und SELVENDRAN, 2001; SUH et al., 2005; KALLIO et al., 2006). Kutin wird vor allem über Esterbindungen zusammengehalten, es treten jedoch auch andere Bindungsarten, zum Beispiel Ether-Bindungen entstanden aus Epoxy- und Hydroxyl-

Gruppen, auf (DESHMUKH et al., 2005; MÜLLER und RIEDERER, 2005; KALLIO et al., 2006). Die Struktur des Polymers hängt von der Kettenlänge sowie von Anzahl und Position der veresterbaren Gruppen in den Monomeren ab und kann ebenso wie die Zusammensetzung je nach Pflanzenspezies, Alter der Pflanze und Organ sowie Entwicklungsstufe variieren (KALLIO et al., 2006). Dadurch wird auch die Struktur und Funktionalität der Kutikula beeinflusst (DESHMUKH et al., 2005; KALLIO et al., 2006). Auch unklar ist der Biosyntheseweg einiger Monomere und wie sie in das Polymer eingebaut werden. Kenntnisse über die Biosynthese von Kutin basieren auf nur wenigen bis heute durchgeführten Studien. Drei Hauptmechanismen für die Biosynthese von Kutin werden diskutiert (siehe Abb. 14) (KOLATTUKUDY und WALTON, 1972; BLÉE und SCHUBER, 1993; HEREDIA, 2003):

i) ω-Hydroxylierung, Epoxidierung und Hydrolyse der aus der Glykolyse entstandenen Fettsäuren, dann Einbau in das Polymer.

ii) Epoxydierung der ungesättigten Fettsäuren, Hydrolyse, ω-Hydroxylierung und Einbau im Polymer.

iii) Epoxydierung, ω-Hydroxylierung und anschließend Hydrolyse, wobei diese letzte Weg biochemisch begünstigt zu sein scheint (BLÉE und SCHUBER, 1993).

Der Einbau synthetisierter Fettsäure-Derivate in das Polymer erfolgt möglicherweise unter Beteiligung von Coenzym A und ATP (SUH et al., 2005; CROTEAU und KOLATTUKUDY, 1974).

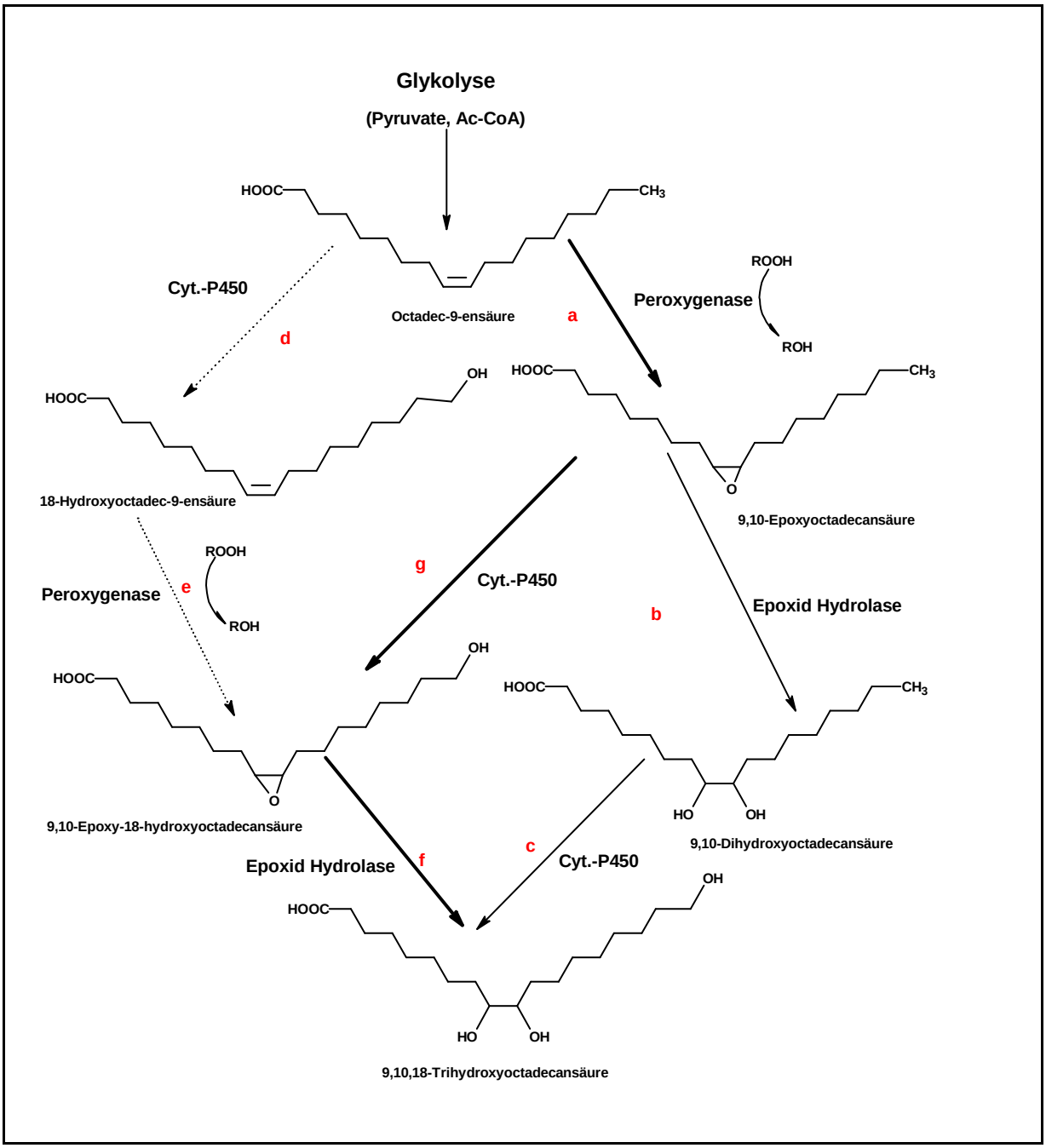



**Abb. 14: Schema möglicher Biosynthesewege aliphatischer Kutinmonomere in Pflanzen: die Biosynthese erfolgt unter Beteiligung unterschiedlicher Enzyme über drei Hauptwege, wobei die Kaskade a-g-f biochemisch begünstigt ist.**

Das in der Kutikula enthaltene Kutan stellt ein nicht verseifbares und nicht extrahierbares Polymer dar, dessen Struktur noch nicht vollständig geklärt ist (DESHMUKH et al., 2003; DESHMUKH et al., 2005; FRANKE et al., 2005). Es handelt sich um ein esterbindungsfreies Polymer. Es wird angenommen, dass Kutan hauptsächlich aus aliphatischen Komponenten wie Fettsäuren und Fettalkoholen, die über Etherbindungen miteinander verknüpft sind, und Kohlenhydraten besteht.

Zusätzlich konnten Alkane und ungesättigte Kohlenwasserstoffe im Kutan identifiziert werden (DESHMUKH et al., 2005).
Obwohl die SPAD von Suberin und Kutin ähnlich aufgebaut sind und beide Biopolymere ähnliche Aufgaben in den Pflanzen erfüllen, weisen Kutin und Suberin Unterschiede in ihrem strukturellen Aufbau auf und kommen in unterschiedlichen Pflanzengeweben vor. Während Kutin hauptsächlich in der Epidermis lokalisiert ist, stellt Suberin den Hauptbestandteil der Endodermis sowie der Exodermis von Pflanzenwurzeln dar (GRAÇA et al., 2002; OTTO und SIMPSON, 2006). Im Suberin ist neben der SPAD auch eine SPPD vorhanden, im Kutin hingegen nicht. Ein weiteres Merkmal, welches beide Polymere unterscheidet, sind die langkettigen α,ω-Dicarbonsäuren (> $C_{26}$), welche hauptsächlich in der SPAD des Suberins vorkommen und nur in vernachlässigbar geringen Anteilen im Kutin zu finden sind (GRAÇA und SANTOS, 2006; KALLIO et al., 2006).

#### 1.2.2.6 Wachse

Wachse sind im allgemeinen bei Raumtemperatur feste, in unpolaren bis mittelpolaren Lösungsmitteln gut lösliche Stoffe, die aus einem komplexen Gemisch aus langkettigen aliphatischen Verbindungen, zum Beispiel Alkane, Alkohole, Aldehyde, Fettsäuren und -ester, bestehen, wobei die Kettenlängen hauptsächlich zwischen 25 und 35 C-Atomen variieren (siehe Tab. 2) (BAUER et al., 2004). Zusätzlich kommen auch phenolische Verbindungen wie Triterpenoide und Derivate der Phenolcarbonsäuren vor (MÜLLER und RIEDERER, 2005; HEREDIA, 2003 BAUER, 2003; BAUER et al., 2004).
In der Kutikula aller oberirdischen Pflanzenteile ist Kutin in den sogenannten intrakutikularen Wachsen eingebettet. Darauf aufgelagert ist das kutikulare Wachs, entweder als amorpher Belag oder in vielfältigen kristallinen Strukturen (BAUER, 2003; HEREDIA, 2003). Das Oberflächenwachs übernimmt wichtige Aufgaben in den Pflanzen als Regulator des Wasserhaushaltes durch Verzögerung der Wasserverdampfung und als mechanische Barriere gegen biochemischen und physikalischen Stress. Die Biosynthese von Wachsen geht teilweise auf die Fettsäure-Biosynthese zurück und ist abhängig von der Wirkung der Elongase auf die Produkte der Fettsäure-Synthetase (MÜLLER und RIEDERER, 2005). Dabei werden als Produkte der Fettsäure-Biosynthese v.a. $C_{16:0}$ und $C_{18:0}$ gebildet. Diese

Produkte unterliegen anschließend einer Oxidation und einer Elongation unter Ausbildung höherer Homologe. Die Zusammensetzung und Konzentration der Wachse sind von der Pflanzenart, dem Gewebe und vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig. Sie können außerdem auch durch die klimatischen Bedingungen (Temperatur, Lichtintensität und Luftfeuchtigkeit) beeinflusst werden. Eine grobe Unterteilung der Wachsbestandteile kann in aliphatische Stoffe unterschiedlicher Oxidationsstufen und aromatische Stoffe (aus Triterpenoiden oder Phenolcarbonsäuren) erfolgen (BAUER, 2003).

**Tab. 2: Die häufigsten Bestandteilen Pflanzlicher kutikularer Wachse**

| Stoffklasse | Struktur | Anzahl der C-Atome |
|---|---|---|
| n-Alkane | $CH_3(CH_2)_nCH_3$ | 21-35 |
| Alkene | $CH_3(CH_2)_nCH{=}CH(CH_2)_mCH_3$ | 17-33 |
| Aldehyde | $CH_3(CH_2)_nCHO$ | 24-36 |
| Ketone | $CH_3(CH_2)_nCO(CH_2)_mCH_3$ | 21-35 |
| Sekundäre Alkohole | $CH_3(CH_2)_nCH(OH)(CH_2)_mCH_3$ | 21-35 |
| β-Diketone | $CH_3(CH_2)_nCOCH_2CO(CH_2)_mCH_3$ | 22-36 |
| Primäre Alkohole | $CH_3(CH_2)_nCH_2OH$ | 22-40 |
| Fettsäuren | $CH_3(CH_2)_nCOOH$ | 20-24 |
| Wachsester | $CH_3(CH_2)_nCOO(CH_2)_mCH_3$ | 36-60 |
| ω-Hydroxycarbonsäure | $HOCH_2(CH_2)_nCOOH$ | 10-34 |
| α,ω-Diole | $HOCH_2(CH_2)_n\ CH_2OH$ | 20-32 |

## 1.3 Problemstellung

BS weisen abhängig von deren Struktur eine Reihe positiver ernährungsphysiologischer Eigenschaften auf und gewinnen in den Ernährungsgewohnheiten der Verbraucher wieder mehr an Bedeutung. Lignine sind Bestandteile des Ballaststoffkomplexes und tragen zu den ernährungsphysiologischen Eigenschaften der BS bei: Durch Lignin wird die Fermentierbarkeit von BS im Darm verzögert, und lignifizierte BS können potentiell kanzerogen wirkende heterozyklische aromatische Amine adsorbieren, wodurch das Darmkrebsrisiko verringert wird.

Dennoch fehlt es an analytischen Methoden, die den exakten Ligningehalt pflanzlicher Materialien bestimmen können. Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Ligninbestimmung ist die Klason-Lignin-Methodik. Dabei wird als Klason-Lignin (KL) ein säureunlöslicher Rückstand bestimmt. Kenntnisse über die Zusammensetzung des so gewonnenen Rückstands aus BS sind limitiert. Fraglich ist, ob im KL tatsächlich ausschließlich Lignin gemäß der Definition enthalten ist oder ob andere Substanzen mitbestimmt werden und zu welchem Anteil diese im Rückstand vorkommen.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung von KL aus UBS. Dazu sollten KL aus Getreide (Weizen, Roggen), Gemüseproben (Grünkohl, Möhre) und Obstproben (Kiwi, Birne) auf Verbindungen untersucht werden, die neben Lignin im KL vorliegen können: Kutin, Suberin, Wachse, Strukturproteine sowie Mineralstoffe. Die Gehalte dieser Verbindungen sollten zur Berechnung von korrigierten KL-Gehalten als Näherung für die Ligningehalte in Ballaststoffproben herangezogen werden. Die so korrigierten KL-Gehalte sollten mit ABSL-Gehalten (ABSL-acetylbromide soluble lignin; acetylbromidlösliches Lignin) der BS verglichen werden. Um die ABSL-Methode, eine weitere Methode zur Ligninbestimmung in pflanzlichen Materialien, auf Ballaststoffproben anwenden zu können, sollten pflanzenspezifische Extinktionskoeffizienten der derivatisierten Lignine ermittelt werden.

Letztendlich sollten die Ergebnisse dieser Arbeiten dazu beitragen, eine verbesserte Methodik für die Bestimmung von Ligninen in BS vorzuschlagen.

Des Weiteren sollten neue Erkenntnisse über Zusammensetzung, Lokalisierung und Gehalte von Ligninen in pflanzlichen Lebensmitteln gewonnen werden. Hierzu sollten essbare Anteile von Pflanzen in die verschiedenen Gewebe unterteilt werden und

mittels analytischer Bestimmungsmethoden auf Ligningehalte und Ligninzusammensetzung analysiert werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Untersuchungsmaterial, Probenvorbereitung und Probenfraktionierung

### 2.1.1 Untersuchungsmaterial

Die Isolierung von UBS und KL erfolgte aus Getreide (Weizen, Roggen), Obst (Birne, Kiwi) und Gemüse (Möhre, Grünkohl) gemäß den in Kap. 2.3 und 2.5 beschriebenen Methoden. Die Getreide-Proben wurden in einem Hamburger Reformhaus gekauft. Die Obst- und Gemüse-Proben (mit Ausnahme des Grünkohls) wurden vom Biohof Timmermann in Hamburg bezogen. Die von den Händlern bestätigten Angaben über Art, Anbauort und -jahr sind in Tab. 3 dargestellt.

**Tab. 3: Angaben über das verwendete Untersuchungsmaterial**

| Materialien | | Botanische Bezeichnung | Sorte/ Varietät | Anbauort | Anbau-jahr | Einsatz, Behandlung |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Getreide | Weizen | *Triticum aestivum* L. | - | Deutschland | 2005 | volles Korn |
| | Roggen | *Secale cereale* L. | - | Deutschland | 2005 | volles Korn |
| Obst | Birne | *Pyrus communis L.* | Packham | Spanien | 2006 | ungeschält, Entfernung des Kerngehäuses |
| | Kiwi | *Actinidia deliciosa* | Hayward | Frankreich | 2007 | Geschält |
| Gemüse | Grünkohl | *Brassica oleracea* L. | Sabellica | Deutschland | 2005 | |
| | Möhre | *Daucus carota* L. | Janette | Deutschland | 2007 | ungeschält |

### 2.1.2 Probenvorbereitung und -fraktionierung

Nach dem Waschen und Schälen (je nach Probe) wurden die essbaren Anteile der Proben eingewogen, eingefroren und anschließend gefriergetrocknet sowie ausgewogen. Die gefriergetrockneten Obst- und Gemüse-Proben und die vorgetrockneten Getreide-Proben wurden in einer Mühle auf einen Partikeldurchmesser < 0,5 mm vermahlen. Des Weiteren wurden Möhren, Kiwis und Birnen fraktioniert. Dazu wurden die Proben gewaschen, Schale, Fruchtfleisch, Kern, Zylinder sowie Samen isoliert (siehe Tab. 4) und wie beschrieben aufgearbeitet. Die vermahlenen Proben wurden für die Bestimmung der UBS eingesetzt. Eine genaue Arbeitsanweisung ist in Kap. 5.3.1.1 beschrieben.

**Tab. 4: Fraktionen der Birnen-, Kiwi- und Möhren-Proben**

| Proben | Fraktionen | Botanische Bezeichnung | Abkürzung |
|---|---|---|---|
| Kiwi | Fruchtfleisch | Mesokarp/Endokarp | KFF |
| | Samen | Samen | KSa |
| | Kern | Columella | KCo |
| Birne | Schale | Perikarp | BiSch |
| | Fruchtfleisch | Hypanthium (Blütenboden) | BiFF |
| Möhre (Bastrübe) | Schale | Exodermis | MSch |
| | Fruchtfleisch | Bastkörper | MFF |
| | Zylinder | Holzkörper | MZ |

## 2.2 Trockengewichtbestimmung von Getreiden

Da die Getreideproben vorgetrocknet vorlagen und einen niedrigen Wassergehalt aufwiesen, wurde zur genauen Bestimmung deren Trockengewichte die indirekte Methode nach Karl-Fischer eingesetzt (MATISSEK und STEINER, 2006). Zur Wasserbestimmung nutzt man die Umsetzung von Schwefeldioxid und Iod zu Schwefelsäure und Iodid (Bunsen-Reaktion), die nur in Gegenwart von Wasser abläuft. Eine genaue Arbeitsanweisung ist im Anhang unter Kap. 5.3.1.1 dargestellt.

## 2.3 Bestimmung und Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe

Die Bestimmung von BS erfolgt enzymatisch-gravimetrisch oder enzymatisch-chemisch. Bei den enzymatisch-chemischen Methoden wird Stärke enzymatisch abgebaut und Nicht-Stärkepolysaccharide, Lignin und, je nach Methode, resistente Stärke werden chemisch bestimmt. Die enzymatisch-chemischen Methoden unterscheiden sich untereinander hauptsächlich durch die erfassten Ballaststoffkomponenten; dabei wird zwischen der ENGLYST-, der UPPSALA- und der SOUTHGATE-Methode unterschieden. Bei der UPPSALA-Methode zählen Lignin (als KL bestimmt) und resistente Stärke zu den Ballaststoffbestandteilen, bei der ENGLYST-Methode werden diese jedoch nicht als Ballaststoffkomponenten erfasst (THEANDER und ÅMAN, 1979; THEANDER et al., 1994; THEANDER et al., 1995; ENGLYST et al., 1994; QUIGLEY und ENGLYST, 1994). Dies erklärt, dass mit der UPPSALA-Methode häufig höhere Ballaststoffgehalte als mit der ENGLYST-Methode bestimmt werden. Bei den enzymatisch-gravimetrischen Methoden werden neben der Stärke auch Proteine enzymatisch abgebaut. Lösliche Polymere werden mit Ethanol gefällt. Die Rückstände werden gravimetrisch bestimmt und um den Restproteingehalt und Aschegehalt korrigiert. Mehrere enzymatisch-gravimetrische Methoden zur Bestimmung von Ballaststoffen werden von der AOAC (Association of Official Analytical Chemists) anerkannt (siehe Tab. 5).

**Tab. 5: Anerkannte AOAC-Methoden zur Bestimmung von Ballaststoffen in Lebensmitteln**

| AOAC Nr. | Methode | Bestimmte Ballaststoff | Autoren |
|---|---|---|---|
| 985.29 | EG | GBS | Prosky et al. |
| 991.42 | EG | UBS | Prosky et al. |
| 993.19 | EG | LBS | Prosky et al. |
| 991.43 | EG | GBS, UBS, LBS | Lee et al. |
| 992.16 | EG | GBS | Mongeau, Brassard |
| 993.21 | Nicht-EG | GBS | Lee, Cardozo |
| 994.13 | EC | GBS | Theander et al. |

GBS, Gesamtballaststoffe; LBS, lösliche Ballaststoffe; UBS, unlösliche Ballaststoffe; EG, enzymatisch-gravimetrisch; EC, enzymatisch-chemisch

Die erste offizielle enzymatisch-gravimetrische Methode zur Bestimmung von GBS (AOAC-Methode 985.29) wurde 1986 verabschiedet und auf die separate Bestimmung von LBS und UBS ausgeweitet. Daraus entstanden die AOAC-

Methoden 991.42, 993.19 und 991.43 (PROSKY et al., 1992; PROSKY et al., 1994; LEE et al., 1992). Während die UBS-Bestimmung nur die wasserunlöslichen Polymere umfasst, werden bei der LBS-Bestimmung die wasserlöslichen Polymere in ca. 80 % Ethanol ausgefällt und als LBS erfasst. Die Summe aus LBS und UBS stellt dann die GBS dar.

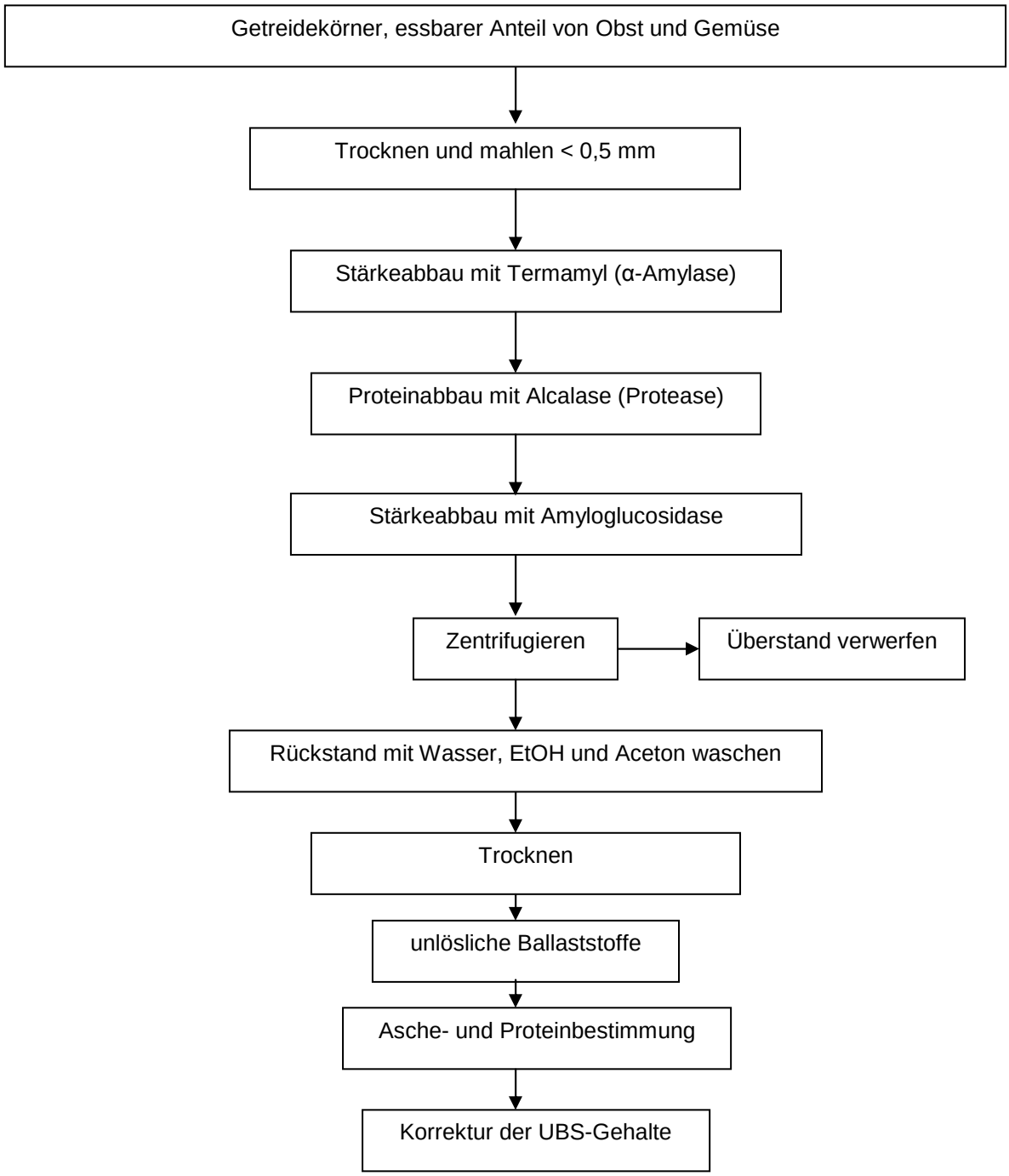



**Abb. 15: Schema zur Bestimmung und Korrektur der Gehalte an unlöslichen Ballaststoffen, UBS – unlösliche Ballaststoffe**

Die hier durchgeführte Isolierung und Bestimmung von UBS basiert auf der offiziellen AOAC-Methode 985.29, die von BUNZEL et al. (2005) auf präparative Verhältnisse angepasst wurde (siehe Abb. 15). Dazu wurden die getrockneten und gemahlenen Proben in Phosphatpuffer suspendiert und bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen nacheinander mit Termamyl (hitzestabile α-Amylase), Alcalase (Protease) und Amyloglucosidase inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen mit heißem destillierten Wasser wurden die Kohlenhydrat- und Proteinabbauprodukte sowie die LBS von den als Rückstand erhaltenen UBS abgetrennt.
Zur Abtrennung lipophiler Verbindungen sowie zur Vorbereitung der Trocknung wurde anschließend mit Ethanol und Aceton gewaschen. Die gewonnenen UBS wurden über Nacht im Vakuumtrockenschrank getrocknet und ausgewogen. Die genaue Arbeitsvorschrift ist im Anhang unter Kap. 5.3.1.2 und 5.3.1.3 beschrieben.

## 2.4 Restprotein- und Aschekorrektur der unlöslichen Ballaststoffe

Die Gehalte der isolierten nicht-korrigierten UBS wurden gemäß Abb. 15 um Restprotein und Asche korrigiert. Als Restprotein werden die nicht enzymatisch abbaubaren Proteine, überwiegend Strukturproteine, bezeichnet.
Die Korrektur von Asche wurde nach der Methode der amtlichen Untersuchungsverfahren gemäß §64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB), Nr. L06.00-4, durchgeführt. Dabei wurden die eingesetzten UBS verascht und der Aschegehalt durch Differenzwägung ermittelt.
Die Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach der Methode von Willis et al. (1996) nach Kjeldahl-Aufschluss (§64 LFGB, Nr. L0600-7). Zur Umrechnung zwischen dem ermittelten N-Gehalt und dem Proteingehalt wurde der Umrechnungsfaktor 6,25 verwendet. Bei der photometrischen Stickstoffbestimmung wurde durch den Einsatz von Natriumsalicylat als Farbreagenz eine hohe Empfindlichkeit und höhere Stabilität des Farbkomplexes im Vergleich zum Phenol erreicht. Eine geringere Toxizität ist ebenfalls von Vorteil (FUKOMOTO und CHANG, 1982; WILLIS et al, 1996; NKONGE und BALLANCE, 1982).
Eine genaue Arbeitsvorschrift für die Bestimmung des Restproteins und der Asche in den nicht-korrigierten UBS ist dem Anhang 5.3.3 und 5.3.4 zu entnehmen.

## 2.5 Isolierung und Bestimmung von Klason-Ligninen

Die Bestimmung des Ligningehalts in pflanzlichen Materialien ist über Jahrzehnte der Schwerpunkt mehrerer Studien gewesen. Die ersten Methoden wurden zur Ligninbestimmung in Holz entwickelt (JOHNSON et al., 1961; LAI und SARKANEN, 1971; HATFIELD et al., 1994) und später auf weitere Pflanzen und Lebensmittel angepasst (HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005). Die bis jetzt vorgeschlagenen Bestimmungsmethoden können in zwei Kategorien unterteilt werden: gravimetrische (zum Beispiel KL, Säure Detergens Lignin (acid detergent lignin, ADL)) und spektroskopische Methoden mit und ohne vorherige Lignin-Extraktion (ABSL, Nahinfrarotspektroskopie (NIRS), Kernresonanzspektroskopie (NMR)) (HATFIELD et al., 1994, HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005; KIRK und OBST, 1988; MATSUMOTO et al., 1984). Viele dieser Methoden haben gemeinsam, dass sie häufig unspezifisch sind und daher nicht zu einer genauen Bestimmung des Ligningehaltes führen. Beispielsweise werden bei der Durchführung von KL und ADL Anteile an Lignin während des Bestimmungsprozesses hydrolysiert (bis zu 50 % bei ADL). Andererseits werden bei der KL-Bestimmung auch Nicht-Lignin-Komponenten, zum Beispiel Strukturproteine, teilweise erfasst. Andere Methoden, die spezifisch sind (zum Beispiel NMR), sind extrem aufwendig. Die Methoden, die eine Extraktion des Lignins beinhalten, haben das Problem, dass eine vollständige Ligninextraktion nur schwer zu erreichen scheint.

In den meisten Arbeiten wird Lignin als KL bestimmt. Diese Methode wurde ursprünglich von KLASON entwickelt (KLASON, 1908; HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005), durch ELLIS et al. (1946) erprobt und von THEANDER und WESTERLUND auf Lebensmittel angewendet (THEANDER und WESTERLUND, 1986). Dabei werden die Pflanzenzellwandbestandteile, v.a. Cellulose, mit einer 72 %igen (v/v), schwefelsauren Lösung vorhydrolysiert. Die Vorhydrolyse trägt dazu bei, die Struktur der Zellwände zu öffnen. Die eigentliche Hydrolyse der Kohlenhydrate, Proteine, etc. erfolgt in verdünnter, schwefelsaurer Lösung in der Hitze. Nach der Hydrolyse wird der Rückstand nach Waschen und Trocknung gravimetrisch bestimmt (HATFIELD et al., 1994, HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005; KIRK und OBST, 1988; MATSUMOTO et al., 1984). Über Jahre wurde versucht, die KL-Methode zu optimieren, wobei die Anpassung auf Gräser und Lebensmittel allgemein große Schwierigkeiten machte, da weitere Bestandteile wie Strukturproteine, Asche und sehr wahrscheinlich

Maillard-Produkte, Wachse, Kutin sowie Suberin teilweise mitbestimmt werden (MONGEAU und BROOKS, 2001; HATFIELD et al., 1994; HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005; LAI und SARKANEN, 1971; BUNZEL et al., 2005; BUNZEL et al., 2006). Eine weitere Problematik bei der Durchführung der KL-Methode entsteht durch einen teilweisen Abbau des Lignins während der Hydrolyse (etwa 5 %). Dieser ist dadurch bedingt, dass die Etherbindungen im Ligninpolymer durch die drastischen Abbaubedingungen (konzentrierte Schwefelsäure, hohe Temperatur) teilweise gespalten werden (HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005). Für die Bestimmung des KL nach THEANDER und WESTERLUND (1986) wurde das Untersuchungsmaterial erst im Eisbad, dann bei Raumtemperatur (RT) in 12 M Schwefelsäure suspendiert, mit Wasser auf 2 M Schwefelsäure verdünnt und in der Hitze hydrolysiert (100 °C, 2 h). Das Hydrolysat wurde unter Vakuum über Glasfaserfilter filtriert, der Rückstand gewaschen und nach Trocknung ausgewogen. Eine genaue Durchführung ist im Anhang 5.3.5 beschrieben.

## 2.6 Photometrische Untersuchung der Klason-Lignin-Waschlösung

Bei dem KL-Verfahren kann Lignin teilweise hydrolysiert und mit den Hydrolyseprodukten ausgewaschen werden (HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005). Um dies zu überprüfen, wurde das KL-Filtrat auf die Anwesenheit von niedermolekularen Ligninbruchstücken, die UV-Aktivität aufweisen, photometrisch untersucht. Da die photometrische Erfassung der niedermolekularen Ligninbruchstücke im KL-Filtrat durch andere Zellwandbestandteile erschwert würde, wurden die oligomeren Ligninbruchstücke mit Ethylacetat aus der neutralisierten, wässrigen Lösung extrahiert. Der Ethylacetatextrakt wurde mittels UV im Wellenlängebereich 190-300 nm untersucht. Da neben Ligninoligomeren auch andere phenolische Pflanzenbestandteile (zum Beispiel Hydroxyzimtsäurederivate) UV-aktiv sind, wurden die Ergebnisse der photometrischen Messung zusätzlich mittels DFRC (derivatization followed by reductive cleavage) abgesichert. Dabei werden Monolignole aus den Oligomeren freigesetzt, gaschromatographisch getrennt und mittels Massenspektromerie (MS) identifiziert (siehe auch 2.14). Die genauen Arbeitsvorschriften sind den Anhängen 5.3.6 und 5.3.15 zu entnehmen.

## 2.7 Gravimetrische Bestimmung des Aschegehalts und des Restproteingehalts im Klason-Lignin

Die Bestimmung des Aschegehalts im KL erfolgte gemäß des in Kap. 2.4 beschriebenen Verfahrens. Eine genaue Arbeitsanweisung ist Anhang 5.3.4 zu entnehmen. Die Bestimmung des Restproteingehalts erfolgte ebenfalls gemäß Kap. 2.4. Eine genaue Arbeitsvorschrift ist im Kap. 5.3.3 aufgeführt.

## 2.8 Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung von unlöslichen Ballaststoffen und Klason-Ligninen

Die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide in den UBS mittels Gaschromatographie (GC) erfolgte zur Charakterisierung der BS. In den KL hingegen sollten keinerlei Kohlenhydrate mehr nachweisbar sein. Um jedoch zu untersuchen, ob durch die einmalige saure Hydrolyse während der KL-Gewinnung tatsächlich alle Kohlenhydrate hydrolysiert wurden oder ob noch Restkohlenhydrate vorhanden waren, wurden auch die KL untersucht.

Die Charakterisierung und Bestimmung der Polysaccharidmonomere erfolgte nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung gaschromatographisch in Form der Alditolacetatderivate. Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode wurde vielfach publiziert und angewendet (ALBERSHEIM et al., 1996; SAEMAN et al., 1954; BLANKENEY et al., 1983; ENGLYST et al., 1994; THEANDER et al., 1994; BUNZEL et al., 2001). Kritisch bei dieser Methode ist die Optimierung der Hydrolysebedingungen. Problematisch hierbei ist, dass freigesetzte Monosaccharide unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse teilweise zersetzt werden können.

Insgesamt kann die Methode in drei Schritte eingeteilt werden (siehe Abb. 16):

i) Vorquellung in 12 M Schwefelsäure und Hydrolyse mit 2 M Schwefelsäure bei 100 °C.

ii) Reduktion der entstandenen Monosaccharide mit Natriumborhydrid und Entfernung des überschüssigen Reagenz mittels Eisessig.

iii) Acetylierung der Alditole durch Zugabe von Essigsäureanhydrid und 1-Methylimidazol (als Katalysator) unter Bildung der Alditolacetate.

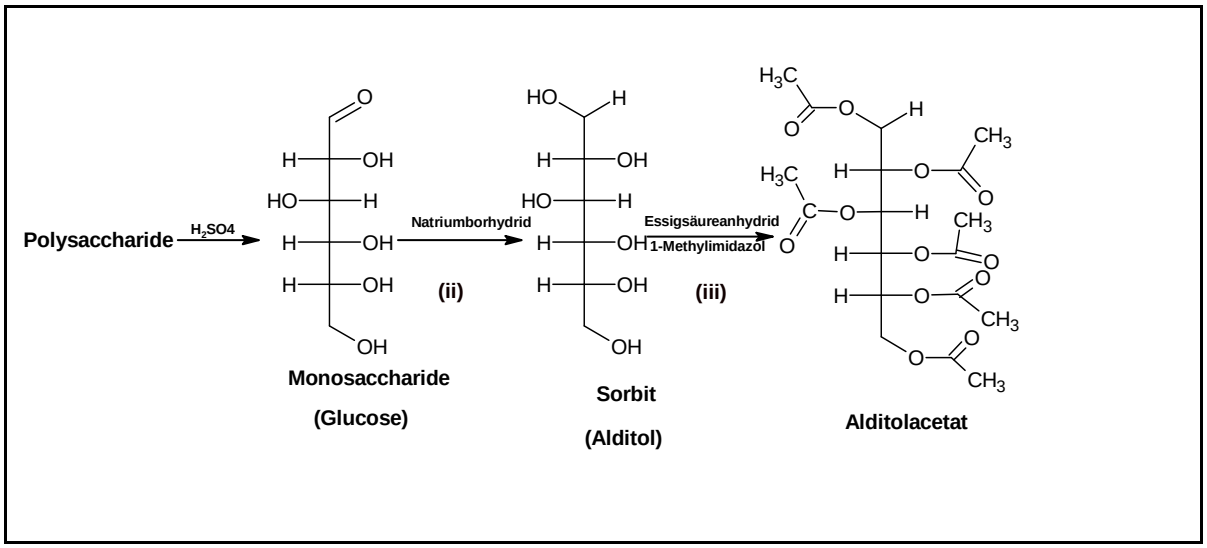



**Abb. 16: Mechanismus der Umsetzung der Kohlenhydrate zu den Alditolacetaten am Beispiel von Glucose**

Die so gebildeten Alditolacetate wurden mit Chloroform extrahiert, gaschromatographisch getrennt und massenspektrometrisch detektiert. Die Monosaccharide wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit externen Standardsubstanzen identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte über die Methode des internen Standards. Eine ausführliche Arbeitsanweisung, die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm befinden sich jeweils im Anhang 5.1.1 und 5.3.7. Ein Beispielchromatogramm ist in Kap. 5.5.1.1 abgebildet.

## 2.9 Charakterisierung und Bestimmung von Wachs- und Fettbestandteilen in Klason-Ligninen

### 2.9.1 Extraktion und gravimetrische Bestimmung

Methoden zur Extraktion von Wachsen basieren auf den physikochemischen Merkmalen der Wachsbestandteile. Abhängig von den lipophilen Eigenschaften der Wachse wurden mehrere unpolare Lösungsmittel bzw. deren Kombinationen zur Extraktion angewendet: Chloroform (SUH et al., 2005; KALLIO et al., 2006; BAKER et al., 1979; MARTINS et al., 1999), Hexan (TULLOCH, 1983), Diethylether (SPENCE et al., 1983), Petrolether (SALASOO, 1982) und Ethylacetat (SPENCE et al., 1983). In 2004 beschrieben BAUER et al. ein Lösungsmittelgemisch zur Extraktion von Wachsen, das Vorteile im Vergleich zu Chloroform oder Hexan bietet: durch die Extraktion der Wachsbestandteile mit methanolischem tertiären

Butylmethylether (TBME/MeOH (9+1)) können auch mittelpolare Wachsbestandteile erfasst werden; ebenso wird dadurch die Toxizität im Vergleich zu Chloroform gemindert (BAUER, 2003; BAUER et al. 2004a; BAUER et al., 2004b; BAUER et al., 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführte Extraktion basiert auf der Methode von BAUER et al. (2004a), wurde jedoch modifiziert. Abweichend von der Originalvorschrift wurden Extraktionen sowohl einmal 24 h und zweimal jeweils 24 h unter ständigem Rühren durchgeführt. Die Extraktausbeuten wurden nach Trocknung gravimetrisch bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass eine einmalige 24-stündige-Extraktion ausreichend war, da sich die Extraktionsausbeuten der zweimaligen und der einmaligen 24-stündigen-Extraktion nur minimal unterschieden. Da vermutlich auch Ester und Restfette in den Extrakten vorhanden sind, wurde vor der chromatographischen Untersuchung mit methanolischem Bortrifluorid umgeestert (siehe Kap. 2.9.2).
Das Schema zur Durchführung der Wachs- und Fettextraktion ist in Abb. 17 aufgeführt, die genaue Arbeitsanweisung ist Kap. 5.3.8 zu entnehmen.

### 2.9.2 Gaschromatographische Charakterisierung der Wachs- und Fettbestandteile

Die früher eingesetzten klassischen Techniken zur Trennung bzw. Quantifizierung der Wachsbestandteile wie zum Beispiel Dünnschichtchromatographie (MISRA und GOSCH, 1990), UV-Spektroskopie (KOLATTUDUKY, 1980) und IR-Spektroskopie (WALTON, 1990) werden durch moderne Bestimmungsmethoden wie GC und HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie) ersetzt. Dies geht einher mit einem beträchtlichen Gewinn an Informationen. In Kombination mit der MS können Informationen über Molmasse, Struktur und Position funktioneller Gruppen gewonnen werden. Die extrahierten Wachs- und Fettbestandteile wurden nach Umesterung (s. 2.9.1) und Silylierung an einer Kapillarsäule getrennt (KALLIO et al., 2006) und durch Vergleich der Massenspektren mit der Literatur (BAUER, 2003; EGLINTON et al., 1968; HOLLOWAY und DEAS, 1971; WALTON und KOLATTUDUKY, 1972) sowie durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von käuflich erwerbbaren Standardsubstanzen identifiziert.
Einige der eingesetzten Standardsubstanzen wurden vor der gaschromatographischen Analyse silyliert und lagen als Trimethylsilylester

(Hexadecansäure und Octadecansäure) oder als Trimethylsilylether (Glycerol und β-Sitosterol) vor. Eicosansäure wurde in der Form des Methylesters analysiert. Hydroxydocosansäure lag als Methylester vor, wurde vor der gaschromatographischen Analyse silyliert und als Methylester, Trimethylsilylether eingesetzt. Die Durchführung, Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Kap. 5.3.8 und 5.1.1 zu entnehmen. Beispiel- und Standardchromatogramme sind im Kap. 5.5.1.2 abgebildet.

## 2.10 Charakterisierung und Bestimmung von Kutin- und Suberinmonomeren in Klason-Ligninen

### 2.10.1 Depolymerisierung, Extraktion und gravimetrische Bestimmung

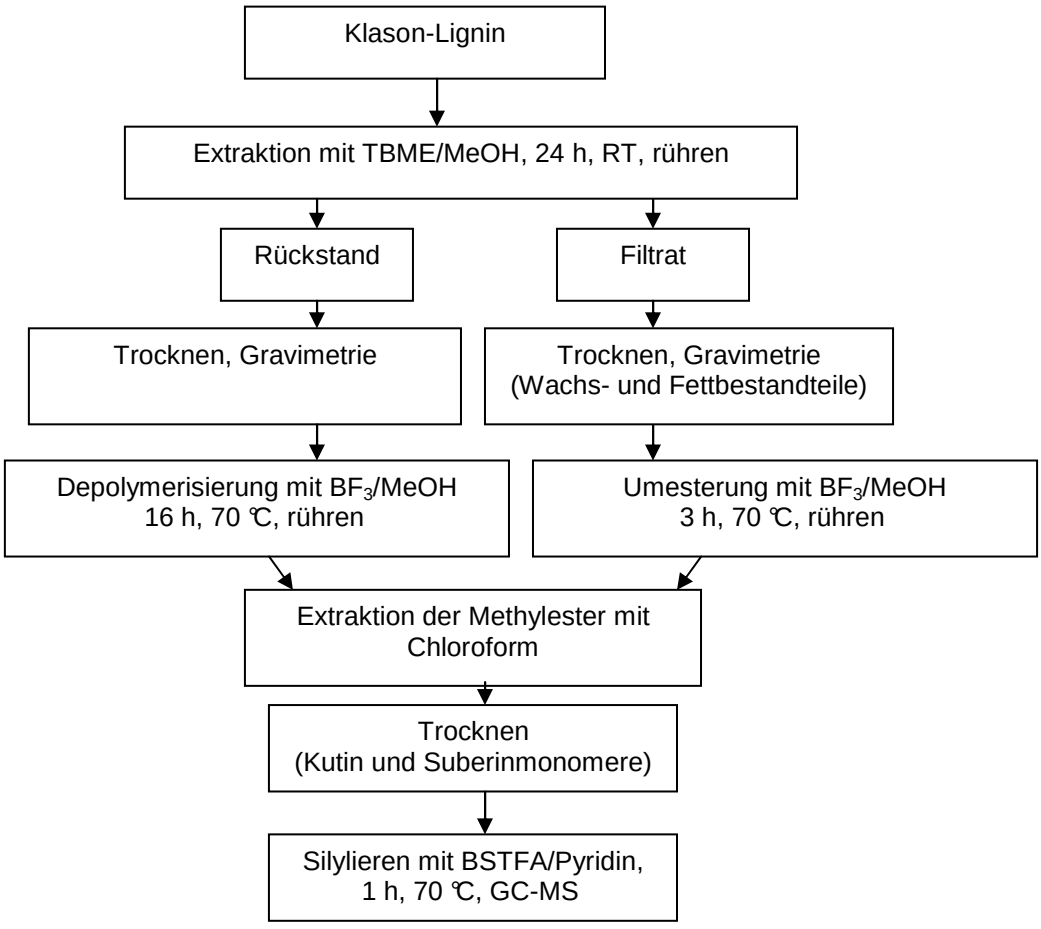



**Abb. 17: Schematische Darstellung der Isolierung und Charakterisierung von Wachs- und Fettbestandteilen sowie von Kutin- und Suberinmonomeren**

Da Kutin und Suberin Polyesterpolymere darstellen, ist die Untersuchung der Monomerenzusammensetzung dieser Verbindungen an die Spaltung von Esterbindungen (Depolymerisierung) gekoppelt. Mehrere Methoden zur Depolymerisierung von Kutin und Suberin werden in der Literatur beschrieben, u. a. die chemische und die enzymatische Depolymerisierung. Die enzymatische Depolymerisierung von Kutin findet unter Einsatz von Kutinase statt (PURDY und KOLATTUKUDY, 1973), für Suberin sind keine Enzyme bekannt. Zu den meist verwendeten chemischen Methoden gehören die Methanolysen mit Bortrifluorid/Methanol ($BF_3$/MeOH), Natriummethanolat/Methanol (NaOMe/MeOH) und Kaliumhydroxid/Methanol (KOH/MeOH) (KOLATTUDUKY, 1980b; OSMAN et al., 1995; BERNARDS, 2002; BONAVENTURE et al., 2004; KALLIO et al., 2006; ZEIER und SCHREIBER, 1998; BERNARDS, 2002; WATTERDORFF, 1980). Die daraus entstehenden Monomere liegen als Methylester vor. Früher wurde auch die Hydrogenolyse mit Lithiumaluminiumhydrid ($LiAlH_4$) als Depolymerisierungsmethode für Kutin und Suberin eingesetzt (BONAVENTURE et al., 2004). Dies ist heute nicht mehr der Fall, da bei diesem Verfahren mit Verlusten an Informationen zu rechnen ist: Carboxyl- und Epoyxgruppen werden reduziert, Dicarbonsäuren können nicht mehr von ω–Hydroxy-Carbonsäuren unterschieden werden, native und aus Epoxyfettsäuren hervorgehende 9- und 10-Hydroxyfettsäuren lassen sich ebenso nicht mehr unterscheiden (RIEDERER und SCHÖNHERR, 1988a).

In dieser Arbeit wurde zur Depolymerisierung von Kutin und Suberin die Methanolyse mit $BF_3$ eingesetzt. Diese Methode ist eine saure Alkoholyse, wobei das $BF_3$ als Katalysator (Lewis-Säure) wirkt und den nucleophilen Angriff des Methanols auf den Ester-Kohlenstoff mit partiell positiver Ladung ermöglicht. Am Ende der Reaktion wird das $BF_3$ zurückgewonnen und der Methylester gebildet. Abb. 18 stellt den Mechanismus zur sauren Umesterung mit methanolischem $BF_3$ dar.

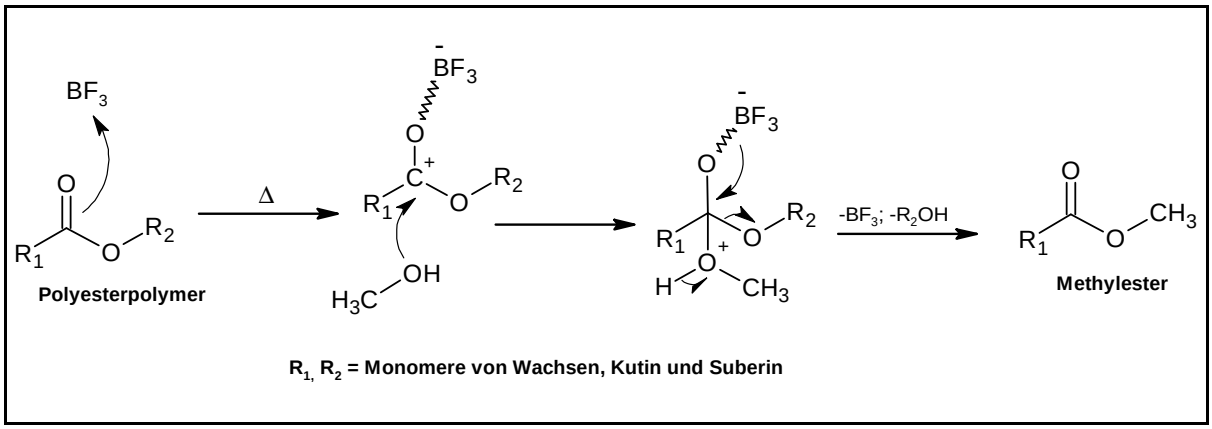



**Abb. 18: Mechanismus der säurekatalysierten Umesterung von Wachsen, Kutin oder Suberin**

Die Depolymerisierung mit methanolischem $BF_3$ ist effektiver als die mit methanolischem Natriummethanolat, aber die Neigung zur Artefaktbildung ist höher. Epoxyfettsäuren werden zu deren Methoxy-Hydroxy-Derivaten umgewandelt und der Verlust an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist häufig beobachtbar (BONAVENTURE et al., 2004; CHRISTIE, 2003). Ein weiteres Problem bei der Methanolyse allgemein ist die strenge Notwendigkeit, unter Feuchtigkeitsausschluss zu arbeiten, um die unkontrollierte Entstehung von NaOH und HF aus NaOMe bzw. $BF_3$ und die so unkontrollierte Induktion von Nebenprodukten (vic-Diole, Fluorhydrine) auszuschließen (RIEDERER und SCHÖNHERR, 1988a).

Die nach der Umesterung mit $BF_3$ erhaltenen Produkte (Methylester der Fettsäuren, Glycerol u. a.) wurden mit Chloroform extrahiert und nach Trocknung gravimetrisch bestimmt. Da Kutin- und Suberinbestandteile als Monomere in Form ihrer Methylester gravimetrisch bestimmt wurden, müssen Korrekturfaktoren ermittelt werden, um den wahren Gehalt an Kutin- und Suberinmonomeren (KSM) in den KL anzunähern. Dazu wurden standardmäßig Korrekturfaktoren für Hydroxyhexadecansäure und Hydroxyoctadecansäure (Hauptbestandteile von Kutin und Suberin) bestimmt und verwendet. Dies wird in Kap. 3.2.3.3.1 näher beschrieben.

Die genaue Arbeitsanweisung zur Depolymerisierung von Kutin und Suberin ist im Anhang unter Kap. 5.3.9 aufgeführt, das Arbeitsschema in Abb. 17.

### 2.10.2 Charakterisierung der Kutin- und Suberinmonomere mittels Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion

Eventuell vorhandene Hydroxyl-Gruppen der gebildeten Methylester wurden zur gaschromatographischen Untersuchung silyliert, wodurch die Flüchtigkeit der Monomere erhöht wird. Die Identifizierung der getrennten Substanzen erfolgte mittels MS durch Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit der Literatur (EGLINTON et al., 1968; HOLLOWAY und DEAS, 1971; HOLLOWAY und DEAS, 1973; KALLIO et al., 2006; WALTON und KOLATTUDUKY, 1972; RIEDERER und SCHÖNHERR, 1988a; RONTANI et al., 2004) sowie durch Vergleich der relativen Retentionszeiten mit denen von käuflich erwerbbaren Standardsubstanzen. Die Ermittlung der relativen Retentionszeiten der identifizierten Kutin- und Suberinbestandteile erfolgte gegen einen internen Standard (IS). Als interner Standard wurde Hydroxydocosansäure in Form des Trimethylsilylesters, Trimethylsilylethers eingesetzt.

Einige eingesetzten Standardsubstanzen wurden vor der gaschromatographischen Analyse silyliert und lagen als Trimethylsilylester (Hexadecansäure und Octadecansäure) oder als Trimethylsilylether (Glycerol und β-Sitosterol) vor. Eicosansäure wurde in Form des Methylesters analysiert. Hydroxydocosansäure lag als Methylester vor, wurde vor der gaschromatographischen Analyse silyliert und als Methylester, Trimethylsilylether eingesetzt. Die detaillierte Arbeitsanweisung, Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind den Kap. 5.3.9 und 5.1.1 zu entnehmen. Beispielchromatogramme sind im Kap. 5.5.1.3 abgebildet.

## 2.11 Partielle Depolymerisierung von Kutin und Suberin in Klason-Ligninen

Suberin- und Kutin-Oligomere resultieren aus der partiellen Depolymerisierung von Kutin und Suberin. Allgemein sind die in der Literatur beschriebenen partiellen Depolymerisierungsvorgänge alkalisch katalysierte Methanolysen, die unter milden Bedingungen (niedrigere Temperatur, kürzere Reaktionszeit) stattfinden. Als Katalysatoren werden häufig KOMe (OSMAN et al., 1995; OSMAN et al., 1999), CaO bzw. $Ca(OH)_2$ (GRAÇA und PAREIRA, 1997; GRAÇA und PAREIRA 2000; GRAÇA und PAREIRA, 2006; GRAÇA und SANTOS, 2007) oder NaOMe (GRAÇA et al., 2002) verwendet. In dieser Arbeit wurden die partiellen Depolymerisierungen mit

NaOMe, KOMe und $Ca(OH)_2$ als Katalysatoren erprobt. Bei der partiellen Depolymerisierung mit NaOMe wurden die UBS 5 h bei 70 °C gemäß GRAÇA et al. (2002) behandelt. Bei der partiellen Depolymerisierung mit KOMe wurde ebenso bei 70 °C depolymerisiert, jedoch nur 30 min. Die partielle Depolymerisierung mit methanolischem $Ca(OH)_2$ erfolgte 6 h unter Rückfluss. Bei der partiellen Depolymerisierung der UBS mit NaOMe und KOMe wurde die Reaktionstemperatur in Vorversuchen zwischen 30 °C und 70 °C variiert. Die partielle Depolymerisierung bei 70 °C erschien jedoch am effektivsten.

Die bei der partiellen Depolymerisierung gebildeten Oligomere liefern zusätzliche Informationen über die Bindungsverhältnisse im Polymer. Problematisch dabei ist jedoch, dass die Ausbeute der gebildeten Oligomere normalerweise 10 % nicht überschreitet, sogar unter 5 % liegen kann, da bevorzugt Monomere gebildet werden (GRAÇA und SANTOS, 2007). Auf diesem Grund ist bei der partiellen Depolymerisierung besonders auf die Reaktionsbedingungen zu achten (Temperatur, Konzentrationen der Reagenzien). Je drastischer die Bedingungen sind (höhere Temperaturen (> 30 °C) oder hochkonzentrierte Reagenzien), desto weniger Di- und Oligomere werden gebildet. Die Trennung und Identifizierung von Kutin- und Suberinoligomeren erfolgt hauptsächlich mittels chromatographischer Verfahren wie DC, GC und HPLC (GERARD et al., 1992). In dieser Arbeit erfolgte die Trennung und Identifizierung der Oligomere mittels GC-MS nach Silylierung. Auch hier erfolgte die Silylierung zur Derivatisierung eventuell vorliegender Hydroxyl-Gruppen. Das Temperaturprogramm zur gaschromatographischen Trennung der Oligomere auf einer Kapillarsäule wurde von GRAÇA und PAREIRA (2000) übernommen. Die Detektion der Oligomere erfolgte massenspektrometrisch, die Identifizierung durch Vergleich der Spektren mit der Literatur (GRAÇA und PAREIRA, 2000; GRAÇA et al., 2002; GRAÇA und SANTOS, 2006; OSMAN et al., 1999; EGLINTON et al., 1968; HOLLOWAY und DEAS, 1971; HOLLOWAY und DEAS, 1973; KALLIO et al., 2006; WALTON und KOLATTUDUKY, 1972; RIEDERER und SCHÖNHERR, 1988a; RONTANI et al., 2004).

Die ausführliche Arbeitsanweisung zur partiellen Depolymerisierung von Kutin und Suberin befindet sich im Anhang unter Kap. 5.3.10. Die Geräteparameter sowie das Temperaturprogramm sind Kap. 5.1.1 zu entnehmen.

## 2.12 Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin

Neben der Klason-Lignin-Methodik wird Lignin hauptsächlich als ABSL bestimmt. Die ABSL-Methode wurde 1961 von Johnson et al. entwickelt und basiert grundsätzlich auf den spezifischen Absorptionseigenschaften von phenolischen Verbindungen im UV-Bereich. Sie wurde nach erstmaliger Publikation stetig weiterentwickelt (JOHNSON et al., 1961; ROBERTSON et al., 1979; LIYAMA et al., 1990; FUKUSHIMA, 2000; FUKUSHIMA und HATFIELD, 2001; FUKUSHIMA und HATFIELD, 2004; FUKUSHIMA und HATFIELD, 2005; BUNZEL et al., 2005). Bei der ABSL-Methode werden Lignine in essigsaurem Acetylbromid (25 %) gelöst und nach weiteren Aufarbeitungsschritten wird die Absorption bei 280 nm gemessen. Die zur Bestimmung von Ligninen in Pflanzen und Lebensmitteln entwickelte ABSL-Methode stellt eine Alternative zur KL-Methodik dar, allerdings ist auch diese fehlerbehaftet. Andere phenolische Verbindungen, die ebenfalls zwischen 200-300 nm absorbieren, in Acetylbromid löslich sind und nicht zu den Ligninbestandteilen zählen, zum Beispiel polysaccharidgebundene Hydroxyzimtsäuren, werden miterfasst. Des Weiteren bestimmt man ebenfalls Substanzen wie Furfural und Hydroxymethylfurfural, die aus den Polysacchariden während der sauren Hydrolyse entstehen können (HATFIELD und FUKUSHIMA, 2005). So kann der Ligningehalt fälschlicherweise erhöht werden. Auch der Standardextinktionskoeffizient (20 L/(g cm), der bei der Berechnung des Ligningehaltes eingesetzt wird, kann zu ungenauen Ergebnissen führen, da der Extinktionskoeffizient von der Monolignolzusammensetzung und den Bindungstypen im Lignin abhängig ist. Diese Faktoren hängen wiederum von Pflanzenart, -gewebe und -alter ab. Die Absorptionsmaxima von G- und S-reichen Ligninen unterscheiden sich (resp. 280 und 270 nm). Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die Variabilität der Tag-zu-Tag-Reproduzierbarkeit (ca. 10 %) bei Anwendung auf Ballaststoffproben (BUNZEL et al., 2005).

Insgesamt stellt die ABSL-Methode ein schnelles photometrisches Verfahren dar, dessen Präzision und Richtigkeit jedoch häufig nicht als zufriedenstellend zu bezeichnen sind.

Das Prinzip des ABSL-Verfahrens ist schematisch in Abb. 19 dargestellt. Die genaue Arbeitsanweisung ist Kap. 5.3.11 zu entnehmen.

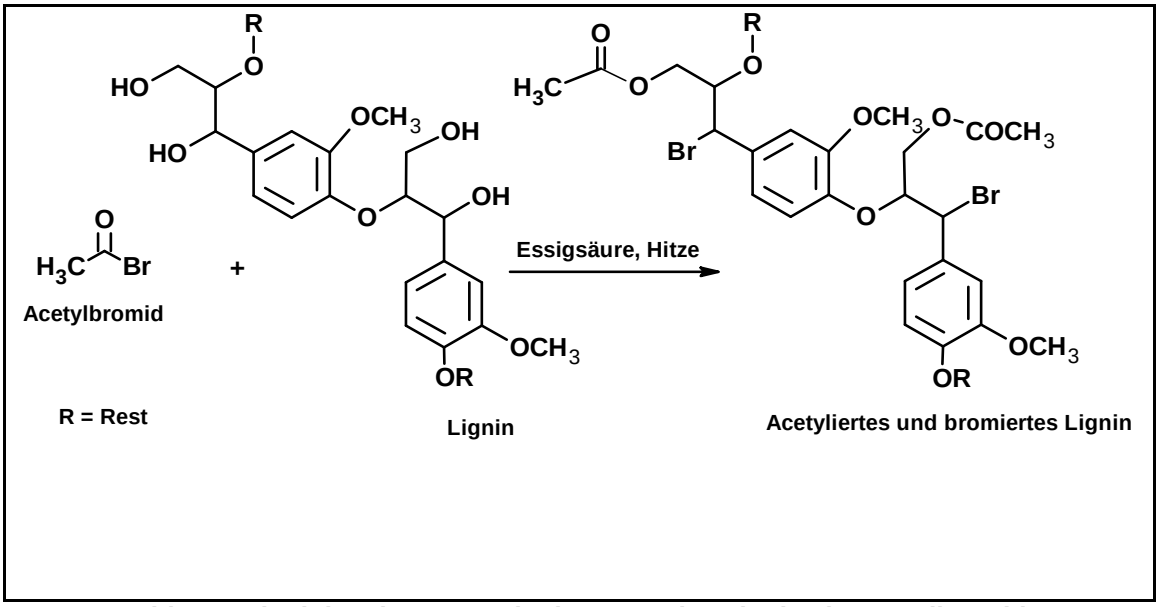



**Abb. 19: Ligninbestimmung mittels Lösen des Lignins in Acetylbromid**

## 2.13 Ermittlung molarer Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung des Ligningehaltes als acetylbromidlösliches Lignin

Zur präziseren Ermittlung von ABSL-Gehalten in BS sollten für die in den verschiedenen BS enthaltenen Lignine spezifische Korrekturfaktoren ermittelt werden.

### 2.13.1 Enzymatische Anreicherung der unlöslichen Ballaststoffe

Die enzymatische Anreicherung der UBS erfolgte in Anlehnung an Bunzel et al. (2005). Dabei wurde zur teilweisen Hydrolyse von Nicht-Stärke-Polysacchariden ein Gemisch aus Carbohydrolasen (Driselase) eingesetzt (siehe Abb. 20).
Der teilweise Polysaccharidabbau geht mit einer Erhöhung der Ligninkonzentration im Rückstand (angereicherte unlösliche Ballaststoffe, AUBS) einher. Eine vollständige Hydrolyse der Nicht-Stärke-Polysaccharide ist jedoch nicht möglich.
Diese Anreicherung ist für die Charakterisierung von Ligninen mittels DFRC (siehe Kap. 2.14) sowie für die Isolierung von Ligninen vorteilhaft, da die Co-Extraktion von Kohlenhydraten reduziert wird. Die genaue Arbeitsvorschrift ist dem Anhang 5.3.2 zu entnehmen.

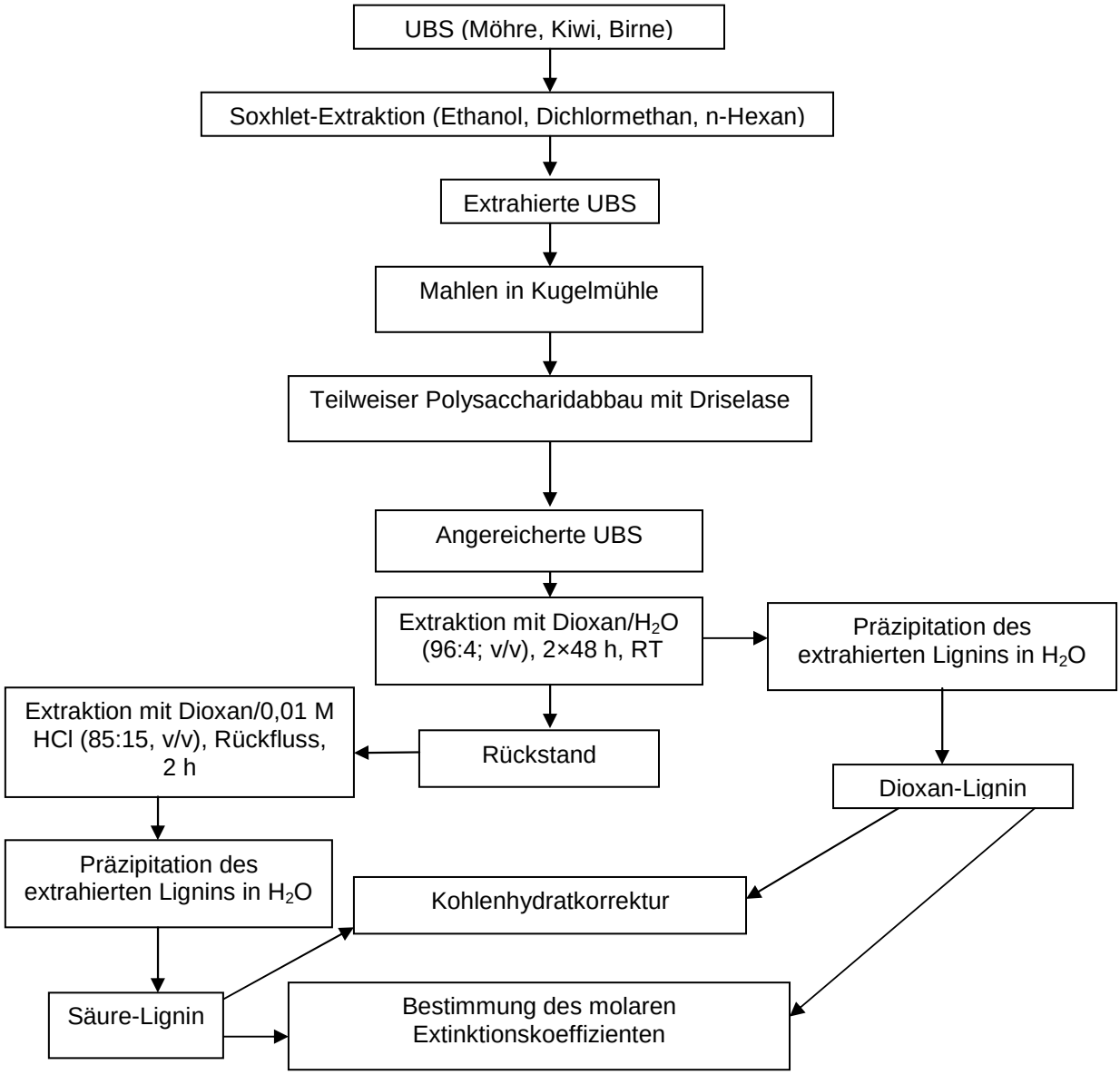



**Abb. 20: Schematische Darstellung der Ermittlung von molaren Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin**

### 2.13.2 Gewinnung von Dioxan- und Säure-Ligninen

Zur Gewinnung von Ligninen zur Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten wurden in dieser Arbeit das Dioxan-Lignin (DL)- und das Säure-Lignin (SL)-Verfahren eingesetzt. Die Extraktion von DL wurde gemäß BUNZEL et al. (2006) basierend auf der Methode von BJÖRKMAN (1954) durchgeführt (siehe Abb. 20). Dabei wird Lignin mit Dioxan/Wasser (96:4; v/v) aus den AUBS extrahiert. Der Extraktionsrückstand wurde zur Isolierung des SL gemäß BUNZEL et al. (2006) basierend auf der Methode von WU und ARGYROPOULOS (2003) mit einem Gemisch aus

Dioxan/0,01 M HCl (85:15; v/v) behandelt. Zur Erhöhung der Reinheitsgrade (Abtrennung von Restproteinen und Kohlenhydraten) der extrahierten DL und SL wurden diese in Wasser in der Kälte präzipitiert. Im Gegensatz zu FUKUSHIMA und HATFIELD (2001; 2004) wurde nicht mit 2 N HCl gearbeitet. Die so isolierten DL und SL wurden nach Korrektur der Kohlenhydratgehalte (siehe Kap. 2.8) zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten eingesetzt.

### 2.13.3 Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten

Da die Zusammensetzung und Struktur des Lignins von der Pflanzenart, dem Pflanzenteil und dem Alter der Pflanze abhängen, und die Absorption von Lignin im UV-Bereich wiederum von der Ligninzusammensetzung und -struktur abhängt, ist die Ermittlung von molaren Extinktionskoeffizienten für Lignine verschiedener Pflanzenspezies für die ABSL-Bestimmung von besonderer Relevanz. Die Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten wurde photometrisch nach der Methode von Fukushima und Hatfield (2001; 2004) durchgeführt. Dabei wurden unter Einsatz verschieden konzentrierter Ligninlösungen Kalibriergeraden bei 280 nm ermittelt. Die aus den so erhaltenen Kalibriergeraden ermittelten Steigungen stellen die molaren Extinktionskoeffizienten (in $cm^{-1}mg^{-1}mL$) der jeweils eingesetzten Proben dar. Die ermittelten Werte wurden für die ABSL-Bestimmung verwendet.
Die genauen Arbeitsanweisungen der in Kap. 2.10.1-2.10.3 beschriebenen Verfahren sind dem Anhang, Kap. 5.3.12 bis 5.3.14, zu entnehmen.

## 2.14 Bestimmung der Ligninzusammensetzung nach reduktiver Spaltung

Die Ligninzusammensetzung kann bestimmt werden, indem man aus dem polymeren Lignin Monomere freisetzt, diese identifiziert und die relativen Gehalte zueinander bestimmt. Die Charakterisierung von Lignin, basierend auf der Spaltung und Untersuchung von Ligninmonomeren, ist kein einfach durchzuführender Prozess, da im Lignin, anders als bei Polysacchariden oder Proteinen, die Monomere über C-C- und Etherbindungen, die enzymatisch-chemisch schwer abzubauen sind, verknüpft sind (MOROSHI, 1991; SAKAKIBARA, 1991). Hauptsächlich werden die Permanganat-Methode, die Thioacidolyse und die alkalische Nitrobenzol-Methode zur Bestimmung der Ligninzusammensetzung eingesetzt (LEWIS UND YAMAMOTO,

1990; LAPIERRE, 1991; LU und RALPH, 1997a). Wegen ihrer Effektivität wird die Thioacidolyse häufig verwendet. Sie ermöglicht es u.a., dass die Anzahl an Alkyl-Aryl-Ether-Bindungen im Polymer abgeschätzt werden kann (LAPIERRE et al., 1986; LU und RALPH, 1997a). Trotz ihrer Effektivität erweist sich die Thioacidolyse aufgrund der komplizierten Durchführung und dem Einsatz von unangenehm riechenden Reagenzien (Ethanthiol) als unvorteilhaft für die Charakterisierung des Lignins. Die neueste Methode zum Nachweis und zur Charakterisierung von Ligninen, die DFRC-Methode, basiert auf der teilweisen Umkehrung der Ligninbiosynthese, wobei selektiv β-O-4-Bindungen gespalten und die so gebundenen Monolignole als deren acetylierte Derivate freigesetzt werden (LU und RALPH, 1997a; LU und RALPH, 1997b; BUNZEL und STEINHART, 2003). Andere Bindungen (β-β, β-5, β-1, 5-5 und 5-O-4) werden nicht gespalten. Der Vorteil der DFRC-Methode gegenüber der Thioacidolyse besteht in einer nahezu quantitativen Spaltung der Arylglycerin-β-Aryl-Etherbindungen (β-O-4-Bindungen) mit bis zu 92 % in Modellverbindungen. Zusätzlich ist die Methode einfacher und unter milderen Bedingungen (T<100 °C) als die Thioacidolyse durchführbar; sie setzt die Monolignole in definierter Form frei und ist außergewöhnlich selektiv (LU und RALPH, 1997b). Ein Nachteil der DFRC-Methode besteht in der Bildung von Kohlenhydratabbauprodukten, die zu Co-Elutionen bei der gaschromatographischen Bestimmung der freigesetzten Monolignole führen können. Deren Bildung sollte dementsprechend möglichst vermieden werden. Da bei der Bestimmung ausschließlich β-O-4-Bindungen des Lignins gespalten werden (LU und RALPH, 1997a), ist außerdem zu beachten, dass keine exakten Verhältnisse der Monomere aus den Analysen resultieren (HOLTMAN et al., 2003). Dieses trifft jedoch auch auf die Thioacidolyse zu. Abb. 21 zeigt schematisch die wichtigsten Reaktionsschritte der DFRC-Methode.

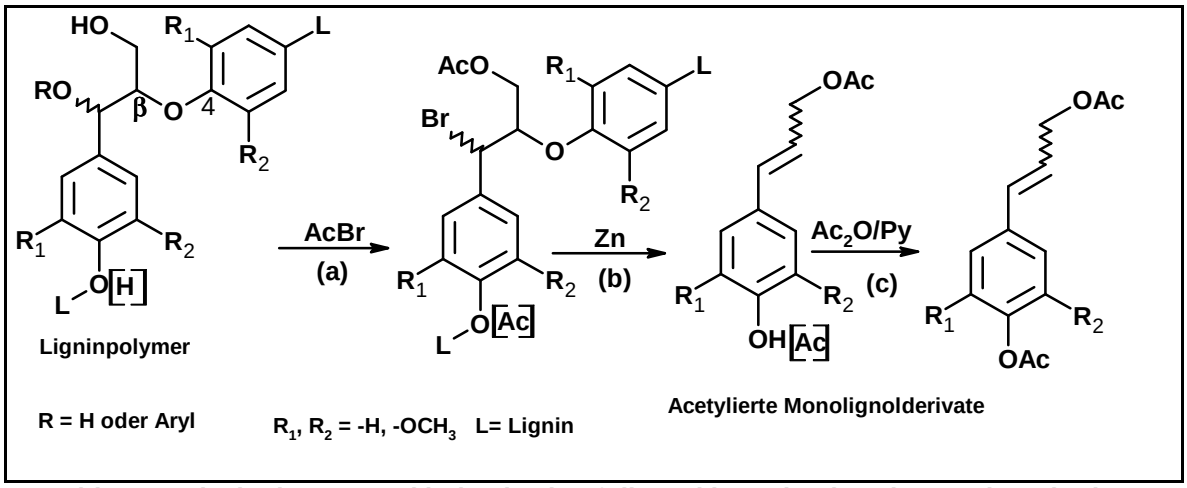



**Abb. 21: Prinzip der DFRC- (derivatization followed by reductive cleavage) Methode**

Zunächst (Schritt a) werden Lignin und andere Zellwandbestandteile durch Bromierung und Acetylierung der freien Hydroxyl-Gruppen gelöst. Dabei werden γ-Hydroxyl-Gruppen schnell, phenolische Hydroxyl-Gruppen langsam acetyliert. In Schritt (b) werden die β-Brom-Ether mit Zinkstaub in polaren Lösungsmitteln reduktiv gespalten. Die bei diesem Prozess freigesetzten phenolischen Hydroxyl-Gruppen der teilweise acetylierten Monolignole werden unter Verwendung von Essigsäureanhydrid mit Pyridin als Katalysator in Schritt (c) acetyliert (LU und RALPH, 1997a). Um Störungen bei der Detektion der Monolignole und Verschmutzung des massenselektiven Detektors durch Kohlenhydrat-reaktionsprodukte zu mindern, wurde zusätzlich eine Aufreinigung der Reaktionsprodukte mittels Festphasenextraktion (SPE) an Kieselgel durchgeführt (BUNZEL et al., 2005). Zur Quantifizierung der freigesetzten Monolignole wurde ein IS (4,4´-Ethylidenbisphenol) verwendet. Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung ist im Anhang unter Kap. 5.3.15 aufgeführt.

Die Trennung und Identifizierung der acetylierten Monolignolderivate erfolgte mittels GC-MS unter den in Kap. 5.1.1 angegebenen Bedingungen. Beispiel- und Standardchromatogramme sind in Kap. 5.5.1.4 aufgeführt.

# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Bestimmung der korrigierten unlöslichen Ballaststoffgehalte

Aus den getrockneten und feingemahlenen Pflanzenproben wurden die UBS gemäß einer modifizierten enzymatisch-gravimetrischen Methode (AOAC, 1990; BUNZEL et al., 2005) präparativ gewonnen. Die isolierten UBS wurden um Restprotein und Asche korrigiert. Dabei weisen die Getreide Weizen und Roggen die höchsten Restproteingehalte mit ca. 10 % auf, die Gemüseproben Grünkohl und Möhre die höchsten Aschegehalte (ca. 4 %). Abhängig von den untersuchten Pflanzenarten unterscheiden sich die UBS-Gehalte erwartungsgemäß stark (siehe Abb. 22). Die höchsten Gehalte an UBS bezogen auf die Trockenmasse sind in den getrockneten Gemüseproben enthalten (Grünkohl 42,4 %, Möhre 21,4 %), die niedrigsten in den Getreideproben (Weizen 9,1 %, Roggen 10,7 %). Die genaue Auflistung der Ergebnisse zur Bestimmung der UBS-Gehalte ist tabellarisch in Kap. 5.4.1 dargestellt.

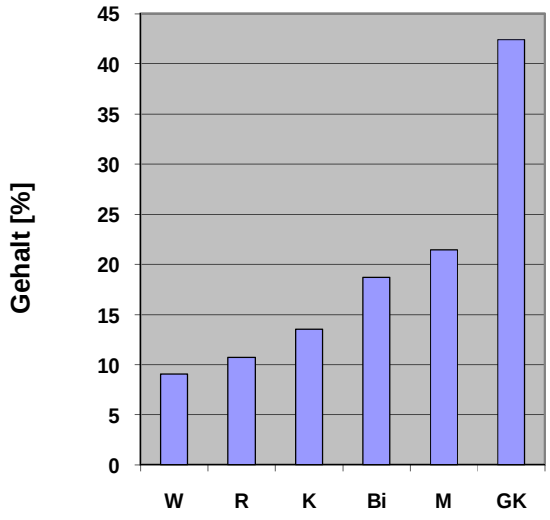



**Abb. 22: Prozentuale Gehalte an korrigierten unlöslichen Ballaststoffen bezogen auf die Trockenmasse: W (Weizen), R (Roggen), Bi (Birne), K (Kiwi), Ba (Banane), GK (Grünkohl), M (Möhre)**

## 3.2 Bestimmung und Korrektur der Klason-Lignin-Gehalte

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Nicht-Lignin-Anteil im KL aus BS von Lebensmitteln bestimmt werden. In Futtermitteln werden die in dem KL vorkommenden mitbestimmten Substanzen auf ca. 1-5 % geschätzt (THEANDER et al., 2001; FUKUSHIMA und HATFIELD, 2005). Es fehlt aber an detaillierten Studien, die den Gehalt von diesen Substanzen in KL aus Lebensmitteln bestimmen und durch Differenzrechnung den „wahren“ Ligningehalt ermitteln. Folglich wird in dieser Arbeit auf die dargestellte Problematik eingegangen, um diese Lücke zu schließen.

### 3.2.1 Isolierung und Bestimmung der Klason-Lignine

Die Bestimmung der KL erfolgte gravimetrisch nach einer Zwei-Schritt-Hydrolyse der UBS mit Schwefelsäure. Die KL-Rückstände wurden über Glasfilter filtriert, neutral gewaschen und getrocknet. Dabei ergaben sich für die Getreideproben, bezogen auf die unkorrigierten UBS, unkorrigierte KL-Gehalte von 12,0 ± 0,0 % und 11,2 ± 0,3 % für Weizen und Roggen. Grünkohl und Möhre wiesen unkorrigierte KL-Gehalte von 13,4 ± 0,4 % und 14,0 ± 0,1 % auf. Die höchsten unkorrigierten KL-Gehalte wurden in den Früchteproben mit 23,7 ± 0,4 % für Birne und 33,0 ± 2,7 % für Kiwi bestimmt. Bezogen auf die korrigierten UBS betragen die KL-Gehalte 13,7 % und 12,5 % für Weizen und Roggen sowie 15,4 %, 15,0 %, 24,9 % und 35,3 % für Grünkohl, Möhre, Birne und Kiwi.
Im Anschluss wurden die isolierten KL auf mögliche Nicht-Lignin-Verbindungen untersucht, um den tatsächlichen Ligningehalt in den KL abzuschätzen.

### 3.2.2 Charakterisierung und Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile in Klason-Ligninen

#### 3.2.2.1 Charakterisierung

Um den „wahren“ Ligningehalt in den isolierten KL-Rückständen der untersuchten Proben abzuschätzen, wurden letztere um die Wachs- und Fettbestandteile (WFB), die Kutin- und Suberinmonomere (KSM) sowie um Asche und Restprotein korrigiert. Dazu wurden die Wachse und Fette sowie Kutin und Suberin in den KL bestimmt und

charakterisiert. Die Charakterisierung und die Bestimmung der WFB und KSM können aufeinanderfolgend aus der gleichen Probe erfolgen, da WFB in unpolaren bis mittelpolaren Lösungsmitteln weitestgehend extrahierbar sind, KSM aber nicht. Letztere können erst nach saurer oder alkalischer Depolymerisierung extrahiert werden (RIEDERER und SCHÖNHERR, 1988b; KALLIO et al., 2006). Die Charakterisierung der WFB in den KL-Proben erfolgte mittels GC-MS nach Extraktion, Trocknung, Umesterung und Derivatisierung der einzelnen Bestandteile wie in Kap. 2.9 beschrieben. Die WFB wurden derivatisiert, um deren Flüchtigkeit bei der GC zu erhöhen. Dabei wurden die Wachs- und Fettbestandteile als Methylester, Trimethylsilylether identifiziert. Einige Monomere wurden als Trimethylsilylester, Trimethylsilylether-Derivate identifiziert. Dies lässt sich vermutlich durch das Vorhandensein von Feuchtigkeit im Reaktionsmedium während der Methylester-Bildung erklären. Die Identifizierung der WFB erfolgte durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster mit Literaturdaten (KALLIO et al., 2006; BAUER, 2003; EGLINTON und HUNNEMAN, 1968; RONTANI und AUBERT, 2004; DRAFFAN et al., 1968). Die Vorgehensweise bei der Identifizierung von WFB soll im Folgenden exemplarisch anhand zweier Monomere demonstriert werden: dem Methylester der Hexadecansäure und dem Trimethylsilylether-Derivat des β-Sitosterols.

Hexadecansäure kann anhand des Molpeaks m/z 270 $[M]^+$ zugeordnet werden. Zusätzlich sind in Abb. 23a u.a. m/z 239 $[M-31]^+$ sowie m/z 241 $[M-29]^+$, m/z 227 $[M-43]^+$ und m/z 199 $[M-71]^+$ zu erkennen, die auf die Abspaltung einer Methoxyl-Gruppe aus dem Methylester sowie die Abspaltung von $CH_3CH_2$-, $CH_3(CH_2)_2$- und $CH_3(CH_2)_4$-Gruppen vom Methylende der derivatisierten Fettsäure zurückzuführen sind. Die Masse m/z 255, die eine mögliche Abspaltung der $CH_3$-Gruppe aus der Methylester-Gruppe repräsentiert wird soweit durch die begünstigte Abspaltung der Methoxyl-Gruppe unterdrückt, sodass das Ion mit der Masse m/z 255 kaum im Massenspektrum beobachtbar ist. Das Vorhandensein der Fragmente m/z 241, 227, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101 und 87, was auf die wiederholende Abspaltung der $CH_2$-Gruppe zurückzuführen ist, deutet auf eine lineare unsubstituierte Kohlenstoffkette hin.

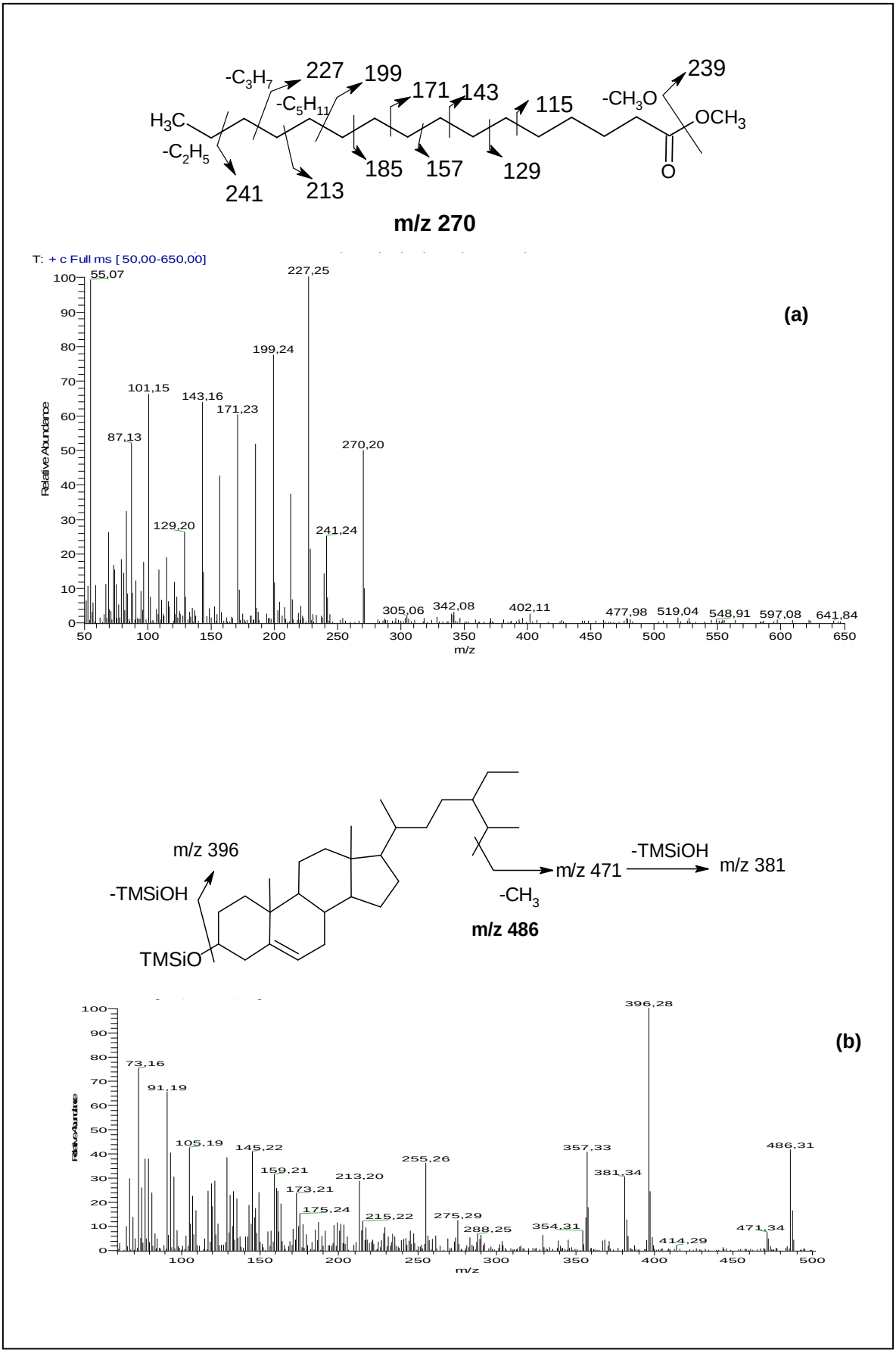



**Abb. 23: Massenspektren und Fragmentierungsmuster von Hexadecansäure (a) und β-Sitosterol (b) in Form der Methylester- bzw. Trimethylsilylether-Derivate (TMSi = Trimethylsilyl)**

Abb. 23b zeigt das Fragmentierungsmuster des trimethylsilylierten β-Sitosterols. Dabei stellt m/z 486 $[M]^+$ den Molpeak dar. Das Signal m/z 471 $[M-15]^+$ ist auf die Abspaltung einer $CH_3$-Gruppe aus der Trimethylsilyl-Gruppe zurückzuführen, m/z 396 $[M-90]^+$ auf die Abspaltung von einer hydroxylierten Trimethylsilyl-Gruppe und m/z 381 $[M-90-15]^+$ auf die Abspaltung von einer hydroxylierten Trimethylsilyl-Gruppe sowie einer $CH_3$-Gruppe aus der aliphatischen Seitenkette.

Ähnlich wurden alle anderen WFB unter Berücksichtigung der Molmasse und der für jedes Molekül spezifischen Fragmentierung identifiziert.

Neben den typischen Fragmentierungen für die Hydroxycarbonsäuren und Dicarbonsäuren wie α-Spaltungen, γ-Spaltungen und McLafferty-Umlagerungen werden auch Fragmente, die bei der Umlagerung beider funktioneller Gruppen entstehen (RONTANI et al., 2004), zur Identifizierung von Dicarbonsäuren bzw. ω-Hydroxycarbonsäuren herangezogen:

- m/z 147, m/z 204, m/z 217, $[M-131]^+$ für Dicarbonsäuren und Dicarbonsäurederivate;
- m/z 147, m/z 204, m/z 217, $[M-131]^+$, $[M-105]^+$ für ω-Hydroxycarbonsäuren und Hydroxycarbonsäurederivate.

Die genannten Fragmente sind für die Identifizierung von Fettsäuren mit zusätzlichen Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen von Relevanz. Insbesondere das Fragment m/z 147 deutet auf eine Umlagerung hin, in die mindestens zwei Trimethylsilyl-Gruppen involviert sind. Die Trimethylsilyl-Gruppe kann sowohl an einer Hydroxyl-Gruppe als auch an einer Carboxyl-Gruppe gebunden sein. Abb. 24a und 24b zeigen die vorgeschlagenen Wege zur Bildung der Fragmente m/z 147, m/z 204 und m/z 217.

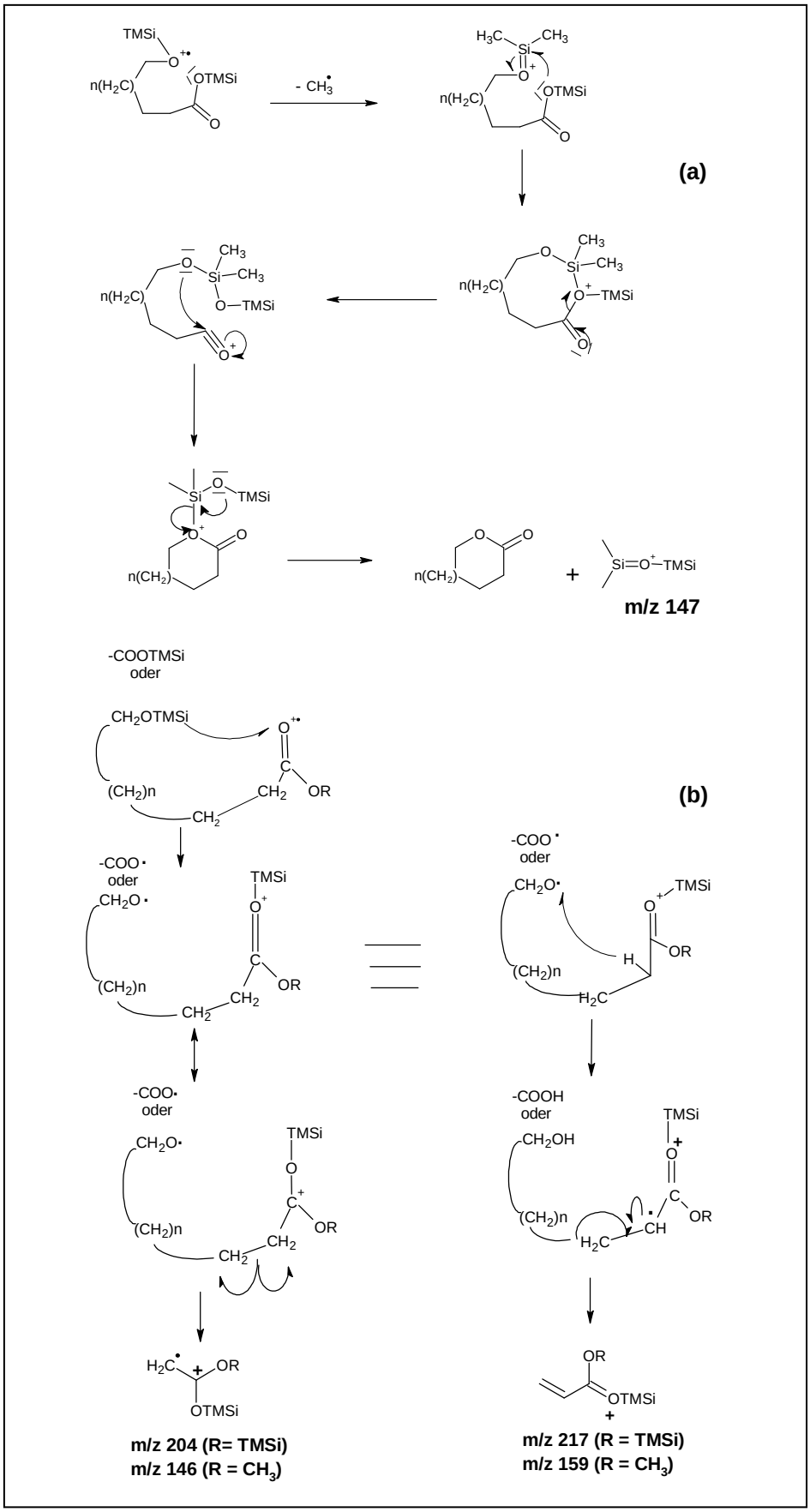



**Abb. 24: Vorgeschlagene Wege zur Bildung der Fragmente m/z 147 (a) sowie m/z 204 und 217 oder 146 und 159 (b) bei der Fragmentierung von Carbonsäurederivaten nach RONTANI und AUBERT, 2004 (TMSi = Trimethylsilyl)**

Die Fragmente m/z 204 und 217 (siehe Abb. 24b) entstehen durch einen einleitenden Transfer der Trimethylsilyl-Gruppe zwischen Ether- und Ester-Gruppen oder zwischen zwei Ester-Gruppen (RONTANI und AUBERT, 2004; DRAFFAN et al., 1968) und nachfolgenden Reaktionen. Der Trimethylsilyl-Transfer ist abhängig von der Kettenlänge der Carbonsäuren (DRAFFAN et al., 1968). In kurzkettigen Carbonsäuren wird der Transfer der Trimethylsilyl-Gruppe unterdrückt und das Fragment m/z 147 wird vorzugsweise gebildet (Abb. 24a) (RONTANI und AUBERT, 2004). Abhängig davon, ob die Carboxyl-Gruppe der untersuchten Substanz trimethylsilyliert oder methyliert ist, entstehen nach Umlagerungen der Derivate die Massen m/z 204 und 217 oder m/z 146 und 159 (RONTANI und AUBERT, 2004). Die Massen m/z 204 und 217 sind jedoch nicht immer spezifisch für Hydroxycarbonsäuren und Dicarbonsäuren. Sie entstehen auch bei der Fragmentierung von Kohlenhydraten (DRAFFAN et al., 1968) und können somit das Vorhandensein von Hydroxycarbonsäuren und Dicarbonsäuren vortäuschen**.**

Hauptsächlich wurden in den KL $C_{16}$- und $C_{18}$-Fettsäuren sowie Glycerol und Phytosterine als WFB identifiziert. Auch substituierte Fettsäuren, v. a. Hydroxyfettsäuren, konnten nachgewiesen werden. Einige Bestandteile wie Glycerol, Hexadecansäure oder β-Sitosterol konnten in allen Proben identifiziert werden.
Octadecadiensäure konnte in den Extrakten von allen Proben mit Ausnahme von Birne identifiziert werden. Octadecensäure und Octadecansäure konnten wiederum in allen Proben nachgewiesen werden. ω-Hydroxyhexadecansäure war nur in den Proben von Weizen und Roggen enthalten. Als weiterer Bestandteil wurde ω-Hydroxyoctadecensäure in Weizen, Roggen und Birne nachgewiesen. Dihydroxyhexadecansäure kommt als Monomer in den Proben von Weizen und Birne vor. Campesterol konnte in Roggen, Kiwi und Birne gefunden werden. Wie bereits erwähnt war das Sterin β-Sitosterol in allen Proben identifizierbar. Sitostanol wurde in Kiwi und Birne nachgewiesen. Insgesamt war die Zusammensetzung der WFB stark von der Pflanze abhängig.
Eine genaue Auflistung der identifizierten WFB in den KL ist in der Tab.6 dargestellt.

**Tab. 6: Übersicht über die identifizierten Wachs- und Fettbestandteile in den Klason-Ligninen**

| Monomere | Rt [min] | W | R | M | K | Bi |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Hexadecansäure, Methylester | 31,95 | + | + | - | - | - |
| Hexadecansäure, Trimethylsilylester | 36.74 | + | + | + | - | + |
| Octadecadiensäure, Methylester | 39.20 | + | + | - | + | - |
| Octadecensäure, Methylester | 39.44 | + | + | - | - | + |
| Octadecansäure, Methylester | 40.45 | + | + | - | - | + |
| Octadecadiensäure, Trimethylsilylester | 43.48 | - | - | + | + | - |
| Octadecensäure, Trimethylsilylester | 43.80 | - | - | + | + | + |
| Octadecansäure, Trimethylsilylester | 45.05 | + | + | + | + | + |
| ω-Hydroxyhexadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 46.80 | + | + | - | - | - |
| ω-Hydroxyoctadecensäure, Methylester/Trimethylsilylether | 53.48 | + | + | - | - | + |
| Dihydroxyhexadecansäure Methylester/Trimethylsilylether | 53.90 | - | + | - | - | + |
| Campesterol, Trimethylsilylether | 78.90 | - | + | - | + | + |
| ß-Sitosterol, Trimethylsilylether | 81.30 | + | + | + | + | + |
| Sitostanol, Trimethylsilylether | 81.78 | - | - | - | + | + |

Die Tatsache, dass Glycerol und die Fettsäuren Hexadecansäure, Octadecansäure, Octadecensäure sowie Octadecadiensäure in den KL-Extrakten der untersuchten Pflanzenproben identifiziert wurden, deutet auf das Vorhandensein von Fetten in den KL hin. Fettsäuren können jedoch auch aus den Wachsen stammen. Des Weiteren wurde die Vermutung, dass Restwachse in den KL-Rückständen vorhanden sind, durch die Identifizierung von Phytosterinen bekräftigt. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass Glycerol, Fettsäuren sowie Fettsäurederivate mitextrahierte Schwefelsäure-Abbauprodukte von Kutin und/oder Suberin darstellen. Da Kutin und

Suberin (SPAD) Polyesterpolymere darstellen, wäre ein Schwefelsäure-katalysierter Abbau von Kutin und/oder Suberin unter den eingesetzten drastischen Bedingungen vorstellbar. Da der KL-Rückstand nach schwefelsaurer Behandlung nur mit einem polaren Lösungsmittel (kaltes Wasser) gewaschen wird, ist eine unvollständige Abtrennung von unpolaren bzw. mittelpolaren Substanzen nicht auszuschließen. Im Falle des Suberins könnte jedoch nur der polyaliphatische Bereich (SPAD) unter den angegebenen Bedingungen angegriffen werden, da dieser Bereich vorwiegend aus veresterten Hydroxycarbonsäuren und Glycerol besteht. Der polyphenolische Bereich ist gegen die saure Hydrolyse jedoch weitgehend resistent, da vermutlich überwiegend chemisch stabile C-C-Bindungen und Etherbindungen vorhanden sind.

### 3.2.2.2 Gravimetrische Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile in den Klason-Ligninen

Die gravimetrische Bestimmung der WFB in den KL erfolgte gemäß Kap. 2.9.1. Als Extraktionsmittel wurde TBME/MeOH (9+1) verwendet, um unpolare bis mittelpolare Substanzen zu erfassen (BAUER, 2003; Bauer et al., 2004a). Die Vollständigkeit der Extraktion von unpolaren WFB durch TBME/MeOH wurde hier durch anschließende Extraktion des KL mit Hexan getestet. Da nur Spuren an WFB mit Hexan nach TBME/MeOH-Extraktion extrahiert werden konnten, konnte somit gezeigt werden, dass die Extraktion des KL mit TBME/MeOH ausreicht, um die in den KL zugänglichen WFB zu isolieren.

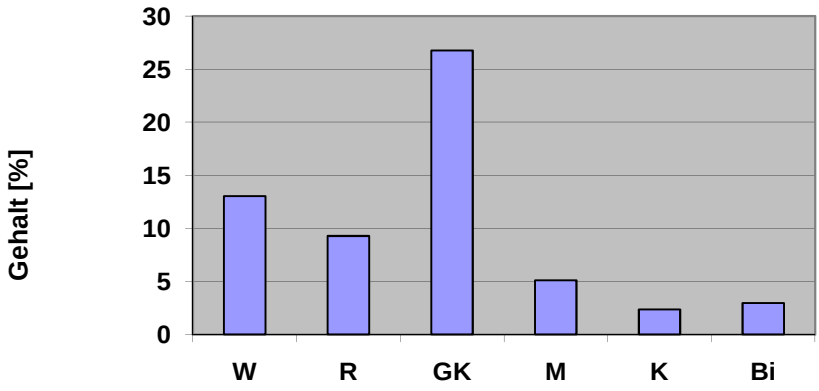



**Abb. 25: Gehalte an Wachs- und Fettbestandteilen (in %) in den Klason-Ligninen der untersuchten Pflanzenproben: W (Weizen), R (Roggen), GK (Grünkohl), M (Möhre) K (Kiwi), Bi (Birne)**

Wie Abb. 25 zu entnehmen ist, wurden die höchsten Gehalte an WFB im KL von Grünkohl mit 26,8 ± 1,9 % ermittelt. Die Getreide (Weizen, Roggen) enthielten 13,0 ± 0,9 % bzw. 9,3 ± 0,2 % WFB. Am niedrigsten war der Gehalt an WFB in dem KL von Kiwi mit 2,4 ± 0,0 %.

Grünkohl ist ein Blattgemüse. Da die Blätter (hohes Oberfläche/Masse-Verhältnis) mit einer Kutikulaschicht überzogen sind, und die Kutikula hauptsächlich aus Kutin und Wachsen besteht, ist zu erwarten, dass der Gehalt an WFB in Grünkohl erhöht ist. Kiwiproben wurden geschält eingesetzt; u.a. erklärt dies den niedrigen ermittelten WFB-Gehalt im KL der Kiwi.

Die Tatsache, dass trotz mehrerer Extraktionsschritte (UBS-Gewinnung, KL-Isolierung) noch Restwachse in den KL vorhanden sind, ist wahrscheinlich auf die vorhandene Matrix zurückzuführen. Es handelt sich bei den bestimmten WFB vermutlich um intrakutikulare Wachse, die für Extraktionsmittel nur schwer zugänglich sind. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass Abbauprodukte von Kutin, Suberin oder Lignin, die bei der KL-Gewinnung nicht ausgewaschen wurden, bei der Bestimmung der WFB jedoch mitextrahiert wurden, den Gehalt an WFB fälschlicherweise erhöhen.

### 3.2.3 Charakterisierung und Bestimmung der Kutin- und Suberinmonomere in den Klason-Ligninen

#### 3.2.3.1 Charakterisierung von Kutin- und Suberinmonomeren nach totaler Depolymerisierung

Die Charakterisierung von Kutin und Suberin in den KL erfolgte mittels GC-MS nach saurer Umesterung mit $BF_3$/MeOH, Trocknung und Silylierung mit N,O-Bis(Trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), 1% Trimethylchlorsilan (TMCS). Die erhaltenen Massenspektren wurden mit Literaturdaten verglichen. Eine Derivatisierung der Carboxyl- und Hydroxyl-Gruppen war notwendig, um die Flüchtigkeit der KSM bei der GC zu erhöhen. Die KSM wurden hauptsächlich in Form der Methylester und Trimethylsilylether identifiziert. Obwohl die Wirkung des BSTFA durch TMCS gesteigert wurde, wurden einige Monomere nur als Methylesterderivate identifiziert, da die OH-Gruppe nicht derivatisiert wurde. Eine genaue Auflistung der in den KL identifizierten KSM ist in Tab. 7 dargestellt.

**Tab. 7: Übersicht über die identifizierten Kutin- und Suberinmonomeren in den Klason-Ligninen**

| Monomere | RRt | Weizen | Roggen | Möhre | Kiwi | Birne |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glycerol, Trimethylsilylether | 0,149 | + | + | + | + | + |
| Hexadecansäure, Methylester | 0,474 | + | + | + | + | + |
| Ferulasäure, Methylester | 0,488 | + | + | - | + | - |
| Kaffeesäure, Methylester | 0,523 | + | + | - | - | + |
| Hexadecansäure, Trimethylsilylester | 0,554 | + | + | + | - | + |
| Hexadecandicarbonsäure, Methylester | 0,496 | + | + | + | - | + |
| Octadecadiensäure, Methylester | 0,584 | - | + | + | - | - |
| Octadecensäure, Methylester | 0,589 | - | + | + | + | - |
| Octadecansäure, Methylester | 0,605 | - | + | + | + | - |
| Octadecadiensäure, Trimethylsilylester | 0,659 | + | + | - | + | - |
| Octadecensäure, Trimethylsilylester | 0,664 | - | + | + | - | - |
| Octadecansäure, Trimethylsilylester | 0,683 | - | + | + | + | - |
| Octadecandicarbonsäure, Methylester | 0,695 | - | - | - | - | + |
| Hydroxyhexadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,708 | - | + | - | + | - |
| Hydroxyoctadecensäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,718 | + | + | + | + | + |
| Dihydroxyhexadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,819 | + | + | - | + | + |
| Hydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,828 | + | + | + | + | + |
| Epoxy-Hydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,898 | + | + | - | + | + |
| Dihydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,928 | + | + | - | + | + |
| Hydroxyeicosansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,942 | + | + | + | + | - |

**Fortsetzung Tab. 7**

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Trihydroxyoctadecensäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,953 | + | - | - | - | - |
| Trihydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,985 | + | + | - | + | + |
| Hydroxydocosansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 1,047 | + | - | + | - | + |
| Hydroxytetracosansäure, Methylester/Trimethlsilylether | 1,063 | - | + | + | - | - |
| Dihydroxyoctadecandicarbonsäure, Methylester/Trimethylsilylether | 0,968 | - | - | - | - | + |
| Chlorierte Hydroxydecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 1,015 | + | + | - | + | - |
| Pentahydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether | 1,023 | - | - | - | - | + |
| Diferulasäure, Methylester/Trimethylsilylether (Doppelpeak) | 1,135 | + | + | - | - | - |
| β-Sitosterol, Trimethylsilylether | 1,244 | + | + | + | + | - |

**Retentionszeit (IS) = 64,64 min**

Ähnlich wie in Kap. 3.2.2.1 wird hier exemplarisch an zwei Monomeren von Kutin und Suberin die Vorgehensweise bei der Identifizierung der einzelnen Monomeren gezeigt: Trihydroxyoctadecansäure und Epoxyhydroxyoctadecansäure (siehe Abb. 26a und b).

Die Molmasse des Trihydroxyoctadecansäurederivats (Abb. 26a) beträgt 562 g/mol. Die Abspaltung einer $CH_3$-Gruppe aus der Trimethylsilyl-Gruppe wird durch das Ion mit m/z 547 $[M-15]^+$ demonstriert. Das Ion mit m/z 531 zeigt die Abspaltung der Methoxyl-Gruppe aus dem Methylester an. Die Position der zwei Hydroxyl-Gruppen in der Kette kann anhand der Spaltung zwischen den Trimethylsilyl-O-Gruppen tragenden Kohlenstoffe zugeordnet werden. Die so entstandenen Fragmente dominieren häufig das Spektrum. Beispielsweise resultieren die Massen m/z 303 und m/z 259 aus der Fragmentierung des Trihydroxyoctadecansäurederivats zwischen den Trimethylsilyl-O-Gruppen tragenden Kohlenstoffen (siehe Abb. 26a). Diese Ionen sind von großer Bedeutung für die strukturelle Aufklärung der zu identifizierenden Verbindung. Im in Abb. 26a dargestellten Massenspektrum stellt das Ion mit der Masse m/z 303 das intensivste Signal dar.

Die Summe der Fragmente m/z 303 und m/z 259 kann zur Angabe der Molmasse der untersuchten Substanz herangezogen werden. Des Weiteren kann die untersuchte Verbindung gut durch die Fragmente 547 $[M-15]^+$ und 531 $[M-31]^+$ charakterisiert werden.

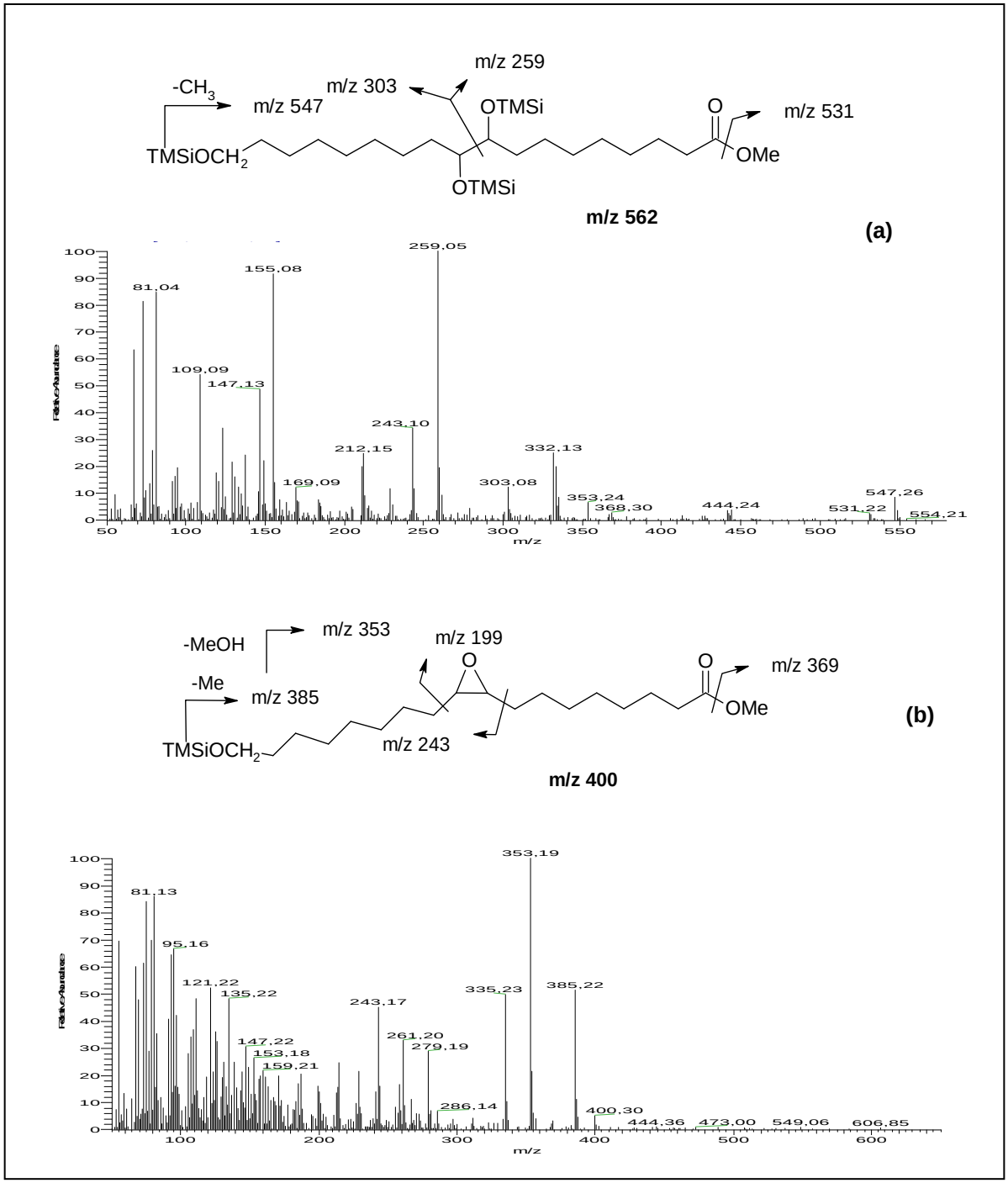



**Abb. 26: Massenspektren und Fragmentierungsmuster von Trihydroxyoctadecansäure (a) und Epoxyhydroxyoctadecansäure (b), in Form der Methylester und Trimethylsilylether-Derivate (TMSi = Trimethylsilyl; Me = Methyl)**

Die Massen m/z 147, m/z 155 und m/z 332 (siehe Abb. 26a und Abb. 27) stellen Fragmente dar, die durch komplexe McLafferty-Umlagerungen entstehen (EGLINTON et al., 1968; DRAFFAN et al., 1968; RONTANI und AUBERT, 2004; McLAFFERTY, 1980). Wie unter Kap. 3.2.2.1 erläutert, entsteht das Fragment m/z 147 bei der Umlagerung zweier silylierter funktioneller Gruppen und ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von mehrfach hydroxylierten Verbindungen, vorausgesetzt die in den Carbonsäuren vorhandenen Carboxyl-Gruppen sind blockiert, zum Beispiel durch Methylierung. Dies ist Voraussetzung, da bei gemischten Trimethylsilylester/Trimethylsilyletherderivaten auch die Hydroxyl-Gruppe der Carboxyl-Gruppe silyliert wird, und ebenso die Masse m/z 147 entsteht, auch wenn nur eine einzige weitere Hydroxyl-Gruppe im Molekül vorhanden ist (RONTANI und AUBERT, 2004).

Das Fragment m/z 332 entsteht durch Umlagerung einer Trimethylsilylgruppe und ist ein Indiz für vic-Trimethylsilylgruppen, wie zum Beispiel in einem 9,10-Bis-Trimethylsilylether, Methylester (CAPELLA, 1968; EGLINTON et al., 1968; EGLINTON und HUNNEMAN, 1968). Abb. 27 stellt den Bildungsweg für das Fragment m/z 332 dar, der Bildungsweg für das Fragment m/z 147 ist Kap. 3.2.2.1, Abb. 24 zu entnehmen.

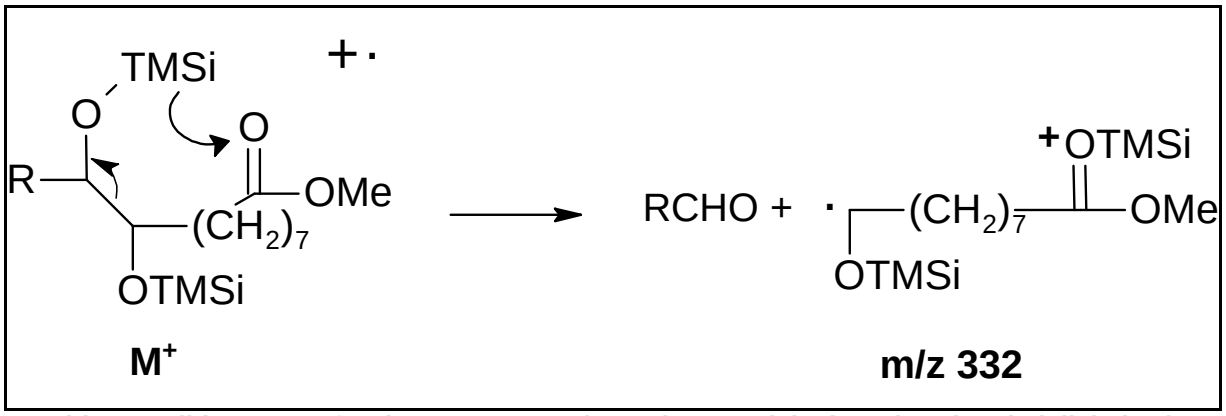



**Abb. 27: Bildungsweg für das Fragment m/z 332 in 9,10-vicinalen Bis-Trimethylsilylether/ Methylester-Derivaten (EGLINTON et al., 1968); TMSi = Trimethylsilyl, Me = Methyl**

In dem Beispiel kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass es sich um 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure handelt (EGLINTON und HUNNEMANN, 1968; EGLINTON et al., 1968).

Die Zuordnung der Epoxyhydroxyoctadecansäure erfolgte anhand des Molpeaks m/z 400 $[M]^+$ (EGLINTON et al., 1968). Die Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der

Trimethylsilyl-Gruppe, einer Methoxyl-Gruppe aus der Methylester-Gruppe sowie die gleichzeitige Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der Trimethylsilyl-Gruppe und einer Methanol-Gruppe von dem Carboxyl-Ende der hydroxylierten Carbonsäure resultiert in den Massen m/z 385 $[M-15]^+$, m/z 369 $[M-31]^+$ und m/z 353 $[M-47]^+$ (Eglinton et al., 1968). Die Die Position der Epoxyl-Gruppe im Molekül lässt sich durch beidseitige Fragmentierung an dieser funktionellen Gruppe, resultierend in den Massen m/z 199 und m/z 243, ableiten (siehe Abb. 26b).

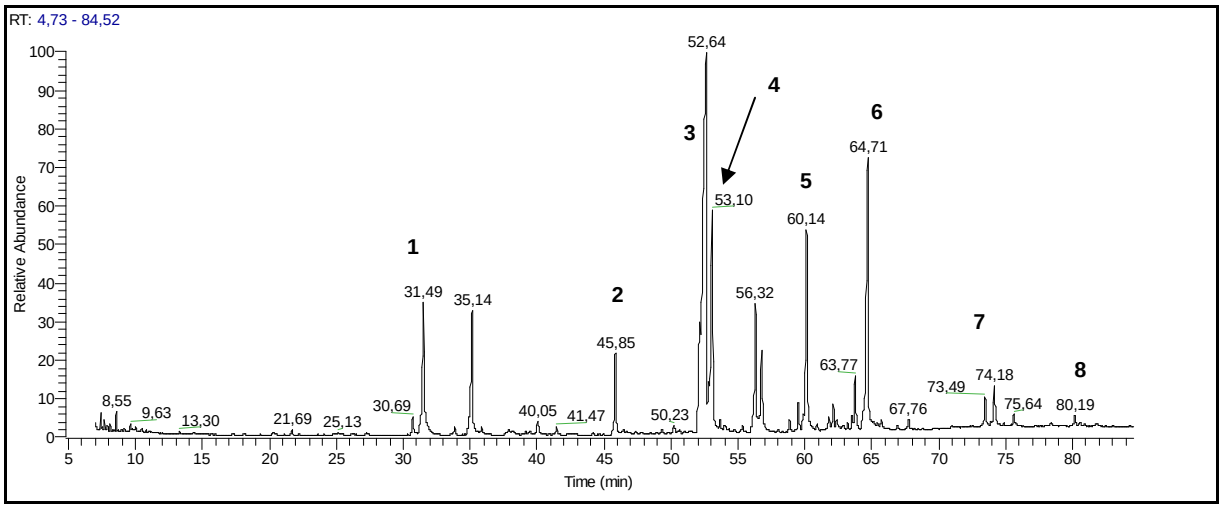



**Abb. 28: Auschnitt eines GC-MS-Chromatogramms des Klason-Lignin-Methanolysats des Weizens: 1. Ferulasäure, Methylester, Trimethylsilylether; 2. Hydroxyhexadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 3. Hydroxyoctadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 4. Dihydroxyhexadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 5.Dihydroxyoctadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 6 Hydroxydocosansäure, Trimethylsilylester, Trimethylsilylether (IS); 7. Dehydrodiferulasäure, Methylester, Trimethylsilylether; 8. β-Sitosterol, Trimethylsilylether**

Abb. 28 zeigt beispielhaft das Chromatogramm des KL-Methanolysats des Weizens, in dem hauptsächlich Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren eluieren.

Hauptsächlich wurden in den KL $C_{16}$- und $C_{18}$-Hydroxycarbonsäuren, v.a. Hydroxyhexadecansäure, Dihydroxyhexadecansäure, Hydroxyoctadecensäure, Epoxyhydroxyoctadecansäure sowie unsubstituierte Fettsäuren und Zimtsäurederivate (Kaffeesäure, Ferulasäure) als KSM identifiziert. Des Weiteren konnten auch Dehydrodiferulasäuren in den KL der Getreideproben Weizen und Roggen identifiziert werden. Diferulasäuren kommen u.a. in der Zellwand von Getreiden vor, wo sie als Cross-links zwischen Arabinoxylanen bzw. zwischen Arabinoxylanen und Lignin fungieren (BUNZEL et al., 2001; RALPH et al., 1998).

Eine ähnliche Rolle könnten sie in den Biolpolymeren Kutin und v. a. Suberin spielen, wobei eine Bindung zwischen den monomeren Bestandteilen des Kutins und des Suberins einerseits und zwischen SPAD und SPPD andererseits gewährleistet werden würde. Glycerol konnte in Spuren nur in einigen Proben identifiziert werden, obwohl Glycerol ein Hauptbestandteil von Kutin und Suberin (SPPD) darstellt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass zur Extraktion der KSM Chloroform verwendet wurde. Glycerol ist in Chloroform nicht nicht bzw. nur in Spuren löslich. Es ist somit wahrscheinlich, dass bei der Extraktion Glycerol in der überwiegend wäßrigen Phase zurückblieben ist.

Wie in Kap. 2.10.1 beschrieben, neigen Epoxyfettsäuren zur Artefaktbildung bei Behandlung des KL mit methanolischem Bortrifluorid (RIEDERER und SCHÖNHERR, 1988b). Abb. 29 zeigt die mögliche Bildung von Methoxy/Hydroxy-Derivaten aus Epoxyhydroxyoctadecansäure bei der Behandlung von KL mit $BF_3$/MeOH.

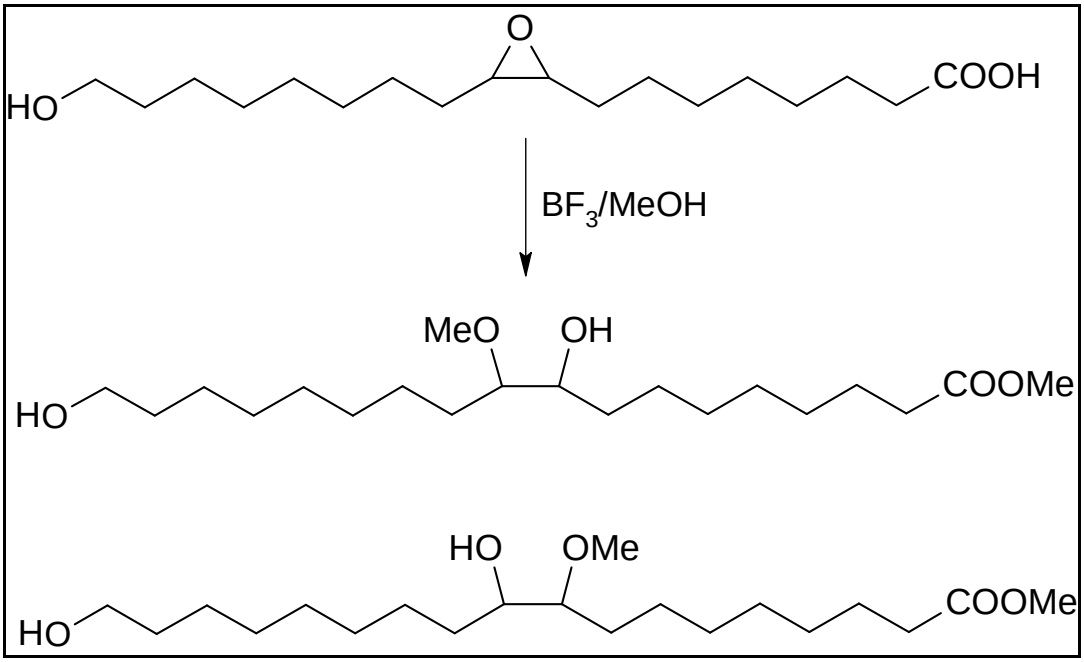



**Abb. 29: Bildung von Methoxy/Hydroxy-Derivaten aus 9,10-Epoxy-18-hydroxyoctadecansäure bei der Umesterung von Kutin und Suberin mit methanolischem Bortrifluorid (Me = Methyl)**

Artefaktbildungen aus Epoxyfettsäuren können nicht nur durch die Umesterung mit methanolischem $BF_3$ eingeleitet werden, sondern auch durch den Einsatz von

anderen Reagenzien (siehe Abb. 30). Dabei werden nicht nur Methoxy/Hydroxy-Derivate, sondern auch chlorierte Derivate und Trihydroxyoctadecansäure gebildet.

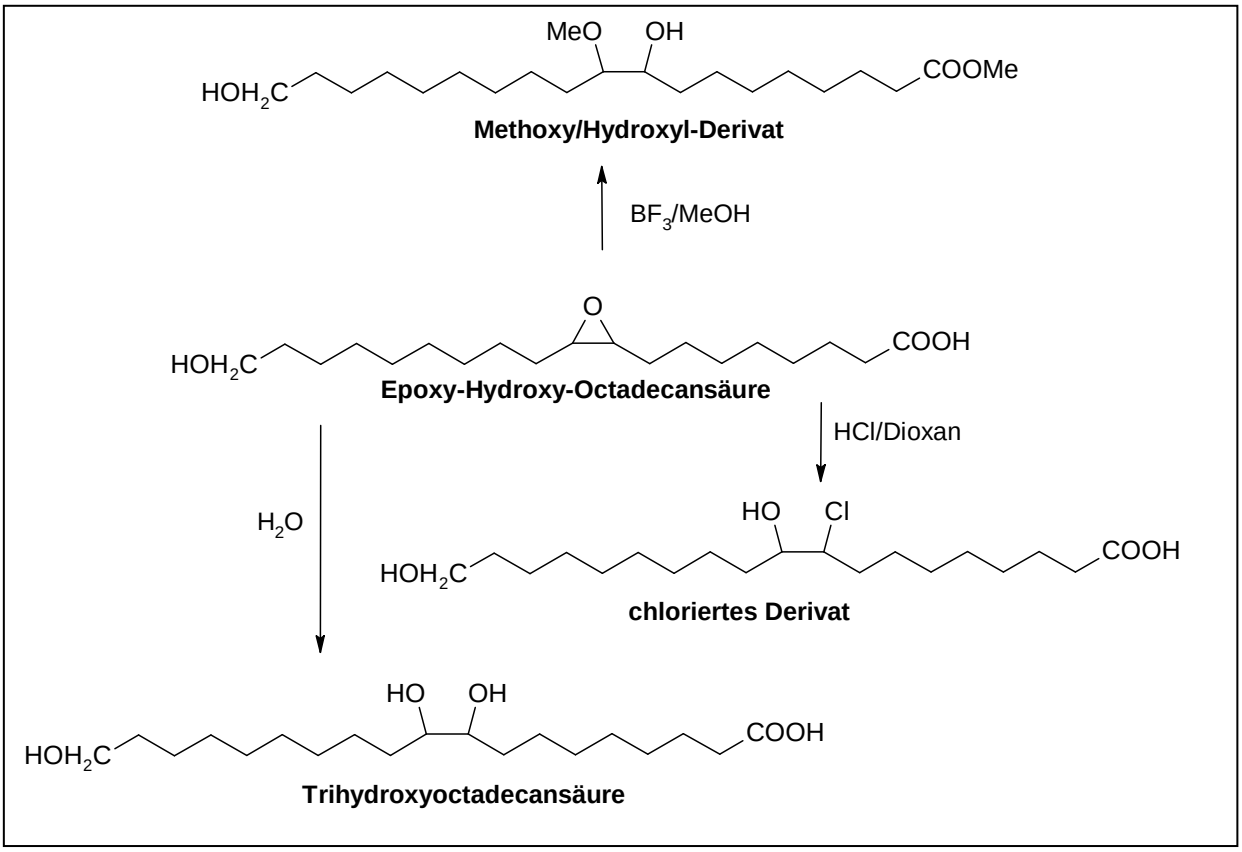



**Abb. 30: Verschiedene Artefaktprodukte der Epoxycarbonsäuren, am Beispiel der 9,10-Epoxy-18-Hydroxyoctadecansäure (Me = Methyl)**

Die Entstehung von diesen Nebenprodukten ist kein kontrollierter Vorgang, sodass nicht gesagt werden kann, welcher Anteil an Epoxyhydroxyoctadecansäure umgewandelt wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass die exakte Bestimmung von Epoxyhydroxyoctadecansäure in verschiedenen KL nicht gewährleistet werden kann. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu beheben, wäre eine Vorbehandlung des Trockenmaterials vor der UBS-Gewinnung mit HCl in Dioxan (SCHÖNHERR und RIEDERER, 1988b). Dadurch könnten die Epoxycarbonsäuren quantitativ in deren chlorierte Derivate umgewandelt und bestimmt werden.

Eine eindeutige Abgrenzung zwischen Kutin und Suberin konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen. In Möhre, wo Suberin zu erwarten war (KOLATTUKUDY et al., 1975; HOSE et al., 2001), konnten Dicarbonsäuren ($C_{16}$-$C_{20}$) identifiziert werden, langkettige Dicarbonsäuren ($C_{24}$-$C_{28}$) aber nicht. Langkettige Dicarbonsäure-Verbindungen stellen Markersubstanzen der SPAD dar (GRAÇA und PAREIRA,

2007). In Möhre ist das Suberin in den Zellwänden des Korkgewebes, zwischen Epidermis und Rinde, aufgelagert. Durch diese Auflagerung wird eine Steuerung des Wasser- und Stofftransports ermöglicht.
Insgesamt kann festgestellt werden, dass die nach totaler Depolymerisierung identifizierten Fettsäuren und Hydroxy-Fettsäuren sowie Zimtsäurederivate und Glycerol zeigen, dass in den KL Kutin und/oder Suberin vorhanden ist (KALLIO et al., 2006; GRAÇA et al., 2002; GRAÇA und PAREIRA, 2007; BERNARDS, 2001), wobei deren Zusammensetzung von der Pflanzenart abhängig ist.
In der Literatur ist das Vorhandensein von Kutin und/oder Suberin in einigen der hier untersuchten Pflanzen, zum Beispiel Weizenkleie (MATZKE und RIEDERER, 1990) und Möhre (KOLATTUKUDY et al., 1975), beschrieben. Diese Untersuchungen sind jedoch begrenzt vergleichbar, da sie sich nicht auf das KL der genannten Pflanzen beziehen.

#### 3.2.3.2 Charakterisierung von Kutin- und Suberinoligomeren nach partieller Depolymerisierung

Um Rückschlüsse auf die im Kutin und Suberin (SPAD) vorhandenen Bindungstypen zu ziehen sowie um das Vorhandensein dieser Polymere in den KL-Rückständen weiter abzusichern, wurde im Zuge dieser Arbeit eine partielle Depolymerisierung mit Natriummethanolat unter milden Bedingungen durchgeführt. Dabei ist auf optimierte Reaktionsbedingungen (Temperatur, Reaktionszeit und Konzentration des Reagenzes) zu achten, da sonst nur Monomere gebildet werden (GRAÇA und PAREIRA, 2000). Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bestimmung konnten neben Monomeren nur einige dimere Verbindungen nachgewiesen werden. Zur Auswertung der erhaltenen Chromatogramme und Spektren diente ein Vergleich mit Massenspektren aus der Literatur (BENTO et al., 1998; EGLINTON et al., 1968; GRAÇA und SANTOS, 2006; GRAÇA et al., 2002; HOLLOWAY und DEAS, 1971; HOLLOWAY und DEAS, 1973; OSMAN et al., 1999; KOLATTUKUDY und WALTON, 1972).
Als Dimere konnten Monooctadecanyl- und Monohexadecanyl-Glycerol nachgewiesen werden. Die Identifizierung von Monohexadecanyl-Glycerol erfolgte anhand des Molpeaks m/z 474 $[M]^+$. Des Weiteren konnten die Massen m/z 459 $[M-15]^+$, m/z 371 $[M-103]^+$, m/z 205 $[M-271]^+$ und m/z 147 beobachtet werden. Diese

werden durch folgende Fragmentierungen gebildet: Abspaltung einer Methylgruppe, gleichzeitige Abspaltung einer hydroxylierten Trimethylsilylgruppe und einer Methylgruppe, der Spaltung zwischen $C_1$ und $C_2$ des Glycerols und McLafferty-Umlagerung (zum Beispiel m/z 147) (siehe Kap. 3.2.2.1).

Allgemein konnten bei der partiellen Depolymerisierung nur wenige Dimere nachgewiesen werden. Sie stellen Ester des Glycerols mit Hexadecansäure und Octadecansäure dar. Damit wurde hier nur das Vorhandensein eines Bindungstyps in den Polymeren Kutin und Suberin gezeigt. In der Literatur werden hingegen noch andere Bindungstypen wie die Ester zwischen Hydroxycarbonsäure und Hydroxycarbonsäure, Glycerol und Hydroxycarbonsäure, Glycerol und Hydroxycarbonsäure und Ferulasäure (siehe Abb. 31) sowie Ferulasäure und Glycerol beschrieben. (GRAÇA und PAREIRA, 2000; GRAÇA et al., 2002; GRAÇA und SANTOS; 2006; GRAÇA und SANTOS; 2007; OSMAN et al., 1999).

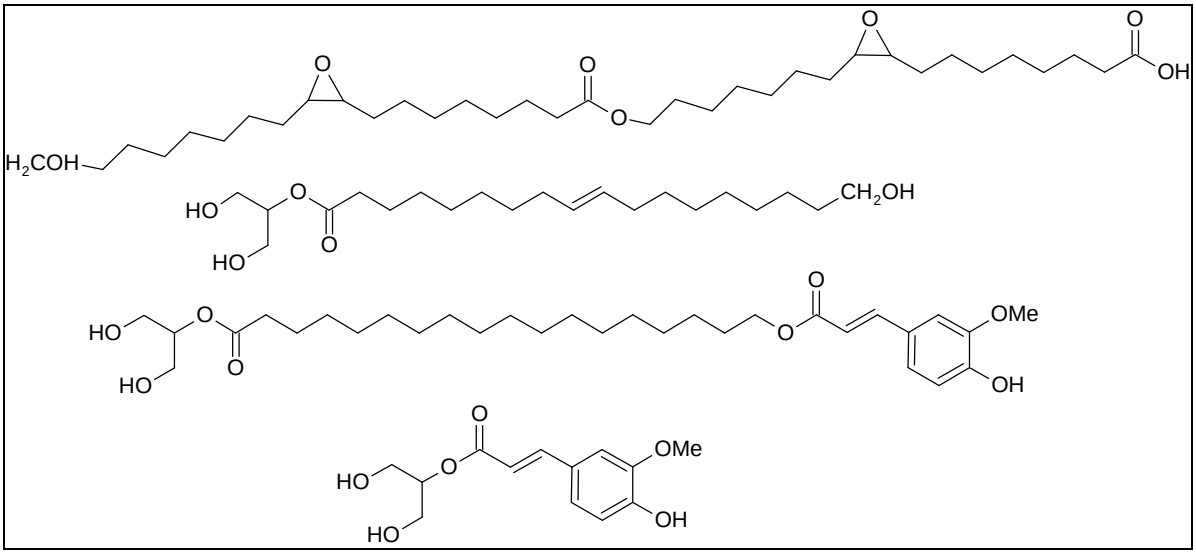



**Abb. 31: In der Lietratur beschriebene Oligomere von Kutin und Suberin, die nach partieller Depolymerisierung erhalten wurden**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch nicht Vertreter aller in der Literatur beschriebenen Bindungstypen nachgewiesen werden. Vermutlich ist dies durch die Behandlung der UBS mit heißer Schwefelsäure bei der KL-Gewinnung zu erklären. Dadurch könnten sich die Bindungen im Polymer strukturell geändert haben, sodass eine Anpassung der Reaktionsbedingungen notwendig ist. Neben Dimeren wurden

erwartungsgemäß hauptsächlich die unter Kap. 3.2.3.1 beschriebenen Monomeren bei der partiellen Depolymerisierung von Kutin und Suberin gebildet. Daher wurden die Reaktionsbedingungen, wie in Kap. 2.11 beschrieben, variiert. Eine Erhöhung der Bildungsrate von Oligomeren bei der partiellen Depolymerisierung konnte jedoch auch durch Anwendung noch milderer Reaktionsbedingungen (Reagenzien, Reaktionszeit, Temperatur) nicht erzielt werden.

#### 3.2.3.3 Gravimetrische Bestimmung von Kutin und Suberinbestandteilen in den Klason-Ligninen

Die Kutin- und Suberinbestandteile in den KL wurden gemäß Kap. 2.10 bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht zwischen den Monomeren von Kutin und Suberin unterschieden werden, da die Bestimmung aus den Gesamtpflanzenorganen und nicht aus den Geweben erfolgte. Die Kutin- und Suberinbestandteile wurden als Monomere in Form ihrer Methylester gravimetrisch bestimmt. Um den wahren Gehalt an KSM in den KL anzunähern, müssen Korrekturfaktoren ermittelt werden, die Korrekturen für die an die Carboxyl-Gruppen addierten Methyl-Gruppen durchführen. Dazu wurden examplarisch Korrekturfaktoren für Hydroxyhexadecansäure und Hydroxyoctadecansäure (Hauptbestandteile von Kutin und Suberin) berechnet. Für die Berechnung des ersten Korrekturfaktors wurde die Molmasse der freien Hydroxyhexadecansäure durch die Molmasse der methylierten Hydroxy-hexadecansäure dividiert (Korrektufaktor 0,951). Die Berechnung des zweiten Korrekturfaktors erfolgte ähnlich, wobei die Molmassen der freien Hydroxyoctadecansäure und des Methylesters eingesetzt wurden (Korrekturfaktor 0,955). Der Mittelwert aus den zwei berechneten Korrekturfaktoren stellt den für die gravimetrische Bestimmung der Kutin- und Suberinbestandteile eingesetzten Korrekturfaktor (0,953) dar.

Nach Korrektur konnten die höchsten KSM-Gehalte in den KL von Roggen und Grünkohl mit 47,1 ± 0,6 % und 40,1 ± 4,7 % ermittelt werden. Die niedrigsten KSM-Gehalte wurden in den KL von Kiwi und Möhre mit 28,6 ± 9,7 % und 23,2 ± 0,4 % ermittelt (siehe Abb. 32).

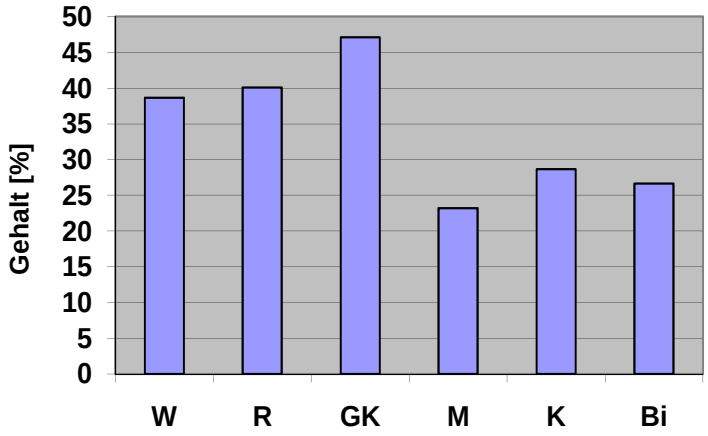



**Abb. 32: Prozentuale Gehalte von Kutin- und Suberinmonomeren in den Klason-Ligninen der untersuchten Pflanzenproben: W (Weizen), R (Roggen), GK (Grünkohl), M (Möhre), K (Kiwi), Bi (Birne)**

Die Gehalte an KSM unterscheiden sich stark von Pflanze zu Pflanze. Auch innerhalb der Getreide sind Schwankungen festzustellen. So unterscheiden sich die KSM-Gehalte von Weizen und Roggen um ca. 2 %. Da Kiwi geschält untersucht wurde, war ein niedrieger KSM-Gehalt zu erwarten. Kutin ist ebenso wie Wachse hauptsächlich in der Kutikula lokalisiert, wo es bis zu 80 % der Trockenmasse darstellen kann (KALLIO et al., 2006). Insgesamt kann festgestellt werden, dass die gravimetrische Bestimmung eine realistische Wiederspiegelung der KSM-Gehalte darstellt.

### 3.2.4 Bestimmung der Asche- und Proteingehalte in den Klason-Ligninen

Die Aschebestimmung erfolgte gemäß Kap. 2.4. Die Aschegehalte betrugen 0,5-2,6 % bezogen auf das KL. Der niedrigste Aschegehalt wurde in den KL von Kiwi mit 0,5 % ermittelt; der höchste in den KL von Weizen mit 2,6 %.

Die Bestimmung der Restproteine in den KL der untersuchten Pflanzenproben erfolgte photometrisch nach Aufschluss und Umsetzung der entstandenen Ammonium-Ionen mit Salicylat. Der höchste Proteingehalt wurde in den KL von Weizen mit 24,0 ± 0,4 % ermittelt. Der Proteingehalt aus dem KL des Roggens war niedriger (13,9 ± 0,5 %). Die Proteingehalte der anderen Proben lagen unter 13,0 %

bezogen auf das KL. Die niedrigsten Proteingehalte wiesen die KL der Birne und Möhre mit ca. 9 % auf.

Die Restproteine, die in den KL vorhanden sind, sind wahrscheinlich hauptsächlich Strukturproteine, die schwer durch Proteasen (UBS-Gewinnung) abzubauen sind. Eine andere Erklärung dafür, dass die bestimmten Restproteine bei der UBS-Gewinnung nicht abgebaut wurden, besteht darin, dass sie in einer komplexen Matrix eingebettet sind und somit für die eingesetzten Enzyme schwer zugänglich sind. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Proteine strukturellen Veränderungen, zum Beispiel im Zuge der Maillard-Reaktion, während des gesamten Verfahrens unterlegen sind. Eine Strukturänderung der Proteine im Zuge der Maillard-Reaktion erscheint möglich, da die Isolierung der UBS und der KL bei hoher Temperatur abläuft.

### 3.2.5 Korrektur der Klason-Lignin-Gehalte

Um den “wahren“ Gehalt an Ligninen in den isolierten KL anzunähern, wurden die ermittelten KL-Gehalte um die Gehalte an mitbestimmten KSM, WFB sowie Restprotein und Asche korrigiert. Abb. 33 gibt einen Überblick über die bei der KL-Gewinnung miterfassten Nicht-Lignin-Substanzen.

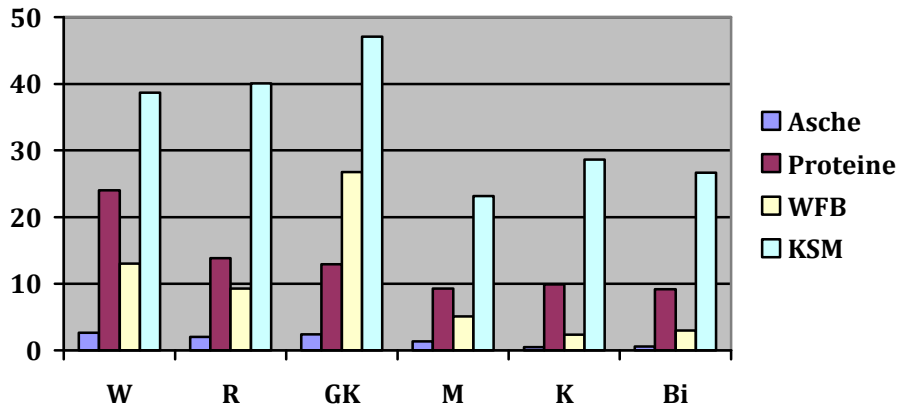



**Abb. 33: Prozentuale Anteile der bei der Klason-Lignin-Gewinnung mitbestimmten Nicht-Lignin-Komponenten (Asche, Proteine, Wachs- und Fettbestandteile (WFB) sowie Kutin- und Suberinmonomere (KSM)): W (Weizen), R (Roggen), GK (Grünkohl), M (Möhre), K (Kiwi), Bi (Birne)**

In allen KL-Proben stellen KSM die dominierenden Nicht-Lignin-Komponenten dar. In den KL von Grünkohl wurden neben KSM hohe Anteile an WFB bestimmt. Die KL von Weizen enthielten einen besonders hohen Gehalt an Proteinen.

Für jede Pflanze konnte durch Addition der Gehalte der in den KL miterfassten Nicht-Lignin-Verbindungen ein Korrekturfaktor ermittelt werden. Die KL-Gehalte der Getreideproben (Weizen, Roggen) und Grünkohl wurden mit Korrekturfaktoren zwischen 0,1-0,4 um mehr als die Hälfte korrigiert. Dies bedeutet, dass die Anteile an „wahren“ Ligninen in den KL dieser Proben 40 % nicht überschreiten. Hingegen betrugen bei Birne, Kiwi und Möhre die Korrekturfaktoren 0,5-0,6. Dies spricht für einen höheren Ligningehalt und einen niedrigeren Gehalt an mitbestimmten Substanzen in den KL dieser Proben.

Abb. 34 stellt den Vergleich der korrigierten KL und der unkorrigierten KL der untersuchten pflanzlichen Proben dar.

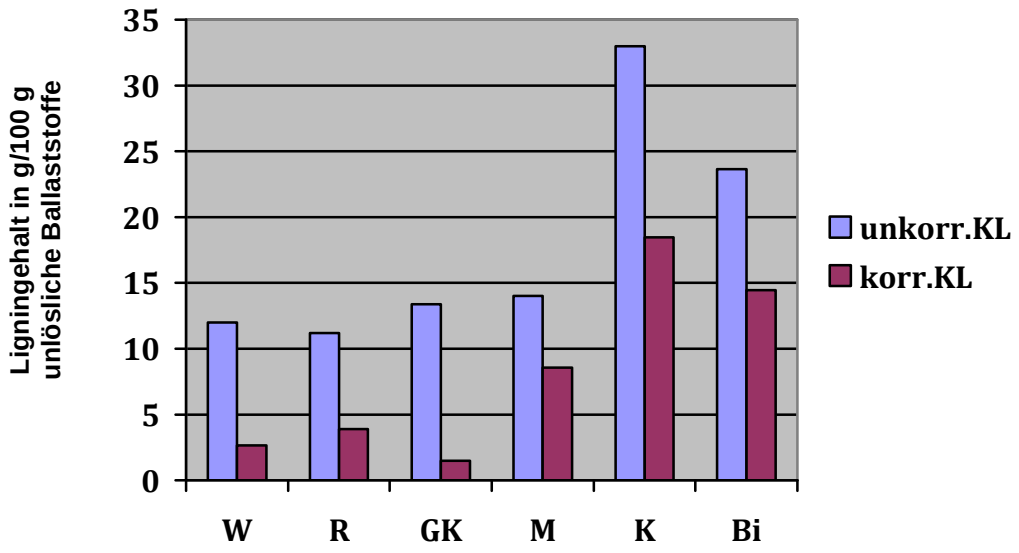



**Abb. 34: Vergleich der Gehalte an unkorrigierten Klason-Ligninen und korrigierten Klason-Ligninen (KL) in den unlöslichen Ballaststoffen der untersuchten Pflanzenproben: W (Weizen), R (Roggen), GK (Grünkohl), M (Möhre), K (Kiwi), Bi (Birne)**

Obwohl die Korrekturfaktoren durch Anwendung sorgfältig ausgearbeiteter Methoden bestimmt wurden, sollten die Werte nicht als „Absolutwerte“ verstanden werden. Im Laufe dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass, obwohl die Trends vollständig gültig blieben, die Zahlenwerte geringere Schwankungen aufwiesen. Dies ist u.a.

damit erklärbar, dass bereits geringe Abweichungen in der Durchführung der UBS- bzw. KL-Gewinnung zu Änderungen in der KL-Zusammensetzung führen.
Die KL-Methodik scheint für solche Pflanzen besser geeignet zu sein, für welche man höhere Ligningehalte in den Geweben erwarten würde. In solchen pflanzlichen Produkten (hier Birne (Steinzellen), Kiwi (Columella, Samen), Möhre (Zylinder)) liegen Werte für die „wahren“ Ligningehalte und die KL-Gehalte näher zusammen. Natürlich ist aber auch von Bedeutung welche Konzentrationen an Strukturproteinen, Wachsen, Kutin und Suberin in den untersuchten pflanzlichen Materialien vorliegen.

Kohlenhydrate müssen bei der Korrektur der KL, anders als Proteine, Asche, Wachse, Kutin und Suberin, nicht berücksichtigt werden. Die aufeinanderfolgende Behandlung der UBS mit konzentrierter und verdünnter Schwefelsäure im Zuge der KL-Methodik führt nahezu zum vollständigen Abbau von Kohlenhydraten. Eine wiederholte Kohlenhydratanalyse des KL zeigte nur bei zwei Proben (Birne und Möhre) Spuren an Mannose und Galaktose (siehe Kap. 5.4.3). Diese wurden jedoch nicht quantifiziert, da deren Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Kohlenhydrate sind daher kein nennenswerter Bestandteil der isolierten KL und nicht in mögliche Korrekturfaktoren einzubinden. Nicht berücksichtigt in den beschriebenen Untersuchungen wurde Kutan. Da Kutan eine unverseifbare Substanz darstellt (KALLIO et al., 2006), ist es möglich, dass es bei der KL-Bestimmung teilweise mitbestimmt wird und somit der Gehalt an KL fälschlicherweise erhöht wird.
Zu berücksichtigen ist auch, dass bei der KL-Gewinnung kleine Anteile an Lignin abgebaut werden können. In der Literatur (FUKUSHIMA und HATFIELD, 2005) wird der teilweise Ligninabbau auf etwa 5 % abgeschätzt. Um zu überprüfen, ob Lignin bei der KL-Gewinnung teilweise abgebaut wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit die schwefelsauren Waschlösungen nach der KL-Gewinnung von Birne und Kiwi auf das Vorhandensein von Ligninfragmenten untersucht. Kiwi und Birne wurden für die Untersuchung auf den Ligninabbau bei der KL-Gewinnung ausgesucht, da in diesen Proben höhere Gehalte an „wahren“ Ligninen zu erwarten sind. Dazu wurden potentielle Monolignole und Oligolignole aus der KL-Waschlösung mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatextrakte wurden anschließend, wie in Kap. 5.3.6 beschrieben, photometrisch und gaschromatographisch untersucht. Die gaschromatographische Untersuchung erfolgte gemäß der DFRC-Methodik. Die

photometrische Untersuchung zeigte Spektren mit Absorptionsmaxima bei 280 nm (siehe Abb. 35).

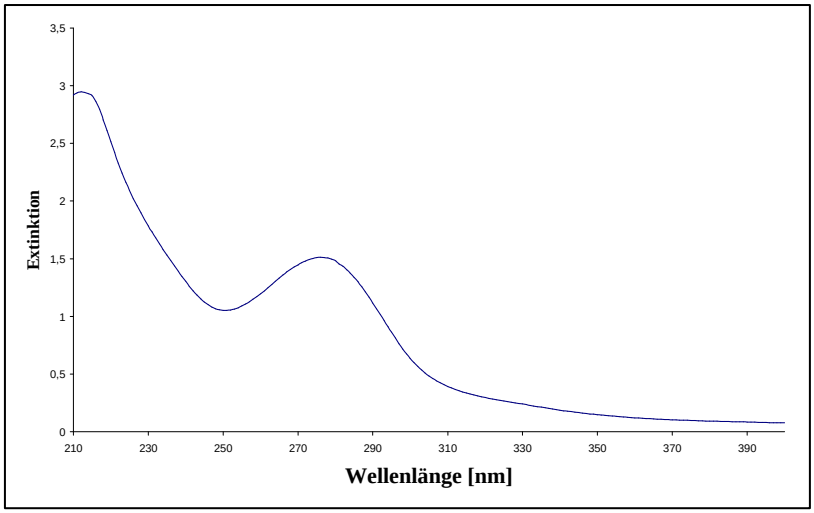



**Abb. 35: Ultraviolett-Spektrum der Waschlösung des Klason-Lignins von Birne**

Des Weiteren konnten gaschromatographisch Coniferylalkohol und Sinapylalkohol in den Ethylacetatextrakten der KL-Waschlösung von Birne und Kiwi identifiziert werden (siehe Tab. 8).

**Tab. 8: Einteilung der Oligolignole in den untersuchten Ethylacetatextrakten der Klason-Lignin Waschlösungen von Birne und Kiwi nach dem Guaiacyl (G)/Sinapyl (S)-Verhältnis**

| Probe | Quotient G/S | Kategorie |
|---|---|---|
| Birne | 0,7 | G/S-ausgewogen |
| Kiwi | 3,1 | G-reich |

Die untersuchte Monolignol/Oligolignol-Mischung aus dem Ethylacetatextrakt der KL-Waschlösung der Birne zeigte ein ausgewogenes Verhältnis an G- und S-Einheiten. Birne enthält wie später (Kap. 3.4.3) und in der Literatur (BUNZEL et al., 2005; BUNZEL et al., 2006) beschrieben ein G/S-ausgewogenes Lignin. In dem Ethylacetatextrakt der KL-Waschlösung von Kiwi wurden kleine Anteile von Coniferylalkohol identifiziert, Sinapylalkohol jedoch nur in Spuren. Das untersuchte Lignin der KL-Waschlösung von Kiwi war, ebenso wie in der Literatur (BUNZEL et al., 2005; BUNZEL et al., 2006) beschrieben, G-reich.

Neben den Waschlösungen wurden auch erhaltenen KL mit Hilfe der DFRC-Methode untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass nur geringe Anteile an Monolignolen (G, S) freigesetzt werden konnten. Die Freisetzungsrate war niedriger als in den UBS. Dies erscheint zunächst ungewöhnlich, da in den KL das Lignin angereichert vorliegen sollte. Möglicherweise wird Lignin bei der drastischen Behandlung mit Schwefelsäure strukturell verändert, sodass eine reduktive Spaltung der Monolignole mittels DFRC nicht mehr erfolgen kann. Genannte Untersuchungen bestätigen somit, dass Lignine bei der KL-Gewinnung durch Schwefelsäure teilweise abgebaut werden und wahrscheinlich strukturellen Veränderungen unterliegen. Die Tatsache, dass Lignine während der KL-Gewinnung teilweise abgebaut werden, ist ein weiteres Indiz dafür, dass die KL-Methode ungeeignet ist, um den „wahren“ Ligningehalt in pflanzlichen Lebensmitteln zu bestimmen.

## 3.3 Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin in den unlöslichen Ballaststoffen und den Klason-Ligninen pflanzlicher Proben

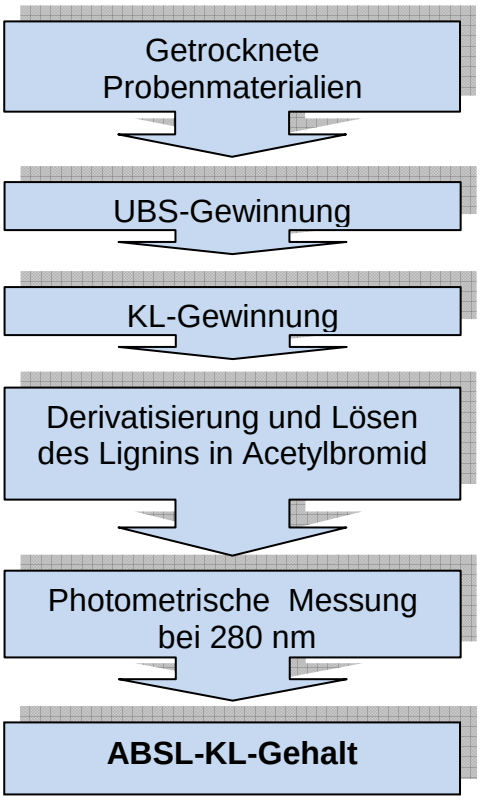



**Abb. 36: Schematische Darstellung der Bestimmung des Ligningehalts in den untersuchten pflanzlichen Proben durch Kombination zweier Verfahren zur Ligninbestimmung: UBS, unlösliche Ballaststoffe; KL, Klason-Lignin; ABSL, Acetylbromidlöslisches Lignin; ABSL-KL-Gehalt, Gehalt des Lignins in Klason-Lignin berechnet als acetylbromidlösliches Lignin**

Eine weitere Strategie zur Bestimmung des „wahren“ Ligningehaltes könnte sein, den Ligningehalt im KL mit einer zweiten Methode, der ABSL-Methode, zu bestimmen. So könnte zumindest das Problem der mitbestimmten Nicht-Lignin-Anteile im KL gelöst werden. Natürlich würde ein solcher methodischer Ansatz jedoch nicht berücksichtigen, dass geringe Ligninanteile während der KL-Gewinnung verloren gehen (s. vorheriges Kapitel). Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurden die ABSL-Gehalte in den KL analysiert und mit denen der UBS bzw. AUBS verglichen (Abb. 37). Dies erfolgt durch Kombination der KL-Methode und der ABSL-Methode (siehe Abb. 36). Dazu wurden die isolierten KL in Acetylbromidlösung gelöst und photometrisch bei 280 nm vermessen.

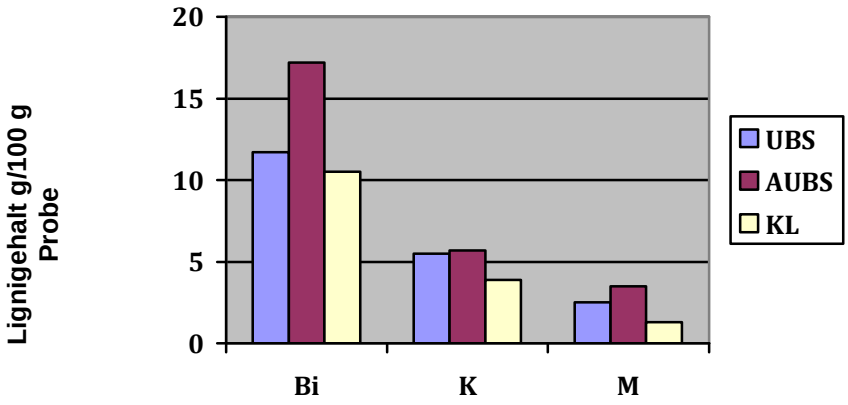



**Abb. 37: Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe (UBS), angereicherten unlöslichen Ballaststoffe (AUBS) und Klason-Lignine (KL) der untersuchten pflanzlichen Proben, berechnet als acetylbromidlösliches Lignin; Bi (Birne), K (Kiwi), M (Möhre)**

Abb. 37 ist zu entnehmen, dass der ABSL-Gehalt der AUBS von Birne, Kiwi und Möhre (17,2 %, 5,7 % und 3,5%) erwartungsgemäß höher ist als der der UBS der untersuchten Proben (11,7 %, 5,5 % und 2,5%). In den AUBS liegen die Lignine nach enzymatischer Behandlung mit Driselase angereichert vor, da Nicht-Stärke-Polysaccharide (Cellulose, Hemicellulose u.a.) teilweise abgebaut und entfernt wurden. Nach dieser Theorie wäre ebenso zu erwarten, dass der ABSL-Gehalt des KL (ABSL-KL-Gehalt) höher ist als der der UBS. Die hier ermittelten ABSL-KL-Gehalte von Kiwi, Möhre und Birne bezogen auf das eingesetzte KL (3,9 %, 1,3 % und 10,5 %) sind sehr niedrig und sogar niedriger als die ABSL-Gehalte der UBS-Proben (5,5 %, 2,5 % und 11,7 %).

Sehr wahrscheinlich unterliegen die Lignine während der schwefelsauren Behandlung strukturellen Veränderungen. Dies würde bedeuten, dass die strukturell veränderten Lignine im KL sich nicht vollständig in der Acetylbromidlösung lösen, so dass nicht das gesamte Lignin im KL erfasst wird. Diese Theorie wird durch die in Kap. 3.2.5 vorgestellten Ergebnisse unterstützt. Die Lignine im KL waren nicht mehr vollständig für die DFRC-Methode zugänglich, ein weiterer Hinweis für die strukturelle Veränderung der Lignine während der KL-Gewinnung.
Die hier anhand von drei Proben (Birne, Kiwi, Möhre) durchgeführten Versuche zeigen, dass der Ansatz der kombinierten KL- und ABSL-Methodik nicht geeignet ist, um die „wahren“ Lignine in pflanzlichen Lebensmitteln zu bestimmen.

## 3.4 Lokalisierung des Ligninpolymers und Bestimmung des „Ligningehaltes“ in den untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit sollte darin bestehen, das Lignin in den untersuchten Obst- und Gemüseproben zu lokalisieren.
Um Rückschlüsse auf die Lokalisierung des Lignins in den untersuchten Proben zu ziehen, wurde die ABSL-Methode angewendet. Das heißt, die Ligningehalte der unterschiedlichen Gewebe von Möhre, Kiwi und Birne (siehe Tab. 4, Kap. 2.1.2) wurden als acetylbromidlösliches Lignin bestimmt. Als Untersuchungsmaterialien wurden Kiwi, Möhre und Birne ausgewählt, da in diesen pflanzlichen Lebensmitteln lignifizierte Gewebe vermutet wurden. Anschließend sollten die in den verschiedenen Geweben lokalisierten Lignine charakterisiert werden. Hierzu sollte die Ligninzusammensetzung mit Hilfe der DFRC-Methode bestimmt werden.

### 3.4.1 Ermittlung molarer Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung des Ligningehalts als acetylbromidlösliches Lignin

Neben der KL-Methodik wird der Ligningehalt pflanzlicher Proben hauptsächlich durch ein schnelles, photometrisches Verfahren bestimmt, die ABSL-Methode. Bei der ABSL-Methode wird Lignin derivatisiert, somit in Lösung gebracht und photometrisch bei 280 nm bestimmt (IIYAMA und WALLIS, 1990; FUKUSHIMA und HATFIELD, 2001; FUKUSHIMA und HATFIELD, 2004; BUNZEL et al., 2005). Die Problematik dabei besteht darin, einen geeigneten molaren Extinktionskoeffizienten

für jede Pflanze bzw. für unterschiedliche Pflanzenorgane zu bestimmen. Zumeist wird dies jedoch vernachlässigt, und ein „universeller“ Extinktionskoeffizient von 20 L $g^{-1}cm^{-1}$ wird zur Berechnung des Ligningehalts in verschiedenen Pflanzenmaterialien eingesetzt (IIYAMA UND WALLIS, 1990, BUNZEL et al., 2005).
Um die Bestimmung der Lignin-Gehalte der untersuchten Pflanzenproben mit Hilfe der ABSL-Methode zu optimieren, ist es notwendig, für das Lignin jeder Pflanze einen molaren Extinktionskoeffizienten zu bestimmen. Dazu wurden UBS-Proben enzymatisch angereichert und in einer Kugelmühle feinst vermahlen. Die AUBS-Proben dienten anschließend zur Isolierung von Ligninen, die zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten eingesetzt wurden.

#### 3.4.1.1 Enzymatische Anreicherung der unlöslichen Ballaststoffe

Um einen für das jeweilige Lignin spezifischen Extinktionskoeffizienten zu bestimmen, muss zunächst ein repräsentativer Anteil des Lignins aus dem pflanzlichen Material isoliert werden. Die Isolierung des Lignins sollte hier aus „angereicherten“ UBS erfolgen. Dies sind UBS, deren Nicht-Stärke-Polysaccharide teilweise enzymatisch abgebaut wurden. Dadurch soll die Mitextraktion von Kohlenhydraten während der Ligninisolierung minimiert werden.
Die höchste Abbaurate von Nicht-Stärke-Polysacchariden nach der Behandlung mit dem Enzymgemisch Driselase wurde in den UBS von Möhre mit 81,8 % erzielt; dies entspricht einem Rückstand von 18,2 %. Die UBS von Kiwi und Birne wurden zu 41,2 % bzw. 71,9 % abgebaut (siehe Kap. 5.4.4, Tab. 16).

#### 3.4.1.2 Gewinnung der Dioxan- und Säure-Lignine

Die Isolierung von Ligninen aus pflanzlichen Proben führt nicht zur Gewinnung von „reinen Ligninen“, da andere Verbindungen wie Proteine oder Kohlenhydrate mitextrahiert werden. Dies ist besonders ausgeprägt, wenn drastische Bedingungen, wie die Extraktion mit Acetylbromid (FUKUSHIMA und HATFIELD, 2004), eingesetzt werden. Des Weiteren ist die Isolierung von Ligninen oft unvollständig, und die Ausbeute ist von der Extraktionsmethode stark abhängig.
Die in Kap. 3.4.1.1 gewonnenen AUBS wurden gemäß des in Kap. 2.13.2 beschriebenen Verfahrens zur Isolierung von DL und SL eingesetzt. Den höchsten

Gehalt an DL wies Birne mit 20,2 % bezogen auf die AUBS auf, darauf folgten Möhre mit einem DL-Gehalt von 13,0 % und Kiwi mit 9,0 % (siehe Abb. 38). Mit 22,1 % wies Möhre den höchsten Gehalt an SL auf, gefolgt von Birne mit 2,3 % und Kiwi mit 1,6 % SL.

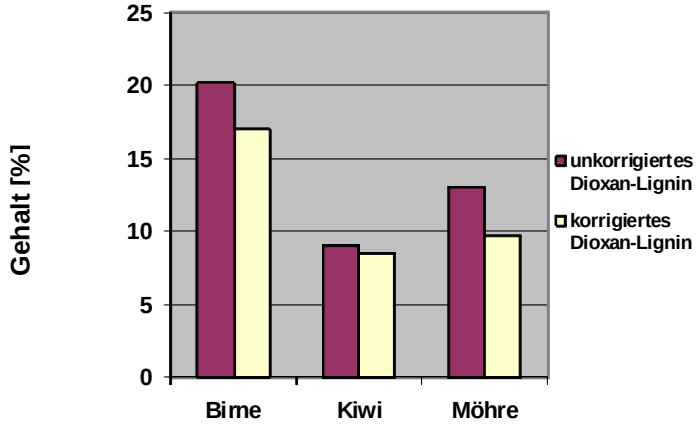



**Abb. 38: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Dioxan-Lignin-Gewinnung**

Für die weitere Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten wurden die DL verwendet, da diese in größeren Ausbeuten gewonnen wurden, weniger mit Kohlenhydraten verunreinigt waren (siehe Kap. 5.4.7) und aufgrund der milderen Extraktionsbedingungen geringeren strukturellen Veränderungen unterlagen. Die Kohlenhydratgehalte der DL betrugen 15,9 % (Birne), 26,0 % (Möhre) und 5,3 % (Kiwi). Nach Korrektur der Ligningehalte um die Kohlenhydratbestandteile betrugen die Gehalte an DL für Birne 17,0 %; Kiwi 8,5 % und Möhre 9,7 % (bezogen auf die AUBS).

Wie beschrieben, wiesen die DL von Möhre und Birne höhere Kohlenhydratanteile auf. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Präzipitation dieser Lignine in Wasser aus nicht geklärter Ursache nicht möglich war. So konnten die DL aus Möhre und Birne nur durch Einengen isoliert werden und ein wichtiger Reinigungsschritt entfiel.

Zur Charakterisierung der Lignine wurden diese NMR-spektroskopisch untersucht. Dazu wurden die DL acetyliert, in deuteriertem Dioxan gelöst und vermessen. Die $^{1}$H-NMR-Spektren der DL von Kiwi und Möhre sind den Abb. 39a und b zu entnehmen.

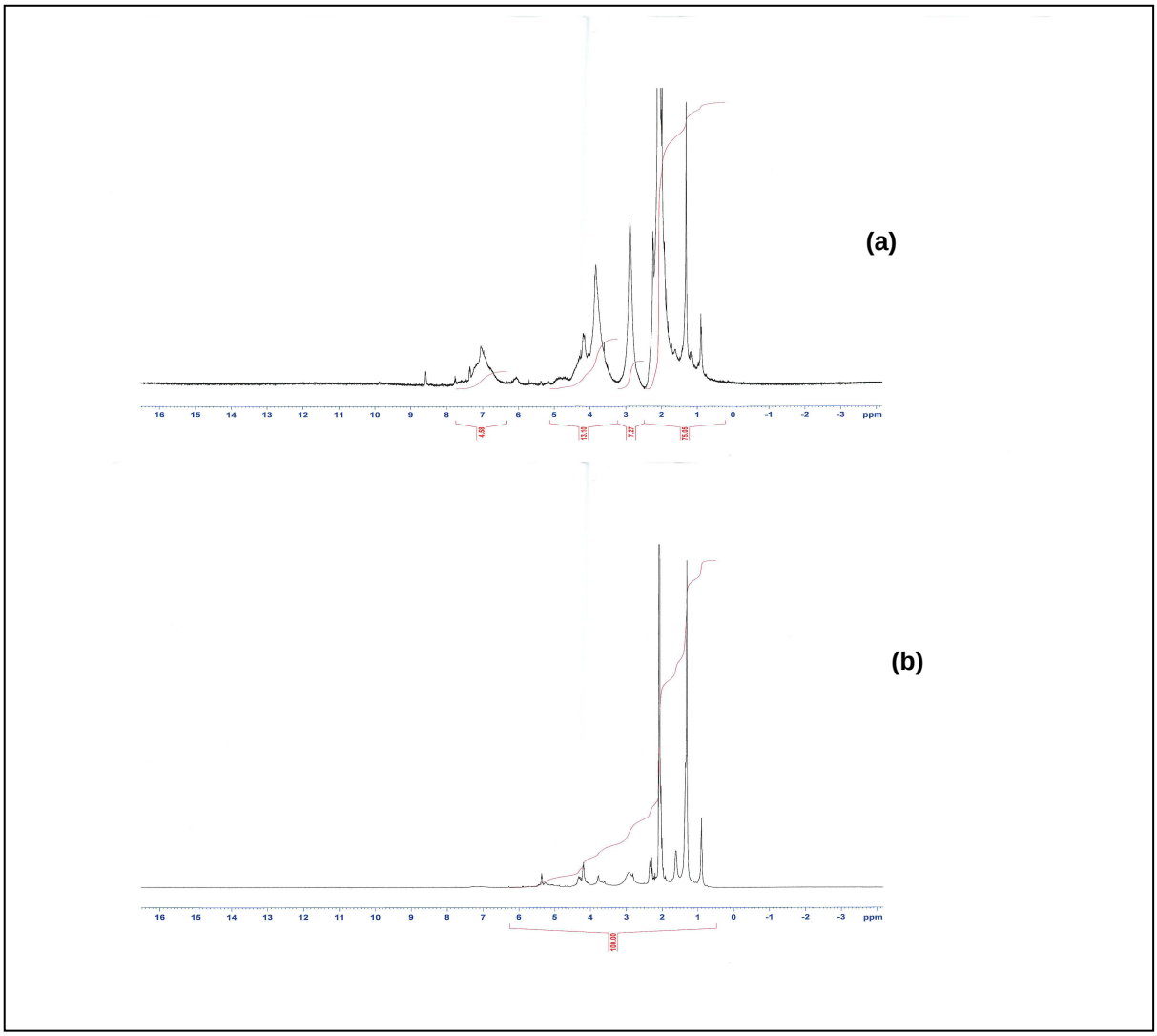



**Abb. 39: Kernresonanzspektroskopische Darstellung der Dioxan-Lignine von Kiwi (a) und Möhre (b)**

Das $^{1}$H-Spektrum des Kiwi DL zeigte intensive Signale im phenolischen Bereich (6-9 ppm). Diese Signale sind im Möhren DL deutlich weniger stark ausgeprägt. Vor allem das DL der Möhre zeigte intensive Signale im aliphatischen Bereich, die nicht nur auf die Acetylierung des DL zurückzuführen sind. Hier ergeben sich klare Hinweise darauf, dass vorhandene Verbindungen wie z.B. Proteine oder aber auch Suberin mitextrahiert wurden.

Die Verunreinigungen der Lignine spiegelte sich in den bestimmten Extinktionskoeffizienten von 10,4 L $g^{-1}$ $cm^{-1}$ für Birne, 13,0 L $g^{-1}$ $cm^{-1}$ für Kiwi und 4,2

L $g^{-1}$ $cm^{-1}$ für Möhre wider. Diese Extinktionkoeffiziente erscheinen unrealistisch und deuten auf die Mitextraktion von Nicht-Ligninkomponenten hin.
Da im Zuge dieser Arbeit also keine spezifischen Extinktionskoeffizienten für Birne, Kiwi und Möhre bestimmt werden konnten, wurden im Weiteren der unspezifische Extinktionskoeffizient 20 L $g^{-1}$ $cm^{-1}$ eingesetzt.

### 3.4.2 Ligningehalte der untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen

Die Bestimmung des Ligningehaltes als ABSL in den UBS und AUBS der gesamten Pflanzenorgane und der verschiedenen Gewebe innerhalb der Organe erfolgte photometrisch bei 280 nm. Zur Berechnung der ABSL-Gehalte wurde aus den im vorherigen Kapitel diskutierten Gründen der Standardextinktionskoeffizient von 20 L $g^{-1}$ $cm^{-1}$ eingesetzt (siehe auch Kap. 2.12). Als Ausgangsmaterialien für die Bestimmung wurden UBS und AUBS eingesetzt.
Bei den Gesamtproben wurde der höchste ABSL-Gehalt in den UBS der Birne mit 11,7 % bestimmt (siehe Abb. 37). Für die UBS der Kiwi wurde ein ABSL-Gehalt von 5,5 % ermittelt, die UBS der Möhre enthielten 2,5 % ABSL. Ebenso wiesen die AUBS der Birne den höchsten ABSL-Gehalt mit 17,2 % auf und für die UBS der Möhre wurde der niedrigste ABSL-Gehalt mit 3,5 % ermittelt. BUNZEL und Mitarbeiter (2005) konnten ABSL-Gehalte von jeweils 25,1 %, 19,5 % und 3,4 % für Birne, Kiwi und Möhre bestimmen. Diese Unterschiede sind vermutlich auf den Einsatz anderer Probenmaterialien und/oder den Reifegrad der Pflanzen zurückzuführen.

In Hinblick auf die Fraktionen der Birne ergab sich für die Schale der höchste ABSL-Gehalt. Der ABSL-Gehalt der UBS der Birnenschale betrug 18,4 %. Die Analyse der UBS des Birnenfruchtfleisches ergab einen ABSL-Gehalt von 10,9 %. Der höchste Gehalt an ABSL bezogen auf den AUBS der Geweben von Birne wurde ebenso in der Schale mit 19,8 % bestimmt.
Bei den Fraktionen der Kiwi wurde der höchste ABSL-Gehalt in den Samen gefunden. Die unbehandelten UBS der Kiwisamen enthielten 5,0 % ABSL. Die Analyse der UBS der Kiwicolumella ergab einen ABSL-Gehalt von 3,5 %. Für das Kiwifruchtfleisch wurden die geringsten ABSL-Gehalte bestimmt. In den UBS des Kiwifruchtfleisches wurde nur ein ABSL-Gehalt von 3,1 % bestimmt. Auch in den AUBS der verschiedenen Fraktionen wiesen die Kiwisamen den höchsten ABSL-

Gehalt mit 5,2 % auf. Der niedrigste ABSL-Gehalt wurde, wie bei der Analyse der UBS, im Kiwifruchtfleisch mit 2,5 % bestimmt.

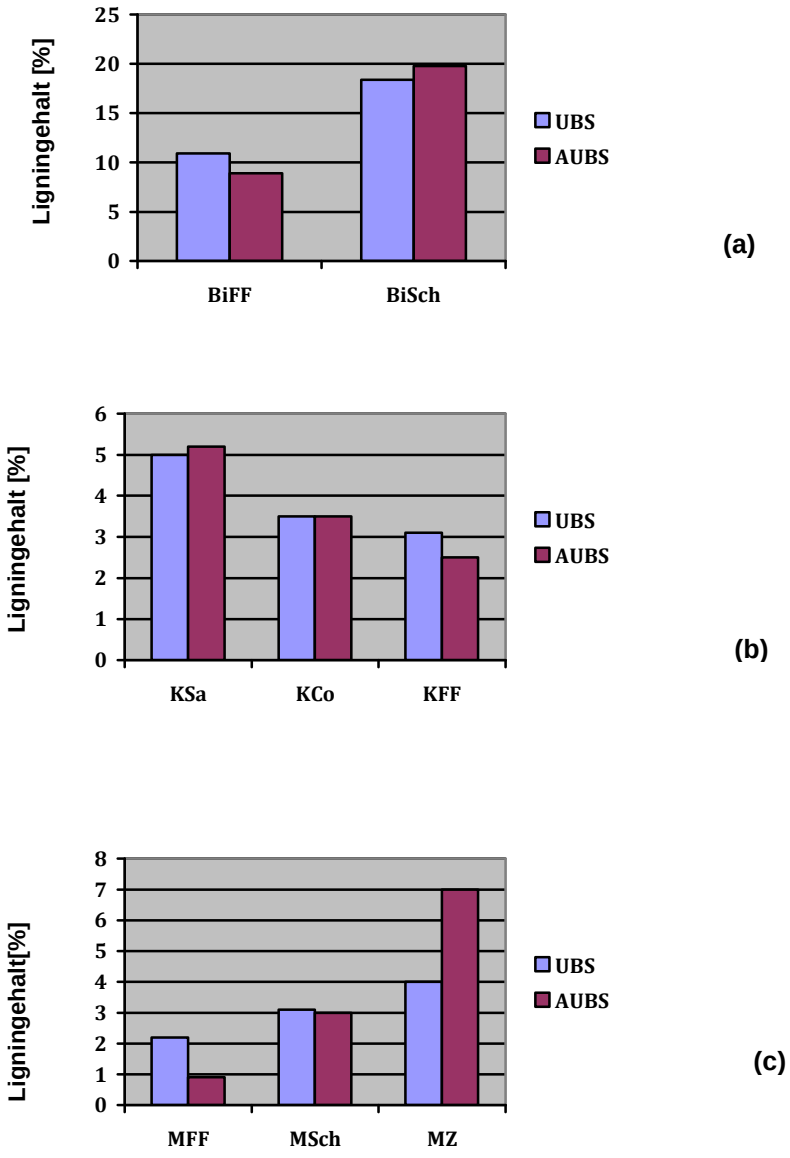



**Abb. 40: Ligningehalte in % (bestimmt als acetylbromidlösliches Lignin) der unlöslichen und der angereicherten unlöslichen Ballaststoffe aus verschiedenen Geweben von Birne (a), Kiwi (b) und Möhre (c): UBS, unlösliche Ballaststoffe; AUBS, angereicherte un-lösliche Ballaststoffe; BiFF, Fruchtfleisch der Birne; BiSch, Schale der Birne; KSa, Samen der Kiwi; KCo, Columella der Kiwi; KFF, Fruchtfleisch der Kiwi; MFF, Fruchtfleisch der Möhre; MSch, Schale der Möhre; MZ, Zylinder der Möhre.**

Für die Fraktionen der Möhre ergaben sich die höchsten ABSL-Gehalte für die Fraktionen des Möhrenzylinders. Die ABSL-Gehalte betrugen jeweils 4,0 % für die UBS und 7,0 % für die AUBS. Der ABSL-Gehalt der UBS der Möhrenschale betrug 3,1 % und der des Möhrenfruchtfleisches nur 2,2 %. Bezogen auf die AUBS betrugen

die ABSL-Gehalte für Möhrenzylinder, Möhrenschale und Möhrenfruchtfleisch 7,0 %, 3,0 % bzw. 0,9 %.

Die ABSL-Gehalte der AUBS des Möhrenfruchtfleisches und des Kiwifruchtfleisches sind niedriger als die der UBS. Normalerweise sollte durch die „Anreicherung“ des Lignins in den AUBS das Gegenteil erreicht werden. Bei der Anreicherung werden Nicht-Stärke-Polysaccharide wie Pektine abgebaut und somit sollte der Ligningehalt relativ erhöht werden. Es wird vermutet, dass bei der Anreicherung der Fraktionen „Birnenfruchtfleisch“, „Möhrenfruchtfleisch“ und „Kiwifruchtfleisch“ andere phenolische, evtl. ligninartige Verbindungen, die bei der Ligninbestimmung der UBS als Lignin mitbestimmt wurden und somit einen höheren Ligninwert vortäuschen, von der Polymermatrix abgetrennt und ausgewaschen wurden.

In Abb. 40a-c sind die ABSL-Gehalte der Fraktionen von Birne, Kiwi und Möhre bezogen auf die UBS und die AUBS graphisch dargestellt.

Wie beschrieben wurden die höchsten ABSL-Gehalte in den Fraktionen für Kiwisamen, Möhrenzylinder bzw. Birnenschale ermittelt.

Birne zählt zu den wenigen Früchten, in denen Lignin im Fruchtfleisch in Steinzellen gebildet wird. Eine anatomische Studie der Birnenfrucht zeigt, dass die Textur des Fruchtfleisches durch Auflagerung von Lignin in den sogenannten Sklereiden (Steinzellen) bestimmt wird (TAO et al., 2009). Abb. 41 zeigt eine Steinzelle der Birnefrucht. In dieser Arbeit konnten dementsprechend auch hohe Ligningehalte in dem Fruchtfleisch der Birne bestimmt werden. Der höchste ABSL-Gehalt wurde jedoch in der Schale der Birne bestimmt.

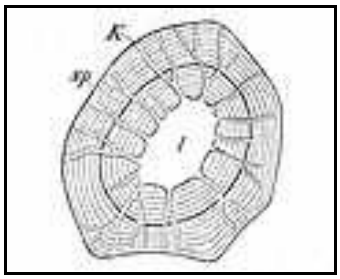



**Abb. 41: Darstellung einer Steinzelle der Birnenfrucht: l, Zellhöhlung; sp, Sprung in Schichtensystem; k Tüpfelkanäle**

Für die Fraktionen der Möhre wurden die höchsten ABSL-Gehalte im Zylinder und in der Schale bestimmt. Die Möhre besteht aus einem Holzteil (Zylinder) und einem Siebteil (Bast/Rinde). Die Leitbündel des Holzteils dienen der Wasserleitung und sind großen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Um diese Transportfunktion kontinuierlich gewährleisten zu können, ist der Holzteil durch Auflagerung von Ligninen stabilisiert. Die Lignifizierung dient des Weiteren dazu, die Wasserundurchlässigkeit der Leitbündel zu gewährleisten. Dies erklärt den relativ hohen ABSL-Gehalt im Möhrenzylinder. Ebenso lässt sich der höhere ABSL-Gehalt

in der Schale durch die anatomische Zusammensetzung dieses Möhrengewebes erklären. Die Exodermis der Möhre ist nach Innen durch eine Korkschicht gestärkt (CISNEROS-ZEVALLOS et al., 1995). Der ABSL-Gehalt der Exodermis ist wahrscheinlich auf das im Kork abgelagerte polyphenolische Suberin zurückzuführen, d.h. Lignin wird durch Suberin vorgetäuscht.

Für die Fraktionen der Kiwifrucht wurden die höchsten ABSL-Gehalte in den Samen und in der Columella bestimmt. Ein hoher Ligningehalt für die verhärteten Kiwisamen wurde erwartet. Dass im Fruchtfleisch der Kiwi ein relativ hoher Anteil an Lignin bestimmt wurde, erschien zunächst ungewöhnlich. In der Literatur wird jedoch das Vorhandensein von lignifizierten Steinzellen in der äußeren Schicht des Fruchtfleisches von *Actinidia deliciosa* beschrieben (HALLETT und SUTHERLAND, 2005).

Die Analyse der verschiedenen Fraktionen von Birne, Kiwi und Möhre bestätigt die Annahme, dass der Ligningehalt vom Pflanzengewebe abhängt. Lignin ist v.a. in verhärteten Geweben wie in den Samen oder in leitbündelhaltigen Geweben wie dem Zylinder der Möhre oder der Columella der Kiwi vorhanden. Diese Gewebe erfüllen u.a. Transport- oder Schutzfunktionen in den Pflanzen.

### 3.4.3 Ligninzusammensetzung der untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen

Studien über die Ligninzusammensetzung in pflanzlichen Lebensmitteln sind bereits selten, Studien über die Ligninzusammensetzung der verschiedenen Fraktionen fehlen völlig.

Daher wurde die Ligninzusammensetzung der AUBS von Kiwi, Birne und Möhre sowie von deren Fraktionen mittels DFRC-Methode untersucht. Die hier durchgeführten Studien beziehen sich auf die AUBS, da in den UBS große Mengen an Nicht-Stärke-Polysacchariden enthalten sind. Diese führen zu Störpeaks in den DFRC-Chromatogrammen. Ein überwiegender Abbau der Nicht-Stärke-Polysaccharide der UBS bei der Gewinnung der AUBS ist daher für eine Untersuchung der Monolignolzusammensetzung notwendig. Nach Freisetzung der Monolignole, Derivatisierung, gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion erfolgte die Identifizierung der acetylierten Monolignole und Monolignolderivate durch Vergleich der Retentionszeiten und

Massenspektren mit denen von Standardsubstanzen und Literaturdaten (LU und RALPH, 1997a; LU und RALPH, 1998). Die Bestimmung der einzelnen Monolignole in den untersuchten Pflanzen erfolgte mit Hilfe der IS-Methode. Es ist anzumerken, dass keine exakte Quantifizierung der Monolignole (G, S), sondern nur eine Abschätzung der Zusammensetzung durch Anwendung der DFRC-Methode möglich ist, da nur β–O-4-verknüpfte G-/S-Einheiten erfasst werden. Da P in keiner Probe identifiziert werden konnte, wurden zum Vergleich und zur Klassifizierung der untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen nur die Anteile von G und S herangezogen. Zu geringeren Anteilen konnten in den Proben die Monolignole G und S in ihrer cis-Konfiguration identifiziert werden. Für die Berechnungen wurden die Flächen der cis- und trans-konfigurierten Monolignole addiert, da deren Massenspektren ähnliche Fragmentierungen zeigten. Diese Isomerisierung der Monolignole findet bei deren Freisetzung während der reduktiven Spaltung statt (LU und RALPH, 1997b; BUNZEL und STEINHART, 2003). Angaben zu den Gehalten der Monolignole in den untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen sind in Kap. 5.4.8 dargestellt. Das Chromatogramm einer Standardmischung sowie Beispiel-Chromatogramme zur Bestimmung der Monolignolzusammensetzung mittels der DFRC-Methode befinden sich im Anhang unter 5.5.1.4, die Massenspektren der Monolignole und des IS in Kap. 5.5.2.2.1.

Die Gehalte der aus den AUBS der Birne freigesetzten G und S betrugen jeweils 5,6 % und 5,3 %. Aus den AUBS der Kiwi wurden 1,9 % G und 0,2 % S freigesetzt. Die Untersuchung der AUBS der Möhre ergab, dass 0,1 % G freigesetzt wurden. S konnte nicht identifiziert werden. Die prozentualen Gehalte der Monolignole in den angereicherten UBS der Gesamtproben sind in Abb. 42 dargestellt.

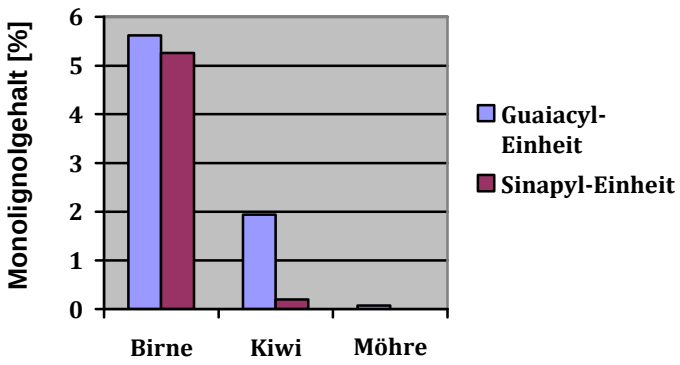



**Abb. 42: Prozentuale Gehalte an Monolignolen, freigesetzt aus der angereicherten unlöslichen Ballaststoffen der Gesamtproben von Birne, Kiwi und Möhre**

Aus den AUBS der Fraktionen der Birne konnten ebenfalls G und S freigesetzt werden. Aus dem Fruchtfleisch wurden 3,6 % G und 3,0 % S freigesetzt. Die Freisetzungsrate der Monolignole aus den AUBS der Schale waren höher: 4,9 % G und 5,0 % S konnten freigesetzt werden.

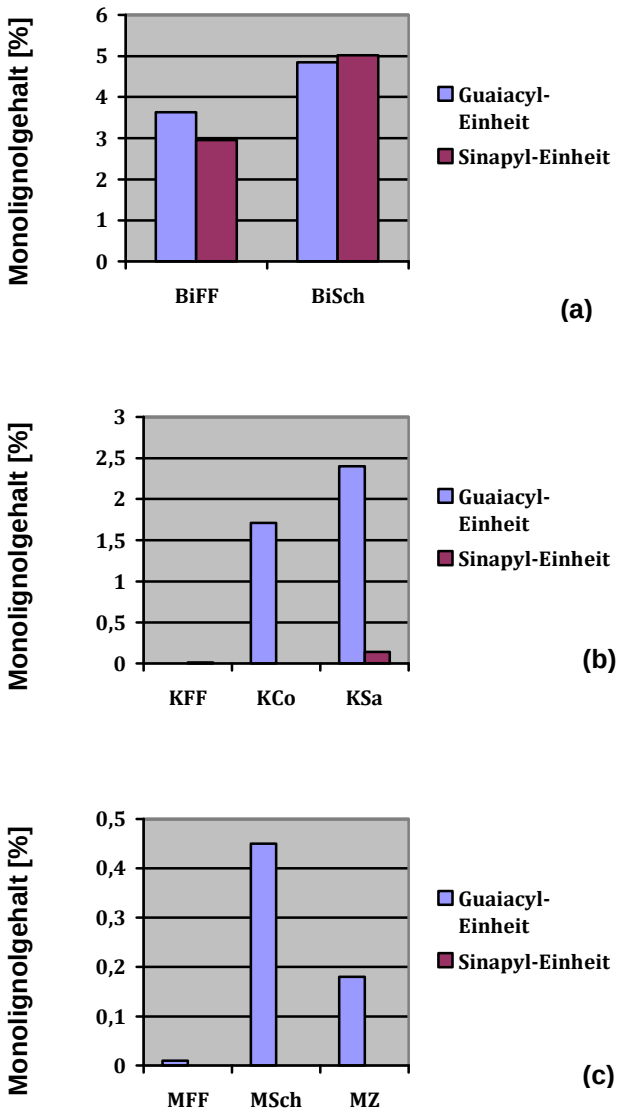



**Abb. 43: Prozentuale Gehalte an Monolignolen, freigesetzt aus den angereicherten unlöslichen Ballaststoffen der Fraktionen von Birne (a), Kiwi (b) und Möhre (c): BiFF, Fruchtfleisch der Birne; BiSch, Schale der Birne; KSa, Samen der Kiwi; KCo, Columella der Kiwi; KFF, Fruchtfleisch der Kiwi; MFF, Fruchtfleisch der Möhre; MSch, Schale der Möhre; MZ, Zylinder der Möhre**

Aus zwei Fraktionen der AUBS der Kiwi (Fruchtfleisch und Columella) wurde jeweils nur ein Monolignol, G oder S, freigesetzt. Aus den AUBS der Fraktion des Fruchtfleisches wurden < 0,1 % S freigesetzt, G wurde nicht nachgewiesen.

Dagegen wurde aus den AUBS der Fraktion der Columella 1,7 % an G bestimmt, S konnte in dieser Fraktion nicht nachgewiesen werden. Aus den AUBS der Fraktion der Kiwisamen wurden 2,4 % G und 0,1 % S freigesetzt.

In den AUBS der Fraktionen der Möhre wurde nur G nachgewiesen. Aus den AUBS der Fraktion des Fruchtfleisches wurden < 0,1 % G freigesetzt, aus der Fraktion der Schale 0,2 % G und aus der Fraktion des Zylinders 0,5 % G. Die prozentualen Gehalte der aus den Fraktionen der AUBS der untersuchten Proben freigesetzten Monolignole sind in Abb. 43 a, b und c dargestellt.

Anhand der G/S-Verhältnisse konnte eine Einteilung der untersuchten Proben erfolgen. Dabei sind Lignine als G-reiche Lignine zu klassifizieren, wenn der Quotient G/S > 3 ist. Lignine mit einem G/S-Quotienten < 3 und > 0,3 werden als ausgewogene Lignine bezeichnet. S-reiche Lignine haben einen Quotienten S/G > 3. Zu berücksichtigen ist, dass aus einigen Ligninen der untersuchten Fraktionen jeweils nur ein Monolignol freigesetzt wurde. Diese Lignine wurden dann als S- bzw. G-haltig klassifiziert. Die Einteilung der Lignine der untersuchten AUBS ist in Tab. 9 dargestellt.

**Tab. 9: Einteilung der Lignine der untersuchten Pflanzen und Pflanzenfraktionen nach dem Guaiacyl (G)/Sinapyl (S)-Verhältnis: Birne, Bi; Kiwi, Ki; Möhre, M; BiFF, Fruchtfleisch der Birne; BiSch, Schale der Birne; KSa, Samen der Kiwi; KCo, Columella der Kiwi; KFF, Fruchtfleisch der Kiwi; MFF, Fruchtfleisch der Möhre; MSch, Schale der Möhre; MZ, Zylinder der Möhre**

| Probe | Quotient G/S | Kategorie |
|---|---|---|
| Bi | 1,1 | G/S-ausgewogen |
| BFF | 1,2 | G/S-ausgewogen |
| BSch | 1,0 | G/S-ausgewogen |
| K | 9,7 | G-reich |
| KSa | 17,1 | G-reich |
| KCo | nur G | G-haltig |
| KFF | nur S | S-haltig |
| M, MFF, MSch, MZ | nur G | G-haltig |

Die hier untersuchten Lignine sind wie in der Literatur beschrieben (BUNZEL et al., 2005; BUNZEL et al., 2006) hauptsächlich G-reiche oder G/S-ausgewogene Lignine.

Bisher sind nur wenige Pflanzen mit S-reichen Ligninen bekannt, z.B. Kenaf oder Rhabarber (RALPH, 1996; BUNZEL et al., 2006).

Das in Kiwifruchfleisch identifizierte S-haltige Lignin stellt einer weiteren solche Ausnahme dar. Abb. 44 zeigt die GC-MS-Chromatogramme der acetylierten Monolignole des Kiwifruchtfleisches im Normalmodus und im Scan-Modus sowie das Massenspektrum des identifizierten acetylierten Sinapylalkohols.

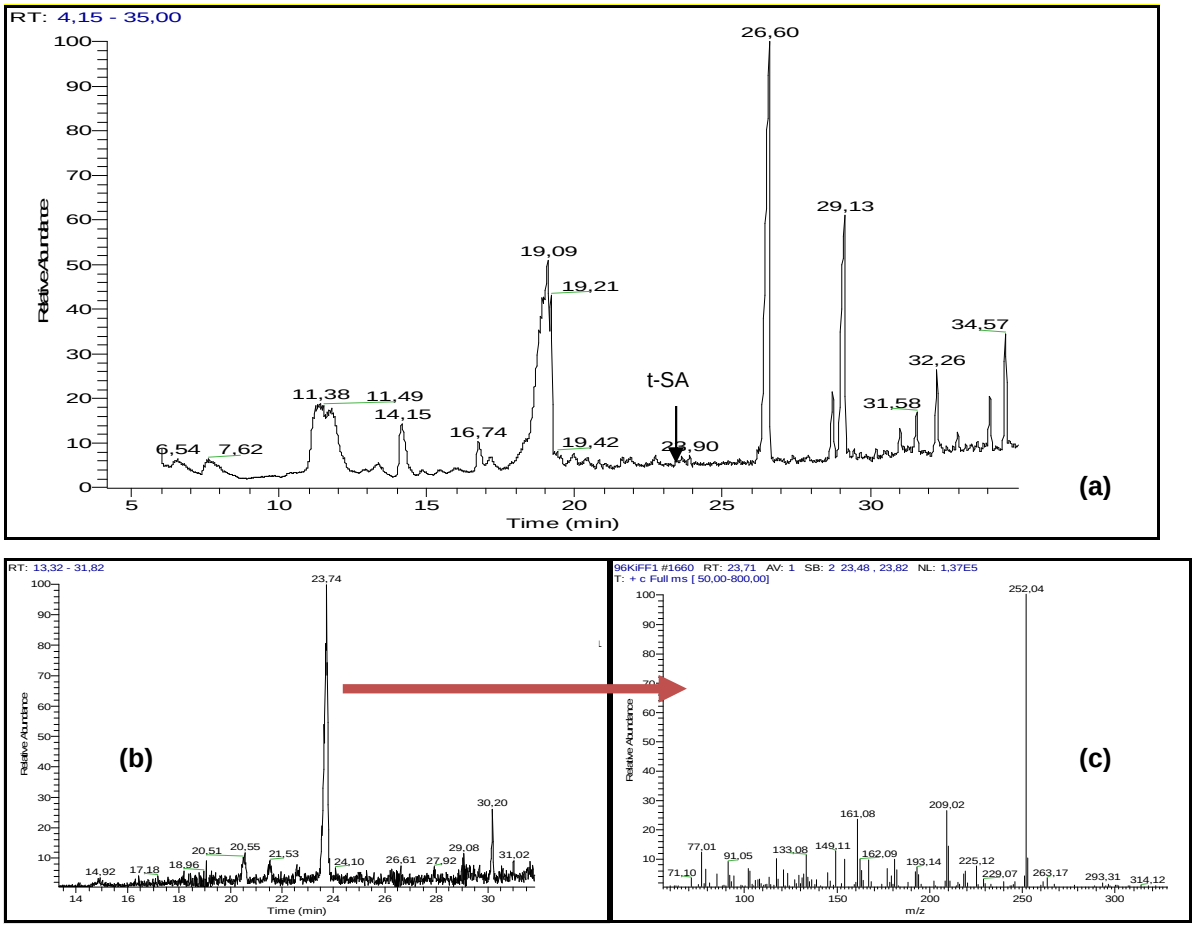



**Abb. 44: GC-MS-Chromatogramme der acetylierten Monolignole der UBS des Kiwifruchtfleischs in Normalmodus (a) und in Scan-Modus (b) sowie das Massenspektrum des identifizierten acetylierten Sinapylalkohols (t-SA) (c)**

BUNZEL und RALPH (2006) konnten ebenfalls mittels zweidimensionaler NMR zeigen, dass Birne G/S-Lignin und Kiwi G-reiches Lignin (ca. 94 % G) enthalten. Diese Ergebnisse bestätigen die in dieser Arbeit mittels DFRC gewonnenen Erkenntnisse für Birne, Kiwi und Möhre. 2005 konnten ebenfalls BUNZEL und Mitarbeiter mittels DFRC-Untersuchungen zeigen, dass Kiwi und Möhre G-reiche Lignine enthalten. Das Lignin von Birne war G/S-ausgewogen. Im Vergleich zu

BUNZEL et al. (2005), die ein hohes G/S-Verhältnis für das Lignin der Möhre ermittelten, konnten im Rahmen dieser Arbeit keine S-Einheiten aus den AUBS der Möhren freigesetzt werden. Das Lignin von Möhre wurde daher als G-haltig klassifiziert.

Ein Überblick über den Vergleich der erzielten Ergebnisse mit der Literatur ist im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 10).

**Tab. 10: Vergleich der bestimmten Guaiacyl (G)/Sinapyl (S)-Anteile der Lignine aus den Proben von Kiwi, Birne und Möhre mit der Literatur (*BUNZEL et al., 2005; ** Bunzel et al., 2006)**

| Probe | G/S | Einteilung |
|---|---|---|
| KIWI | | |
| Kiwi-Probe | 9,7 | G-reich |
| Kiwi DFRC* | 16,5 | |
| Kiwi DL** | 14,6 | |
| Kiwi SL** | 61,5 | |
| BIRNE | | |
| Birne-Probe | 1,1 | G/S-ausgewogen |
| Birne DFRC* | 0,6 | |
| Birne DL** | 0,8 | |
| Birne SL** | 0,7 | |
| MÖHRE | | |
| Möhre-Probe | nur G | G-haltig |
| Möhre DFRC* | 38,8 | G-reich |

Während alle Fraktionen der Möhre G-reiches Lignin und alle Fraktionen der Birne G-ausgewogenes Lignin enthalten, sind die Lignine der Fraktionen der Kiwi unterschiedlich zusammengesetzt. Das Lignin der gesamten Kiwi und der Samen war G-reich, in der Columella wurde G-haltiges Lignin bestimmt, in der Fraktion des Fruchtfleisches S-haltiges. Wie erwartet, korrelieren die mittels DFRC-Methode bestimmten Monolignolgehalte mit den ABSL-Gehalten. Aus Fraktionen, die hohe ABSL-Gehalte aufweisen, konnten ebenso hohe Gehalte an Monolignolen freigesetzt werden. Zum Beispiel wurden für die Fraktionen von Kiwi ABSL-Gehalte von 2,5 % (Fruchtfleisch der Kiwi), 3,6 % (Columella der Kiwi) und 5,2 % (Samen der Kiwi) bezogen auf die AUBS bestimmt. Ebenso wurden DFRC-Monolignolgehalte (G+S)

von < 0,1 % (Fruchtfleisch der Kiwi), 1,7 % (Columella der Kiwi) und 2,5 % (Samen der Kiwi) in den AUBS ermittelt. Die ABSL-Gehalte und die DFRC-Monolignolgehalte der Fraktionen der Samen waren jeweils am höchsten. Die Anteile an freigesetzten Monolignolen sind jedoch nicht nur vom Ligningehalt abhängig, sondern auch von der Zusammensetzung und der Löslichkeit des Lignins im Reaktionsmedium. Letzteres ist auch von der Matrix (AUBS) abhängig (BUNZEL et al., 2005). Normalerweise sollte G-reiches Lignin weniger stak durch die Anwendung der DFRC-Methode abgebaut werden, da Coniferylalkohol in C5-Stellung unsubstituiert ist und weitere Bindungen wie 5-5, β-5 oder 5-O-4 auftreten können (BUNZEL et al., 2005), welche nicht im Zuge der DFRC-Methode gespalten werden.

Durch Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit Literaturdaten (LU und RALPH, 1997a; LU und RALPH, 1998 LU und RALPH, 1999a LU und RALPH, 1999b) konnten auch Monolignolderivate bzw. unübliche Monolignole in den AUBS von Birne, Kiwi und Möhre in Spuren identifiziert werden. Die Strukturen der Monolignolderivate MD1-MD8 basieren auf den Grundkörpern von G, G‘ und S (siehe Abb. 45). Da die Monolignolderivate nur in Spuren in den untersuchten AUBS vorkommen, wurden sie nicht für die Klassifizierung der Lignine herangezogen.
Alle identifizierten Monolignolderivate waren Derivate des Coniferyl- bzw. Sinapylalkohols: *p*-Cumarylalkohol und *p*-Cumarylalkoholderivate konnten im Rahmen dieser Arbeit in keiner Probe identifiziert werden. Die identifizierten Monolignolderivate stellen Keto-Einheiten oder Endgruppen des Lignins dar. Zum Beispiel ist G-$CH_2CH_2CH_2Br$ das durch Anwendung der DFRC-Methode entstehende bromierte Derivat von endständigem Coniferylalkohol. S-CHOAc-$CH_2CH_2OAc$ entsteht aus Sinapaldehyd (BUNZEL et al., 2005; LU und RALPH, 1998). Ebenso konnten anhand der Massenspektren Keto-Derivate von S und G identifiziert werden: G-CHOAc-CO-$CH_3$ und S-CHOAc-CO-$CH_3$. Die oben aufgeführten Substanzen sind eindeutige Beweise für das Vorhandensein andere Monomere im Ligninpolymer.

MD1 G-$CH_2COCH_3$

MD2 G-$CH_2CH_2CH_2Br$

MD3 S-$COCH_2CH_3$

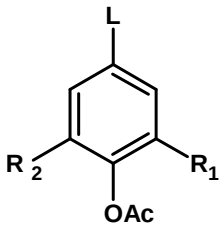
MD4 G-CHOAc-$COCH_3$

MD5 S-CHOAc-$COCH_3$

MD6 S-CHOAc-$CH_2CH_2OAc$

MD7 G'-$CH{=}CHCH_2OAc$

MD8 S-CHOAc-$CH_2CH_2OAc$




G $R_1$= $OCH_3$, $R_2$= H

G' $R_1$= H, $R_2$= OAc

S $R_1$=$R_2$= $OCH_3$

**Grundkoerper,** L= Lignin

**Abb. 45: Strukturen der massenspektroskopisch identifizierten Monolignolderivate**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Monolignolderivate bzw. unübliche Monolignole nur in Spuren nachgewiesen. Dies ist nicht immer der Fall. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass z. B. das Lignin von Kenaf über 50 % acetylierte Monolignolderivate enthält (RALPH, 1996; RALPH et al., 2004c). Ebenso wurde bewiesen, dass diese Monolignolderivate bei dem Lignifizierungsprozess in das Ligninpolymer eingebaut werden und nicht aus der nachträglichen Acetylierung des Lignins entstehen (RALPH, 2004c). Andere Monolignolderivate bzw. unübliche Monolignole wie *p*-Cumarsäure-Derivate (Mais) und *p*-Hydoxybenzoesäure-Derivate (Palme, Weide) wurden in isolierten Ligninen identifiziert (Ralph et al., 2004c).

# 4 Zusammenfassung

Lignine sind Bestandteile des Ballaststoffkomplexes und sind von besonderer Bedeutung für diese heterogene Stoffgruppe. Durch Lignin wird z. B. die Fermentierbarkeit von Ballaststoffen in Darm verlangsamt, was u. a. dazu führt, dass kurzkettige Fettsäuren auch im distalen Kolon gebildet werden. Dies erscheint im Hinblick auf eine Dickdarmkrebsprävention erstrebenswert. In der Literatur ist auch die Bindung von heterozyklischen aromatischen Aminen, welche potentielle Kanzerogene darstellen, an Lignine beschrieben. Die heterozyklischen aromatischen Amine werden so aus dem Körper befördert, ohne aktiviert zu werden. Schließlich haben Lignine auch antioxidative Eigenschaften und stellen Vorstufen für die dimeren Mammalian-Lignane dar.

In der Literatur finden sich nur wenige Forschungsarbeiten über Lignine in pflanzlichen Lebensmitteln. Insbesondere fehlen Quantifizierungsmethoden, die für eine exakte Ligninbestimmung in Lebensmitteln geeignet sind.

In dieser Arbeit wurde die zumeist angewandte Methode zur Bestimmung des Ligningehalts in Lebensmitteln, die Klason-Lignin-Methode, hinterfragt. Dazu wurden Klason-Lignine isoliert und auf das Vorhandensein von Nicht-Lignin-Verbindungen (Mineralstoffe, Restprotein, Kutin, Suberin, Wachs- und Fettbestandteile) analysiert. Klason-Lignine wurden aus den unlöslichen Ballaststoffen aus Weizen, Roggen, Birne, Kiwi, Möhre und Grünkohl präparativ gewonnen. Mineralstoffe wurden gravimetrisch nach Veraschung, Restproteine photometrisch nach Kjeldahlaufschluss bestimmt. Kutin, Suberin, Wachs- und Fettbestandteile konnten nach Extraktion, Umesterung und Derivatisierung mittels Gaschromatographie und massenspektrometrischer Detektion identifiziert sowie gravimetrisch quantifiziert werden. Als typische Wachs- und Fettbestandteile wurden Glycerol, Fettsäuren, Fettsäurederivate sowie Phytosterine identifiziert. Die in der Literatur beschriebenen Monomere von Kutin und Suberin (v.a. $C_{16}$-$C_{18}$-Hydroxycarbonsäuren, Glycerol, Dicarbonsäuren und Ferulasäure) wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als Bestandteile der verschiedenen Klason-Lignine nachgewiesen. Die höchsten Gehalte an Mineralstoffen und Restproteinen wurden im Klason-Lignin aus Weizen (2,6 % Asche, 24,0 % Protein) bestimmt. Der höchste Gehalt an Wachs- und Fettbestandteilen wurde hingegen in den Klason-Ligninen von Grünkohl (26,8 %) ermittelt. Mit 47,1 % zeigte das Klason-Lignin aus Grünkohl auch den höchsten

Gehalt an Kutin- und Suberinmomeren. Im Klason-Lignin der untersuchten Lebensmittelproben konnten somit zum Teil sehr hohe Anteile (bis zu ca. 80 %) an Nicht-Lignin-Verbindungen identifiziert und quantifiziert werden. Ferner wurde in dieser Arbeit aber auch gezeigt, dass nicht nur Nicht-Lignin-Verbindungen in den Klason-Ligninen bestimmt werden, sondern, dass auch Anteile an Lignin während der Klason-Lignin-Gewinnung abgebaut und ausgewaschen werden.

Dies bedeutet, dass die Bestimmung des Ligningehalts in Lebensmitteln nach *Klason* wie sie bis heute durchgeführt wird, keine exakte Quantifizierungsmethode für Lignine darstellt.

Eine weitere Methode zur Ligninbestimmung wurde in dieser Arbeit auf Lebensmittel angewendet, die Methode des Acetylbromid-löslichen Lignins. Es wurde versucht, die Methode auf Lebensmittel anzupassen, in dem für die Lignine aus Lebensmittel spezifische Extinktionskoeffizienten bestimmt werden sollten.

Diese Ansatz konnte jedoch nicht erfolgreich zu Ende geführt werden, da die bekannten Methoden zur Ligninisolierung, auf Lebensmittel angewendet, zu viele Begleitsubstanzen mitextrahieren. Dies führt zu unkorrekten Extinktionskoeffizienten.

Abschließend wurden neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung und die Lokalisierung von Ligninen in den untersuchten pflanzlichen Lebensmitteln gewonnen. Unlösliche Ballaststoffe aus Möhre, Kiwi, Birne und verschiedene Fraktionen dieser Gemüse/Früchte wurden enzymatisch behandelt, um Polysaccharide abzubauen und Lignine anzureichern. Die Ligningehalte wurden dann als Acetylbromid-lösliches Lignin bestimmt und die Ligninzusammensetzung wurde mit Hilfe der sogenannten DFRC-Methode analysiert. In Bezug auf die angereicherten unlöslichen Ballaststoffe der Gesamtproben wurde der höchste Gehalt an Acetylbromid-löslichem Lignin in der Birne mit 17,2 % bestimmt, der niedrigste Gehalt an Acetylbromid-löslichem Lignin wurde in der Möhre ermittelt (3,5 %). Die Fraktionen Möhrezylinder, Kiwisamen und Birneschale zeigten mit jeweils 4,0 %, 5,0 % und 18,4 % bezogen auf die angereicherten unlöslichen Ballaststoffe, die höchsten Gehalte an acetylbromidlöslichem Lignin. Des Weiteren konnte eine Einteilung der Lignine der untersuchten Pflanzen nach ihrem Syringyl/Guaiacyl-Verhältnis erfolgen. Die Lignine aus allen Möhrenfraktionen sowie aus der Kiwicolumella wurden als reine Guaiacyl-Lignine klassifiziert. Die Lignine aus den Kiwisamen waren Guaiacyl-angereichert, die aus den Birnenfraktionen zeigten ein

ausgeglichenes Guaiacyl-Syringyl-Verhältnis. Auffällig war, dass im Lignin des Kiwifruchtfleisches nur Syringyl-Gruppen nachgewiesen werden konnten.

Soll die Bedeutung von Ligninen in Lebensmitteln für ernährungsphysiologische Prozesse in Zukunft besser verstanden werden, muss zunächst eine Methode ausgearbeitet werden, die eine präzise Bestimmung des Lignins in Lebensmittel erlaubt.

# 5 Anhang

## 5.1 Geräte und Hilfsmittel

### 5.1.1 Gaschromatographie*

* In den Kapiteln 5.1.1.2-5.1.1.4 sind nur die Parameter aufgeführt, die von denen in 5.1.1.1 abweichen.

5.1.1.1 Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile

Gaschromatograph: Trace GC Ultra (Thermo Finnigan Scientific, USA)

| | |
|---|---|
| Säule: | Zebron ZB-5-Kapillarsäule (30 m Länge, 0.25 mm i.D., 0.25 µm Filmdicke) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) |
| Injektor: | 280 ℃, Split 1:10 |
| Detektor: | MS, Polaris Q Series (Thermo FINNIGAN Scientific; USA)<br>Ionisierungsenergie: 70 eV<br>Temperatur der Ionenquelle: 200 ℃<br>Messbereich: 50-650 m/z<br>Transferline: 310 ℃ |
| Trägergas: | Helium, Flussrate 1 mL/min |
| Auswerteeinheit: | PC, Software Qual Browser Version 1.4 SR1 (Thermo Finnigan Scientific, USA) |
| Autosampler: | Thermo Quest AS 2000<br>(Thermo Finnigan Scientific, USA)<br>Injektionsvolumen 2 µL |

Temperaturprogramm:

40 ℃ bis 130 ℃, Heizrate 9 ℃/min

130 ℃ bis 310 ℃, Heizrate 2 ℃/min

310 ℃, 10 min isotherm

5.1.1.2 Bestimmung der Kutin- und Suberinmonomere sowie Kutin- und Suberinoligomere

s. 5.1.1.1

5.1.1.3 Bestimmung der Kohlenhydrate als Alditolacetate (s. auch 5.1.1.1)

Injektor: 310 °C, Splitless

Temperaturprogramm:

65 °C, 1 min isotherm

65 °C bis 165 °C, Heizrate 30 °C/min

165 °C, 12 min isotherm

165 °C bis 220 °C, Heizrate 10 °C/min

220 °C, 3 min isotherm

220 °C bis 240 °C, Heizrate 20 °C/min

240 °C, 3 min isotherm

Detektor: Temperatur der Ionenquelle: 160 °C

5.1.1.4 Charakterisierung der Lignine nach reduktiver Spaltung (s. auch 5.1.1.1)

Temperaturprogramm:

140 °C, 1 min isotherm

140 °C bis 230 °C, Heizrate 3 °C/min

230 °C bis 310 °C, Heizrate 30 °C/min

310 °C, 10 min isotherm

### 5.1.2 Photometrie

Photometer I: UVIKON Spektrophotometer 930

Software: UVS900Lite (Kontron Instruments, Campania, Italien)

Photometer II: Lamda 2 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Monza, Italien)

### 5.1.3 Kernresonanzspektroskopie

NMR-Gerät: DRX 500 (Bruker, Rheinstetten)

Meßfrequenz: 1H: 500,13 MHz

Lösungsmittel: Aceton-$d^6$, 0,7 mL

### 5.1.4 Sonstige Geräte

Gefriertrockenschrank: MR 3002 S (Heidolph, Schwabach)

Vakuumtrockenschrank 1: RVT 360 mit Vacuubrand Membranpumpe (Heraeus, Hanau)
Vakuumtrockenschrank 2: MZ 2C (Heraeus, Hanau)
Mühle: A 10 S (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
Rotationsverdampfer 1: HBR 2 (Heidolph, Schwabach)
Rotationsverdampfer 2: V 2000 (Heidolph, Schwabach)
Wasserbad: 1012 (GFL GmbH, Burgwedel)

## 5.2 Verwendete Chemikalien

**Tab. 11: Verwendete Chemikalien**

| Substanz | Gefahren-symbol | R-Sätze | S-Sätze | Hersteller |
|---|---|---|---|---|
| Aceton | F, Xi | 11-36-66-67 | 9-16-26 | Merck |
| Acetylbromid | C | 14-34 | 9-26-36/37/39-45 | Fluka |
| Alcalase® 2,4 AU/g | Xn | 37/38-41-42 | 24-26-36/37/39 | Novo-Nordisk |
| Ammoniaklösung 25 % | C, N | 34-50 | 26-36/37/39-45-61 | Merck |
| Ammoniumchlorid | Xn | 22-36 | 22 | Merck |
| Amyloglucosidase 300 AGU/g | - | - | - | Novo-Nordisk |
| L-Arabinose | - | - | - | Merck |
| Bortrifluorid-Methanol-Komplex 20 % | F, T | 11-23/24/25-34-39/23/24/25 | 6.3-16-26/36/37/39-45 | Merck |
| BSA (Bovine Serum Albumin) | - | - | - | Sigma |
| BSTFA-TMCS (1%) | Macherey & Nagel | 10-34 | 16-26-36/37/39-45 | |
| Chloroform | Xn | 22-38-40-48/20/22 | 36/37 | Merck |
| Coniferylalkohol | - | - | 24/25 | - |
| *p*-Cumarylalkohol | Xi | 36/37/38 | 26-37 | |
| Dichlormethan | Xn | 40 | 23.2-24/25-36/37 | Merck |
| Dimethylsulfoxid | - | - | - | Fluka |
| Di-Natrium-hydrogenphosphat | - | - | - | Merck |
| 1,4-Dioxan | F, Xn | 11-19-36/37-40-66 | 9-16/36/37-46 | Merck |

**Fortsetzung Tab. 11**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Driselase | - | - | - | Sigma-Aldrich |
| Eisessig | C | 10-35 | 23.2-26-45 | Acros |
| Erythrit | - | - | - | Merck |
| Essigsäureanhydrid | C | 10-20/22-34 | 26-36/37/39-45 | Acros |
| Ethanol 96 % | F | 11 | 7-16 | Merck |
| Ethylacetat | F, Xi | 11-36-66-67 | 16-26-33 | Merck |
| 4,4'-Ethylidenbisphenol | Xi | 36/37/38 | 26-36 | Aldrich |
| D-Fructose | - | - | - | Merck |
| D-Galactose | - | - | - | Merck |
| D-Glucose | - | - | - | Merck |
| Glycerol | - | - | - | Merck |
| n-Hexan | F, Xn, N | 11-38-48/20-51/53-62-65-67 | 9-16-29-33-36/37-61-62 | Merck |
| Hydroxylaminhydrochlorid | Xn, N | 22-36/38-43-48/22-50 | 22-24-37-61 | Fluka |
| Hydroxydocosansäure | - | - | - | Matreya |
| Kaliumhydroxid | C | 22-35 | 26-3637/39-45 | Merck |
| D-Mannose | - | - | - | Merck |
| Methanol | F, T | 11-23/24/25-39/23/24/25 | 7-16/36/37-45 | Merck |
| Methylhexadecanoat- | - | - | - | Merck |
| Methyleicosanoat | - | - | - | Fluka |
| 1-Methylimidazol | C | 21/22-34 | 26-36-45 | Fluka |
| Methyloctadecanoat | - | - | - | Merck |
| Myo-Inosit | - | - | - | Merck |
| Natriumborhydrid | F, T | 15-24/25-35 | 14.2-26-36/37/39-43.6-45 | Fluka |
| Natriumdihydrogenphosphat | - | - | - | Merck |
| Natriumhydrogencarbonat | - | - | - | Kertess |
| Natriumhydroxid | C | 35 | 26-36/37/39-45 | Merck |
| Natriumhypochlorit 12,5 % | C | 31-34 | 26-28.1-36/37/39-45 | Merck |
| Natriummethanolat | F, C | 11-14-34 | 8-16-26-43.6-45 | Merck |
| Natriumnitroprussiat | T | 25 | 22-37-45 | Merck |
| Natriumsalicyat | Xn | 22-36 | 22-24 | Merck |
| Natriumsulfat | - | - | - | Riedel-de-Haen |
| Natronlauge | C | 35 | 26-36/37/39-45 | Merck |

**Fortsetzung Tab. 11**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Pyridin | F, Xn | 11-20/21/22 | 26-28.1 | Fluka |
| L-Rhamnose | - | - | - | Merck |
| Salzsäure 37 % | C | 34-37 | 26-36/37/39-45 | Merck |
| Schwefelsäure 95-97 % | C | 35 | 26-30-45 | Merck |
| Selenreaktionsgemisch | N | 52/53 | 61 | Merck |
| Sinapylalkohol | Xi | 36/37/38 | 26 | - |
| β-Sitosterol | - | - | - | Matreya |
| Stickstoff (gasförmig) | - | - | - | Merck |
| Termamyl ® 120 KNU/g | Xn | 42 | 36 | Novo-Nordisk |
| *tert*-Butylmethylether | F, Xi | 11-38 | 9-16-24 | Merck |
| Tri-Natriumphosphat | Xi | 36/38 | - | Merck |
| D-Xylose | - | - | - | Merck |
| Zinkpulver | N | 50/53 | 60-61 | Merck |

## 5.3 Arbeitsvorschriften

### 5.3.1 Gewinnung der unlöslichen Ballaststoffe

5.3.1.1 Probenvorbereitung und Wassergehaltbestimmung

Fraktionierung

- Obst und Gemüse waschen
- nicht-essbare Teile entfernen
- Kiwi (Fruchtfleisch, Columella, Samen), Birne (Fruchtfleisch, Schale) und Möhre (Schale, Fruchtfleisch, Zylinder) mit Hilfe eines Messers in die einzelnen Fraktionen auftrennen
- einzelne Fraktionen bzw. Gesamtproben einwiegen und einfrieren

Trocknung und gravimetrische Bestimmung des Wassergehalts

- Obst- und Gemüseproben für 6 Tage bei -45 ℃ und 0 ,15 mbar gefriertrocknen und auswiegen
- Getreideproben im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz trocknen
- Wassergehalt durch Differenzrechnung bestimmen
- getrocknete Proben in einer Mühle vermahlen und sieben (Partikeldurchmesser < 0,5 mm)

Karl-Fischer-Titration

- 1 g Probe in einen trockenen 50-mL-Messkolben genau einwiegen
- Meßkolben mit getrocknetem Methanol bis zur Marke auffüllen
- verschließen und durch kräftiges Schütteln gut mischen (Probelösung)
- Vortitration: 20 mL Methanol in das Titriergefäß pipettieren und bis zum Endpunkt titrieren
- Bestimmung des Blindwertes (Wassergehalt des Lösungsmittels): 20 mL Lösungsmittel (Methanol) in das austitrierte Titriergefäß einfüllen und bis zum Endpunkt titrieren
- Bestimmung des Titers: mit einer 20-µL-Kolbenhubpipette 20 µL (= 20 mg) Wasser in das austitrierte Medium pipettieren
- Lösung bis zum Endpunkt titrieren
- Titration der Probelösung: 20 mL der Probelösung in das austitrierte Medium pipettieren und Lösung bis zum Endpunkt titrieren

5.3.1.2 Enzymatischer Abbau

- 15 g (20 g) getrocknetes und feingemahlenes Probenmaterial in einen 500 mL Iodzahlkolben einwiegen
- in 250-300 mL 0.08 M Phosphatpuffer (pH 6.0) suspendieren; Kiwiproben zusätzlich mit verd. Natronlauge auf pH 6-7 einstellen
- 1125 µL (1500 µL) Termamyl (hitzestabile α-Amylase) zufügen
- 25 min (30 min) bei 100 ℃ im Wasserbad erhitzen, alle 5 min leicht umschwenken
- im Eisbad auf RT abkühlen, pH-Wert mit 0.275 M Natronlauge auf 7.5 ± 0.1 einstellen
- 450 µL (600 µL) Alcalase zufügen
- 30 min bei 60 ℃ unter ständiger Bewegung (rotieren am Rotationsverdampfer) inkubieren
- im Eisbad auf RT abkühlen, pH-Wert mit 0.325 M Salzsäure (32 mL konz. Salzsäure im Meßkolben mit bidest. Wasser auf 1000 mL auffüllen) auf 4.5 ± 0.1 einstellen
- 525 µL (700 µL) Amyloglucosidase zufügen
- 30 min bei 60 ℃ unter ständiger Bewegung inkubieren

- Suspension 10 min zentrifugieren

5.3.1.3 Isolierung der unlöslichen Ballaststoffe

- Zentrifugationsrückstand zweimal mit je 50 mL 70 °C heißem bidest. Wasser waschen, jeweils 10 min zentrifugieren
- Zentrifugationsrückstand mit je 50 mL 96 %igem Ethanol, dann mit je 50 mL Aceton waschen, jeweils 10 min zentrifugieren
- Rückstand 16 h bei 40 ℃ und 25 mbar im Vakuumtrockenschrank trocknen und auswiegen

### 5.3.2. Enzymatische Anreicherung der unlöslichen Ballaststoffe

- 150-300 mg der UBS genau in ein Nunc Tube einwiegen und mit 10 mL destilliertem Wasser versetzen
- Suspension mit ca. 20 mg Driselase versetzen, schütteln und für 96 h im Trockenschrank bei 37 ℃ auf einem Taumelrollmischer inkubieren
- Nunc Tubes 10 min im siedenden Wasserbad erhitzen und zentrifugieren
- nach Saugfiltration über einen Glasfaserfilter, Rückstand zweimal mit 10 mL destilliertem Wasser, zweimal mit 10 mL Ethanol und zweimal mit 10 mL Aceton waschen
- Rückstand über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 40 ℃ trocknen, auswiegen, für spätere Analysen aufbewahren

### 5.3.3 Photometrische Bestimmung des Stickstoffgehalts-Gehaltes

**Kjeldahl-Aufschluss:**

- 0.3-0.4 g Probe in einen Kjeldahl-Aufschlusskolben einwiegen
- mit einigen Glasperlen, 0.5 g Selenreaktionsgemisch und 5 mL konz. Schwefelsäure versetzen
- Gemisch mindestens 3 h auf einem Heizblock bis zum Auflösen des Probenrückstandes und Entfärbung der Lösung erhitzen
- 10 mL bidest. Wasser zur abgekühlten Lösung geben, diese quantitativ (ohne Glasperlen) in einen 50 mL Messkolben überführen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen

**Photometrische Messung:**

- jeweils 0.2 mL Standardlösung (Ammoniumchlorid gelöst in dest. Wasser, Konzentrationen: 12-44 mg/L Sickstoff) und Probenlösung (evtl. nach Verdünnung) sowie Wasser als Blindwertlösung in ein 20 mL Schliffstopfenreagenzglas pipettieren
- 4 mL frisch hergestellte Farbreagenzlösung (3,2 g Natriumsalicylat, 8,0 g Trinatriumphosphat und 0,05 g Natriumnitroprussiat mit dest. Wasser auf 100 mL auffüllen) zugeben
- kurz schütteln und die Lösungen sofort mit 1 mL 0.25 %iger Natriumhypochloritlösung versetzen und schütteln
- Lösungen mindestens 10 min stehen lassen, in eine Küvette überführen und photometrisch bei einer Wellenlänge λ = 685 nm gegen den Blindwert messen
- externe Kalibrierung mit Standardlösungen der Konzentrationen 4, 12, 20, 28, 36 und 44 mg Stickstoff/L

### 5.3.4 Gravimetrische Bestimmung des Aschegehaltes

- 1 g Probe in einen Porzellantiegel einwiegen
- 4 h bei 500 °C im Muffelofen veraschen und nach Abkühlen im Exsikkator auswiegen

### 5.3.5 Gewinnung und gravimetrische Bestimmung des Klason-Lignins

- ca. 1 g UBS in einen 500 mL Iodzahlkolben einwiegen
- 20 mL 12 M Schwefelsäure unter Eiskühlung hinzugeben, rühren
- 30 min im Eisbad stehen lassen, alle 5 min rühren
- 2 h bei RT stehen lassen, alle 10 min rühren
- mit 130 mL destilliertem Wasser verdünnen, rühren
- 2 h im Trockenschrank bei 100 °C hydrolysieren, alle 20 min umschwenken
- über Nacht bei RT abkühlen, Überstand des Probenhydrolysates über eine Glasfritte mit gewogenem Glasfaserfilter saugfiltrieren
- Rückstand mit ca. 500 mL destilliertem Wasser säurefrei waschen, ca. 1 h bei RT trocknen

- über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C trocknen, auswiegen

### 5.3.6 Untersuchung der Klason-Lignin-Filtrate

- Filtrat grob mit 6 M Natronlauge, dann mit 0,1 M Natronlauge auf pH = 7 einstellen
- 50 mL des neutralisierten Filtrates dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahieren
- über Magnesiumsulfat trocknen, filtrieren, am Rotationsverdampfer einengen und in ein Pyrexglas überführen
- am Stickstoffstrom bis zur Trockene eindampfen und für UV-Scans und DFRC-Analytik einsetzen

### 5.3.7 Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes als Alditolacetate

**Externer Standard**

- jeweils 5 mg Xylose, Arabinose, Glucose, Rhamnose, Mannose, Galactose und Fructose in 10 mL dest. Wasser lösen
- 100 µL der Lösung in ein Pyrexglas geben
- Wasser unter einem Stickstoffstrom entfernen
- wasserfreien Rückstand in 100 µL 0,1 M Ammoniaklösung aufnehmen
- 1 mL frisch angesetzte 2 %ige Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid zugeben
- Pyrexglas verschließen und 1 Stunde bei 60 °C im Wasserbad unter Rühren inkubieren
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 100 µL interne Standard-Lösung zugeben
- 2 mL Essigsäureanhydrid und 200 µL 1-Methylimidazol zugeben
- 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- unter Eiskühlung 5 mL dest. Wasser zugeben
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- wässrige Lösung mit 2 mL Chloroform extrahieren
- organische Phase zweimal mit jeweils 5 mL dest. Wasser extrahieren
- Wasserreste für 30 Minuten bei -45 °C ausfrieren

- 100 µL der organischen Phase abnehmen und in ein mit Mikroeinsatz versehenes Vial geben
- mittels GC/MS vermessen

**Hauptversuch**

- ca. 50 mg Probe in ein Pyrexglas einwiegen
- 500 µL 12 M Schwefelsäure zugeben, auf vollständige Benetzung achten
- 30 Minuten bei 35 ℃ inkubieren
- mit 2,5 mL dest. Wasser verdünnen
- 1 Stunde bei 100 ℃ im Trockenschrank inkubieren, alle 20 Minuten schütteln
- auf Raumtemperatur abkühlen
- mit 1,2 mL 25%igem Ammoniak versetzen
- in einen 10-mL-Messkolben überführen und mit dest. Wasser auffüllen
- die Lösung membranfiltrieren
- 100 µL der membranfiltrierten Lösung in ein Pyrexglas überführen
- 1 mL frisch angesetzte 2 %ige Natriumborhydridlösung in Dimethylsulfoxid zugeben
- Pyrexglas verschließen und 1 Stunde bei 60 ℃ im W asserbad unter Rühren inkubieren
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 100 µL interne Standard-Lösung zugeben
- 2 mL Essigsäureanhydrid und 200 µL 1-Methylimidazol zugeben
- 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- unter Eiskühlung 5 mL dest. Wasser zugeben
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- wässrige Lösung mit 2 mL Chloroform extrahieren
- organische Phase zweimal mit jeweils 5 mL dest. Wasser extrahieren
- Wasserreste für 30 Minuten bei -45 ℃ ausfrieren
- 100 µL der organischen Phase abnehmen und in ein mit Mikroeinsatz versehenes Vial geben
- mittels GC/MS vermessen

### 5.3.8 Gaschromatographische Identifizierung und gravimetrische Bestimmung der Wachs- und Fettbestandteile

**Externer Standard**

- 1 mg/mL externer Standard beinhaltend Glycerol, Hexadecansäure, Octadecansäure, Methyl-Eicosanoat Hydroxydocosansäure und β-Sitosterin herstellen
- 100 µL des externen Standards in ein Vial geben, unter Stickstoff trocknen und anschließend im Vakuumtrocknenschrank trocknen
- externen Standard in 300 µL BSTFA/ Pyridin ( 2/1; v/v) aufnehmen, 1 h bei 70 ℃ im Trockenschrank silylieren

**Hauptversuch**

- ca. 100 mg KL genau in einen 100 mL Iodkahlkolben einwiegen
- mit 20 mL TBME/MeOH (9/1; v/v), versetzen
- Suspension 24 h rühren
- Suspension filtrieren und Rückstand aufbewahren (siehe 5.3.9)
- Extrakte am Rotationsverdampfer einengen
- eingeengte Extrakte in ein zuvor ausgewogenes Vial überführen
- restliches Lösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernen
- 16 h im Vakuumtrockenschrank bei 40 ℃ und 25 mbar trocknen
- Rückstände auswiegen
- Rückstand in 4 mL n-Hexan lösen
- Lösung in einen 100 mL Rundkolben überführen und mit 10 mL 14 %iger methanolischer Bortrifluorid-Lösung versetzen
- 3 h bei 70 ℃ unter Rückfluss erhitzen
- auf Raumtemperatur abkühlen
- Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne einengen
- mit 50 mL dem. Wasser versetzen
- dreimal mit je 30 mL Chloroform extrahieren
- die Chloroform-Extrakte am Rotationsverdampfer einengen
- die Extrakte in Vials überführen
- das restliche Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom entfernen, 24 h vakuumtrocknen und auswiegen

- den Rückstand in 300 µL BSTFA/ Pyridin ( 2/1; v/v) aufnehmen
- 1 h bei 70 ℃ im Trockenschrank silylieren
- 200 µL der Lösung in ein mit Mikroeinsatz versehenes Vial geben
- mittels GC/MS vermessen

### 5.3.9 Gaschromatographische Identifizierung und gravimetrische Bestimmung von Kutin- und Suberinmonomeren nach totaler Depolymerisierung

- ca. 40 mg des getrockneten Rückstandes aus 5.3.8 genau in einen 100 mL Rundkolben einwiegen
- mit 20 mL 14 %iger methanolischer Bortrifluorid-Lösung versetzen
- 16 h unter Rückfluss bei 70 ℃ inkubieren
- Suspension auf Raumtemperatur abkühlen und filtrieren
- Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockenen einengen
- mit 50 mL destilliertem Wasser versetzen
- dreimal mit je 30 mL Chloroform, beinhaltend den internen Standard (Hydroxyeicosansäure, 1 mg/mL), extrahieren
- Extrakte am Rotationsverdampfer einengen
- Extrakte in Vials überführen
- Restlösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernen, 24 h vakuumtrocknen und auswiegen
- Rückstand in 300 µL BSTFA/ Pyridin ( 2/1; v/v) aufnehmen
- 1 h bei 70 ℃ im Trockenschrank silylieren
- mittels GC/MS vermessen
- externer Standard wurde wie unter 5.3.8 beschrieben angesetzt und gemessen

### 5.3.10 Partielle Depolymerisierung der untersuchten Klason-Lignine

**Partielle Depolymerisierung mit methanolischem Natriummethanolat**

- ca. 100 mg KL genau in einen 100 mL Rundkolben einwiegen
- mit 20 mL 50 mM Natriummethanolat-Lösung versetzen
- 5 h unter Rückfluss bei 70 ℃ erhitzen

- Reaktionslösung auf Raumtemperatur abkühlen und filtrieren
- Filtrate am Rotationsverdampfer einengen
- eingeengte Filtrate in Vials überführen
- restliche Lösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernen, 24 h vakuumtrocknen und auswiegen
- den Rückstand mit 300 µL BSTFA/ Pyridin ( 2/1; v/v) aufnehmen
- 1 h bei 70 ℃ im Trockenschrank silylieren
- mittels GC/MS vermessen

**Partielle Depolymerisierung mit methanolischem Calciumhydroxid**

- ca. 100 mg KL in einen 100 mL Rundkolben einwiegen
- ca. 50 mg Calciumhydroxid hinzufügen
- mit 20 mL Methanol versetzen
- 6 h unter Rückfluss bei 70 ℃ inkubieren
- Reaktionslösung auf Raumtemperatur abkühlen und filtrieren
- Rückstand mit kleinen Mengen Dichlormethan und Methanol waschen
- Rückstand bei 50 ℃ im Trockenschrank trocknen und zur späteren Untersuchung aufbewahren
- Extrakte vereinigen und am Rotationsverdampfer einengen
- das eingeengte Filtrat in ein Vial überführen
- restliches Lösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernen
- Rückstand mit 600 µL BSTFA/ Pyridin ( 2/1; v/v) aufnehmen
- 1 h bei 70 ℃ im Trockenschrank silylieren
- mittels GC/MS vermessen

**Partielle Depolymerisierung mit methanolischem Kaliummethanolat**

- ca. 100 mg KL in einen 100 mL Rundkolben einwiegen
- mit 20 mL 0,1 M Kaliummethanolat-Lösung versetzten
- 30 min bei 70 ℃ unter Rückfluss inkubieren
- filtrieren und den Rückstand mit kleinen Mengen Methanol waschen
- Rückstand bei 50 ℃ im Trockenschrank trocknen und zur weiteren Untersuchung aufbewahren

- vereinigte Extrakte mit dem zweifachen Volumen an destilliertem Wasser versetzen
- Lösung mit 4 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,5 ± 0,1 einstellen
- Lösung dreimal mit je 30 mL Chloroform extrahieren
- vereinigte organische Extrakte über Natriumsulfat trocknen und filtrieren
- Extrakt am Rotationsverdampfer einengen
- das eingeengte Filtrat in ein Vial überführen
- restliches Lösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernen
- den Rückstand mit 600 µL BSTFA/ Pyridin ( 2/1; v/v) aufnehmen
- 1 h bei 70 ℃ im Trockenschrank silylieren
- mittels GC/MS vermessen

### 5.3.11 Photometrische Bestimmung des Ligningehaltes als acetylbromidlösliches Lignin

- ca. 50 mg UBS, AUBS oder KL in ein Pyrexglas einwiegen
- mit 2,5 mL 25 %iger essigsaurer Acetylbromidlösung versetzen
- 2 h im Wasserbad bei 50 ℃ auf dem Magnetrührwerk inkubieren
- alle 20 min mit Hilfe von Miniaturrührstäbchen rühren
- im Eisbad abkühlen, Magnetrührstäbchen entfernen und 10 min bei 5000 U/min zentrifugieren
- nach Erreichen der RT werden 100 µL des klaren Überstandes in einen 10 mL Messkolben pipettiert
- mit der Reagenzlösung (Essigsäure/2 M Natronlauge/0,5 M Hydroxylaminhydrochlorid; 130/35/7; v/v/v) bis zur Eichmarke auffüllen
- nach genau 15 min gegen einen Blindwert bei 280 nm vermessen

### 5.3.12 Gewinnung des Dioxan-Lignins

- UBS gemäß Kap. 5.3.1 isolieren
- UBS je 8 h mit Ethanol, Dichlormethan und n-Hexan in einer Soxhlet-Apparatur extrahieren
- extrahierte UBS mit Hilfe einer Kugelmühle feins tvermahlen

- vermahlene Probe in einen 100 mL Rundkolben geben
- 20 mL Dioxan/Wasser (96:4 v/v) pro g Probe hinzufügen
- für 48 Stunden unter Lichtausschluss rühren
- Suspension zentrifugieren
- Überstand aufbewahren
- Rückstand weitere 48 h unter Lichtausschluss mit neuem Lösungsmittelgemisch rühren
- Suspension zentrifugieren
- Überstände vereinigen und über einen Glasfaserfilter vakuumfiltrieren
- Rückstand der Filtration dreimal mit jeweils 20 mL Dioxan/Wasser (96:4, v/v) waschen
- Zentrifugations- und Filtrationsrückstände vereinigen, trocknen und auswiegen
- Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 10 mL einengen
- eingeengtes Filtrat in 500 mL dest. Wasser tropfen
- zur Vervollständigung der Präzipitation 1 h in den Kühlschrank stellen
- Rückstand abzentrifugieren und dreimal mit 30 mL dest. Wasser waschen
- Rückstand für 48 h gefriertrocknen und auswiegen

### 5.3.13 Gewinnung des Säure-Lignins

- Rückstand aus 5.3.12 in einen Zweihalskolben geben
- in Dioxan/0,01 M Salzsäure (20 mL/g Probe) suspendieren
- Stickstoff für 10 min durch die Suspension leiten
- Suspension für 2 Stunden unter Stickstoffffluss und Rückfluss erhitzen
- Suspension durch eine Glasfaserfritte (Porosität 3) vakuumfiltrieren
- Rückstand zweimal mit jeweils 10 mL Dioxan/Wasser (85:15|v/v) und 10 mL Dioxan waschen
- Rückstand trocknen und auswiegen
- Filtrat am Rotationsverdampfer auf ca. 10 mL einengen
- eingeengtes Filtrat in 1,1 L saures Wasser (pH 2) tropfen
- zur Vervollständigung der Präzipitation für 1 h in den Kühlschrank stellen
- Rückstand abzentrifugieren und dreimal mit 30 mL dest. Wasser waschen

- Rückstand für 48 h gefriertrocknen und auswiegen

### 5.3.14 Photometrische Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten der Säure- und Dioxan-Lignine

- genau 10 mg der um die Kohlenhydratgehalte korrigierten DL und SL in 5 mL Dioxan lösen
- 0,2 bis 0,7 mL der Lösung in 0,1 mL-Schritten sowie ein Blindwert in 20 mL Schliffstopfenreagenzgläser geben
- die Schliffstopfenreagenzgläser für 2 Stunden in den Vakuumtrockenschrank stellen
- 0,5 mL 25 %ige essigsaure Acetylbromidlösung hinzugeben
- 30 min bei 50 ℃ im Wasserbad inkubieren
- im Eisbad kühlen und mit Reagenzlösung bis zur Kalibriermarke auffüllen
- nach genau 15 min bei 280 nm vermessen

### 5.3.15 Charakterisierung der Ligninzusammensetzung nach reduktiver Spaltung

**Lösen und Acetylierung:**

- ca. 50 mg Probe werden genau in ein Pyrexglas eingewogen und mit 7,5 mL einer 20 %igen essigsauren Acetylbromidlösung versetzt und 3 h bei 50 ℃ im Wasserbad auf dem Magnetrührwerk unter Verwendung von Miniaturrührstäbchen gerührt
- Lösung am Stickstoffstrom bis zur Trockene eindampfen

**Reduktive Spaltung und Extraktion:**

- Rückstand in 7,5 mL Dioxan/Eisessig/destilliertem Wasser (5/4/1; v/v/v) lösen, mit ca. 50 mg Zinkstaub versetzen, vortexen und für 40 min auf dem Magnetrührer rühren
- 750 µL des internen Standards hinzufügen und durch Nachspülen mit 10 mL einer gesättigten Ammoniumchloridlösung und 10 mL Dichlormethan den Ansatz quantitativ in einen Scheidetrichter überführen

- wässrige Phase mit 3 %iger Salzsäurelösung auf pH < 3 ansäuern, kräftig schütteln
- organische Phase abtrennen, die wässrige Phase erneut zweimal mit je 5 mL Dichlormethan extrahieren und die organischen Phasen vereinigen
- Trennstufe zwischen Dichlormethan und gesättigter Ammoniumchloridlösung weitere zwei Male durchführen
- vereinigte organischen Phasen über Magnesiumsulfat trocknen, filtrieren, am Rotationsverdampfer einengen, in ein Pyrexglas pipettieren und am Stickstoffstrom bis zur Trockene eindampfen

**Acetylierung und Festphasenextraktion:**

- Rückstand in 1,5 mL Dichlormethan aufnehmen und mit 0,2 mL Pyridin und 0,2 mL Essigsäureanhydrid über Nacht bei RT acetylieren
- acetyliertes Produkt nach Zugabe von 1,5 mL Dichlormethan auf eine mit 2 mL Dichlormethan konditionierte SPE-Säule (Varian Bond; Festphase: Silica, Füllmenge: 500 mg, Elutionsmittel: Chloroform/Ethylacetat 10:1, 9 mL) geben
- Eluat am Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen, in 200 µL Dichlormethan aufnehmen, in ein Vial mit Mikrolitereinsatz überführen
- Lösung mittels GC-MS vermessen

### 5.3.16 Charakterisierung der acetylierten Dioxan-Lignins mittels Kernresonanz-Spektroskopie

- ca. 100 mg Dioxan-Lignin gemäß Kap. 5.3.15 mit Essigsäureanhydrid bei RT über Nacht acetylieren
- Lösungsmittel unter Stickstoff-Strom entfernen
- restliches Lösungsmittel in Vakuumtrockenschrank entfernen
- Rückstand in deuteriertem Aceton aufnehmen und $^{1}$H-NMR-Spektren messen

## 5.4 Tabellen

### 5.4.1 Gehalte an unlöslichen Ballaststoffen in den untersuchten Trockenproben

**Tab. 12: Korrigierte Gehalte an unlöslichen Ballaststoffen in den Trockenproben, in g/100 g Trockenprobe**

| Probe | UBS Gehalt | Sy | Asche-gehalt | Sy | Protein-gehalt | Sy | Korrektur-faktor | Korr. UBS-Gehalt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Weizen | 10,3 | 0,2 | 1,0 | 0,0 | 11,1 | 2,5 | 0,880 | 9,1 |
| Roggen | 12,0 | 0,3 | 1,1 | 0,0 | 9,8 | 0,1 | 0,897 | 10,7 |
| Grünkohl | 48,9 | 0,2 | 5,6 | 0,0 | 8,9 | 0,3 | 0,867 | 42,4 |
| Möhre | 22,9 | 0,2 | 4,6 | - | 2,8 | 0,4 | 0,936 | 21,4 |
| Kiwi | 14,5 | 0,2 | 0,6 | - | 2,3 | 0,0 | 0,935 | 13,5 |
| Birne | 19,7 | 0,1 | 1,2 | 0,1 | 0,9 | 0,1 | 0,952 | 18,7 |

n = 2

### 5.4.2 Gehalte der korrigierten Klason-Lignine der untersuchten Trockenproben

**Tab. 13: gravimetrisch bestimmte Gehalte an unkorrigierten Klason-Ligninen, Nicht-Ligninen und korrigierte Klason-Ligninen in g/100 g unlösliche Ballaststoffe**

| Probe | Unkorr. KL | Asche | Proteine* | WFB** | KSM | Korrektur-faktor | Korr. KL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Weizen | 12,0 | 2,6 | 24,0 | 13,0 | 38,7 | 0,2 | 2,6 |
| Roggen | 11,2 | 2,0 | 13,9 | 9,3 | 40,1 | 0,4 | 3,9 |
| Grünkohl | 13,4 | 2,4 | 13,0 | 26,8 | 47,1 | 0,1 | 1,5 |
| Möhre | 14,0 | 1,3 | 9,3 | 5,1 | 23,2 | 0,6 | 8,6 |
| Kiwi | 33,0 | 0,5 | 9,9 | 2,4 | 28,6 | 0,6 | 23,7 |
| Birne | 23,7 | 0,6 | 9,2 | 3,0 | 26,6 | 0,6 | 14,4 |

n = 2; *Wiederfindungsrate$_1$ = 65,54 %

**Wiederfindungsrate$_2$ = 80,85 % für Glycerol, 97,96 % für Fette.

**Tab. 14 Standardabweichungen der gravimetrisch bestimmten Klason-Lignine (in g/100 g unlösliche Ballaststoffe) sowie der in Klason-Ligninen bestimmten Proteine, Wachs- und Fettbestandteile und Kutin-/ Suberinmonomere (in g/100 g Klason-Lignin)**

| Probe | Sy (Unkorr. KL) | Sy (Proteine) | Sy (WFB) | Sy (KSM) |
|---|---|---|---|---|
| Weizen | 0,0 | 0,4 | 1,9 | 0,6 |
| Roggen | 0,3 | 0,5 | 0,9 | 0,9 |
| Grünkohl | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 4,9 |
| Möhre | 0,1 | 0,9 | 0,4 | 0,4 |
| Kiwi | 2,7 | 2,9 | 0,0 | 1,4 |
| Birne | 0,4 | 1,5 | 0,5 | 0,4 |

n = 2

### 5.4.3 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der untersuchten Klason-Lignine

**Tab. 15: Monosaccharidzusammensetzung der untersuchten Klason-Lignin-Proben***

| Probe | Monosaccharid | Fläche |
|---|---|---|
| Birne | Myo-Inosit (IS) | 48906706 |
| | Mannose | 4259582 |
| Möhre | Myo-Inosit (IS) | 44203544 |
| | Mannose | 2529178 |

n = 2; *Da in den untersuchten KL von Weizen, Roggen, Kiwi und Grünkohl keine Monosaccharide identifiziert wurden, sind diese hier nicht aufgeführt.

### 5.4.4 Gehalte an angereicherten unlöslichen Ballaststoffen

**Tab. 16: Prozentuale Gehalte der angereicherten unlöslichen Ballaststoffe bezogen auf die eingesetzten unlöslichen Ballaststoffe von Birne, Kiwi und Möhre (g/100 g)**

| Probe | Ausbeute | Sy |
|---|---|---|
| Möhre | 18,2 | 1,3 |
| Kiwi | 58,8 | 2,5 |
| Birne | 28,1 | 3,2 |

n = 2

### 5.4.5 Gehalte an acetylbromidlöslichen Lignine

**Tab. 17: Gehalte an acetylbromidlöslichen Ligninen in den Gesamtproben in g/100 g unlösliche Ballaststoffe/angereicherte unlösliche Balaststoffe/Klason-Lignin**

| Probe | | ABSL* | Sy |
|---|---|---|---|
| UBS | Birne | 11,7 | 0,1 |
| | Kiwi | 5,5 | 0,5 |
| | Möhre | 2,5 | 0,1 |
| AUBS | Birne | 17,2 | 0,3 |
| | Kiwi | 5,7 | 0,1 |
| | Möhre | 3,5 | 0,3 |
| KL | Birne | 10,5 | 0,0 |
| | Kiwi | 3,9 | 0,5 |
| | Möhre | 1,3 | 0,5 |

*ε = 20 $g^{-1}Lcm^{-1}$, n = 2

**Tab. 18: Gehalte an acetylbromidlöslichen Ligninen in den Probenfraktionen in g/100 g unlösliche Ballaststoffe/angereicherte unlösliche Ballaststoffe**

| Proben | | ABSL* | Sy |
|---|---|---|---|
| UBS | MFF | 2,2 | 0,1 |
| | MSch | 3,1 | 0,1 |
| | MZyl | 4,0 | 0,1 |
| | BiSch | 18,4 | 0,1 |
| | BiFF | 10,9 | 1,3 |
| | KiSa | 5,0 | 0,2 |
| | KiCo | 3,5 | 0,1 |
| | KiFF | 3,1 | 0,1 |
| AUBS | MFF | 0,9 | 0,1 |
| | MSch | 3,0 | 0,3 |
| | MZ | 7,0 | 0,0 |
| | BiSch | 19,8 | 2,2 |
| | BiFF | 8,9 | 1,5 |
| | KiSa | 5,2 | 0,1 |
| | KiCo | 3,5 | 0,4 |
| | KiFF | 2,5 | 0,0 |

*ε = 20 $g^{-1}Lcm^{-1}$, n= 2

### 5.4.6 Bestimmung der Dioxan- und Säureligningehalte

**Tab. 19: Prozentuale Gehalte an Dioxan- und Säure-Ligninen bezogen auf die angereicherten unlöslichen Ballaststoffe**

| Probe | DL [%] | Sy (DL) | SL [%] | Sy (SL) |
|---|---|---|---|---|
| Möhre | 13,0 | 0,0 | 22,1 | 0,0 |
| Kiwi | 9,0 | 0,0 | 1,6 | 0,0 |
| Birne | 20,2 | - | 2,3 | - |

n = 2 (Möhre, Kiwi); n = 1 (Birne)

### 5.4.7 Monosaccharidzusammensetzung der Dioxan- und Säure-Lignine

**Tab. 20: Prozentuale Anteile an Restzuckern in den Dioxan- und Säure-Ligninen**

| Monosaccharid | $G_{Zucker}$ [%] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Birne-DL | Birne-SL | Kiwi-DL | Kiwi-SL | Möhre-DL | Möhre-SL |
| L-Rhamnose | 0,3 | 0,6 | 0,4 | 0,6 | 1,7 | 0,7 |
| L-Arabinose | 3,0 | 10,4 | 0,3 | 1,2 | 1,1 | 1,5 |
| D-Xylose | 9,4 | 11,2 | 2,1 | 14,1 | 0,4 | 0,7 |
| D-Fructose | 0,6 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 5,2 | 5,2 |
| D-Mannose | 1,7 | 2,4 | 1,8 | 4,4 | 15,0 | 8,3 |
| D-Glucose | 0,9 | 1,6 | 0,4 | 1,5 | 2,5 | 3,4 |
| Gesamtzucker: | 15,9 | 26,6 | 5,3 | 22,1 | 26,0 | 19,7 |

n = 2

### 5.4.8 Monolignolzusammensetzung der angereicherten unlöslichen Ballaststoffe

**Tab. 21: Gehalte der Hauptmonolignole in den angereicherten unlöslichen Ballaststoffen in g/100 g angereicherten unlöslichen Ballststoffe**

| AUBS | | Gehalt G | Sy (G) | Gehalt S | Sy (S) |
|---|---|---|---|---|---|
| Birne | Birne | 5,6 | 0,8 | 5,3 | 1,9 |
| | BiFF | 3,6 | 0,2 | 3,0 | 0,6 |
| | BiSch | 4,9 | 0,3 | 5,0 | 0,6 |
| Kiwi | Kiwi | 1,9 | 0,2 | 0,2 | 0,1 |
| | KiSa | 2,4 | 0,3 | 0,1 | 0,0 |
| | KiCo | 1,7 | 0,1 | - | - |
| | KiFF | - | - | 0,0 | 0,0 |
| Möhre | Möhre | 0,1 | 0,0 | - | - |
| | MFF | 0,0 | 0,0 | - | - |
| | MSch | 0,2 | 0,1 | - | - |
| | MZ | 0,5 | 0,0 | - | - |

n = 2

## 5.5 Chromatogramme und Spektren

### 5.5.1 Chromatogramme

#### 5.5.1.1 Bestimmung der Kohlenhydratgehalte als Alditolacetate

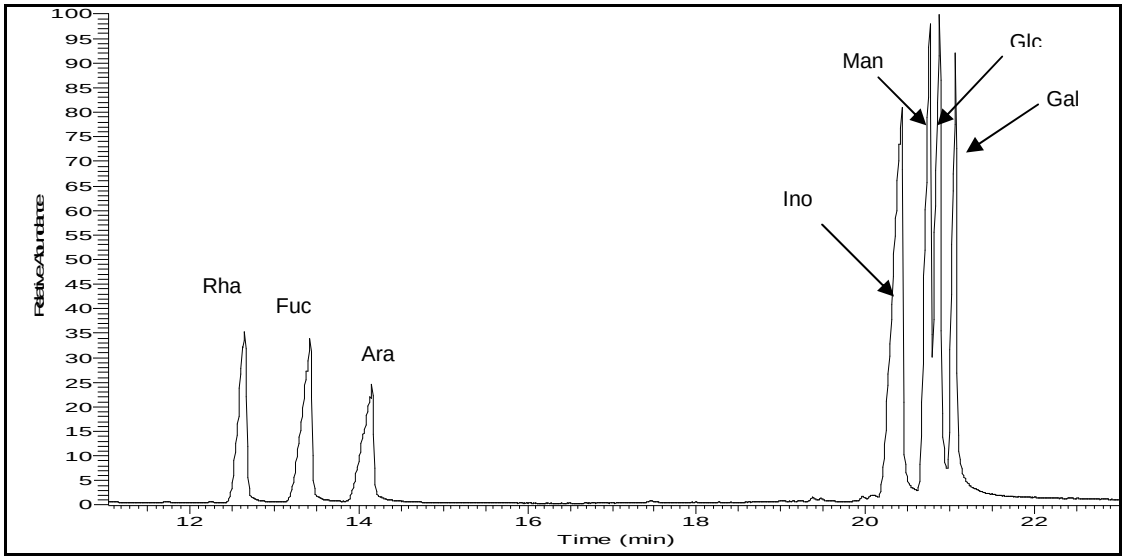



**Abb. 46: GC-MS-Chromatogramm eines Standardgemisches zur Bestimmung der Kohlenhydrate als Alditolacetate: Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; Ara, Arabinose; Ino, Myo-Inositol; Man, Mannose; Glc, Glucose; Gal, Galactose**

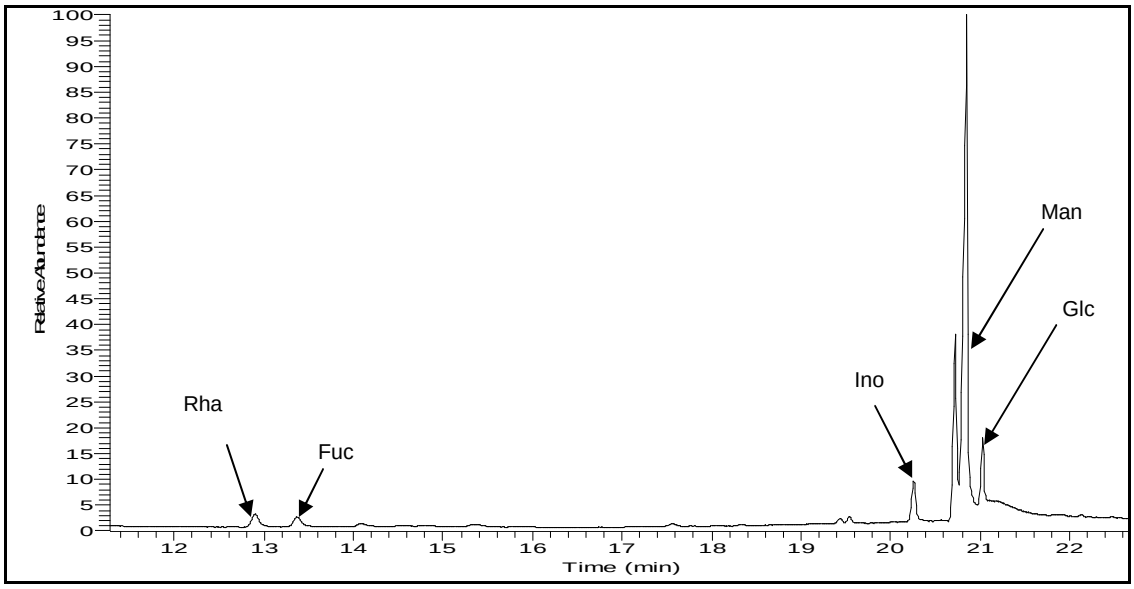



**Abb. 47: GC-MS-Chromatogramm der Bestimmung der Kohlenhydrate in angereicherten Möhrenballaststoffen: Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; Ino, Myo-Inositol; Man, Mannose; Glc, Glucose; Gal, Galactose**

### 5.5.1.2 Charakterisierung der Wachs- und Fettbestandteile (Weizen, Birne, Möhre, externer Standard)

(Anmerkung: der Beispielchromatogramm von Roggen bezieht sich auf die unlölichen Ballaststoffe)

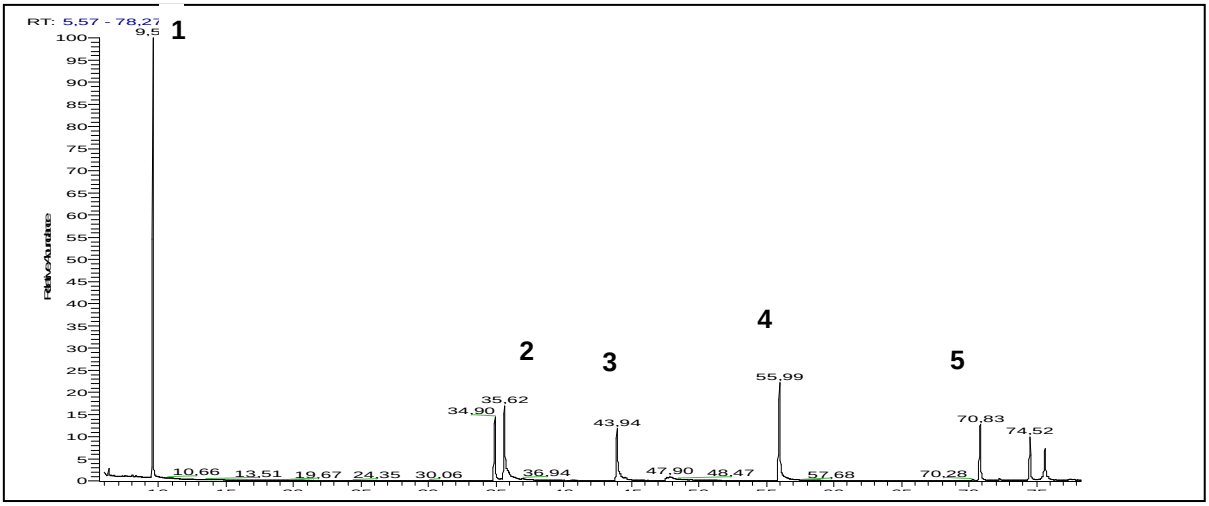



**Abb. 48: GC-MS-Chromatogramm eines Standardgemisches zur Charakterisierung von Wachs- und Fettbestandteilen sowie Kutin- und Suberinmonomeren in den Klason-Ligninen:**

**1. Glycerol, Trimethylsilylether; 2. Hexadecansäure, Trimethylsilylester; 3. Octadecansäure, Trimethylsilylester; 4. Eicosansäure, Methylester; 5. Hydroxydocosansäure, Methylester/Trimethylsilylether**

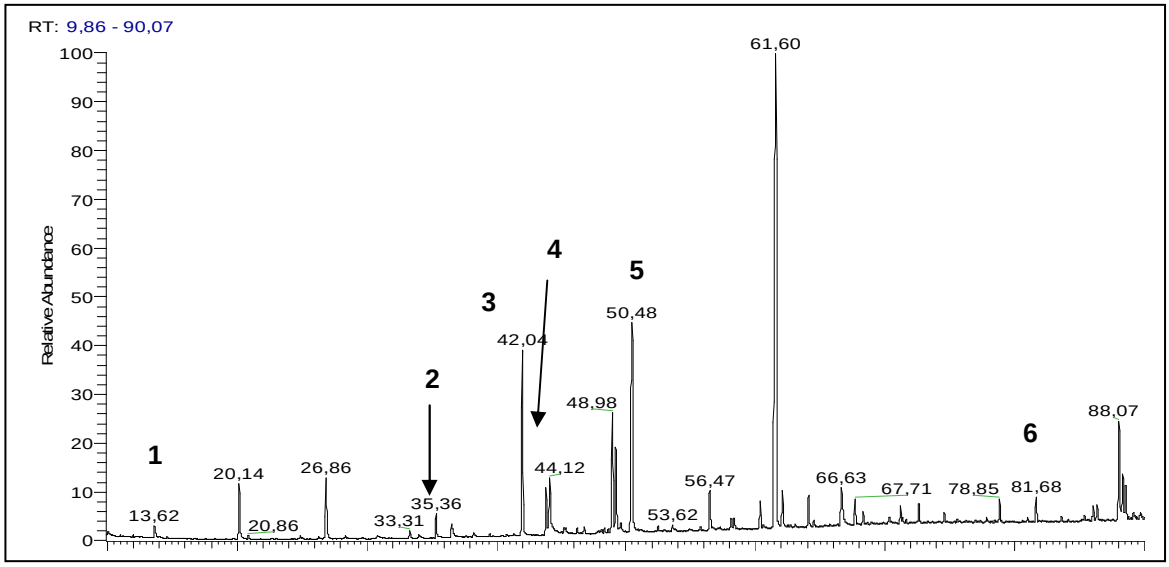



**Abb. 49: GC-MS-Chromatogramm des Extrakts der unlöslichen Ballaststoffe von Roggen: 1. Glycerol, Trimethylsilylether; 2. Hexadecansäure, Trimethylsilylester; 3. Octadecadiensäure, Trimethylsilylester; 4. Octadecensäure, Trimethylsilylester; 5. Hydroxyhexadecensäure, Methylester/Trimethylsilylether; 6. β-Sitosterol, Trimethylsilylether**

### 5.5.1.3 Charakterisierung von Kutin- und Suberinmonomeren (Kiwi, Roggen)

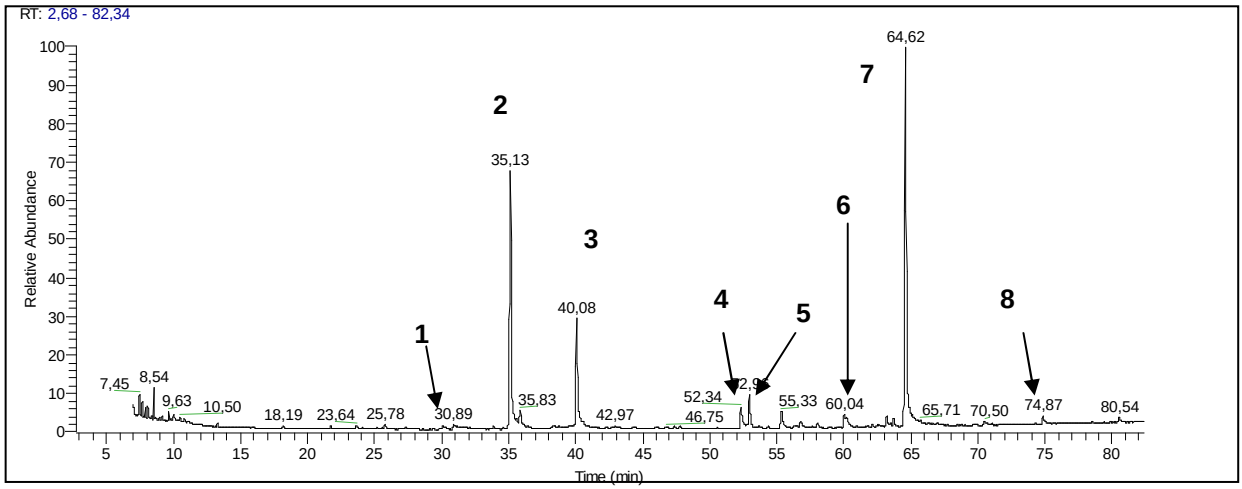



**Abb. 50: GC-MS-Chromatogramm des Klason-Lignin-Methanolysats von Kiwi: 1. Hexadecansäure, Methylester; 2. Hexadecansäure, Trimethylsilylester; 3. Hydroxyhexadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 4. Hydroxyoctadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 5. Dihydroxyhexadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 6. Dihydroxyoctadecansäure, Methylester, Trimethylsilylether; 7. IS; 8. Dehydidroferulasäure, Methylester, Trimethylsilylether**

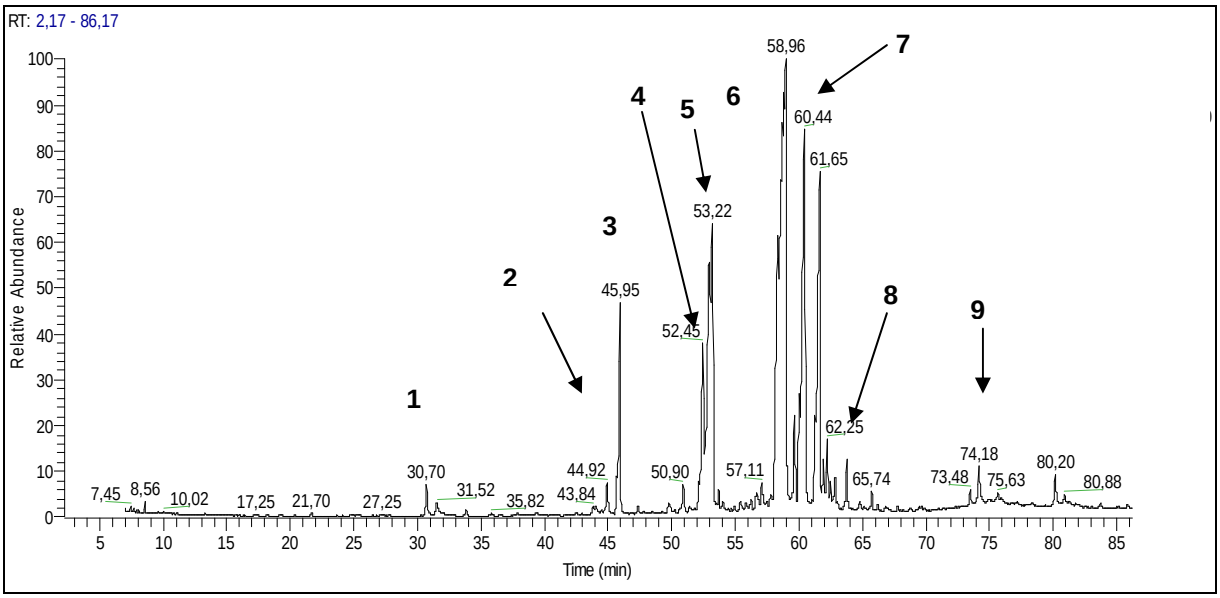



**Abb. 51: GC-MS-Chromatogramm des Klason-Lignin-Methanolysats von Roggen: 1. Hexadecansäure, Methylester; 2. Octadecandicarbonsäure, Methylester; 3. Hydroxyhexadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether; 4. Hydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether; 5. Dihydroxyhexadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether; 6. Epoxy-Hydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether; 7. Dihydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether; 8. Trihydroxyoctadecansäure, Methylester/Trimethylsilylether; 9. Dehydrodiferulasäure, Methylester/Trimethylsilylether**

### 5.5.1.4 Charakterisierung und Bestimmung von Lignin nach reduktiver Spaltung

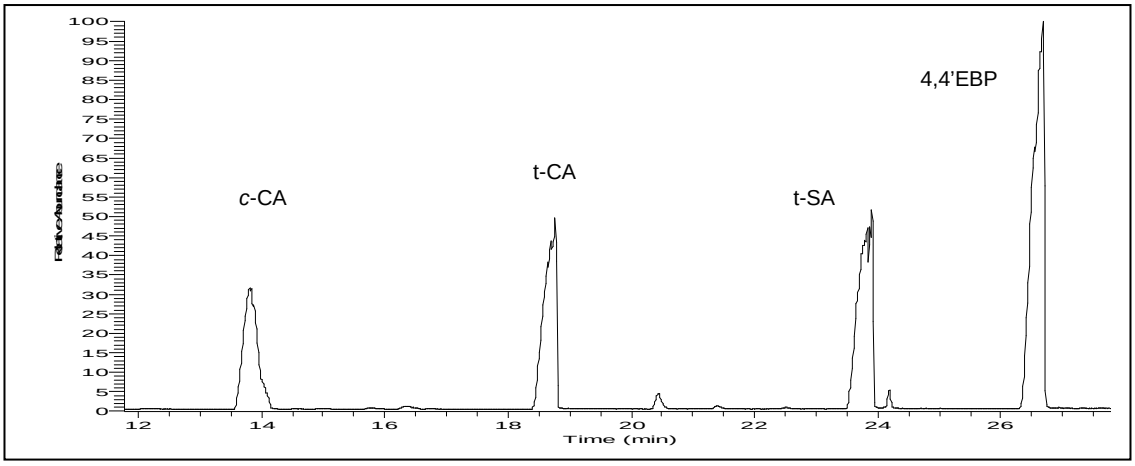



**Abb. 52: GC-MS-Chromatogramm des acetylierten Monolignolstandards: c-CA, cis-Coniferylalkohol ; t-CA, trans-Coniferylalkohol ; t-SA, trans-Sinapylalkohol ; 4,4'EBP, 4,4'-Ethylidenbisphenol (IS)**

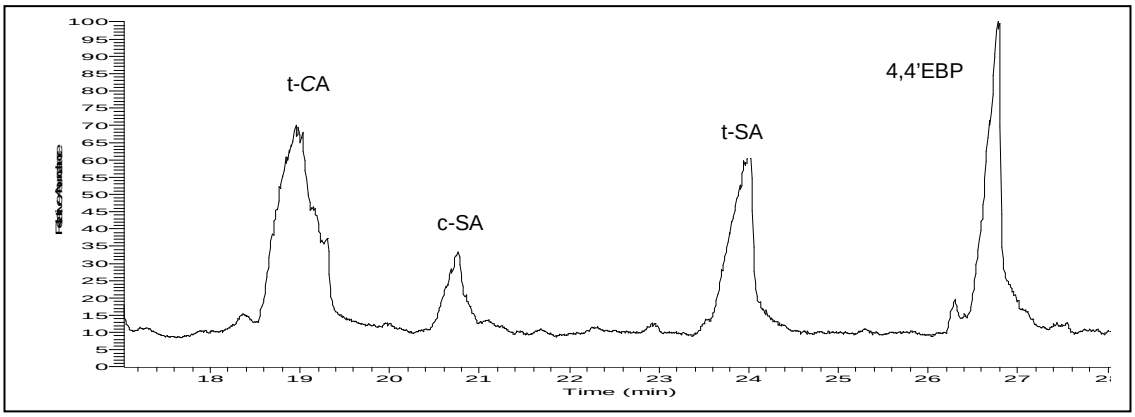



**Abb. 53: GC-MS-Chromatogramm der acetylierten Monolignole unlöslicher Birnenballaststoffe: c-CA, cis-Coniferylalkohol ; t-CA, trans-Coniferylalkohol ; t-SA, trans-Sinapylalkohol ; 4,4'EBP, 4,4'-Ethylidenbisphenol (IS)**

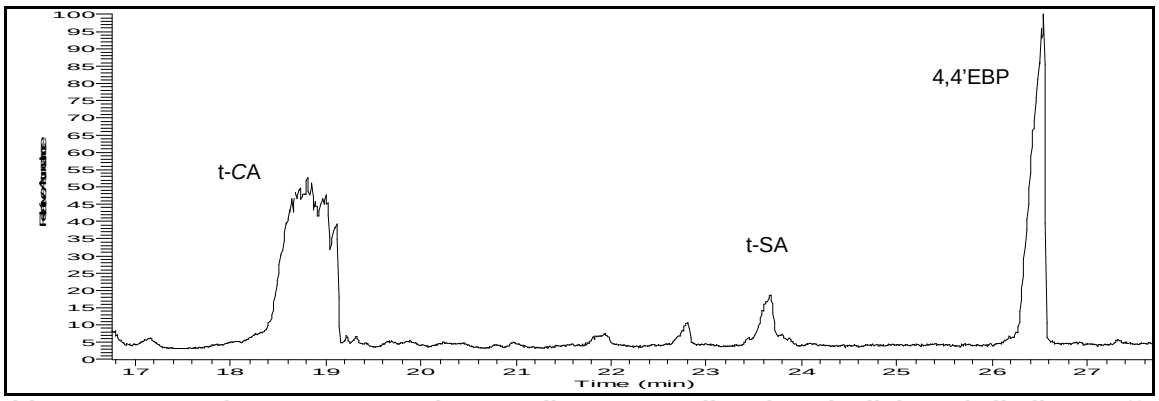



**Abb. 54: GC-MS-Chromatogramm der acetylierten Monolignole unlöslicher Kiwiballaststoffe: t-CA, trans-Coniferylalkohol ; t-SA, trans-Sinapylalkohol ; 4,4'EBP, 4,4'-Ethylidenbisphenol (IS)**

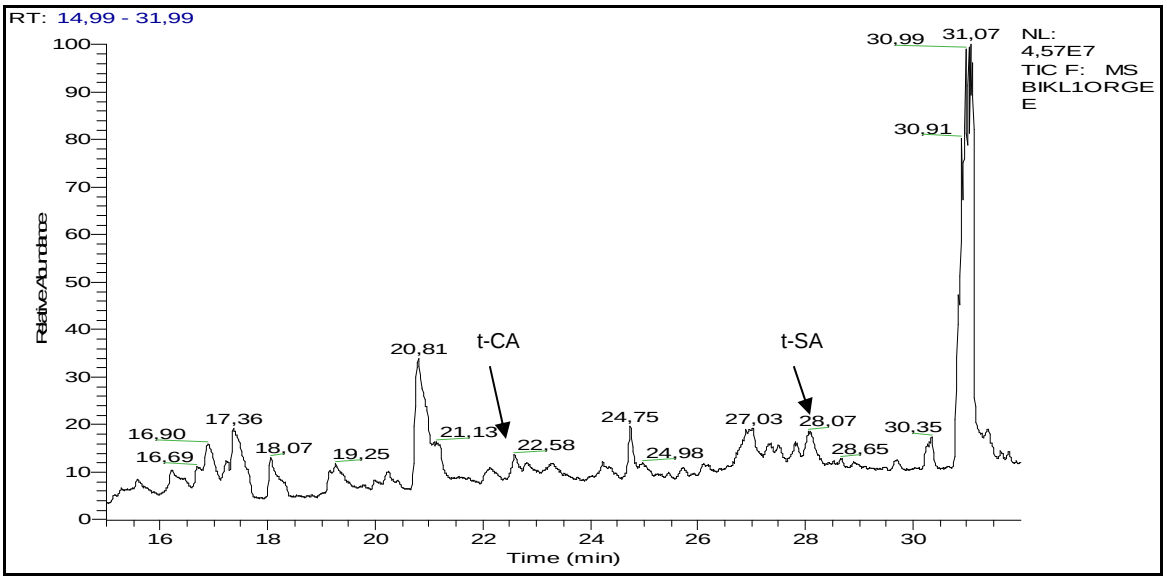



**Abb. 55: GC-MS-Chromatogramm der acetylierten Monolignole des Ethylacetatextrakts der Klason-Lignin-Waschlösung der Kiwi: t-CA, trans-Coniferylalkohol ; t-SA, trans-Sinapylalkohol**

## 5.5.2 Spektren

### 5.5.2.1 UV-Spektrum

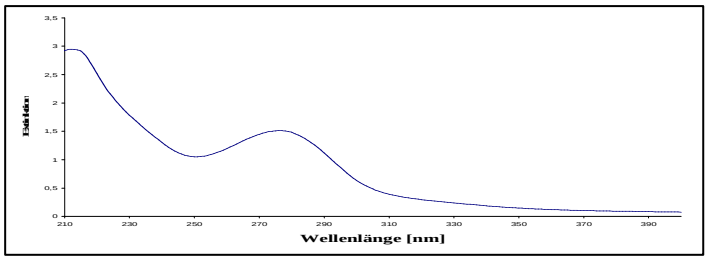



**Abb. 56: UV-Spektrum des Klason-Lignin-Filtrates von Kiwi**

### 5.5.2.2 Massenspektren

#### 5.5.2.2.1 Massenspektren der Monolignole

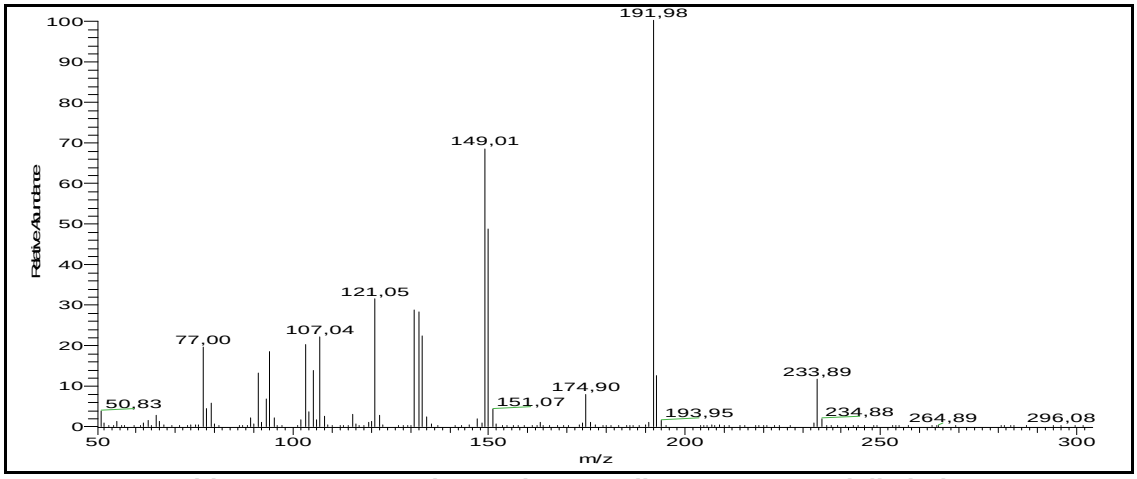



**Abb. 57: Massenspektrum des acetylierten *p*-Cumarylalkohols**

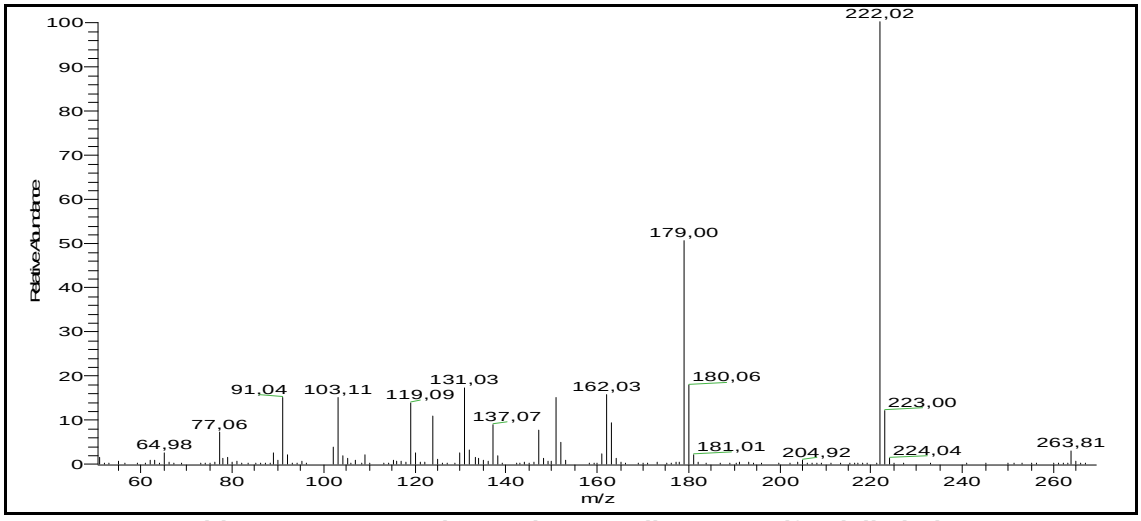



**Abb. 58: Massenspektrum des acetylierten Coniferylalkohols**

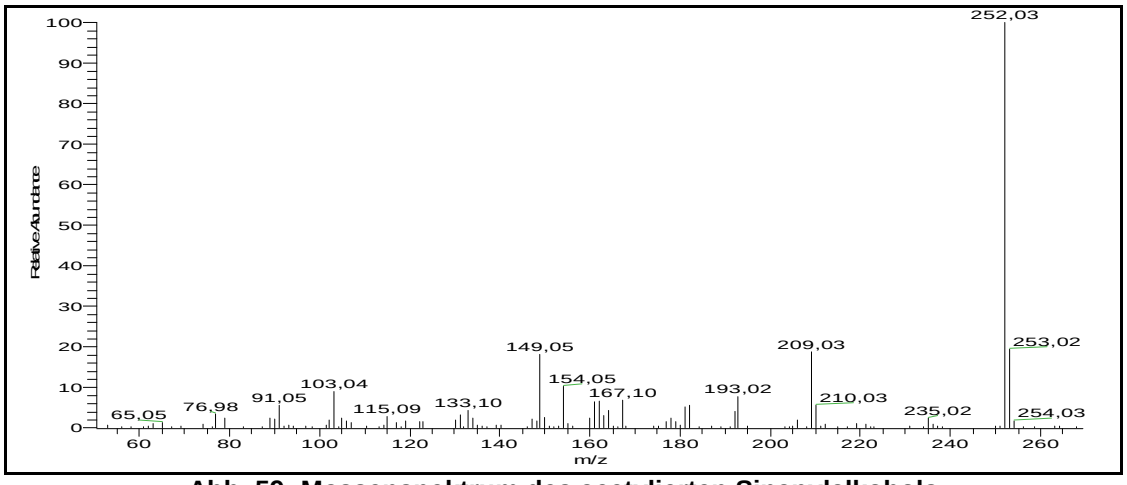



**Abb. 59: Massenspektrum des acetylierten Sinapylalkohols**

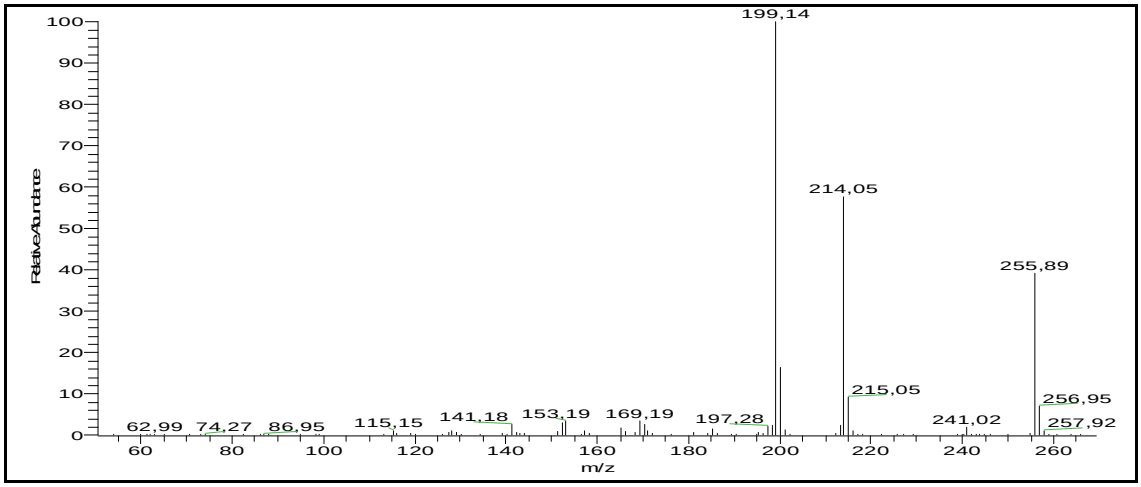



**Abb. 60: Massenspektrum des acetylierten 4,4'-Ethylidenebisphenols (interner Standard)**

### 5.5.2.2.2 Massenspektren der Wachs- und Fettbestandteile

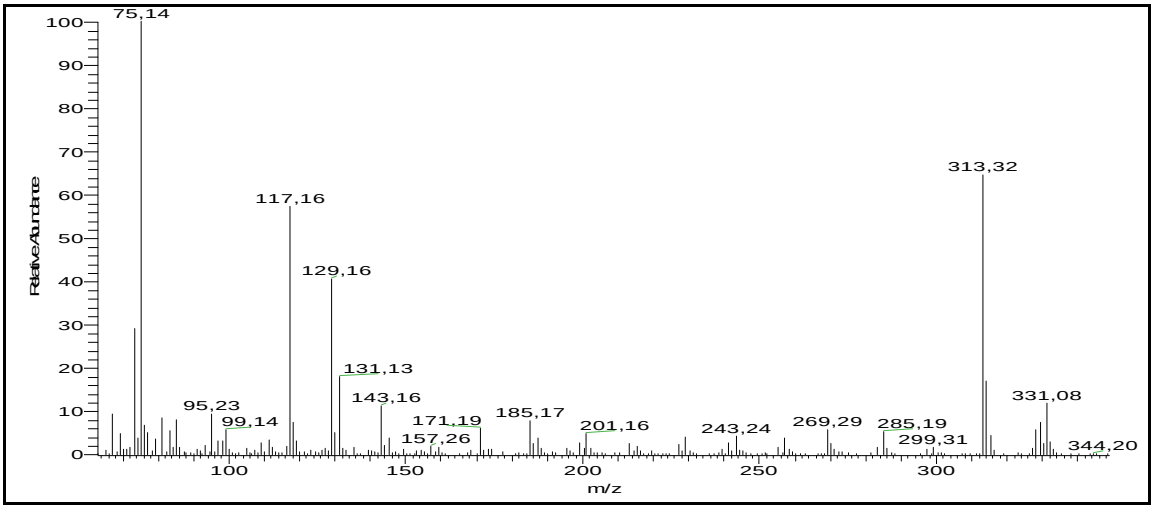



**Abb. 61: Massenspektrum der Hexadecansäure in Form des Trimethylsilylesterderivats**

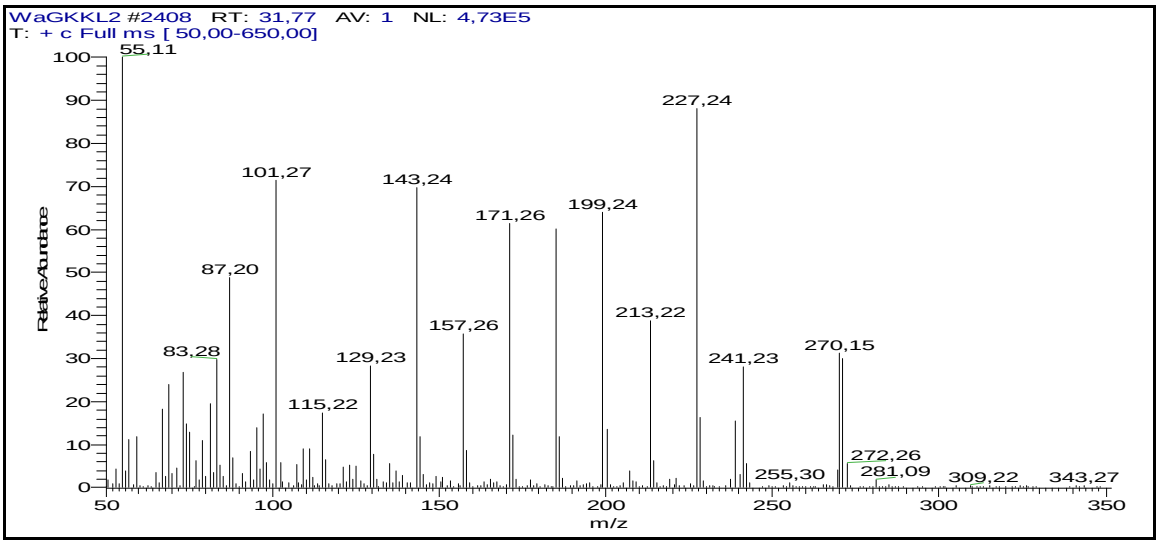



**Abb. 62: Massenspektrum der Hexadecansäure in Form des Methylesterderivats**

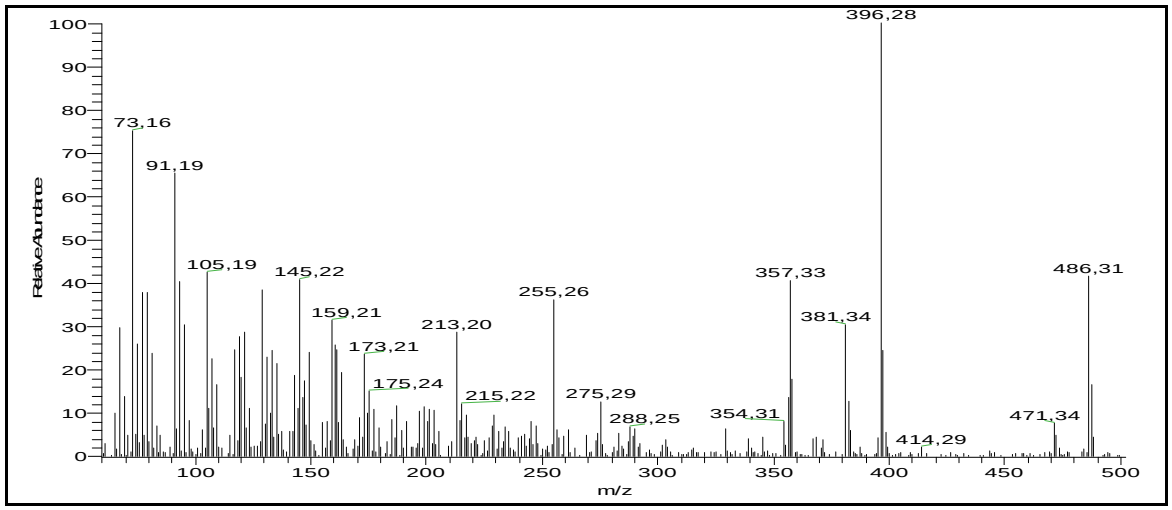



**Abb. 63: Massenspektrum des β-Sitosterols in Form des Trimethylsilyletherderivats**

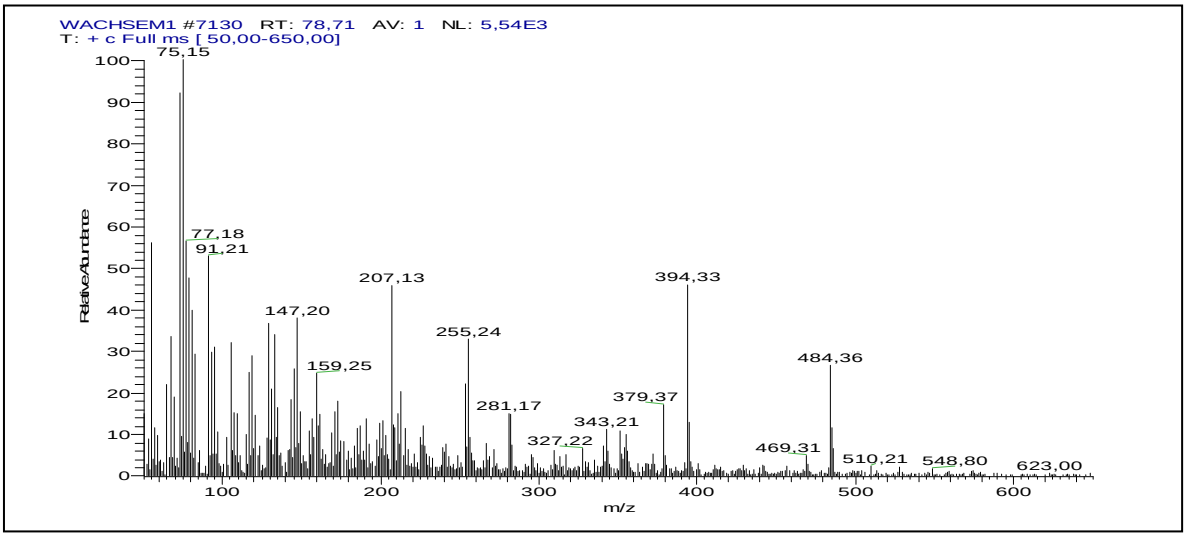



**Abb. 64: Massenspektrum des Ergostanols in Form des Trimethylsilyletherderivats**

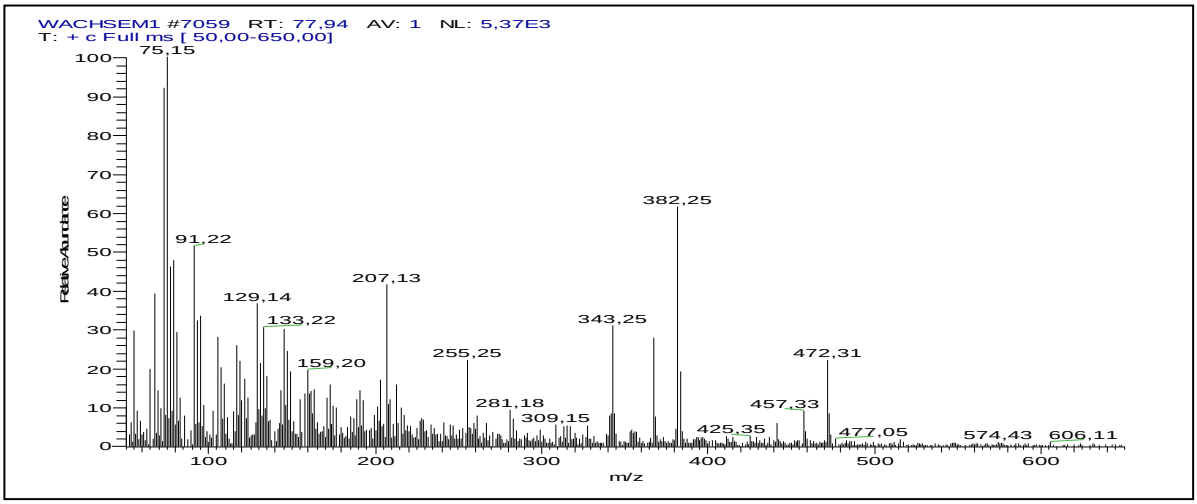



**Abb. 65: Massenspektrum des Campesterols in Form des Trimethylsilyletherderivats**

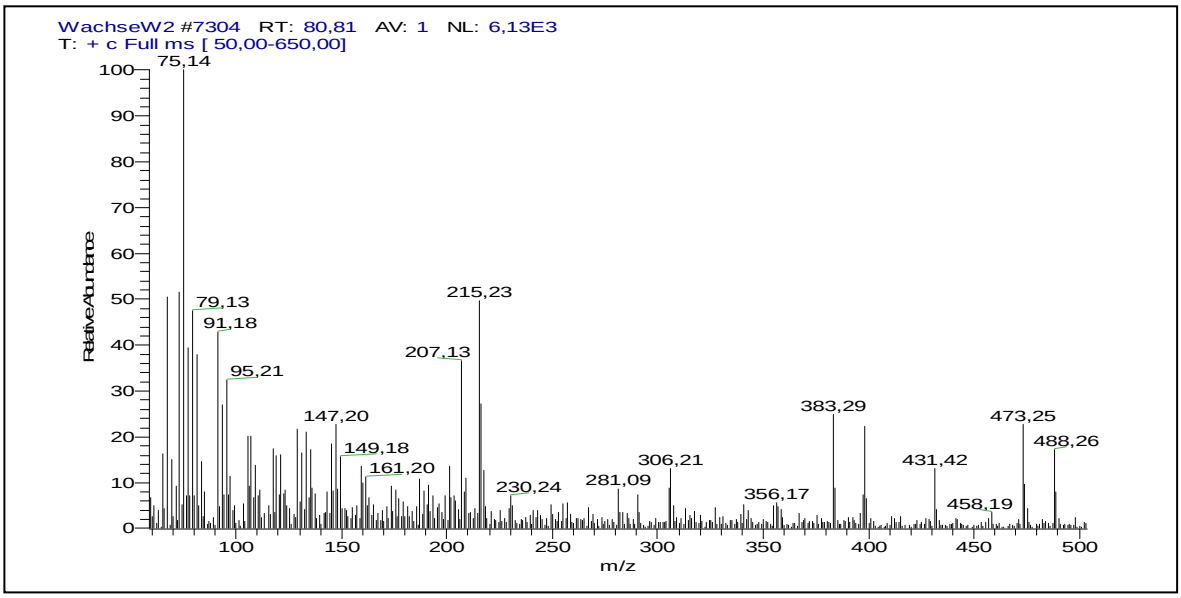



**Abb. 66: Massenspektrum des Sitostanols in Form des Trimethylsilyletherderivats**

### 5.5.2.2.3 Massenspektren von Kutinmonomeren und –oligomeren sowie Suberinmonomeren und –oligomeren

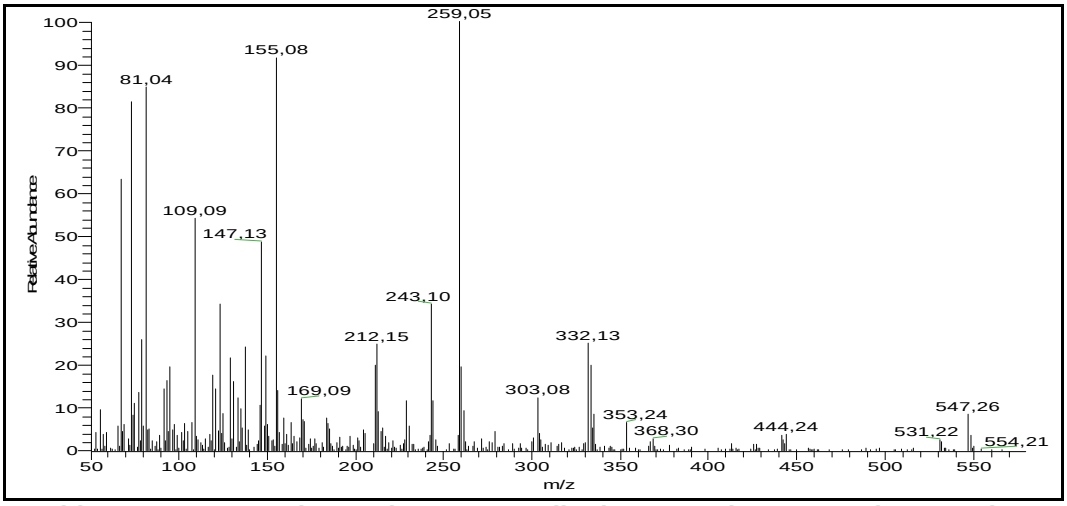



**Abb. 67: Massenspektrum der 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure in Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

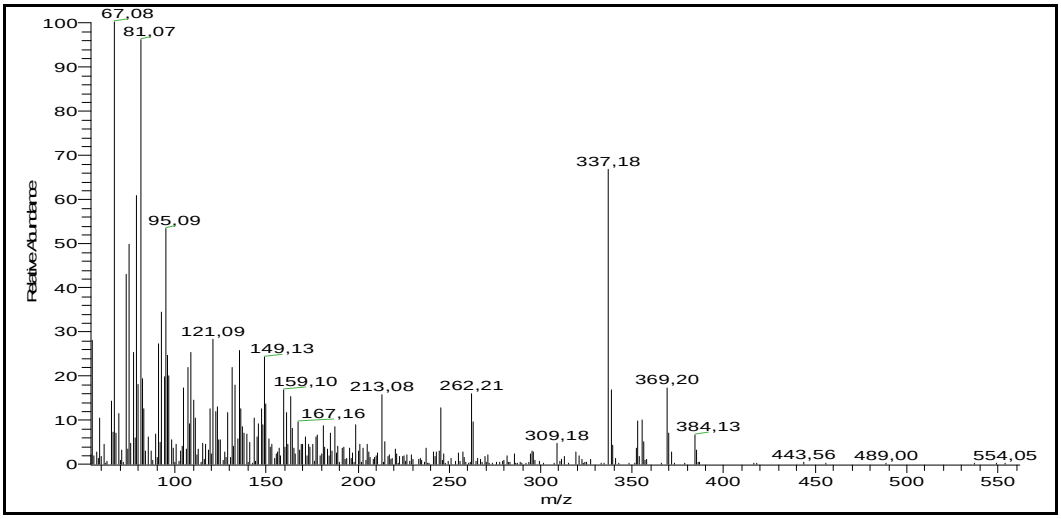



**Abb. 68: Massenspektrum der 18-Hydroxyoctadecen-9-säure in Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

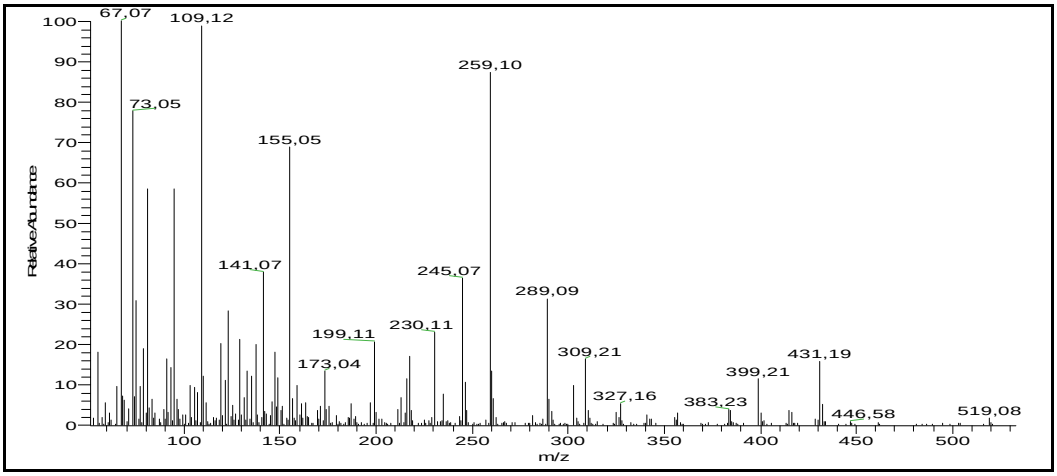



**Abb. 69: Massenspektrum der 10,16-Dihydroxyhexadecansäure in Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

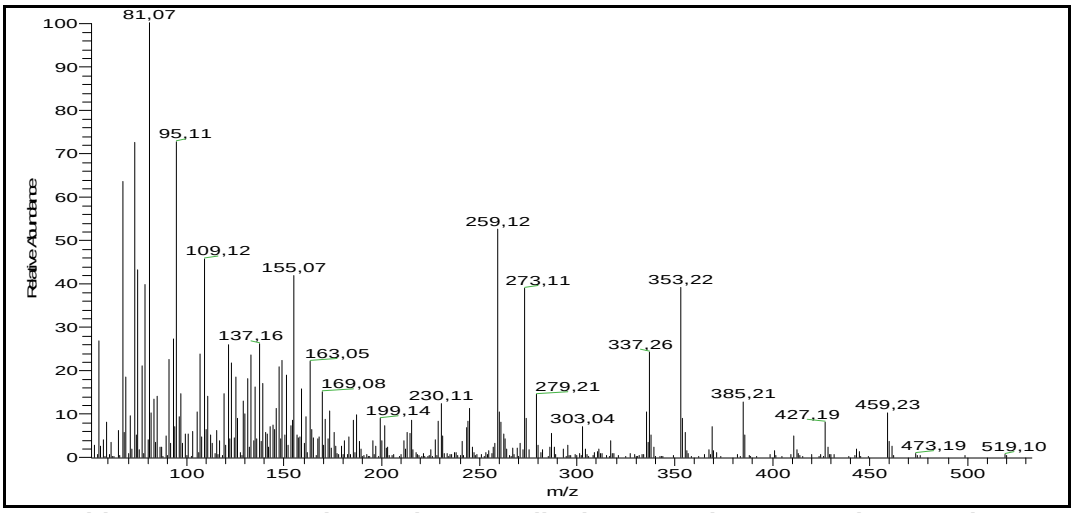



**Abb. 70: Massenspektrum der 9,18-Dihydroxyoctadecansäure in Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

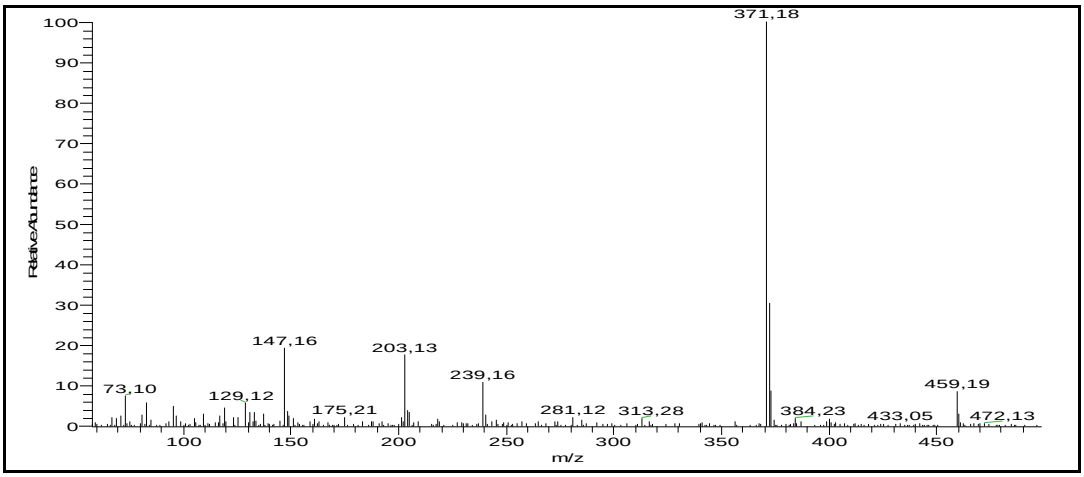



**Abb. 71: Massenspektrum des Monohexadecanyl-O-Glycerols in Form des Trimethyl-silyletherderivats**

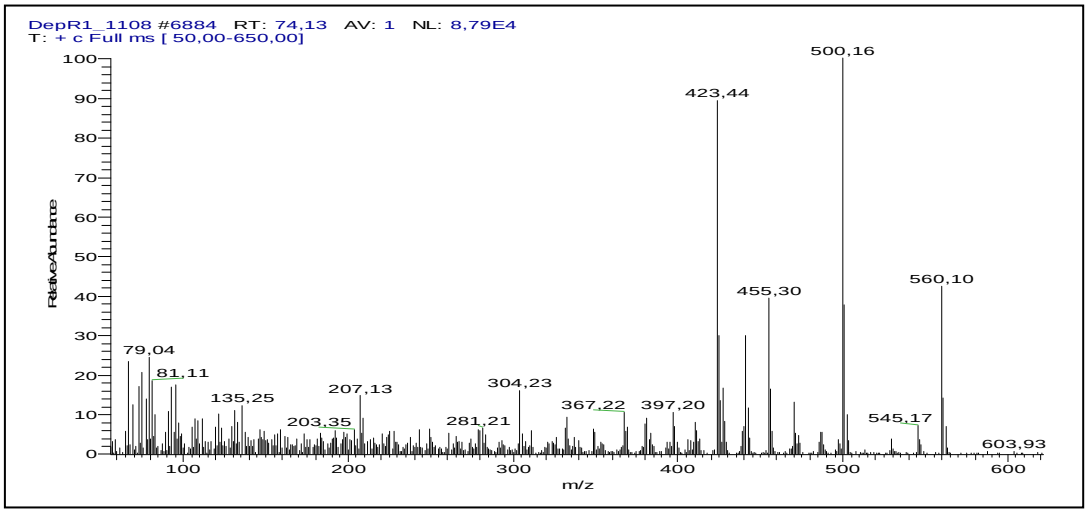



**Abb. 72: Massenspektrum einer Diferulasäure in der Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

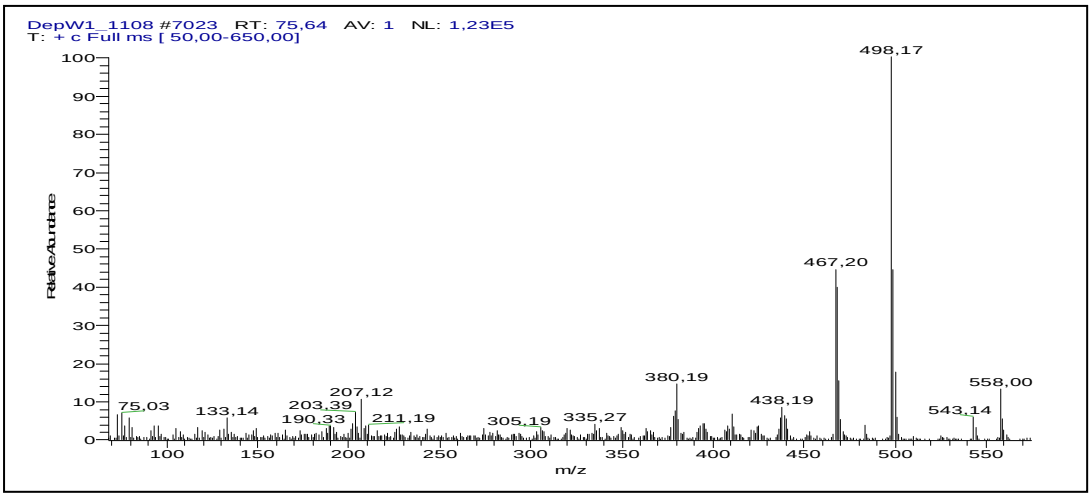



**Abb. 73: Massenspektrum einer Dehydrodiferulasäure in der Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

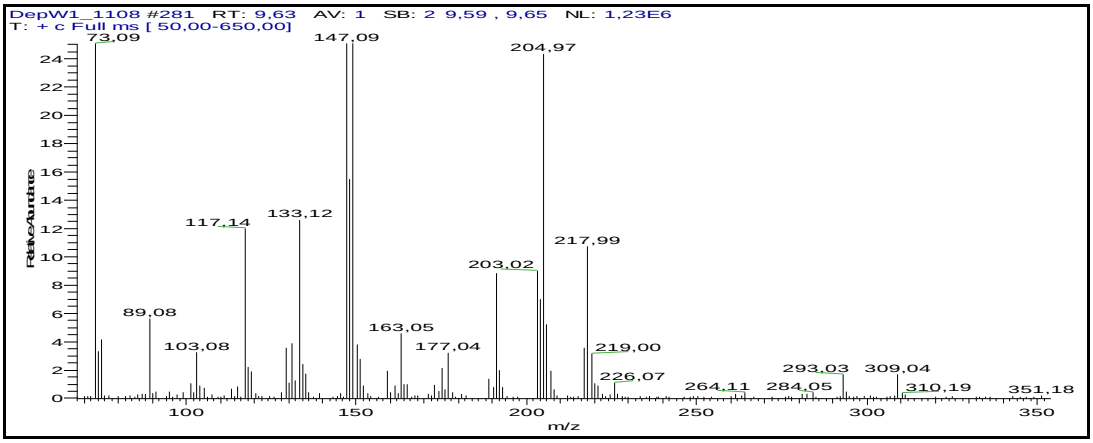



**Abb. 74: Massenspektrum des Glycerols in Form des Trimethylsilyletherderivats**

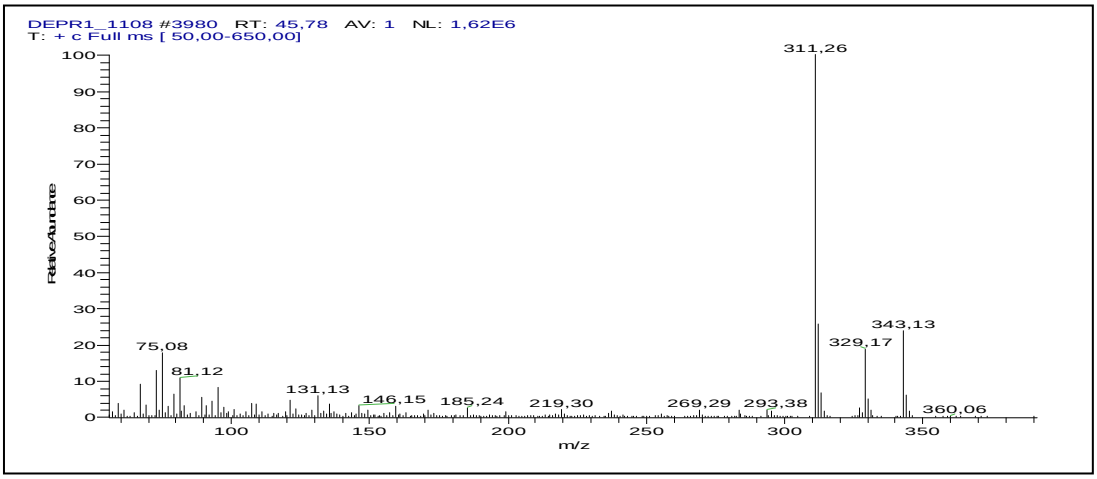



**Abb. 75: Massenspektrum der Hydroxyhexadecansäure in Form des Methylester/Trimethylsilyletherderivats**

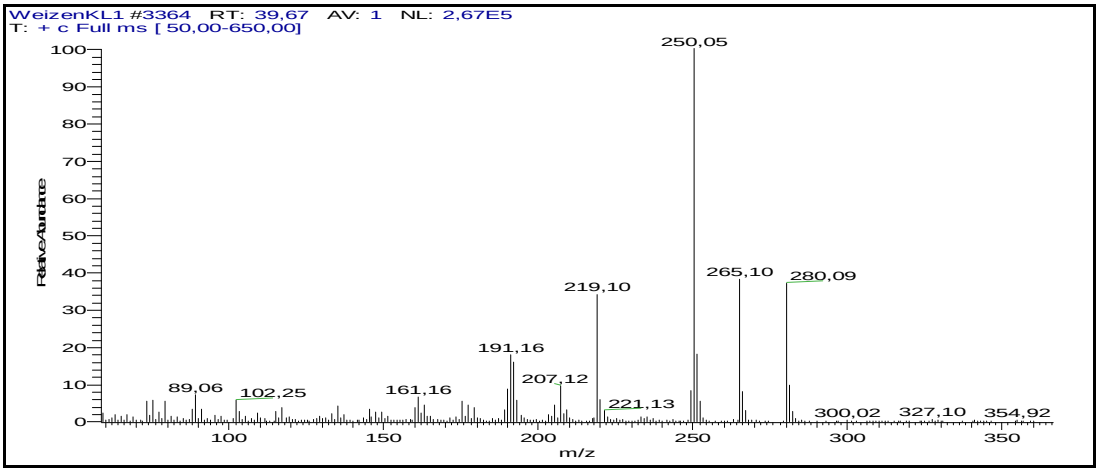



**Abb. 76: Massenspektrum der Ferulasäure in Form des Methylester/Trimethylsilyetherderivats**

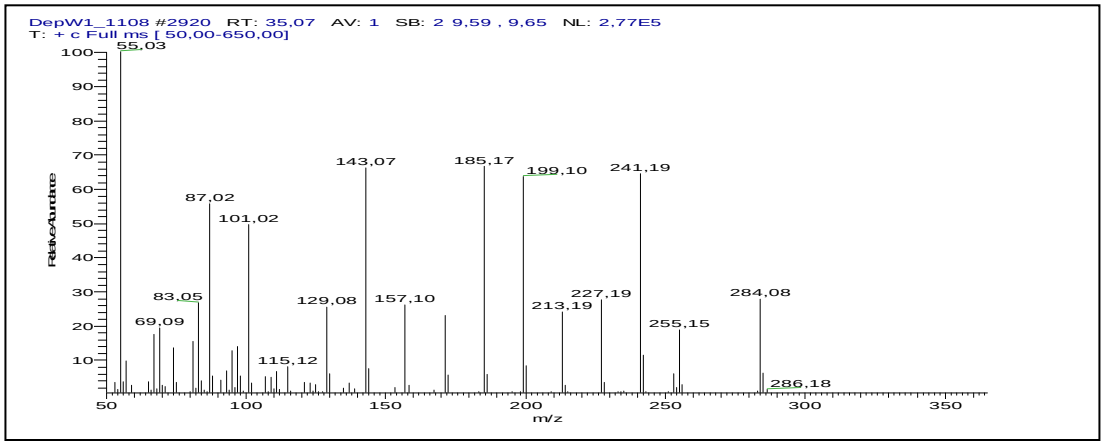



**Abb. 78: Massenspektrum der Heptadecansäure in Form des Methylesterderivats**

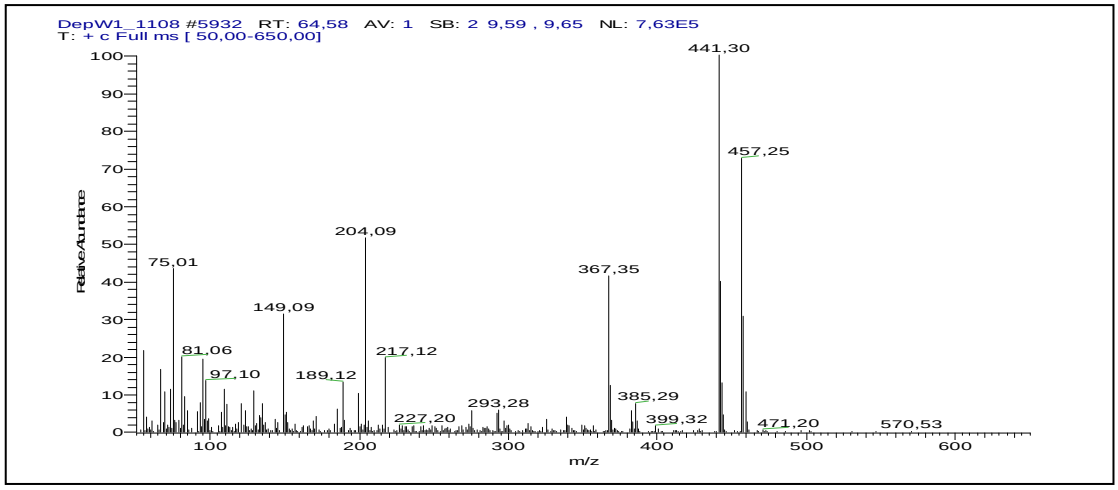



**Abb. 77: Massenspektrum der Hydroxydocosansäure (IS bei der Bestimmung der Kutin- und Suberinmonomere) in Form des Trimethylsilylester/Trimethylsilyletherderivats**

# 6 Literatur

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

Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neil, M. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J.: An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants, In: pectins and pectinases-proceedings of a conference (J. Visser, ed.), Elvesier Publishers, Amsterdam, 47-55, (1996).

AOAC: Insoluble dietary fiber in food and food products. Enzymatic-gravimetric method. Phosphat buffer. First action, AOAC Off. Meth. Anal., 399 (1990).

Asp, N. G., Björck, I., Nyman, M.: Physiological effects of cereal dietary fibre, Carbohydr. Polym., **21**, 183-187 (1993).

Baker, E. A., Hunt, G. M.: Secondary alcohols from Fragaria leaf waxes, Phytochemistry, **28**, 1059-1060 (1979).

Bauer, S.: Die Zusammensetzung der Oberflächenwachse von Tomaten, Paprika und Auberginen, Dissertation, Universität Münster (2003).

Bauer, S., Schulte, E., Thier, H.-P.: Composition of the surface wax from tomatoes, Eur. Food Res. Technol., **219**, 223-228 (2004a).

Bauer, S., Schulte, E., Thier, H.: Composition of the surface wax from tomatoes, Eur. Food Res. Technol., **219**, 487-491 (2004b).

Bauer, S., Schulte, E., Thier, H.-P.: Composition of the surface waxes from bell pepper and eggplant, Eur. Food Res. Technol., **220**, 5-10 (2005).

Begum, A. N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., Nagano, K., Fukushima, K., Heinonen S. -M., Adlercreutz, K., Rémésy, C., Scalbert, K.: Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats, J. Nutr., **134**, 120-127 (2004).

Bento, M. F.; Pereira, H.; Cunha, M. A.; Moutinho, A. M. C.; van den Berg, K. J.; Boon, J. J.: Thermally assisted transmethylation gas chromatography-mass spectrometry of suberin components in cork from Quecus suber L., Phytochem. Anal., **9**, 75-87 (1998).

Bernards, M. A., Lopez, M. L., Zajicek, J., Lewis, N. G.: Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin, J. Biol. Chem., **270**, 7382-7386 (1995).

Bernards, M. A., Razem, F. A.: The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non lignin cell bio-polymer, Phytochemistry, **57**, 1115-1122 (2001).

Bernards, M. A.: Demystifying suberin, Can. J. Bot., **80**, 227-240 (2002).

Bernards, M.A., Summerhurst, D.K., Razem, F.A.: Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: the Suberin connection, Phytochem. Rev., **3**, 113-126 (2004).

Björkman, A.: Isolation of lignin from finely divided wood with neutral solvents, Nature, **174**, 1057-1058 (1954).

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., **113**, 291-299 (1983).

Blée, E., Schuber, F.: Biosynthesis of cutin monomers: involvement of a lipoxygenase/peroxygenase pathway, Plant J., **4**, 113-123 (1994).

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M.: Lignin biosynthesis, Annu. Rev. Plant Biol., **54**, 519-546 (2003).

Bonaventure, G., Beisson, F., Ohlrogge, J., Pollard, M.: Analysis of the aliphatic monomer composition of polyesters associated with Arabidopsis epidermis: occurrence of octadeca-cis-6, cis-9-diene-1,18-dioate as the major component, Plant J., **40**, 920-930 (2004).

Bunzel, M., Ralph, J., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Steinhart, H.: Identification of 4-O-5'-coupled dehydrodiferulic acid from insoluble cereal fiber, J. Agric. Food Chem., **48**, 3166-2169 (2000).

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

Bunzel, M., Steinhart, H.: Strukturmerkmale von Ballaststoffkomponenten, Chem. Unserer Zeit, **37**, 188-196 (2003).

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., **52**, 6496-6502 (2004).

Bunzel, M., Seiler, A., Steinhart, H.: Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method, J. Agric. Food Chem., **53**, 9553-9559 (2005).

Bunzel, M., Ralph, J.: NMR charakterisation of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber, J. Agric. Food Chem., **54**, 8352-8361 (2006).

Carpita, N., McCann, M. C.: The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations, Plant Soil, **247**, 71-80 (2002).

Capella, P., Zorzut, C. M.: Determination of double bound position in monounsaturated fatty acid esters by mass spectrometry of their trimethylsilyloxy derivatives, Anal. Chem., **40**, 1458 (1968).

Chesson, A.: Effects of sodium hydroxide on cereal straws in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms, J. Sci. Food Agric., **32**, 745-758 (1981).

Christie, W.W.: lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids, The oily press, 3rd edition Bridgwater, England (2003).

Cisneros-Zevallos, L., Mikla, E. S, Krochta, J.M.: Mechanism of surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage, J. Food Sci., **60**, 320-333 (1995).

Croteau, R., Kollatukudy, P. E.: Biosynthesis of the hydroxy fatty acid polymers-enzymatic synthesis of cutin from monomer acids by all free preparations from epidermis of *Vicia faba* leaves, Biochemistry, **13**, 3193-3202 (1974).

DAVIN; B.L., Wang, H.-B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.N., Sarkanen, S., Lewis, N.G.: Stereoselective bimolecular phenox radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center, Science, **275**, 362-366 (1997).

Deshmukh, A. P., Simpson, A. J.: Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy, Phytochemistry, **64**, 11163-1170 (2003).

Deshmukh, A. P., Simpson, A. J., Hadad, C. M., Hatcher, P. G.: Insight into the structure of cutin and cutan from agave americana leaf cuticle using HRMAS spectroscopy, Org. Geochem, **36**, 1072-1085 (2005).

DeVries, J. W., Prosky, L., Li, B., Cho, S.: A historical perspective on defining dietary fiber, Cereal Foods World, **44**, 367-369 (1999).

Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkjane, V., Viesturs, U.: Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants, Bioresour. Technol., **95**, 309-317 (2004).

Draffan, G. H., Stillwell, R. N., McCloskey, J. A.: Electron impact-induced rearrangement of trimethylsilyl groups in long chain compounds, Org. Mass Spectrom., **1**, 669-685 (1968).

Eglinton, G., Hunnemann, D. H.: Gas chromatographic – mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids – III, Org. Mass Spectrom., **1**, 593-611 (1968).

Eglinton, G., Hunneman, D.H., McCormick, A.: Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxyl acids, -III, Org. Mass Spectrom., **1**, 593-611 (1968).

Englyst, H. N., Quigley, N. E., and Hudson, G. J.: Determination of dietary fibre as nonstarch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent sugars, Analyst (Cambridge, U. K.), **119**, 1497 (1994).

Ferguson, L. R., Roberton, A. M., Watson, M. E., Kestell, P., Harris, P.J.: The adsorption of a range of dietary carcinogens by cellulose, a model insoluble dietary fiber, Mutat. Res., **310**, 257-266 (1993).

Ferguson, L. R., Harris, P.J.: Studie on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer, Mutat. Res., **350**, 173-184 (1996).

Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., Schreiber, L.: Apoplastic polyesters in arabidopsis surface tissues – a typical suberin and a particular cutin, Phytochemistry, **66**, 2643-2658 (2005).

Freudenberg, K., Neish, A. C.: Constitution and biosynthesis of lignin, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968).

Fukumoto, H. E., Chang, W. G.: Manual salycilate-hypochlorite procedure for determination of ammonia in Kjeldahl digests, J. AOAC Int., **65**, 1076-1079 (1982).

Fukushima, R. S., Dehority, B. A.: Feasability of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses, J. Anim. Sci., **78**, 3135-3143 (2000).

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., **49**, 3133-3139 (2001).

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., **52**, 3713-3720 (2004).

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

Gérard, H.C., Osman, S.F., Fett, W.F., Moreau, R.A.: Separation, identification and qualification of monomers from cutin polymers by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection, Phytochem. Anal., **3**, 139-144 (1992).

Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H.: Deposition of suberin in roots of soybean Induced by excess boron, Plant Sci., **168**, 397-405 (2005).

Gibeaut, D. M., Carpita, N. C.: Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides, FASEB J., **8**, 904-915 (1994).

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., **46**, 2609-2614 (1998).

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., **50**, 6008-6016 (2002).

Graça, J., Pereira, H.: Cork suberin: A glyceryl based polyester, Holzforschung, **51**, 225-234 (1997).

Graça, J., Pereira, H.: suberin structure in potato periderm: glycerol long chain monomers, and glyceryl and feruloyl dimers, J. Agric. Food Chem., **48**, 5476-5483 (2000).

Graça, J., Schreiber, L., Rodrigues, J., Pereira, H.: Glycerol and glycerol esters of ω-hydroxyacids in cutins, Phytochemistry, **61**, 205-215 (2002).

Graça, J., Santos, S.: Linear aliphatic dimeric esters from cork suberin, Biomacromolecules, **7**, 2003-2010 (2006).

Graça, J., Santos, S.: Suberin: A biopolyester of Plant`s Skin, Macromol. Biosci., **7**,128-135 (2007).

Hallett, I.C., Sutherland, P.W.: Structure and development of kiwifruit skins, Int. J. Plant Sci., **166**, 693 (2005).

Harkin, J. M.: Lignin-a natural polymeric product of phenol oxidation, In: Taylor WI and Battersby A.R, (ed), oxidative coupling of phenols, Dekker, M. New York, 243-321 (1967).

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

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., **65**, 51-58 (1994).

Hatfield, R. D., Fukushima, R. S.: Can lignin be accurately measured?, Crop. Sci., **45**, 832-839 (2005).

Heredia, A.: Biophysical and biochimical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer, Biochim. Biophys. Acta, **1620**, 1-7 (2003).

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

Holloway, P. J., Deas, A. H. B.: Occurrence of positiona isomers of dihydroxyhexadecanoic acid in plant cutins and suberins, Phytochemistry, **10**, 2781-2785 (1971).

Holloway, P.J., Deas, A.H.B., Epoxyoctadecanoic acids in plant cutins and suberins, Phytochemistry, **12**, 1721-1735 (1973).

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., **51**, 3535-3540 (2003).

Hose, E., Clarkson, D.T., Steudle, E., Schreiber, L., Hartung, W.: The exodermis: a apoplastic barrier, J. Exp. Bot., **52**, 2245-2264, (2001).

Hunnemann, D. H., Eglinton, G.: The constituent acids of gymnosperm cutins, Phytochemistry, **11**, 1989-2001 (1972).

Iiama, K., Wallis, A. F. A.: Dertermination of lignin in herbaceus plants by an improved acetyl bromide procedure, J. Sci. Food Agric., **51**, 145-161 (1990a).

Iiama, K., Lam, T. B. T., Stone B. A.: Phenolic acid bridges between polysaccharides an lignin in wheat internodes, Phytochemistry, **29**, 733-737 (1990b).

Izydorczyk, M. S., Biliaderis, C. G.: Effect of molecular size on physical properties of wheat arabinoxylan, J. Agric. Food Chem., **40**, 561-568 (1992).

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

Jamet, E., Albenne, C., Boudart, G., Irshad, M., Canut, H., Pont-Lezica, R.: Recent advances in plant cell wall proteomics, Proteomics, **8**, 893-908 (2008).

Johnson, D. B., Moore, W. E., Zank, L. C.: The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples, Tappi, **44**, 793-798 (1961).

Jrs, www.jrs.de/wDeutsch/anwend/innovationen/img/cellulosefaser.jpg, 02.03.2010

Kallio, H., Nieminen, R., Tuomasjukka, S., Hakal, M.: Cutin composition of five finnish berries, J. Agric. Food Chem., **54**, 457-462 (2006).

Kirk, T. K., Obst, J. R.: Lignin determination; Methods Enzymol., **161**, 87-101 (1988).

Klason, P.: Die Verfahren der Holzzellstoff-Fabrikation. Aussprache, In: Verein der Zellstoff and papier Chemiker and Ingenieure, Hauptversammlung, Berlin, 52, (1908).

Kollatukudy, P. E., Walton, T. J.: Structure and biosynthesis of the hydroxyl fatty acids of cutin in Vicia *faba* leaves, Biochemistry, **11**, 1897-1907 (1972).

Kollatukudy, P. E., Kronman, K., Poulose, A.J.: Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry, Plant Physiol., **55**, 567-573 (1975).

Kollatukudy, P. E.: Cutin, suberin and waxes, The biochemistry of plants, vol 4, Editor: Stumpf, Academic press, London, 571-645 (1980).

Lai, Y. Z., Sarkanen, K. V.: Isolation and structural studies, In: Lignins, occurrence, formation, structure and reactions, Editors: Sarkanen and Ludwig, Wiley-interscience, New York, 165-240 (1971).

Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C.: Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-, syringyl-lignin fractions, Holzforschung, **40**, 113-118 (1986).

Lapierre, C., Pollet, B., Monties, B., Rolando, C.: Thioacidolysis of spruce lignin: gas chromatography-mass spectroscopy analysis of the main dimers recovered after raney nickel desulfurization, Holzforschung, **45**, 61-68 (1991).

Lapierre, C., Pilate, G., Pollet, B., Mila, I., Leplé, J.C., Jouanin, L., Kim, H. und Ralph, J.: Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins, Phytochemistry, **65**, 313-321 (2004).

Lee, S. C., Prosky, L., de Vries, J. W.: Determination of total, soluble, and insoluble dietary fibre in foods - Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study, J. AOAC Int., **75**, 395-416 (1992).

Lia, A., Hallman, G., Sandberg, A. S., Sundberg, B., Aman, P., Anderson, H.: Oat beta-glucan increases bile acid excretion and a fiber rich barley fraction

increases cholesterol excretion in ileostomy subjects, J. Clin. Nutr., **62**, 1245-1251 (1995).

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., **45**, 2590-2592 (1997a).

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., **45**, 4655-4660 (1997b).

Lu, F., Ralph, J.: The DFRC method for lignin analysis. Part 2. Monomers from isolated lignins, J. Agric. Food Chem., **46**, 547-552 (1998).

Lu, F., Ralph, J.: The DFRC method for lignin analysis. 7. Behavior of cinnamyl end groups, J. Agric. Food Chem., **47**, 1981-1987 (1999a).

Lu, F., Ralph, J.: Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins, J. Agric. Food Chem., **47**, 1988-1992 (1999b).

Lewis, N. G., Yamamoto, E.: Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **41**, 455-496 (1990).

Mac Dougall, 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., **70**, 133-150 (1996).

Mac Dougall, A. J., Selvendran, R. R.: Chemistry, architecture, and composition of dietary fiber from plant cell walls. In: Handbook of dietary fiber, Cho, S.S., Dreher, M. L., Eds., Dekker, Ottawa, Canada, 281-319 (2001).

McLafferty, F. W.: Interpretation of mass spectra, University science book, Milled valley, California 164 (1980).

Martin-Cabrejas, M. A., Esteban, R. M., Lopez-Andreu, F. J., Waldron, K., Selvendran, R. R.: Dietary fiber content of pear and kiwi pomaces, J. Agric. Food Chem., **43**, 662-666 (1995).

Martins, C. M. C., Mesquita, S. M. M., Vaz, V. L. C.: Cuticular waxes of the holm (*Quercus ilex* L. Subst. *Ballota* (desf.) samp.) and cork (*Q suber* L.) oaks, Phytochem. Anal., **10**, 1-5 (1999).

Matissek, R., Steiner, G.: Lebensmittelanalytik, 3. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 4-8 (2006).

Matsumoto, Y., Ishizu, H., Nakano, J., Terarsawa, K.: Residual sugars in Klason-lignin, J. Wood Chem. Technol., **4**, 321-330 (1984).

Matzke, K., Riederer, M.: Composition of the cutin of the caryopses and leaves of *Triticum aestivum* L., Planta, **182**, 461-466 (1990).

Matzke, K., Riederer, M.: A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L., Planta, **185**, 233-245 (1991).

Misra, S., Grosch, A.: Analysis of epicuticular waxes, In. Essential oils and waxes, Editors: Linskens and Jackson, Springer, Berlin, 205-229 (1999).

Mongeau, R., Brooks, S. P. J.: Chemistry and analysis of lignin. In: Handbook of dietary fiber, Cho, S.S., Dreher, M. L., Eds., Dekker, Ottawa, Canada, 321-373 (2001).

Moroshi, N.: Chemical characterization of wood and its components, In: wood and cellulosic chemistry, David, N, -S., H. Nobuo, S., Eds., Dekker, New York, 331-392 (1991).

Morrison, I. M.: A semi-micro-method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops, J. Sci. Food Agric., **23**, 455-463 (1972a).

Morrison, I. M.: Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes, J. Sci. Food Agric., **23**, 1463-1469 (1972b).

Müller, C., Riederer, M.: Plant surface properties in chemical ecology, J. Chem. Ecol., **31**, 2621-2651 (2005).

Nkonge, C., Balance, G. M.: A sensitive colometric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests, J. Agric. Food Chem., **30**, 416-420 (1982).

Osman, S. F., Gerard H. C., Fett, w. F., Moreau R. A., Dudley, R. L.: Method for the production and characterization of tomato cutin oligomers, J. Agric. Food Chem., **43**, 2134-2137 (1995).

Osman, S. F., Irwin, P., Fett, W. F., O'Connor, J. V., Parris, N.: Preparation, isolation, and characterization of cutin monomers and oligomers from tomato peels, J. Agric. Food Chem., **47**, 799-802 (1999).

Otto, A., Simpson, M. J.: Sources and composition of hydrolysable aliphatic lipids and phenols in soils from western Canada, Org. Geochem., **37**, 385-407 (2006).

Peňa, M. J., Vergara, C., E., Carpita, N., C.: The structures and architectures of plant cell walls define dietary fibre composition and the textures of foods, In: Advanced dietary fibre technology (eds. Mc Clearly and Prosky), 42-60 (2001).

Plaami, S. P.: Content of dietary fiber in foods and its physiological effects, Food Rev. Int., **13**, 29-76 (1997).

Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., de Vries, J. W., Furda, I.: Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study, J. AOAC Int., **71**, 1017-1023 (1988).

Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., de Vries, J. W., Furda, I.: Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: collaborative study, J. AOAC Int., **75**, 360-367 (1992).

Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., de Vries, J. W., Furda, I.: Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: collaborative study, J. AOAC Int., **77**, 690-694 (1994).

Purdy, R.E; Kolattukudy, P.E.: Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from Fusarium solani f. Sp. Pisi: Isolation and some properties of the enzyme, Arch. Biochem. Biophys., **159**, 61-69 (1973).

Quideau, S.: Chapter 2: Lignin, Ph.D. Thesis, University of Wisconsin-Madison (1994).

Quigley, m. E., Englyst, H. N.: Determination of the uronic acid constituents of non-starch polysaccharides by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. Analyst, **119**, 1511-1518 (1994).

Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H., Hattfield, R. D.: Identification and synthesis of a new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls, J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1**, 3485-3498 (1994a).

Ralph, J., Hattfield, R. D., Quideau, S., Helm, R. F., Grabber, J. H., Jung, -H. J. G.: Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR, J. Amer. Chem. Soc., **116**, 9448-9456 (1994b).

Ralph, J.: An unusual lignin from Kenaf, J. Nat. Products, **59**, 341-342 (1996).

Ralph, J., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, M. G., Simple preparation of 8-5-coupled diferulate, J. Agric. Food Chem., **46**, 2531-2532 (1998).

Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J., Kim, H., Lu, F., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M.R., Van Doorsselaere, J., Sederoff, R.R.,

O'Mallley, D.M., Scott, J.T., MacKay, J.J., Yahiaoui, N., Boudet, A.-M., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L und Boerjan, W.: Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR, Phytochemistry, **57**, 993-1003 (2001c).

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., **3**, 29-60 (2004c).

Riederer, M., Shönherr, J.: Covalent binding of chemicals to plant cuticles: quantitative determination of epoxide contents of cutins, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **17**, 21-27 (1998a).

Riederer, M., Shönherr, J.: Development of plant cuticles: fine structure and cutin composition of Clivia minata Reg. Leaves, Planta, **174**, 127-138 (1988b).

Robertson, J. A., Eastwood, M. A., Yeoman, M. M.: An investigation of lignin extraction from dietary fibre using acetyl bromide, J. Sci. Food Agric., **30**, 1039 (1979).

Rontani, J. –F., Aubert, C.: Trimethylsilyl transfer during electron ionization mass spectral fragmentation of some ω–hydroxycarboxylic and ω–dicarboxylic acid trimethylsilyl derivatives and the effect of the chain length, Rapid Commun. Mass Spektrom., **18**, 1889-1895 (2004).

Saeman, J. F., Bubl, L. J., Harris, E. E,: Quantitative saccharification of wood and cellulose. Ind. Eng. Chem., **17**, 35-37 (1954).

Sakakibara, A.: Chemistry of lignin. In: Hon DN-S and Shiraishi N, (ed), Wood and cellulosic chemistry, Marcel Dekker, New York, 113-175 (1991).

Salasoo, I., Effect of leaf age on epicuticukar wax alkanes in Rhododendon, Phytochemistry, **22**, 461-463 (1983).

Saulnier, L., Crepeau, M. J., Lahaye, M., Thibault, J. F., Garcia-Conesa, M. T., Kroon, P. A., Williamson, G.: Isolation and structural determination of two 5,5`-diferuloyloligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates, Carbohydr. Res., **320**, 82-92 (1999).

Scheppach, W.: Ernährungsmedizinische Bedeutung von komplexen

Kohlenhydraten, In: Kohlenhydrate in der Ernährungsmedizin unter besonderer Berücksichtigung des Zuckers (Hrsg.: R. Kluthe und H. Kasper), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 19-23 (1996).

Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., Zeier, J.: Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls, J. Exp. Bot., **50**, 1267-1280 (1999).

Spence, R.M.M., Tucknott, O.G., Baker, E.A., Holloway, P.J.: Compounds associated with the surface lipid layer of watercress, Phytochemistry, **22**, 1753-1756 (1983).

Suh, M. S., Samuels, A. L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J.: Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in arabidopsis stem epidermis, Plant Physiol., **139**, 1649-1665 (2005).

Tao, S., Khanizadeh, S., Zhang, H., Zang, S.: Anatomy, ultrastructure and lignin distribution of stone cells in two *Pyrus* species, Plant Sci., **176**, 413-416 (2009).

Theander, O., Aman, P.: Studies on dietary fibres. 1. Analysis and chemical characterization of water-soluble and water-insoluble dietary fibres, Swed. J. Agric. Res., **9**, 97 (1979).

Theander, O., Westerlund, E.: Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber, J. Agric. Food Chem., **34**, 330-336 (1986).

Theander, O., Aman, P., Westerlund, E., Graham, H.: Enzymatic/chemical analysis of dietary fiber, J. AOAC Int., **77**, 703-709 (1994).

Theander, O., Aman, P., Westerlund, E., Andersson, R., Pettersson, D.: Total dietary fiber determined as neutral sugar and uronic acid residues, and lignin (The uppsala Method): collaborative study, J. AOAC Int., **78**, 1030 (1995).

Theander, O., Westerlund, E., Andersson, R., Aman, P.: Determination of total dietary fiber and it's individual components by the uppsala method, In: Handbook of dietary fiber in human nutrition, 87-109 (2001).

Trowell, H. C.: Crude fibre, dietary fibre, and artherosclerosis, Atherosclerosis, **16**, 138 (1972).

Trowell, H. C.: Definition of dietary fibre, Lancet **i**, 503 (1974).

Trowell, H. C., Southgate, D. A. T., Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M. A., Jenkins, D. J. A.: Dietary fibre redefined, Lancet **a**, 967 (1976).

Tulloch, A. P.: Epicuticular waxes from *Agropyron dasystachyum, Agropyron riparium* and *Agropyron elongatum*, Phytochemistry, **22**, 1605-1613 (1983).

Wächterhäuser: www.waechterhaeuser.de/baum/index.php?section=zellwand, 02.03.2010

Walton, T. J., Kolattukudy, P. E.: Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry, Biochem., **11**, 1885-1897 (1972).

Walton, T. J.: Waxes, cutin and suberin, In: Methods in plants biochemistry, Vol 4, Editors: Dey and Harborne, Academic press, London, 106-158 (1990).

Wattendorff, J.: Cutinisierte und suberinisierte Zellwände: Schutzhüllen der höheren Pflanzen, Biol. unserer Zeit, **3**, 81-90 (1980).

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., **44**, 1804-1807 (1996).

Wisker, E., Daniel, M., Rave, G., Feldheim, W.: Short chain fatty-acids produced in vitro from fibre residues obtained from mixed diets containing different breads and in human faeces during the ingestion of the diets, Br. J. Nutr., **84**, 31-37 (2000).

Wu, S., Argyropoulos, D. S.: An improved method for isolating lignin in high yield and purity, J. Pulp Pap. Sci., **29**, 235-240 (2003).

Zeier, J., Schreiber, L: Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: chemical composition in relation to fine structure, Planta, **206**, 349-361 (1998).

# Curriculum vitae

Gérard Tchetseubu Saha

## Personal data

| | |
|---|---|
| Date of birth | 22.12.1975 |
| Place of birth | Yaounde |
| Nationality | Cameroon |
| Marital status | married |
| Profession | project manager |

## Education

| | |
|---|---|
| 2006-2009 | Doctoral degree in food chemistry-University Hamburg |
| 2005 | diploma in food chemistry - University Brunswik (Mark „gut") |
| 1999-2005 | study of food chemistry - University Brunswik |
| 1995-1998 | DEUG in Biochemistry-University Yaounde |
| 1995 | Baccalaureate |

Diploma thesis: „Phytochemical Analysis of the fruits of Solanum rugosum"

Doctoral thesis: „Chemical characterization of Klason-Lignins from unsoluble dietary fiber"
Methods used: GC-MS, GC-FID, HPLC, LC-MS, CCC, IR, NMR

## Experience

| | |
|---|---|
| 03/2003-12/2005 | graduate assistant - University Brunswik |
| 04/2006-03.2009 | research assistant - University Hamburg |
| Ongoing | Project manager - TTZ Bremerhaven |

## Computer skills

| | |
|---|---|
| Office | MS Word, MS Excel, MS PowerPoint excellent |
| Internet | HTML good |
| Other | ChemSketch good |

## Languages

French, excellent
German, excellent
Italian, excellent
English, good