

**CHARAKTERISIERUNG VON XYLANEN UND
XYLANDERIVATEN DURCH REDUKTIVE
AMINIERUNG UND
FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

-Abteilung Holzchemie-

Vorgelegt von

Dominic Lorenz

Hamburg, 2018

Gutachter:

Prof. Dr. Bodo Saake
Universität Hamburg

Prof. Dr. Petra Mischnick
Technische Universität Braunschweig

Tag der Disputation:

09.02.2018

Mein Dank gilt:

Youssef Akil, Dr. Clemens Altaner, Ramona Bahmann, Marie Bendler, Laura Dehne, Nicole Erasmy, Dany Gellert, Martina Heitmann, Dr. Ron Janzon, Anna Knöpfle, Dr. Othar Kordsachia, Isabell Kühnel, Sascha Lebioda, Dr. Ralph Lehnen, Prof. Dr. Elisabeth Magel, Dr. Dirk Manns, Manuela Mauerhöfer, Prof. Dr. Petra Mischnick, Dr. habil. Jürgen Odermatt, Silke Radke, Dr. Maria Riedner, Prof. Dr. Bodo Saake, Andreas Schreiber, Dr. Katrin Schwarz, Stephanie Schwarz, Inge Stichweh, Astrid Stilke, Prof. Dr. Maija Tenkanen, Bernhard Ziegler, der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., der Universität Hamburg sowie meiner Familie und meinen Freunden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	ix
Schemenverzeichnis	x
Publikationen mit Beschreibung der eigenen Anteile	xi
Sonstige Publikationen	xiii
Kurzfassung	xiv
Abstract	xvi
1 Zielsetzung	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Hemicellulosen und Xylane	3
2.1.1 Vorkommen der Hemicellulosen und Xylane	4
2.1.2 Chemische Struktur und Eigenschaften der Xylane	5
2.1.2.1 Glucuronoxylane	6
2.1.2.2 Arabinoglucuronoxylane	7
2.1.3 Isolierung der Xylane	9
2.1.3.1 Alkaliextraktion	9
2.1.3.2 Weitere Aufschlüsse.....	10
2.2 Hydroxyalkylierung von Xylanen	11
2.2.1 Hydroxyalkylierung mit Epoxiden	11
2.2.2 Hydroxyalkylierung mit cyclischen organischen Carbonaten	13
2.3 Bedeutung der Xylane	15
2.3.1 Physiologische Bedeutung	15
2.3.2 Technologische Bedeutung.....	16
2.3.2.1 Bedeutung der Xylane bei der Herstellung von Zellstoff	16
2.3.2.2 Herstellung von Xylit	17
2.3.2.3 Medizinische Anwendungen	17

2.3.2.4	Herstellung von Verpackungsmaterialien	17
2.3.2.5	Herstellung von Aerogelen aus Gelen	19
2.4	Analytik von nativen und hydroxyalkylierten Xylanen	21
2.4.1	Analytik von Xylanen ohne Hydrolyse	21
2.4.1.1	Größenausschlusschromatographie (SEC)	21
2.4.1.2	Magnetresonanzspektroskopie (NMR)	22
2.4.2	Hydrolyse der Polymere	23
2.4.2.1	Saure Hydrolyse	23
2.4.2.2	Enzymatische Hydrolyse.....	26
2.4.3	Reduktive Aminierung	27
2.4.3.1	Reaktionsprinzip der reduktiven Aminierung	27
2.4.3.2	Aminierung.....	29
2.4.3.3	Reduktion	30
2.4.4	Chromatographische Analyse von Kohlenhydraten	32
2.4.4.1	Anionenaustauschchromatographie (HPAEC).....	32
2.4.4.2	Borat-Komplex-Anionenaustauschchromatographie (Borat-HPAEC)	34
2.4.4.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	35
3	Arbeitsschema.....	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Analytik isolierter Methylglucuronoxylane	38
4.1.1	Hydrolyse von MGX	39
4.1.2	Entfernung des Sulfats.....	43
4.1.3	Reduktive Aminierung	43
4.1.3.1	Chromatographische Trennung	44
4.1.3.2	Optimierung der reduktiven Aminierung.....	49
4.1.3.3	Statistische Parameter für die Analytik von MGX	51
4.1.3.4	Quantitative Auswertung	53
4.1.4	Zusammenfassung zur Analytik der MGX	55
4.2	Analytik von Zellstoffen und Biomasse	57
4.2.1	Bestimmung von Kohlenhydraten in Zellstoffen	57
4.2.2	Bestimmung von Kohlenhydraten in lignocelluloser Biomasse.....	60
4.2.3	Zusammenfassung der Analyse lignocelluloser Biomasse.....	63

4.3	Analytik modifizierter Xylane	65
4.3.1	Einfluss der Reaktionsbedingungen auf Arabinoxylane	67
4.3.2	Charakterisierung hydroxyalkylierter Proben mit HPAEC-UV.....	69
4.3.3	Mikrowellenbasierte TFA-Hydrolyse	70
4.3.4	Substitutionsmuster der Pentosen	72
4.3.5	Differenzierung zwischen derivatisierter Xylose und Arabinose	77
4.3.6	Statistische Parameter für die Analytik derivatisierter Xylane	81
4.3.7	Zusammenfassung der Untersuchungen hydroxyalkylierter Arabinoxylane.....	82
5	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	84
	<i>Literatur</i>	87
	<i>Anhang.....</i>	111
	<i>Publikationen I – III</i>	131

Abkürzungsverzeichnis

2-AA	2-Aminobenzoessäure
2-PB	2-Picolinborankomplex
Abb.	Abbildung
AG	Arabinogalactan
Ara	Arabinose
AX	Arabinoxylan
B	gebleichter Zellstoff
Borat-HPAEC	Borat-Komplex-Hochleistungsanionenaustausch- chromatographie
CFC	Cellulose Nanokristalle
COC	cyclisch organisches Carbonat
COV	Variationskoeffizient
Đ	Dispersität
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Polymerisationsgrad
DS	Substitutionsgrad
ED ₅₀	wirksame Dosis
EH	enzymatische Hydrolyse
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometrie
GalA	Galacturonsäure

GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
HexA	Hexenuronsäure
HILIC	Hydrophilic-Interaction-Liquid-Chromatographie
HPAEC	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssig-Chromatographie
HPLC-MS	Hochleistungsflüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie
HP-Xylan	hydroxypropyliertes Xylan
HVE-Xylan	hydroxyvinylethyliertes Xylan
HZS	Hydroxyzimtsäurederivat
IST	interner Standard
KP	Kraft-Zellstoff
LOD	Detektionsgrenze
LOQ	Quantifizierungsgrenze
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Man	Mannose
meGlcA	4-O-methyl- α -D-glucuronopyranosyl Uronsäure
meGlcA-X	meGlcA gebunden an Xylose
meGlcA-X ₂	meGlcA gebunden an Xylobiose
meGlcA-X ₃	meGlcA gebunden an Xylotriose
MGX	Methylglucuronoxylan
M _{mi}	monoisotopische Masse

MS	molare Substitution
MS ₁	monosubstituiert
MS ₂	disubstituiert
NaOAc	Natriumacetat
NMR-Spektroskopie	Magnetresonanzspektroskopie
PAD	gepulste amperometrische Detektion
PC	Propylencarbonat
PET	Polyethylenterephthalat
PF	Peakfläche
PFV	Peakflächenverhältnis
ppm	parts per million
RID	Brechungsindexdetektor
Rückst.	Rückstand
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SH	2-stufige Säurehydrolyse
SP	Sulfit-Zellstoff
Tab.	Tabelle
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
TFA	Trifluoressigsäure
t _R	Retentionszeit
VEC	Vinylethylencarbonat
WFR	Wiederfindungsrate
wt%	Gewichtsprozent
Xyl	Xylose

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Arbeitsschritte für die Charakterisierung verschiedener polysaccharid-basierter Ausgangsproben.....	37
Abb. 2: Untersuchungen der Xylose und mGlcA-Konzentrationen nach 2-stufiger Schwefelsäurehydrolyse	41
Abb. 3: HPAEC-UV-Chromatogramm isolierter Standards	45
Abb. 4: Retentionszeiten neutraler und saurer Kohlenhydrate	47
Abb. 5: Chromatogramm des mGlcA-X ₃ Standards	48
Abb. 6: Optimierung der 2-AA und 2-PB Konzentrationen	49
Abb. 7: WFR der Analyten Xylose und mGlcA nach Sulfatfällung und reduktiver Aminierung.....	51
Abb. 8: Chromatogramme eines partiell hydrolysierten und reduktiv aminierten Buchenholz MGX.....	53
Abb. 9: Molare Anteile von mGlcA und Xylose.....	56
Abb. 10: Partikelgrößenverteilung in filtrierten enzymatischen Hydrolysaten.....	60
Abb. 11: Gravimetrische bestimmte Ausbeuten von Arabinoxylanen.....	68
Abb. 12: Relative Gehalte von Arabinose und Xylose nach unterschiedlichen Reaktionsbedingungen	69
Abb. 13: HPAEC-UV-Chromatogramm von Arabinoxylan und einer hydroxypropylierten Probe.....	70
Abb. 14: Optimierung der mikrowellen-basierten TFA-Hydrolyse.....	71
Abb. 15: Chromatogramme der derivatisierten Proben X _{HP} -0,8 und X _{HVE} -1,0	73
Abb. 16: Substitutionsverteilung hydroxyalkylierter Anhydropentosen	74
Abb. 17: Abhängigkeit von MS zu DS	75
Abb. 18: HPLC-MS-Chromatogramme von hydroxyalkylierten Arabinoxylanen.....	78
Abb. 19: Relative Anteile mono- und disubstituierter Derivate.....	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gehalte von Hemicellulosen in den Zellwänden von Pflanzen	4
Tab. 2: Referenzwerte der molaren Verhältnisse von Xylose und mGlcA	39
Tab. 3: Relative Anteile von Xylose und mGlcA nach 1-stufiger Hydrolyse.....	40
Tab. 4: Gradient für die chromatographische Trennung hydrolysierter und reaktiv aminierter MGX (HPAEC-UV).....	45
Tab. 5: WFR aller untersuchten Kohlenhydrate (HPAEC-UV)	50
Tab. 6: Statistische Parameter für die Bestimmung mittels Borat-HPAEC.....	52
Tab. 7: Statistische Parameter für die Bestimmung mittels HPAEC-UV	52
Tab. 8: Analyse von Zellstoffhydrolysaten nach enzymatischer und 2-stufiger Säurehydrolyse (HPAEC-UV).....	58
Tab. 9: Zusammensetzung der untersuchten Biomasseproben	62
Tab. 10: Zusammensetzung nativer Arabinoxylane für die Derivatisierung mit COC ...	65
Tab. 11: Untersuchte Proben und deren Bezeichnung	66
Tab. 12: Vergleich der berechneten MS-Werte mittels HPLC-Fluoreszenz und ¹³ C-NMR-Spektroskopie	75
Tab. 13: Prozentualer Anteil von di- zu monosubstituierten Pentosederivaten.....	76

Schemenverzeichnis

Schema 1: Primäre Struktur eines Glucuronoxylans	6
Schema 2: Primäre Struktur eines Arabinoglucuronoxylans	8
Schema 3: Hydroxycimtsäuren in Xylanen	9
Schema 4: Hydroxyalkylierung von Kohlenhydraten mit Epoxiden	12
Schema 5: Hydroxyalkylierung von Kohlenhydraten mit COC's	14
Schema 6: Saure Hydrolyse einer glycosidischen Bindung	23
Schema 7: Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten	28
Schema 8: 2-AA als Reagenz für die reduktive Aminierung.....	30
Schema 9: 2-PB als Reagenz für die reduktive Aminierung	31
Schema 10: Arbeitsschritte für die Analytik von MGX	39
Schema 11: Fällung von Sulfat als Bariumsulfat.....	43
Schema 12: Reduktive Aminierung von hydrolysierten MGX.....	44
Schema 13: Allgemeine Struktur hydroxyalkylierter Xylane.....	67
Schema 14: Arbeitsschritte für die Analytik hydroxyalkylierter Arabinoxylane	67

Publikationen mit Beschreibung der eigenen Anteile

- I Dominic Lorenz, Nicole Erasmy, Youssef Akil, Bodo Saake
A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS
Carbohydrate Polymers, 2016, 140, 181-187

- Idee und Planung
- Durchführung, Optimierung und Auswertung der Hydrolysen
- Durchführung und Optimierung der reduktiven Aminierung
- Entwicklung eines Verfahrens für HPAEC-UV
- Auswertung und Interpretation der Daten
- Verfassen des Manuskriptes zur Publikation

- II Dominic Lorenz, Ron Janzon, Bodo Saake
Determination of uronic acids and neutral carbohydrates in pulp and biomass by hydrolysis, reductive amination and HPAEC-UV
Holzforschung, 2017, 71, 767-775

- Idee und Planung
- Durchführung von Probenvorbereitung, enzymatischer und saurer Hydrolyse, Analytik der Kohlenhydrate sowie Messung der Partikelgrößen
- Auswertung und Interpretation der Daten
- Verfassen des Manuskriptes zur Publikation

III Dominic Lorenz, Anna Knöpfle, Youssef Akil, Bodo Saake

Quantitative investigations of xylose and arabinose substituents in hydroxypropylated and hydroxyvinylethylated arabinoxylans

Carbohydrate Polymers, 2017, 175, 671-678

- Idee und Planung
- Entwicklung und Optimierung der Hydrolyse
- Probenvorbereitung
- Analytik mittel HPLC-MS und HPLC-Fluoreszenz
- Auswertung und Interpretation der Daten
- Verfassen des Manuskriptes zur Publikation

Bestätigung der Autorenanteile:

Prof. Dr. Bodo Saake

Sonstige Publikationen

- IV Youssef Akil, Dominic Lorenz, Ralph Lehnen, Bodo Saake
Save and non-toxic Hydroxyalkylation of Xylan using Propylene Carbonate
Proceedings of the 4th EPNOE International Polysaccharide Conference 2015,
Warschau, Polen 19. Oktober – 22. Oktober 2015, Seite 102
- V Dominic Lorenz, Youssef Akil, Bodo Saake
Detailed Characterization of Xylans by HPAEC-UV/VIS after Labeling by Anthranilic Acid
Proceedings of the 4th EPNOE International Polysaccharide Conference 2015,
Warschau, Polen 19. Oktober – 22. Oktober 2015, Seite 79
- VI Youssef Akil, Dominic Lorenz, Ralph Lehnen, Bodo Saake
Save and non-toxic hydroxyalkylation of xylan using propylene carbonate
European Polymer Journal, 2016, 77, 88-97
- VII Dominic Lorenz, Bodo Saake
Simultaneous determination of monosaccharides, oligosaccharides and uronic acids in partially hydrolyzed pulp and biomass
Proceedings of the 14th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp 2016,
Autrans, Frankreich 28. Juni – 01. Juli 2016, 115-118.

Kurzfassung

Für die Analytik von Xylanen und Xylanderivaten sind Verfahren mit komplexen Anforderungen erforderlich. Diese Polysaccharide weisen eine heterogene Zusammensetzung mit vielfältigen Eigenschaften der einzelnen Komponenten auf. Daher müssen Verbindungen chromatographisch voneinander getrennt werden, die auf der einen Seite große strukturelle Ähnlichkeiten, auf der anderen Seite signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Ladung und Größe aufweisen. Zudem gibt es für viele Bestandteile, wie beispielsweise 4-*O*-methyl- α -D-glucopyranosyl Uronsäure (mGlcA) in Methylglucuronoxylanen oder die substituierten Monosaccharide der Xylanderivate, keine reinen Standards, die für eine Quantifizierung geeignet sind.

Zum Aufbau einer neuen Methode für die Analytik von Methylglucuronoxylanen wurde zunächst das Verhalten der Polymere während der Hydrolyse mit Schwefelsäure untersucht. Es konnte verdeutlicht werden, dass die α -(1 \rightarrow 2)-glycosidische Bindung von mGlcA zur Xylosehauptkette deutlich stärker ist als die β -(1 \rightarrow 4)-glycosidische Bindung zwischen den Xylosebausteinen. Mit Intensivierung der Hydrolysebedingungen unterliegen die Bestandteile einem sekundären Abbau, sodass maximal nur zwischen 55 und 64% der mGlcA, verglichen mit den Referenzwerten aus ^{13}C -NMR-Spektroskopie, in der Polymerlösung bestimmt werden können. Die Minimierung des sekundären Abbaus durch mildere Hydrolysebedingungen bewirkt eine partielle Hydrolyse, die den Verbleib von Oligosacchariden mit mGlcA als Bestandteil zur Folge hat. Auch für diese Verbindungen stehen keine reinen Standards zur Verfügung. Um dennoch alle Komponenten quantifizieren zu können, wurden die Kohlenhydrate durch reduktive Aminierung mit 2-Aminobenzoesäure (2-AA) und 2-Picolinboran mit einem UV-Label versehen. Nach Chromatographie mittels HPAEC konnten die markierten Kohlenhydrate durch UV-Detektion mit einem molaren Detektorrespons erfasst und mittels 2-AA-Kalibrierung quantifiziert werden. Durch die zusätzliche Detektion der Oligomere konnten bis zu 9% mehr Xylose und bis zu 85% mehr mGlcA bestimmt werden.

Das Verfahren, bestehend aus reduktiver Aminierung und HPAEC-UV, wurde auf komplexe xylanhaltige Produkte übertragen. Dafür erfolgte zunächst der Vergleich der enzymatischen und sauren Hydrolyse von Zellstoffen. So konnte festgestellt werden, dass nach vollständiger saurer Hydrolyse rund 44% weniger mGlcA enthalten ist als nach

enzymatischer Hydrolyse. Letztere spaltet die Polysaccharide aber nicht vollständig, sodass Partikel mit Durchmessern zwischen 0,1 und 6 μm in den Hydrolysaten verbleiben. Folglich sind auch die Summen detektierter Kohlenhydrate für die jeweiligen Zellstoffe deutlich geringer als nach saurer Hydrolyse. In einem weiteren Schritt wurden verschiedene Hölzer und Einjahrespflanzen mit dem entwickelten Verfahren analysiert. Für diese Proben ist die saure Hydrolyse unabdingbar. Grundsätzlich wurden höhere mGlcA-Gehalte ermittelt als in Literaturdaten angegeben. Der Vergleich der übrigen Kohlenhydrate ergab eine gute Übereinstimmung. Somit gelang es ein Verfahren zu entwickeln, mit dem neutrale und saure Kohlenhydratbestandteile simultan erfasst werden können.

Weiterhin wurden Derivate von Arabinoxylanen, die nach Umsetzung mit den cyclisch organischen Carbonaten Propylencarbonat ($\text{PC} \rightarrow \text{X}_{\text{HP}}$) und Vinylethylencarbonat ($\text{VEC} \rightarrow \text{X}_{\text{HVE}}$) erhalten wurden, charakterisiert. Dafür war ein hydrolytisches Verfahren notwendig, das kompatibel mit nachfolgenden massenspektrometrischen Untersuchungen ist. Dies konnte mit einer mikrowellenbasierten TFA-Hydrolyse erreicht werden. Nach reduktiver Aminierung und Ermittlung der Retentionszeiten mit HPLC-MS wurden die markierten Kohlenhydrate mittels HPLC-Fluoreszenz analysiert und quantifiziert. Die berechneten höchsten molaren Substitutionen betragen 1,8 (X_{HP}) beziehungsweise 2,3 (X_{HVE}). Demnach neigt X_{HVE} eher zur Verlängerung der Substituenten als X_{HP} . Zudem gelang erstmals die getrennte Erfassung von Xylose- und Arabinosederivaten. Die Umsetzungsraten von Arabinose sind im Vergleich zu Xylose um bis zu 2,4-mal höher für monosubstituierte und 3,0-mal höher für disubstituierte Bausteine.

Abstract

The analysis of xylans and xylan derivatives after hydroxyalkylation with cyclic organic carbonates requires methods that are suitable for these complex samples. These polysaccharides have a heterogeneous composition with diverse properties in terms of their composition. It is therefore necessary to separate compounds by chromatographic methods that have many structural similarities on the one hand, but significant differences in their charge and size on the other hand. Furthermore, for many constituents, such as 4-*O*-methyl- α -D-glucouronic acid (meGlcA) in methylglucuronoxylans or the substituted monosaccharides in the xylan derivatives, there are no pure standards available which are suitable for quantification.

In order to develop a new method for the analysis of methylglucuronoxylans, the behavior of the polymers during hydrolysis with sulfuric acid was investigated. It was shown that the α -(1 \rightarrow 2)-glycosidic bond of meGlcA to the xylose backbone is significantly stronger than the β -(1 \rightarrow 4)-glycosidic bonds between the xylose units within the backbone. With intensification of the hydrolysis conditions, the constituents are subject to secondary degradation. Accordingly, only a maximum of between 55 and 64% of meGlcA can be determined, compared with the reference values from ^{13}C NMR spectroscopy of the polymer solutions. The minimization of the secondary degradation by milder hydrolysis conditions results in partial hydrolysis and causes the presence of oligosaccharides with meGlcA as a constituent. For these compounds no pure standards are available, as well. In order to quantify all components, the carbohydrates were labeled with an UV-active tag by reductive amination with 2-aminobenzoic acid (2-AA) and 2-picoline borane. After chromatography using HPAEC, the labeled carbohydrates could be detected by UV detection with a molar detector response and quantified by 2-AA calibration. Based on the additional detection of the oligomers up to 9% more xylose and up to 85% more meGlcA were determined.

The method, consisting of reductive amination and HPAEC-UV, was transferred to complex xylan-containing products. For this purpose, a comparison of the enzymatic and acidic hydrolysis of pulp was carried out. After complete acid hydrolysis, the detectable amount of meGlcA was reduced by about 44% compared to enzymatic hydrolysis. However, the latter does not cleave the polysaccharides completely and particles with

diameters between 0.1 and 6 μm remain in the hydrolysates. Consequently, the sums of detected carbohydrates for the respective pulps are also significantly lower compared to acid hydrolysis. In addition, various woods and annual plants were analyzed using the developed method. For these samples an acid hydrolysis is compulsory. In principle, higher mGlcA contents were determined as stated in the literature data. The comparisons of the remaining carbohydrates were in good agreement. Thus, a method has been developed that allows the simultaneous determination of neutral and acidic carbohydrate components.

Furthermore, arabinoxylans were characterized after derivatization with the cyclic organic carbonates propylene carbonate ($\text{PC} \rightarrow \text{X}_{\text{HP}}$) and vinyl ethylene carbonate ($\text{VEC} \rightarrow \text{X}_{\text{HVE}}$). These samples require a hydrolysis that is compatible with subsequent mass spectrometry studies. This was achieved with a microwave-assisted TFA hydrolysis, since TFA can be removed completely afterwards. After reductive amination and determination of the retention times with HPLC-MS, the labeled carbohydrates were analyzed and quantified by HPLC fluorescence. The calculated highest molar substitutions were 1.8 (X_{HP}) and 2.3 (X_{HVE}), respectively. Accordingly, X_{HVE} has more extended substituents compared to X_{HP} . In addition, the separate determination of xylose and arabinose derivatives was achieved for the first time. The conversion rates of arabinose were up to 2.4 times higher for monosubstituted and 3.0 times higher for disubstituted units compared to xylose.

1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des FNR-geförderten Projektes „Aerowood“ in der Zeit von 08.2014 bis 10.2017 durchgeführt. Ziel des bearbeiteten Teilgebietes war es, neue Verfahren für die Analytik von Xylanen und hydroxyalkylierten Xylanderivaten zu entwickeln.

Methylglucuronoxylane

Die Analytik der Monomerzusammensetzung von Polysacchariden erfolgt üblicherweise durch saure Hydrolyse zu Monomeren und anschließender chromatographischer Messung. Da Xylane nicht nur aus einer sich wiederholenden Monomereinheit bestehen, befinden sich im Polymer verschiedene glycosidische Bindungen mit unterschiedlichen Bindungsstärken. Weiterhin unterliegen die aus der Hydrolyse hervorgehenden Monosaccharide unter den sauren Bedingungen zum Teil Abbaureaktionen. Durch diese Gegebenheiten kann es kein säurehydrolytisches Verfahren geben, welches die vollständige Spaltung der Polymere in Monosaccharide bewirkt und gleichzeitig den sekundären Abbau verhindert. Weiterhin stellt vor allem die Quantifizierung des Xylanbestandteils 4-O-methyl- α -D-glucuronsäure (meGlcA) eine Herausforderung dar, da reine Standards von meGlcA nicht erhältlich sind und aufwendig isoliert werden müssen. Die alternative Verwendung von Glucuronsäure für die Kalibrierung erzeugt hingegen große systematische Fehler.

Für die Entwicklung eines neuen Verfahrens sollte zunächst das Verhalten von Methylglucuronoxylanen während der Hydrolyse detailliert erforscht und darauf aufbauend ein mildes Hydrolyseverfahren entwickelt werden. Da erwartet wurde, dass dies eine partielle Hydrolyse zur Folge hat, musste ein geeignetes Verfahren für die Quantifizierung aller Bestandteile entwickelt werden, obwohl zum Teil keine reinen Standards für eine Kalibrierung zur Verfügung standen. Dies sollte durch die reduktive Aminierung mit 2-Aminobenzoesäure (2-AA) und 2-Picolinboran realisiert werden, da so mittels UV-Detektion ein molarer Detektorrespons erzeugt wurde. Die Quantifizierung könnte folglich nur mit dem Derivatisierungsreagenz 2-AA als Standard ermöglicht werden. Weiterhin sollte ein Verfahren für die chromatographische Trennung mittels Anionenaustauschchromatographie entwickelt werden. Nach Abschluss dieser

Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die entwickelte Methode auch auf komplexe Proben wie Zellstoffe oder lignocellulose Biomasse übertragen werden kann.

Hydroxyalkylierte Arabinoxylane

Die Hydroxyalkylierung von Xylanen ist eine Form der chemischen Derivatisierung zur Veränderung der Polymereigenschaften. Dadurch soll hauptsächlich die Entwicklung neuer Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen ermöglicht werden. Bisher gab es jedoch kein analytisches Verfahren, womit die einzelnen Monomerderivate betrachtet werden konnten. Da eine Vielzahl unterschiedlicher Produkte entsteht, müssen diese zunächst chromatographisch aufgetrennt werden. Weiterhin ist ein Verfahren erforderlich, das zum einen die Ermittlung der Retentionszeiten und zum anderen die Quantifizierung der einzelnen Verbindungen ermöglicht. Dabei ist neben der Unterscheidung in Abhängigkeit der Seitenkettenlänge auch die Differenzierung von Xylose- und Arabinosesubstituenten von Bedeutung. Dies wird dadurch erschwert, dass keine Standardsubstanzen für die Erstellung einer Kalibrierung zur Verfügung stehen.

Zum Aufbau eines analytischen Verfahrens für diese Substanzklasse sollte zunächst eine geeignete Methode für eine möglichst vollständige Hydrolyse in monomere Bestandteile entwickelt werden. Nach reduktiver Aminierung der Derivate sollten diese flüssigchromatographisch getrennt, deren Retentionszeiten bestimmt und mithilfe eines geeigneten Detektors quantifiziert werden. Neben der Darstellung der Substitutionsverteilungen sollte auch die Unterscheidung von Xylose- und Arabinosesubstituenten signifikant zum Verständnis der Derivatisierungen beitragen und detaillierte Einblicke in die Strukturen hydroxyalkylierter Verbindungen liefern.

2 Stand des Wissens

2.1 Hemicellulosen und Xylane

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts erfolgte die Darstellung des Holzzuckers Xylose aus „Holzgummi“, einem mit Natronlauge aus Holz extrahierten Material (Koch, 1886). Die erste reine Herstellung und anschließende Charakterisierung als Pentose gelang schon wenige Jahre später (Wheeler et al., 1889). Zusammen mit den Arbeiten von E. Schulze über „paragalactanartige Substanzen“ kann dies als Startpunkt der Forschungen über Hemicellulosen betrachtet werden, die er in einer Mitteilung aus dem Jahr 1891 auch erstmals als solche bezeichnete (Schulze et al., 1890; Schulze, 1891a, b). Als „Hemicellulose“ fasste Schulze alle „durch heiße verdünnte Mineralsäuren unter Glucose-Bildung leicht in Lösung zu bringenden Zellwandbestandteile“ (Schulze, 1891a) zusammen, wobei er unter dem Ausdruck „Glucose“ alle monomeren Zucker verstand. In den folgenden Jahrzehnten wurde das Wissen über diese komplexe Substanzklasse der Kohlenhydrate stets erweitert. Durch die folglich entstandene Komplexität ist bis heute jedoch keine einheitliche Definition der Hemicellulosen zu finden. Weitestgehende Übereinstimmung besteht für die Beschreibung als heterogene Gruppe von Polysacchariden, die über ein β -(1 \rightarrow 4)-glycosidisches Rückgrat aus Glucose, Mannose oder Xylose verfügen und nicht der Cellulose oder den Pektinen zugehörig sind (Scheller et al., 2010). Zusätzlich gibt es die Ansicht nur die Polysaccharide als Hemicellulosen zu bezeichnen, deren glycosidische Bindung durch eine äquatoriale und keine axiale Konfiguration charakterisiert ist. Durch diese Aussage wird die Klasse der Galactane von den Hemicellulosen ausgeschlossen, wohingegen andere Autoren dieser Systematik widersprechen (Ebringerová et al., 2005). Über die vielfältigen Möglichkeiten der Einteilung von Kohlenhydraten berichteten Scheller et al. (2010) ausführlich. Weiterhin existieren in der Literatur die Begrifflichkeiten der Polyosen (Staudinger et al., 1939) sowie der Pentaosen (Belitz et al., 2008), wobei sich die jeweiligen Definitionen über zugehörige Polysaccharide von denen der Hemicellulosen zum Teil unterscheiden. Da die Bezeichnung Hemicellulosen die größte Verbreitung hat, wurde diese auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.1.1 Vorkommen der Hemicellulosen und Xylane

Mithilfe mikroskopischer Aufnahmen erfolgte schon nach den ersten Untersuchungen aus dem Jahr 1890 die Lokalisierung der Hemicellulosen in den Wänden pflanzlicher Zellen (Schulze et al., 1890). Sowohl Art als auch Gehalt der Hemicellulosen in den Zellwänden sind jedoch sehr variabel. Scheller et al. (2010) beschrieb die Polysaccharide in Zellwänden wichtiger Pflanzengruppen. Er wählte dabei die Untergliederung in Gräser, Dikotyledone und Koniferen um Ähnlichkeiten bezüglich Qualität und Quantität der entsprechenden Hemicellulosen zu verdeutlichen. Zusätzlich beschrieben die Autoren Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen primärer oder sekundärer Zellwand, die in adaptierter Form in Tab. 1 wiedergegeben sind (Scheller et al., 2010).

Tab. 1: Gehalte von Hemicellulosen in den primären und sekundären Zellwänden von Pflanzen, adaptiert von Scheller et al. (2010).

Polysaccharid	Gehalt der Polysaccharide in der Zellwand [wt%]					
	Gras		Dikotyledone		Koniferen	
	primär	sekundär	primär	sekundär	primär	sekundär
Glucuronoxylan	-	-	-	20-30	-	-
Arabino-glucuronoxylan	20-40	40-50	5	-	2	5-15
Glucomannan	2	0-5	3-5	2-5	-	-
Galactogluco-mannan	-	-	-	0-3		10-30
Xyloglucan	2-5	Spuren	20-25	Spuren	10	Spuren
β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-Glucan	2-15	Spuren	-	-	-	-

Die aus mengenmäßiger Sicht bedeutendsten Hemicellulosen werden durch die Gruppe der Xylane definiert. Nach dem allgemeinen Verständnis bestehen diese weiterhin aus den Untergruppen der Glucuronoxylane und Arabinoglucuronoxylane und werden durch eine xylosebasierte Hauptkette beschrieben (Ebringerová et al., 2005; Scheller et al., 2010). Während erstere die häufigsten Hemicellulosen in der sekundären Zellwand

dikotyledoner Pflanzen darstellen, sind letztere vor allem in primärer und sekundärer Zellwand von Gräsern zu finden. Der Anteil aller Xylane an trockener Biomasse wurde in vielen Studien umfangreich untersucht und mit Werten zwischen 15 und 35% bestimmt. Die Zellwände von Gräsern können dabei bis zu 50% Xylane aufweisen. Durch diesen hohen Gehalt werden Xylane als das zweithäufigste Polysaccharid nach Cellulose bezeichnet (Thomas et al., 1987; Ishii, 1997; Pauly et al., 2008; Vogel, 2008; Zabortina et al., 2008; Deutschmann et al., 2012).

Die biologischen Funktionen der Xylane und im Allgemeinen auch der Hemicellulosen beruhen weitestgehend auf deren strukturgebenden Eigenschaften in den pflanzlichen Zellwänden. Durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte, sowie zum Teil auch kovalenter Quervernetzungen mit Lignin, werden Netzwerke gebildet, die einen wesentlichen Beitrag für die Struktur der Zellwände haben (Ishii, 1991; Ralph et al., 1992; Ishii, 1997; Mellerowicz et al., 2008; Scheller et al., 2010). Eine weitere große Bedeutung haben Hemicellulosen als Reservekohlenhydrate in Pflanzensamen, was bereits in den ersten Charakterisierungen von 1890 nachgewiesen wurde (Schulze et al., 1890). Neuere Untersuchungen zeigten, dass diese Hemicellulosen eine ähnlich wichtige Position als Speicherkohlenhydrate einnehmen wie Stärke (Reid, 1985; Fischer et al., 2004; Naran et al., 2008).

2.1.2 Chemische Struktur und Eigenschaften der Xylane

Xylane verfügen über einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad (DP) von 100 bis 200 und haben eine molare Masse zwischen 10 000 und 40 000 g/mol (Deutschmann et al., 2012). Im Vergleich zu den anderen pflanzlichen Polysacchariden Cellulose (DP = 5000 – 15 000) und Pektin (DP = 160 – 2 800) zählen die Xylane somit zu den kleineren Polymeren (Hänsel et al., 1999).

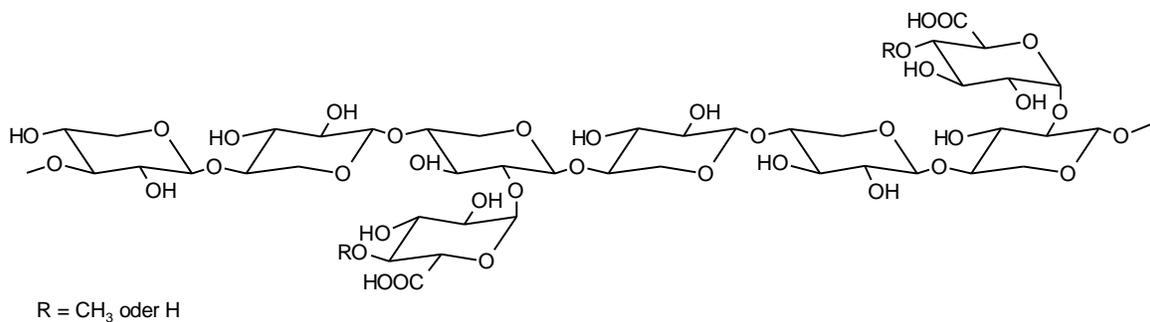
Wie alle Hemicellulosen werden auch die Xylane der terrestrischen Pflanzen den Heteropolysacchariden zugeordnet – die Polymere sind demnach aus mindestens zwei unterschiedlichen Monosacchariden zusammengesetzt. Da jedes Molekül nicht aus nur einer sich wiederholenden Struktureinheit besteht, existiert eine sehr hohe Vielzahl an unterschiedlichen Verbindungen. Deren Zusammensetzung ist abhängig von Art und

Gattung der Pflanze aber auch von den Organen, in denen sie zu finden sind. Alle Xylane zeichnen sich dadurch aus, dass sie ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verbundenen Xylopyranosyluntereinheiten besitzen. Die große Variabilität dieser Substanzklasse entsteht demnach durch Art und Anzahl der vorhandenen Seitengruppen. Grundsätzlich werden Xylane in zwei Fraktionen unterteilt: Glucuronoxylane und Arabinoglucuronoxylane. Unter letzterem können auch die in der Literatur als Glucuronoarabinoxylane und Arabinoxylane bezeichneten Verbindungen zusammengefasst werden, da eine Unterscheidung dieser drei Untergruppen meist nicht eindeutig zu benennen ist. Die entsprechende Nomenklatur der Xylane gibt dabei Aufschluss über die häufigsten Monosaccharideinheiten im Molekül (Ebringerova et al., 2000; Ebringerová et al., 2005; Scheller et al., 2010).

Grundsätzlich wurde festgestellt, dass die Strukturen der Xylane abhängig von der jeweiligen biologischen Funktion sind. Xylane mit der Funktion als Reservekohlenhydrat sind vielfältiger und stärker verzweigt als solche, die der Erhöhung der Festigkeit dienen (Huisman et al., 2000; Fischer et al., 2004; Ceusters et al., 2008).

2.1.2.1 *Glucuronoxylane*

Glucuronoxylane sind die dominierenden Hemicellulosen in den Hölzern der Angiospermen (Laubbäume). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass die Hauptkette in unregelmäßigen Abständen, aber immer an Position 2 der Xyloseeinheiten, mit Glucuronsäure verzweigt ist (Schema 1).



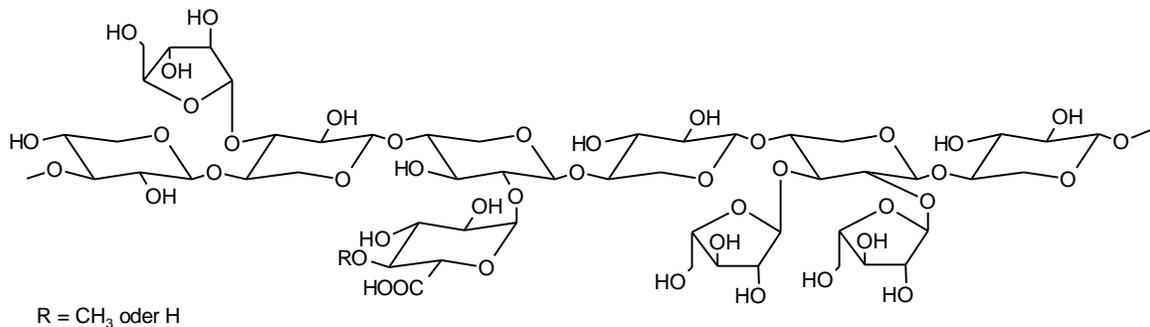
Schema 1: Primäre Struktur eines Glucuronoxylans.

Neben geringen Mengen der unterivatisierten Glucuronsäurereste sind die meisten dieser Seitenketten an Position 4 mit einer Methylgruppe verethert und liegen somit als 4-*O*-methyl- α -D-glucuronsäure (meGlcA) vor. Daher ist für diese Polymere auch der Begriff der Methylglucuronoxylane (MGX) gebräuchlich. Der bestimmbare Anteil dieser Verzweigungen ist neben den bereits erwähnten natürlichen Faktoren auch von den Bedingungen während der Xylanextraktion abhängig. Das Verhältnis Xylose : meGlcA wurde im Durchschnitt mit 10 : 1 ermittelt, kann aber auch Werte von bis zu 4 : 1 annehmen (Stephen, 1983). Ein bedeutender Anteil der Hydroxylgruppen im Polymer ist zusätzlich mit Essigsäure verestert (Acetylierungsgrad $\sim 0,6$). Auch wenn beide zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen der Xylose acetyliert vorliegen können, so wird die 3-*O*-Substitution gegenüber der 2-*O*-Substitution deutlich bevorzugt. Zusätzlich wurde die Doppelsubstitution der Xylosemonomere sowie die Acetylierung der meGlcA-Seitenketten an Position 3 beschrieben (Bouveng et al., 1960; Timell, 1967; Teleman et al., 2000; Teleman et al., 2002; Evtuguin et al., 2003). Neben dieser grundlegenden Zusammensetzung der Glucuronoxylane wurden in einigen Pflanzen auch spezielle Strukturmerkmale identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass in den Xylanen des *Eucalyptus globulus* (1 \rightarrow 2)-glycosidische Bindungen von α -D-Galactopyranose sowie D-Glucopyranose zu den meGlcA-Seitengruppen bestehen. Daraus folgerten die Autoren, dass es kovalente Quervernetzungen zu anderen Hemicellulosen mit meGlcA als verbindendes Element gibt (Shatalov et al., 1999; Evtuguin et al., 2003). Zusätzlich wurde der Einfluss der Uronsäuren für die Minimierung des oxidativen Stresses in Pflanzen beschrieben (vgl. 2.3.1) (Pristov et al., 2011). In verschiedenen Laub- und Nadelhölzern wurde eine charakteristische Oligosaccharidstruktur entdeckt, die sich am reduzierenden Ende der Xylane befindet. Diese besteht aus β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)-D-Xylp (Shimizu et al., 1976; Johansson et al., 1977; Andersson et al., 1983; Pena et al., 2007).

2.1.2.2 *Arabinoglucuronoxylane*

Arabinoglucuronoxylane kommen hauptsächlich in den Zellwänden monokotyledoner Pflanzen vor, wurden aber auch in Dikotyledonen gefunden (Smith et al., 2001; Scheller et al., 2010). Neben den bereits in Glucuronoxylanen beschriebenen Seitengruppen

meGlcA und Glucuronsäure an Position 2 der Xylosebausteine, verfügen diese Hemicellulosen zusätzlich über Verzweigungen mit Arabinofuranosen. Diese können sowohl α -(1 \rightarrow 2)-glycosidisch als auch α -(1 \rightarrow 3)-glycosidisch mit den Xylose-Einheiten des Rückgrates verbunden sein. Letzteres wird dabei bevorzugt gebildet (Schema 2). Ferner wurden Doppelsubstitutionen beschrieben und auch die Ausbildung dimerer Seitenketten nach dem Muster α -L-Araf-(1 \rightarrow 2)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xylp oder trimere Verzweigungen wie α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)- β -D-Xylp konnten beobachtet werden (Carpita et al., 1986; Verbruggen et al., 1998; Fischer et al., 2004).

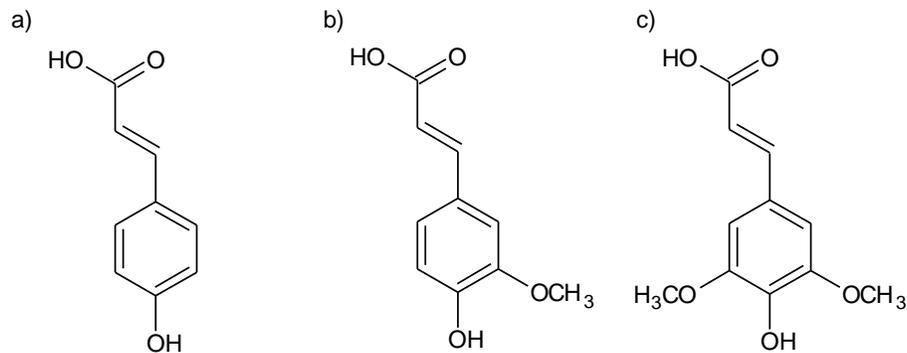


Schema 2: Primäre Struktur eines Arabinoglucuronoxylans.

Genau wie Glucuronoxylane liegen auch diese Polysaccharide acetyliert vor. Jedoch sind die Substitutionsmuster acetylierter Arabinoglucuronoxylane bislang nur wenig untersucht. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Grad der Acetylierung mit Werten zwischen 0,1 und 0,3 deutlich unter denen der Glucuronoxylane liegt. Genau wie bei Glucuronoxylanen finden Veresterungen bevorzugt an Position 3 der Xylose statt, wobei auch Doppelsubstitutionen vorliegen können (Alves et al., 2010; Morais de Carvalho et al., 2017).

Eine Besonderheit in Arabinoglucuronoxylanen ist die Anwesenheit der Hydroxyzimtsäurederivate (HZS) Ferulasäure, p-Cumarsäure und Sinapinsäure, die über Esterbindungen mit den Polymeren verknüpft sind (Schema 3) (Geissmann et al., 1971; Hartley et al., 1989; Ishii, 1997; Smith et al., 2001). Neben geringer Mengen Galactopyranosyl- und Xylopyranosylester sind die HZS vor allem mit Arabinose-

Substituenten an den Position 2 und 5 verbunden. Durch das Enzym Peroxidase erfolgt die oxidative Kopplung zweier HZS. Die somit erzeugten Quervernetzungen zwischen verschiedenen Polysacchariden, aber auch zwischen Polysacchariden und Lignin, führen zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Zellwände und sind ein maßgeblicher Inhibitor für das Zellwachstum (Ishii, 1991; Ralph et al., 1992; Ishii, 1997; Schooneveld-Bergmans et al., 1999).



Schema 3: In Xylanen vorkommende Hydroxyzimtsäuren: a) p-Cumarsäure, b) Ferulasäure, c) Sinapinsäure.

2.1.3 Isolierung der Xylane

Die Freisetzung der Xylane aus Pflanzenmatrices ist durch das bereits beschriebene Netzwerk mit anderen Zellwandbestandteilen nur unter Anwendung chemischer oder physikochemischer Verfahren möglich. Daher wurden verschiedene Isolierungsmethoden entwickelt, in deren Abhängigkeit Xylane unterschiedlicher Qualität dargestellt werden können. Die Ausbeuten variieren dabei deutlich je nach gewähltem Rohstoff und Extraktionsverfahren.

2.1.3.1 Alkaliextraktion

Die Alkaliextraktion von Hemicellulosen ist das traditionelle Verfahren und wurde in Ansätzen bereits für die ersten Isolierungen angewandt (Koch, 1886; Schulze et al., 1890). Eine vorangestellte Delignifizierung durch H₂O₂ oder NaClO₂ sowie weitere zahlreiche Optimierungen resultierten in Ausbeuten von bis zu 38% bezogen auf die gesamte Biomasse von Weizenstroh und Maiskolben (Lawther et al., 1996; Hromádková

et al., 1999). Sun et al. (2002a, 2002b, 2003) untersuchten ein abgewandeltes Verfahren der Alkaliextraktion mit verdünnter NaOH- bzw. KOH-Lösung, Ultraschallbehandlung sowie Aufreinigung mit aktiviertem H₂O₂ und konnten Ausbeuten zwischen etwa 20 und 25% Hemicellulosen feststellen. Die basischen Bedingungen hatten jedoch bei all diesen Extraktionen den Verlust der Acetylgruppen unter Freisetzung von Essigsäure zur Folge. Die in dieser Arbeit eingesetzten Xylane wurden durch Alkaliextraktion gewonnen.

2.1.3.2 Weitere Aufschlüsse

Ein oft angewandtes Verfahren zur Isolation von Xylanen ist der Dampfdruckaufschluss von Holz und Biomasse (Mason, 1926). Dieser bewirkt die partielle Hydrolyse der Hemicellulosen zu Oligomeren und ermöglicht somit deren Wasserlöslichkeit und Extraktion (Glasser et al., 1998; Shimizu et al., 1998). Die Xylanausbeuten nach dem Dampfdruckaufschluss wurden mit Werten zwischen 20 und 30% bestimmt (Schooneveld-Bergmans et al., 1998), konnten jedoch durch Recycling der erhaltenen Lösung deutlich erhöht werden (Surek et al., 2017). Weitere Verfahren basieren auf einem mikrowellenbasierten Aufschluss und haben ebenfalls eine partielle Hydrolyse der Polymere zur Folge (Teleman et al., 2000; Jacobs et al., 2002). Außerdem gibt es Möglichkeiten des Heißwasser- (Kilpelainen et al., 2012; Blumentritt et al., 2016) und Kaltwasseraufschlusses (Fincher et al., 1974; Schooneveld-Bergmans et al., 1998) oder der Isolierung mittels RuCl₃-Katalyse (Sánchez-Bastardo et al., 2017).

2.2 Hydroxyalkylierung von Xylanen

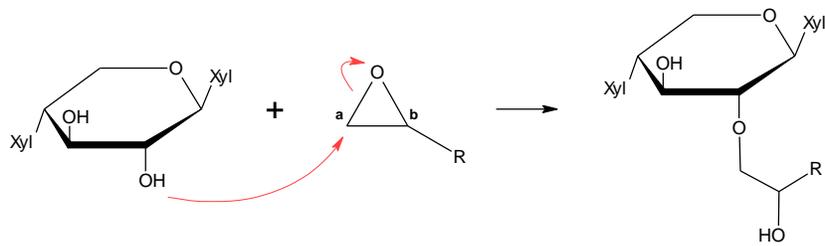
Durch die chemische Veränderung von Xylanen kann das Produkt- und Anwendungsspektrum dieser Biopolymere vielfältig erweitert werden. Die Derivatisierungen erfolgen dabei meist durch Reaktionen der Hydroxylgruppen mit entsprechenden Derivatisierungsreagenzien und haben die Bildung von Estern bzw. Ethern zur Folge. Parameter zur Charakterisierung von modifizierten Polysacchariden sind der Substitutionsgrad (DS) sowie die molare Substitution (MS). Der DS gibt darüber Auskunft, wie viele Hydroxylgruppen der Monomereinheiten im Durchschnitt substituiert wurden. Mit Ausnahme des nichtreduzierenden Endes ergibt sich für die Xyloseuntereinheiten eines Xylans somit ein maximaler DS von 2,0. Der MS ist ein Maß für das molare Verhältnis der Substituenten zur Monomereinheit im Polysaccharid. Ist der MS höher als der DS, so haben die entstandenen Substituenten mit weiteren Molekülen des Derivatisierungsreagenzes reagiert. Folglich findet eine Verlängerung entlang der eingeführten Substituenten statt.

Von besonderer Bedeutung für die Erzeugung derivatisierter Xylane sind Reaktionen, die eine Hydroxyalkylierung der Polysaccharide zur Folge haben. Obwohl diese Art der Derivatisierung für Cellulose schon länger erforscht wird (Soignet et al., 1967), rückten Xylane als Edukt erst Mitte der 1990er Jahre in den Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen (Glasser, 1995).

2.2.1 Hydroxyalkylierung mit Epoxiden

Traditionell wurden diese Verbindungen durch Umsetzung mit Epoxiden erzeugt. Epoxide können im großtechnischen Maßstab durch Oxidation ungesättigter Verbindungen mit Wasserstoffperoxid gewonnen werden (Meiers et al., 1998; Jenzer et al., 2001). Es handelt sich um heterocyclische Verbindungen, die aufgrund großer Ringspannung sehr reaktiv sind. Mit Luft können explosionsfähige Gemische entstehen und durch Alkylierung der DNA geht von Vertretern dieser Klasse eine karzinogene Wirkung aus (GESTIS-Stoffdatenbank, 2017).

Aufgrund der hohen Ringspannung des Epoxids kann die Ringstruktur durch nucleophile Angriffe an einem der Kohlenstoffatome geöffnet werden (Schema 4).



Schema 4: Hydroxyalkylierung von Xylanen mit Epoxiden.

Der Sauerstoff des Epoxids fungiert als Abgangsgruppe, verbleibt aber durch die zusätzliche Bindung zu einem weiteren Kohlenstoff im Molekül. Unter neutralen bzw. basisch katalysierten Bedingungen findet der Angriff des Nucleophils bevorzugt an dem C-Atom mit geringerer sterischer Hinderung (**a**) statt. Die Reaktion folgt dabei einem S_N2 -artigen Mechanismus. Grundsätzlich kann eine Ringöffnung des Epoxids auch durch Säuren katalysiert werden. In diesem Fall bildet sich zunächst ein Alkoxoniumion als Zwischenprodukt. Die ionische Ladung kann an dem höher substituierten C-Atom besser stabilisiert werden, wodurch der nucleophile Angriff bevorzugt an Position **b**, einem S_N1 -artigem Mechanismus folgend, stattfindet (Eliel, 1956). Den sauren Bedingungen steht jedoch die induzierte Hydrolyse der Polysaccharide gegenüber, weswegen für die Hydroxyalkylierung der Xylane grundsätzlich alkalische Medien gewählt werden. Da außerdem für die Isolierung der Xylane ebenfalls der Einsatz von basischen Substanzen erforderlich ist, kann somit eine simultane Durchführung der Derivatisierung ermöglicht werden (Jain et al., 2000; Laine et al., 2013).

Die ersten Beschreibungen hydroxyalkylierter Xylane gehen auf W. Glasser (1995) zurück, der diese Produkte als vielversprechende Alternative zu cellulose- und stärkebasierten Derivaten beschrieb. Dabei hob er vor allem die Bedeutung für die Erzeugung biologisch abbaubarer Folien hervor (Glasser, 1995). Hydroxypropylierte Xylane wurden durch die Reaktion mit Propylenoxid erzeugt, wobei die Synthese dieser Derivate bei konstanten Bedingungen für Reaktionstemperatur (25°C) und Reaktionszeit (24 h) erfolgte. Durch Variationen des pH-Wertes konnten unterschiedliche Substitutionsgrade erreicht werden. Dabei ergaben basischere Bedingungen auch größere DS-Werte, die im Bereich von 0,2 (pH 10,5) bis 1,9 (pH 13,0) festgestellt wurden (Jain et al., 2000). Der enzymatische Abbau dieser hydroxypropylierten Xylane sank drastisch

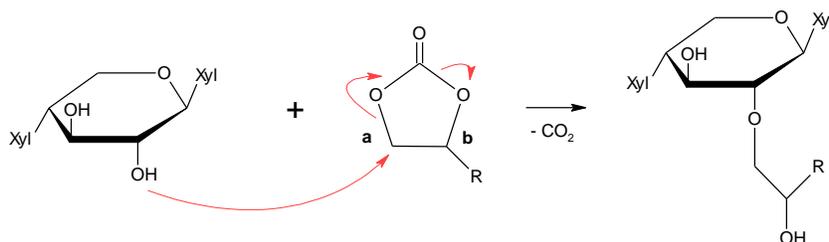
mit steigendem DS. Während von derivatisierten Xylanen mit einem DS von 0,25 noch etwa 60% abgebaut wurden, sank diese Rate auf rund 18% bei einem DS von 1,0 (Glasser et al., 1995). Weiterhin stellten die Autoren fest, dass die Wasserlöslichkeit der Xylane bei niedrigem DS deutlich verbessert werden konnte und die Produkte harte sowie transparente Folien bildeten. Die vollständig substituierten Xylane waren in verschiedenen organischen Lösungsmitteln löslich und die daraus erzeugten Folien hatten thermoplastische Eigenschaften (Jain et al., 2000). Um die Arbeitsschritte während der Aufarbeitung zu reduzieren, etablierten Laine et al. (2013) ein Verfahren zur Hydroxyalkylierung von Xylanen in direkter Folge des Alkali-Extraktionsprozesses und führten dieses im Pilotmaßstab durch. Neben der heterogenen Umsetzung mit Propylenoxid erfolgte auch die Derivatisierung mit 1-Allyloxy-2,3-epoxypropan sowie mit Butoxymethyloxiran (Laine et al., 2013). Weitere Möglichkeiten der Hydroxyalkylierung von Xylanen wurden durch die Reaktion mit 2,3-Epoxy-1-propanol (Hettrich et al., 2017) und 1-Azido-2,3-epoxy-propan (Pahimanolis et al., 2014) realisiert. Letzteres diente vor allem als Ausgangsprodukt für die Quervernetzung der Xylane, die durch eine kupferkatalysierte Reaktion der Azide mit den Endgruppen einer Polyethylenglycol-Kette erreicht wurde. Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass die Hydroxyalkylierung der Xylane die Konformation und Kompaktheit der Polymere beeinflusst. Mit steigendem DS sank die Flexibilität und die Polysaccharid-Ketten lagen geweiteter vor (Pitkänen et al., 2017).

2.2.2 Hydroxyalkylierung mit cyclischen organischen Carbonaten

Im Gegensatz zu den Reaktionen mit Epoxiden ist die Hydroxyalkylierung mit cyclischen organischen Carbonaten (COC) ein neuartiger Reaktionsweg. Die chemische Struktur der COC kann auch als Kohlensäureester beschrieben werden, bei denen die Alkylreste zum gleichen Molekül gehören. Dadurch liegen diese Verbindungen ringförmig vor. Die konventionelle Herstellung der COC erfolgt durch Cycloaddition von CO₂ an Epoxiden und hat somit die Bildung von fünfgliedrigen Ringen zur Folge. Über die vielfältigen Möglichkeiten zur Synthese von COC wurde detailliert berichtet (Sakakura et al., 2007; Schäffner et al., 2010). Die umweltfreundliche Herstellung von COC wurde bislang nur im Labormaßstab durch eine chitosanbasierte Katalyse realisiert (Kumar et al., 2017). Die

COC haben einige Vorteile gegenüber den Epoxiden. Allen voran sind dabei die deutlich geringere Toxizität und Flüchtigkeit zu nennen. Außerdem wird durch die Anwendung der COC das Explosionspotential während der Synthese minimiert (Schäffner et al., 2010).

Die Verwendung von COC für die Hydroxyalkylierung von Kohlenhydraten wurde erstmals in einem Patent von 1984 beschrieben (Pope, 1984). Es gibt zudem Untersuchungen, die sich mit der Hydroxyalkylierung von Ligninen (Kühnel et al., 2015; Duval et al., 2017; Kühnel et al., 2017) und Tanninen (Duval et al., 2016, 2017) unter Verwendung der COC auseinandersetzen. Die Reaktion für die beschriebenen Derivatisierungen von Xylanen mit den Carbonaten ist in Schema 5 dargestellt.



Schema 5: Hydroxyalkylierung von Xylanen mit cyclischen organischen Carbonaten (COC).

In ersten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Hydroxyalkylierung von Xylanen wie beschrieben durchgeführt werden kann (Zhang et al., 2015; Akil et al., 2016a; Akil et al., 2016b). Die eingesetzten COC waren dabei Propylencarbonat (PC, R = -CH₃) und Vinylethylencarbonat (VEC, R = -CH=CH₂). Die Umsetzungen erfolgten homogen in DMSO. Unter Einsatz des basischen Katalysators 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) wurden Substitutionsgrade von bis zu 1,5 (PC) und 1,2 (VEC) erreicht. Durch die Ermittlung der molaren Substitution konnte weiterhin festgestellt werden, dass eine Verlängerung der Seitenketten an der neu entstandenen Hydroxylgruppe erfolgte. Bei vergleichbaren DS-Werten war diese Verlängerung nach Umsetzung mit VEC höher als mit PC. Genau wie bei den Produkten nach Umsetzung mit Epoxiden verbesserte sich auch bei diesen Derivaten die Wasserlöslichkeit in Abhängigkeit des DS (Akil et al., 2016a; Akil et al., 2016b).

2.3 Bedeutung der Xylane

2.3.1 Physiologische Bedeutung

Dass Hemicellulosen einen positiven Einfluss auf die Gesundheit haben, wurde indirekt bereits Mitte des 19. Jahrhunderts postuliert (Burne, 1840) und sie wurden seit jeher auch als Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung empfohlen (Cummings, 2001). So stehen vor allem die Bedeutung als Ballaststoff und die probiotischen Eigenschaften im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen (Chen et al., 2005; Damaskos et al., 2008; Ekhart et al., 2010). Einen noch größeren Einfluss auf die Darmflora haben Oligosaccharide der Hemicellulosen und speziell auch der Xylane (Chen et al., 2005; Gullón et al., 2008). Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit sind Oligomere ebenfalls für die Entwicklung von Säuglingsnahrung von Bedeutung (Ackerman et al., 2017). So wurden verschiedene Oligosaccharide auf Xylan-, Mannan- und Glucanbasis zu entsprechenden Produktformulierungen gegeben und die daraus folgende unterstützende Wirkung auf das Wachstum von *Bifidobacterium breve* beschrieben. Diese Kulturen dienen dem Aufbau des Immunsystems und sollen Infektionen vorbeugen (Speelmans et al., 2016). Neben diesen Einflüssen auf das Verdauungssystem wurden auch weitere physiologische Bedeutungen festgestellt. So wirken Xylane cholesterolsenkend (Jonnalagadda et al., 1993) und blutdruckregulierend (Toshiaki et al., 1996). Mit Hydroxyzimtsäure veresterte Xylane zeigen antioxidative Wirkung und fungieren als Radikalfänger. Dabei wirken Sinapinsäure-Verbindungen effektiver gegen oxidativen Stress als Ester der Ferulasäure. Eine besondere physiologische Bedeutung haben veresterte Glucuronoxylane, da durch die Uronsäuren zusätzlich zweiwertige Metallionen gebunden werden können (Wrigstedt et al., 2010). Diese sind in biologischen Systemen für die Zersetzung von H_2O_2 sowie die Bildung von Hydroxyl-Radikalen ($\cdot OH$) verantwortlich, was mit der Fenton-Reaktion beschrieben werden kann.

Durch die Komplexierung des Eisens an den Säurefunktionen kann zum einen die Fenton-Reaktion teilweise unterbunden, zum anderen die dennoch entstandenen Radikale von naheliegenden Hydroxyzimtsäuren stabilisiert werden (Wrigstedt et al., 2010; Pristov et al., 2011). Als Folge dessen wirken saure Xylane der Bildung von Magengeschwüren entgegen und weisen eine wirksame Dosis (ED_{50}) von 20,4 mg/kg auf (Cipriani et al., 2008).

2.3.2 Technologische Bedeutung

Xylane und Hemicellulosen sind für zahlreiche technologische Prozesse von großer Bedeutung, da sie als Ausgangsprodukt für die Herstellung neuer Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen dienen. Dafür werden zum einen isolierte Xylane aus Bagasse, Getreidespelzen und Rückständen der Zuckerrübenverarbeitung verwendet, zum anderen xylanhaltige pflanzliche Materialien mit Anteilen an Cellulose und Lignin. Ziel der meisten Anwendungen ist die vollständige Verwertung von Biomasse. Weiterhin beeinflussen Xylane biomasseverarbeitende Prozesse.

2.3.2.1 Bedeutung der Xylane bei der Herstellung von Zellstoff

Die Herstellung von Zellstoff erfolgt aus Lignocellulosen, wobei die im Endprodukt enthaltenen Xylane dessen Qualität beeinflussen. So hat der zusätzliche Einsatz von Xylanen positive Auswirkungen auf die mechanische Stärke der produzierten Zellstoffe und erhöht zudem die Ressourceneffizienz und Ausbeuten der Produkte (Ramírez et al., 2008; Han et al., 2012). Weithin hat die in MGX vorkommende mGlcA eine besondere Bedeutung für die Bleiche alkalisch erzeugter Zellstoffe (Jiang et al., 2000). Unter diesen Bedingungen wird mGlcA durch Abspaltung von Methanol zu 4-Desoxy- β -L-threo-hex-4-enopyranosyluronsäure, mit dem Trivialnamen Hexenuronsäure (HexA), umgewandelt. Zum einen stört HexA die Bestimmung des Ligningehaltes mittels der κ -Zahl-Methode, zum anderen werden während oxidativer Bleichstufen sehr viel mehr der notwendigen Chemikalien benötigt. Um weniger Bleichreagenzien zu verbrauchen, können die Zellstoffe zunächst mit verdünnter Säure behandelt werden. Dadurch wird der Abbau von HexA zu 2-Fursäure und 5-Formyl-2-fursäure bewirkt, wobei diese Produkte durch Extraktion mit Wasser größtenteils wieder entfernt werden können (Teleman et al., 1996; Jiang et al., 2000). Kürzlich konnte erstmals beschrieben werden, dass auch die Produkte des HexA-Abbaus weiterreagieren und komplexere chinoide Verbindungen ausbilden. Diese haben somit einen Einfluss auf die Farbgebung der Zellstoffe (Rosenau et al., 2017).

2.3.2.2 *Herstellung von Xylit*

Von herausragender ökonomischer Bedeutung ist die Herstellung von Xylit aus Xylanen und xylanhaltiger Biomasse. So wurden im Jahr 2013 rund 160 000 t des Zuckerersatzstoffes hergestellt, wobei ein steigender Bedarf für die Zukunft prognostiziert wurde (Venkateswar Rao et al., 2016). Die Herstellung wird meist durch katalytische Umsetzung von Xylose unter erhöhtem Druck und Temperatur realisiert. Biotechnologische Ansätze wurden bislang nicht großtechnisch umgesetzt (Albuquerque et al., 2014; Jain et al., 2014).

2.3.2.3 *Medizinische Anwendungen*

Die Verwendung von Xylanen für medizinische Fragestellungen ist bislang nur von untergeordneter Bedeutung. Hauptuntersuchungsgebiet ist die Entwicklung neuartiger Drug-delivery Systeme, wobei die unverdaulichen Xylane eine gezielte Wirkstofffreisetzung ermöglichen sollen. So gelang bereits die Herstellung von Mikrokapseln durch Quervernetzungen von Xylanen (Nagashima et al., 2008; Marcelino et al., 2015). Daus et al. (2010) nutzten xylanbasierte Nanopartikel und veresterten diese mit Paracetamol. In einer weiteren Arbeit wurden magnetische Mikropartikel mit einer Xylan-Matrix umhüllt und somit Marker für Magnetresonanz-Untersuchungen des Magen-Darm-Traktes erzeugt (Silva et al., 2007). Weiterhin konnte das Potential der Xylane für die Herstellung künstlicher Herzgewebe aufgezeigt werden. So verhalten sich Gerüste aus Xylan und Polyvinylalkohol ähnlich wie natürliches Gewebe wodurch zwischenzelluläre Verbindungen aufgebaut werden können (Silva et al., 2015). Darüber hinaus haben sulfatierte Xylane antivirale und anticancerogen Wirkung und hemmen zusätzlich die Blutgerinnung (Daus et al., 2011).

2.3.2.4 *Herstellung von Verpackungsmaterialien*

Eines der wesentlichen Forschungsgebiete für die Anwendung nativer und chemisch modifizierter Xylane ist die Herstellung von Folien als Verpackungsmaterialien. Da Xylane aufgrund ihrer relativ kurzen Kettenlänge nicht für die Erzeugung stabiler Produkte geeignet sind, erfolgten Untersuchungen von Xylanen als Bestandteil in Kompositen. Durch die Mischung von Xylanen mit Galactoglucomannanen (Mikkonen et

al., 2008), sulfonierter Nanocellulose (Saxena et al., 2009a; Saxena et al., 2009b; Saxena et al., 2011) und bakterieller Nanocellulose (Stevanic et al., 2011) sowie die Verwendung von xylanhaltiger Biomasse (Goksu et al., 2007; Šimkovic et al., 2017) gelang es, Folien mit guten Barriereigenschaften herzustellen.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Folien aus Xylanen ist die Verwendung der Polysaccharide nach chemischer Modifikation. So wurden Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften nach Carboxymethylierung (Šimkovic et al., 2017), Veresterung mit Carbonsäureanhydriden (Fundador et al., 2012) sowie aus Mischungen derivatisierter Xylane mit Cellulosederivaten (Buchanan et al., 2003) erzeugt.

Von großer Bedeutung ist weiterhin die Herstellung von Verpackungsmaterialien aus hydroxyalkylierten Xylanen. Aufgrund der geänderten Eigenschaften werden die Substituenten auch als interne Weichmacher bezeichnet. Durch den zusätzlichen Einsatz der externen Weichmacher Glycerin und Sorbit konnten sowohl die mechanische Stabilität als auch die Barriereigenschaften gegenüber Wasserdampf noch weiter verbessert werden (Mikkonen et al., 2009). Entscheidenden Einfluss auf die Effektivität des Gasrückhaltevermögens hatte vor allem der Substitutionsgrad, wobei die Transmissionen für Sauerstoff und Wasserdampf mit steigendem DS zunahm (Mikkonen et al., 2015). Neben Sorbit untersuchten Bayati et al. (2014) den Zusatz von Nanokristallen aus Cellulose (CFC) zu den Produktformulierungen. Durch einen variablen Anteil von 40% Sorbit und CFC stieg die Glasübergangstemperatur der Folien leicht an, wohingegen die Durchlässigkeit für Wasser deutlich reduziert wurde (Bayati et al., 2014). Zusätzlich hatten die so hergestellten Folien Einfluss auf die Durchlässigkeit aromaaktiver Alkohole in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße. Es wurde festgestellt, dass Sorbit die Permeabilität erhöhte, während sie durch CFC gesenkt wurde (Bayati et al., 2015). Da die hergestellten Folien empfindlich gegenüber Feuchtigkeit waren und dadurch auch die Barriereigenschaften negativ beeinflussten, empfahlen die Verfasser dieser Studien die entsprechenden Produkte immer zusammen mit einer zusätzlichen wasserabweisenden Folie zu verwenden (Bayati et al., 2016). Die hygroskopischen Eigenschaften der Folien konnten durch die Verwendung von 3-butoxy-2-hydroxypropylierten Xylanen verringert werden (Nypelö et al., 2016).

Ein weiteres Einsatzgebiet hydroxyalkylierter Xylane ist die Beschichtung von papierbasierten Verpackungsmaterialien. Durch den Zusatz von Citronensäure, Sorbit oder Glycerin gelang es, die Barriereigenschaften der Materialien stark zu variieren. So sank beispielsweise die Sauerstoffdurchlässigkeit, verglichen mit einer Beschichtung des Kunststoffes PET, auf rund ein Drittel (Laine et al., 2013).

Die Eigenschaften der Filme und Beschichtungen sind weiterhin von der chemischen Struktur der Xylane abhängig. So wird die Beschaffenheit von Folien aus Arabinoxylanen vom DS der Arabinose-Substituenten beeinflusst. Je geringer der DS umso höher ist die Kristallinität, was gleichzeitig eine Verringerung der Sauerstoffpermeabilität zur Folge hat (Höije et al., 2008).

2.3.2.5 Herstellung von Aerogelen aus Gelen

Ein aktuelles Forschungsgebiet für den Einsatz von Polysacchariden ist die Herstellung von Aerogelen. Als Basis dienen dafür stets Gele, die als ein dreidimensionales Netzwerk beschrieben werden können und deren Poren mit einer Flüssigkeit gefüllt sind. Wenn diese flüssige Phase durch Trocknung mit überkritischem CO₂ entfernt wird, bleibt die Struktur des Gels weitgehend erhalten. Dadurch entstehen die für Aerogele typischen Eigenschaften wie eine große Oberfläche, geringe Dichte und hohe Kompressionsstabilität (Hüsing et al., 1998). Neben den anorganischen silikabasierten Aerogelen, die bislang am detailliertesten erforscht wurden, konnte seit 1987 auch die Gruppe der organischen Aerogele etabliert werden (Stergar et al., 2016). Potentielle Einsatzgebiete kohlenhydratbasierter Aerogele sind vor allem biomedizinische Anwendungen (Stergar et al., 2016) sowie die Herstellung funktionalisierter Verpackungsmaterialien für die Lebensmittelindustrie (Mikkonen et al., 2013).

Die Herstellung der Aerogele gelang bereits aus verschiedenen Polysacchariden wie Cellulose (Jin et al., 2004) und Pektinen (García-González et al., 2015). Aufgrund ihrer geringen Kettenlänge bilden Xylane jedoch keine stabilen Gele aus. Für diesen Zweck müssen Modifikationen der Polymere vorgenommen werden (vgl. 2.2), die zumeist mit einer kovalenten Quervernetzung einhergehen. So gelang die Erzeugung von Aerogel-Schäumen mittels Xylan-Citrat-Chitosan Quervernetzungen mit einer Dichte von 0,00254 g/cm³ und einer Absorption von bis zu 100 g Salzlösung je Gramm Material. Die

Aerogel-Schäume wurden als elastisch, weich, langlebig und sehr porig beschrieben. Daher empfahlen die Autoren der Studie eine Anwendung als Absorber im Gesundheitsbereich und für medizinische Textilien (Salam et al., 2011). Weiterhin gelang die Herstellung von Gelen aus Xylanen, nach vorheriger Quervernetzung mit Polypropylenglycol und Polyethylenglycol. Diese Produkte zeichneten sich durch ihre reversible Quellbarkeit bei geringen Temperaturen (7°C) und Entquellung bei höheren Temperaturen (70°C) aus. Die mechanische Stabilität und Porengröße der Gele war abhängig von Art und Kettenlänge des Vernetzers (Pahimanolis et al., 2014). Durch Derivatisierung von Xylanen mit thiolhaltigen Seitenketten konnten Zwischenprodukte geschaffen werden, die durch die oxidative Kopplung der Thiole stabile Gele bildeten (Pahimanolis et al., 2015). In einer aktuellen Arbeit von Parikka et al. (2017) gelang es erstmals, mechanisch starke Aerogele aus Arabinoxylanen herzustellen ohne den Einsatz eines Vernetzers. Mit der selektiven TEMPO-Oxidation am C5 der Arabinoseeinheiten konnten die Polysaccharide über die Ausbildung von Halbacetalen quervernetzt werden. Da reduziertes TEMPO durch das Enzym Laccase wieder oxidiert wurde, genügte der Einsatz geringer Mengen des Oxidationsmittels (Parikka et al., 2017). Die Herstellung von Aerogelen aus hydroxyalkylierten Xylanen konnte bislang nicht beschrieben werden.

2.4 Analytik von nativen und hydroxyalkylierten Xylanen

Für die Analytik von nativen und hydroxyalkylierten Xylanen können verschiedene Methoden herangezogen und somit eine große Vielfalt unterschiedlicher Ergebnisse und Struktur-Eigenschafts-Beziehungen generiert werden. Dabei wird zwischen Verfahren zur Charakterisierung der gesamten Polymere sowie der monomeren Bausteine unterschieden. Letztere erfordern zunächst die Hydrolyse der Polysaccharide in kleinere Untereinheiten. In diesem Kapitel wurden alle Methoden erörtert, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

2.4.1 Analytik von Xylanen ohne Hydrolyse

2.4.1.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist ein chromatographisches Verfahren zur Trennung von Molekülen in Abhängigkeit ihrer Größe. Im Gegensatz zu anderen Methoden der Flüssigchromatographie soll die SEC nur auf Transportvorgängen beruhen und nicht auf den Unterschieden von Löslichkeit oder Affinität der Analyten zum Säulenmaterial. So diffundieren kleine Moleküle in die Poren der stationären Phase und werden folglich stärker retardiert als größere Moleküle (Nuyken et al., 2017). Die Polymere haben in der Regel kein definiertes Molekulargewicht und streuen um einen Mittelwert. Dieser Umstand wird durch die Dispersität (\mathcal{D}) beschrieben (Striegel et al., 2009). Die Untersuchung von Xylanen und anderen Holzbestandteilen mit SEC wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (Fishman et al., 2000; Lawoko et al., 2011). Von großer Bedeutung für die Darstellung richtiger Ergebnisse mittels SEC ist die vollständige Löslichkeit der Polymere. Ein Lösungsmittelsystem aus DMSO und Wasser im Verhältnis 9:1 und die Zugabe 0,05 M LiBr hat sich dabei als geeigneter Eluent herausgestellt (Saake et al., 2001). Darüber hinaus ist es notwendig Multi-Detektoren-Systeme unter Berücksichtigung der intrinsischen Viskosität zu verwenden (Fishman et al., 2000; Saake et al., 2001).

Die Analyse von modifizierten Polysacchariden stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Untersuchungen hydroxyalkylierter Xylane mit SEC wurden erstmals von Nypelö et al. (2016) beschrieben. In einer aktuellen Studie von Pitkänen et

al. (2017) wurde der Einfluss des DS-Wertes derivatisierter Xylane mittels SEC untersucht. Die Autoren der Studie beschrieben, dass sich die Konformation der Xylane in Abhängigkeit des DS verändert. So lagen Derivate mit einem niedrigen DS als kompaktes Knäuel vor, wohingegen solche mit hohem DS geweitete Strukturen hatten (Pitkänen et al., 2017).

2.4.1.2 *Magnetresonanzspektroskopie (NMR)*

Das Prinzip der Kernresonanz-Experimente beruht darauf, dass die Kerne der Atome mit elektromagnetischen Wellen einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt werden. Die somit erzeugten Spektren sind essentieller Bestandteil für die Strukturaufklärung chemischer Verbindungen. Durch die Integration der Signale können NMR-spektroskopische Methoden auch für quantitative Untersuchungen herangezogen werden. Etabliert wurden sowohl die Ermittlung von relativen Verhältnissen sowie die Bestimmung der absoluten Konzentrationen (Friebolin, 2013; Altaner et al., 2016).

In Bezug auf Xylane sind vor allem eindimensionale ^{13}C - und ^1H -NMR-Messungen von Bedeutung und fanden ihre Anwendung in der Aufklärung struktureller Änderungen nach chemischer Modifikation (Jain et al., 2000; Strnad et al., 2013). Weiterhin konnte die Detektion und Quantifizierung von Abbauprodukten xylanhaltiger Biomasse nach intensiver schwefelsaurer Hydrolyse mittels ^1H -NMR-Spektroskopie erfolgreich durchgeführt werden (Altaner et al., 2016).

Für die Untersuchungen hydroxyalkylierter Xylane stellt diese Art der Analytik ein weit verbreitetes Instrument zur Bestimmung der charakteristischen Kenngrößen des Substitutionsgrades (DS) sowie der molaren Substitution (MS) dar (Laine et al., 2013; Mikkonen et al., 2015). Zur Berechnung des DS wurde das Integral in ^{13}C -Spektren der mit Hydroxyalkylketten substituierten C-Atome (Position 2 und 3) durch das Integral des unsubstituierten C1 der Xylose geteilt. Die Ermittlung des MS erfolgte mittels Division des Integrals der Methylgruppe durch das des C1-Atoms. Unter Berücksichtigung dieser beiden Kenngrößen konnte ebenfalls die durchschnittliche Kettenlänge der angefügten Substituenten berechnet werden (Akil et al., 2016a; Akil et al., 2016b).

Der Einsatz von NMR-Spektroskopie hat den großen Vorteil, dass die Polysaccharide ohne vorangegangene Hydrolyse vermessen werden können und somit keine zusätzlichen

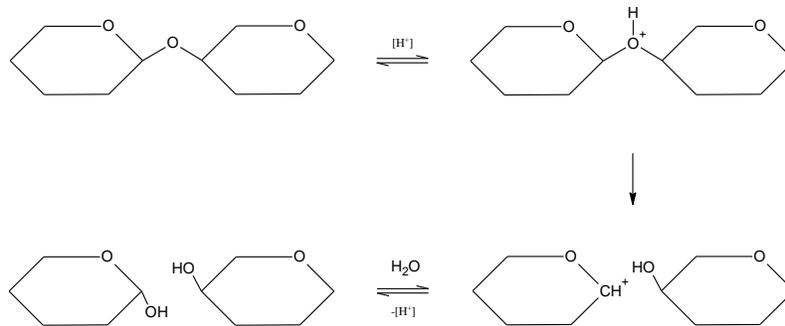
Nebenreaktionen zu berücksichtigen sind. Verglichen mit vielen chromatographischen Verfahren ist die Empfindlichkeit dieser Methoden jedoch gering, wodurch Bestandteile niedrigerer Konzentration nicht erfasst werden können. Vor allem bei niedrigen DS- und MS-Werten hydroxyalkylierter Xylane treten so große Messungenauigkeiten auf.

2.4.2 Hydrolyse der Polymere

Die Spaltung chemischer Bindungen unter Wasseranlagerung wird als Hydrolyse bezeichnet. Im speziellen Fall der Polysaccharide können die resultierenden Produkte sowohl Oligosaccharide als auch Monomere sein. In Abhängigkeit des eingesetzten Katalysators kann zwischen saurer und enzymatischer Hydrolyse unterschieden werden. Die Autohydrolyse von Polysacchariden wird formal der sauren Hydrolyse zugeordnet. Da sie jedoch für die Isolierung von Xylanen und nicht für analytische Fragestellungen von Bedeutung ist, wurde die Autohydrolyse in Kapitel 2.1.3 thematisiert.

2.4.2.1 Saure Hydrolyse

Die saure Hydrolyse von Polysacchariden erfolgt durch den Einsatz eines sauren Katalysators (Schema 6).



Schema 6: Vereinfachte Darstellung der sauren Hydrolyse einer glycosidischen Bindung.

Im ersten Schritt der Hydrolyse bildet sich die konjugierte Säure des Kohlenhydrats, indem sich ein Proton des Katalysators am glycosidischen Sauerstoff anlagert. Nach Spaltung der glycosidischen Bindung entsteht ein Carbenium-Ion, an welches ein

Wassermolekül nucleophil angreifen kann. Mit der gleichzeitigen Regeneration des Katalysatorprotons ist die Hydrolyse abgeschlossen (Szejtli, 1976). Der Ablauf der Hydrolyse ist in großem Maße von der Konzentration der Säure sowie dem pH Wert im wässrigen Medium abhängig. Typische Säuren für die Katalyse der hydrolytischen Spaltung sind Schwefelsäure (Saeman et al., 1954), Salzsäure im Rahmen einer Methanolyse (Sundberg et al., 1996) und Trifluoressigsäure (Zhao et al., 2008).

Die Hydrolyse mit Schwefelsäure, basierend auf einem Verfahren von Saeman et al. (1954), wird häufig für Polysaccharide und komplexe pflanzliche Biomasse angewandt. Es müssen jedoch unterschiedliche Konditionen in Abhängigkeit der Probenbeschaffenheit gewählt werden, wobei die Hydrolyse von Biomasse und Zellstoffen intensivere Bedingungen erfordert als die Spaltung isolierter Polysaccharide (Willför et al., 2009).

Bei der Methanolyse erfolgt die Hydrolyse der Polysaccharide in wasserfreiem Methanol mittels HCl. Dieses Verfahren ist für die Spaltung der glycosidischen Bindungen von Hemicellulosen geeignet. Insbesondere wurde die annähernd vollständige Freisetzung von mGlcA beschrieben (Sundberg et al., 1996). Da keine hinreichende Spaltung der β -(1 \rightarrow 4) glycosidischen Bindungen zwischen Glucosebausteinen erreicht werden kann, ist diese Art der Hydrolyse ungeeignet für Cellulose (Sundberg et al., 1996; Willför et al., 2009).

Die Hydrolyse von Polysacchariden mit Trifluoressigsäure erfolgt häufig in einer Labormikrowelle. Die großen Vorteile dieser Variation gegenüber dem Einsatz konventioneller Erhitzung sind die deutliche Reduktion der Reaktionszeit von mehreren Stunden auf wenige Minuten und die schonenden Reaktionsbedingungen. Dadurch sind weniger Nebenprodukte zu erwarten (Zhao et al., 2008; Ducatti et al., 2011; Liu et al., 2016). Dies kann zum einen durch die kurze Dauer erhöhter Temperatur aber auch durch die Art der Erhitzung erklärt werden. Durch die Anregung von Dipolen in den Reaktionsgefäßen erfolgt eine direkte Temperierung der Proben. Bei konventionellen Verfahren wird die Wärme von außen in die Reaktionsgefäße eingetragen. Wie Kappe (2004) beschrieb, führt die Erhitzung mit Mikrowellen verglichen mit konventionellen Verfahren zu einem umgekehrten Temperaturgradienten. Dadurch wird das Risiko der

partiellen Überhitzung durch ungleichmäßiges erwärmen der Proben minimiert und das Potential für unerwünschte Nebenreaktionen reduziert (Kappe, 2004).

Weiterhin fanden auch andere Säuren wie Citronensäure und Milchsäure (Harder et al., 2015) bereits Anwendung für die Hydrolyse von Polysacchariden. Kürzlich wurde außerdem ein neues Verfahren beschrieben, dass die Hydrolyse von Biomasse mit einem chitosanbasierten Katalysator in einer ionischen Flüssigkeit ermöglicht. Entscheidend ist dabei der Zusatz von Tensiden, wodurch die komplexe Struktur der Lignocellulosen aufgebrochen und die Entfernung von Lignin gefördert wird (Si et al., 2017).

Die optimalen Bedingungen für eine vollständige Hydrolyse von Polysacchariden sind von der Art der jeweiligen glycosidischen Bindung bzw. der direkten chemischen Umgebung abhängig. So ist die β -(1 \rightarrow 4)-glycosidische Bindung der Cellulose grundsätzlich stärker ausgeprägt als die der Xylane (Willför et al., 2009). Bei Heteropolysacchariden wie den Xylanen ist dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, da die β -(1 \rightarrow 4)-glycosidische Bindung zwischen den Xylose-Einheiten der Hauptkette leichter zu hydrolysieren ist als die β -(1 \rightarrow 2)-glycosidische Bindung der Seitenketten zu den Xylose-Einheiten (De Ruiter et al., 1992; Tenkanen et al., 1995). Weiterhin erfordern isolierte Polysaccharide eine weniger intensive Art der Probenvorbereitung als Kohlenhydrate, die Bestandteile komplexerer Gebilde wie etwa pflanzlicher Biomasse sind (Willför et al., 2009). Mit der Intensivierung der Hydrolysebedingungen steigt jedoch auch das Potential für unerwünschte Nebenreaktionen. Aus Xylose wird hauptsächlich das Abbauprodukt Furfural gebildet, das im weiteren Verlauf zu Ameisensäure umgesetzt wird. Aus den Hexosen Glucose, Mannose und Galactose bildet sich hingegen 5-Hydroxymethylfurfural. Dieses reagiert weiter zu Ameisensäure und Lävulinsäure (Palmqvist et al., 2000; Altaner et al., 2016).

Für die vollständige Hydrolyse von Polysacchariden und insbesondere von komplexen Biomasseproben sind intensive Bedingungen notwendig. Diese haben jedoch zum Teil signifikante Abbaureaktionen der Analyten zur Folge, wodurch eine quantitative Auswertung nicht mehr gewährleistet werden kann. Für konventionelle Methoden werden die Bedingungen der Hydrolyse in der Regel so gewählt, dass die höchste Konzentration monomerer Zucker freigesetzt wird. Diese Herangehensweise bedeutet jedoch nicht, dass

auch alle vorhandenen Kohlenhydrate tatsächlich vollständig analytisch erfasst werden können.

2.4.2.2 *Enzymatische Hydrolyse*

Im Gegensatz zur sauren Behandlung der Polysaccharide stellt die enzymatische Hydrolyse ein schonenderes Verfahren dar. Aufgrund der hohen Substratspezifität der Biokatalysatoren sind für eine vollständige Hydrolyse von einem oder mehreren Polysacchariden jedoch komplexe Enzymmischungen notwendig. Weiterhin muss gewährleistet werden, dass die Polysaccharide gut zugänglich für eine hydrolytische Spaltung sind. Das Vorhandensein von Lignin ist dabei besonders hinderlich, weshalb die Polysaccharide in nativen Holzproben nicht enzymatisch abgebaut werden können (Dahlman et al., 2000). Außerdem haben die Struktur und Porosität einen Einfluss auf den enzymatischen Abbau, wobei sich die mechanische Zerkleinerung sowie die Dampfbehandlung als Möglichkeiten der Probenvorbereitung bewährt haben (Kerley et al., 1988; Hendriks et al., 2009; Schütt et al., 2013). Es wurde weiterhin berichtet, dass die enzymatische Entfernung von Arabinosesubstituenten den darauffolgenden Abbau durch Xylanasen mindern kann, da somit vor allem die Wasserlöslichkeit der Polymere beeinflusst wird (Li et al., 2017). Generell führen eine gute Quellbarkeit sowie ein geringer Grad der Kristallinität von Cellulose zu guten Hydrolyseausbeuten (Kerley et al., 1988). Dahlman et al. (2000) entwickelten ein Verfahren, mit dem Zellstoffe und delignifizierte Hölzer annähernd vollständig enzymatisch abgebaut werden können. Dies beinhaltet auch die enzymatische Spaltung der glycosidischen Bindung des Substituenten mGlcA zu Xylose (Dahlman et al., 2000). Demgegenüber stehen jedoch Untersuchungen, wonach der Erfolg der enzymatischen Hydrolyse von Cellulose in direktem Zusammenhang mit dem Gehalt an Xylanen korreliert. So wurden von Dammström et al. (2009) starke Wechselwirkungen zwischen Cellulose und Glucuronoxylanen festgestellt. Vergleichbare Erkenntnisse erlangten ebenfalls Várnai et al. (2010). Auch Penttilä et al. (2013) folgerten, dass Xylane und Cellulose Cluster ausbilden, die für die Enzyme nicht zugänglich sind. Ein simultaner Abbau der Xylane erhöhte zwar die Ausbeuten, es blieb jedoch stets ein Restanteil in den Proben enthalten (Várnai et al., 2011; Penttilä et al., 2013). Neben Xylanasen und Cellulasen sind für einen möglichst

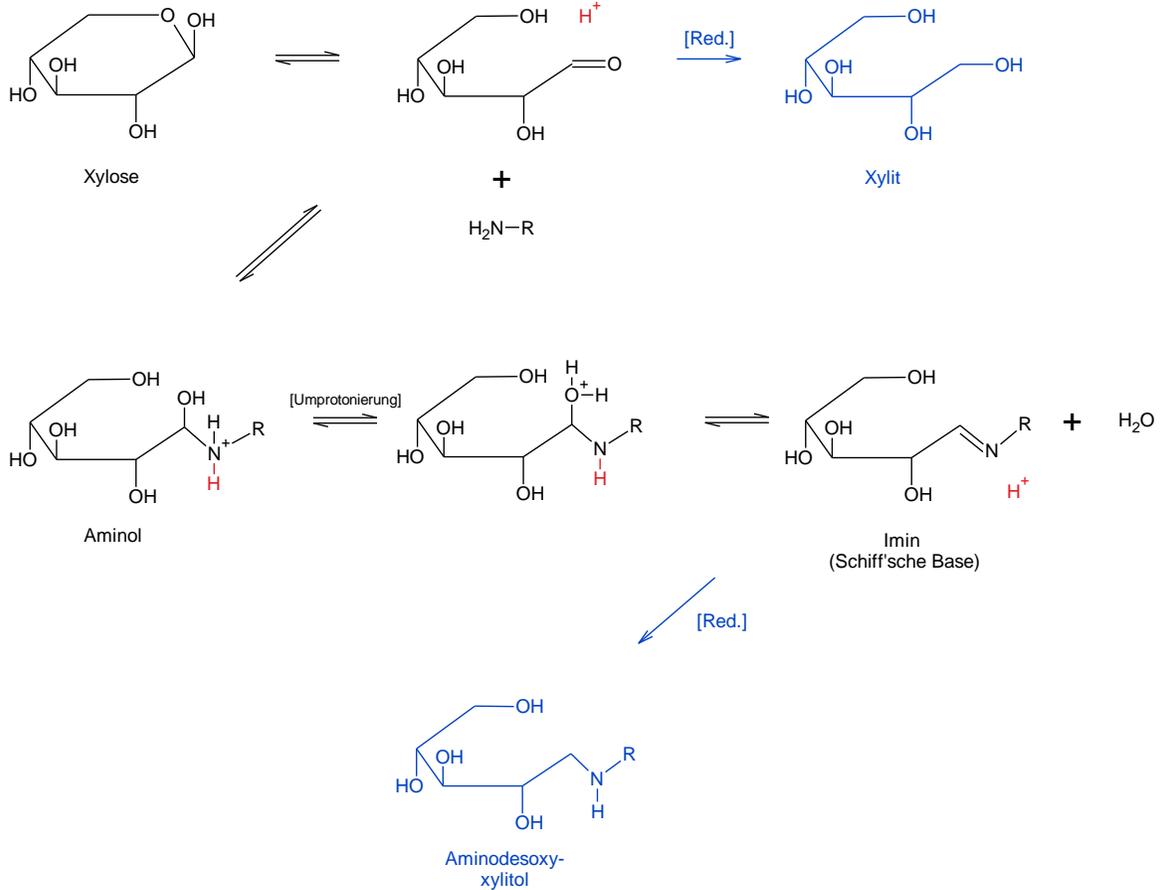
vollständigen enzymatischen Abbau von Zellstoffen und Polysacchariden auch weitere Enzyme wie Mannanasen erforderlich (Várnai et al., 2011). Außerdem werden spezielle Enzyme zur Abspaltung der Seitenketten benötigt. So ist vor allem das Enzym Glucuronidase für die Freisetzung von mGlcA von großer Bedeutung (Tenkanen et al., 1995; Teleman et al., 1996).

2.4.3 Reduktive Aminierung

Die Analytik von Mono- und Oligosacchariden beinhaltet vielfältige Herausforderungen. So sind die Möglichkeiten der Detektion stark eingeschränkt, da Kohlenhydrate keine Chromo- oder Fluorophore besitzen und für die Detektion mittels Massenspektrometrie nur eine geringe Empfindlichkeit aufweisen (Harvey, 2011). Weiterhin stehen für den Xylanbestandteil mGlcA und für die erzeugten substituierten Derivate keine reinen Standards zur Verfügung, die jedoch für die Quantifizierung mit einer externen Kalibrierung notwendig sind. Aus diesen Gründen wurden verschiedene Verfahren der Derivatisierung entwickelt, die in der Literatur umfangreich zusammengefasst wurden (Lamari et al., 2003; Pabst et al., 2009; Harvey, 2011). Von herausragender Bedeutung für die verbesserte Detektion der Kohlenhydrate ist vor allem die Markierung der reduzierenden Enden mit chromophoren beziehungsweise fluorophoren Labels. Der in der Literatur dominierende Reaktionsweg ist dabei die reduktive Aminierung.

2.4.3.1 Reaktionsprinzip der reduktiven Aminierung

Die reduktive Aminierung von Kohlenhydraten erfolgt in zwei Schritten. Zuerst reagiert das reduzierende Ende mit einem Amin unter Bildung der Schiff'schen Base (Imin). Darauf folgend wird dieses Imin reduziert, wodurch ein stabiles Endprodukt entsteht (Schema 7) (Herges et al., 2017).



Schema 7: Reduktive Aminierung von Kohlenhydraten am Beispiel der Xylose.

Die chemischen Strukturen von reduzierenden Kohlenhydraten und somit auch von Xylose stellen ein Gleichgewicht zwischen dem ringförmigen Halbacetal und dem Aldehyd dar. Unter Säurekatalyse können Amine nucleophil an den Carbonyl-Kohlenstoff des offenkettigen Isomers angreifen, wobei zunächst ein protoniertes Aminol gebildet wird. Durch Umprotonierung zur benachbarten Hydroxylfunktion entstehen ein sekundäres Amin und gleichzeitig ein Oxoniumion, wobei letzteres als gute Abgangsgruppe fungiert. Unter Wasserabspaltung und Regeneration des Katalysator-Protons wird ein Imin gebildet. Dieses kann im vorliegenden Fall auch als Aldimin bezeichnet werden (IUPAC, 2014). All diese Reaktionen sind im wässrigen Medium reversibel, wobei die Lage des Gleichgewichtes von den jeweiligen Substituenten abhängig ist. Um ein stabiles Endprodukt mit hohen Ausbeuten zu erhalten, muss das Imin zusätzlich einer Reduktion unterzogen werden, die bei den vorliegenden

Reaktionsbedingungen irreversibel ist. Durch die Bildung von Aminodesoxyxylitol wird die Schiff'sche Base aus dem Gleichgewicht entfernt. Dieses verschiebt sich somit auf die Seite des Imins, wodurch die quantitative Umsetzung der Xylose erfolgt. Weiterhin kann der Einsatz eines Reduktionsmittels in einer Nebenreaktion die Reduktion der Xylose zum Zuckeralkohol Xylit hervorrufen (Schellenberg, 1963; Borch et al., 1971; Herges et al., 2017).

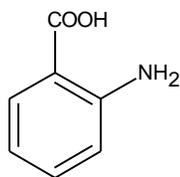
2.4.3.2 *Aminierung*

Wie bereits beschrieben (vgl. 2.4.3.1), wird die Aminierung von Kohlenhydraten sauer katalysiert. Dies hat jedoch direkten Einfluss auf die Wahl des Amins. In der Regel reagieren Amine im wässrigen Milieu basisch, da Protonen unter Bildung von Hydroxid-Ionen an das freie Elektronenpaar des Stickstoffs angelagert werden können (Beyer et al., 2004). Folglich liegen diese Verbindungen im sauren Medium vollständig protoniert vor und stehen für nucleophile Angriffe nicht zur Verfügung. Sie sind somit ungeeignet für die reduktive Aminierung von Kohlenhydraten (Sun et al., 2009). Bei aromatischen Aminen ist die Basizität der Aminogruppe hingegen deutlich abgeschwächt, was auf dem mesomeren Effekt dieser Verbindungen beruht (Beyer et al., 2004).

Für die reduktive Aminierung von Kohlenhydraten wurden bereits verschiedene Amine auf ihre Wirksamkeit getestet. Darunter sind viele aromatische Verbindungen wie 2-Aminobenzoesäure (Bigge et al., 1995), 2-Aminobenzamid (Bigge et al., 1995), 2-Aminopyridin (Hase et al., 1978), Procain (Takao et al., 1996), 1-Naphtylamin (Rakete et al., 2013) oder Derivate dieser Verbindungen (Harvey, 2011). Weiterhin wurde die Verwendung von Kronenetheraminen (Przybylski et al., 2002; Batista et al., 2008; Unterrieser et al., 2011) und Trimethylammoniumchlorid (Unterrieser et al., 2011) für den Einsatz bei der reduktiven Aminierung untersucht. Quantitative Umsetzungen konnten vor allem mit aromatischen Aminen erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der Einsatz von 2-Aminobenzoesäure (2-AA) untersucht, da diese Verbindung kostengünstig mit hoher Reinheit erworben werden kann und von ihr nur ein geringes Gefährdungspotential ausgeht. Weiterhin verfügt 2-AA über UV- und fluoreszenz-aktive Eigenschaften (Anumula, 1994;

Anumula, 2008; Zapala et al., 2009). 2-AA ist eine aromatische Carbonsäure mit einem Amin an Position 2 (Schema 8).



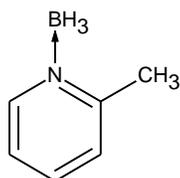
Schema 8: 2-Aminobenzoesäure (2-AA) als Reagenz für die reduktive Aminierung von Kohlenhydraten.

Aufgrund der beiden funktionellen Gruppen ist 2-AA eine zwitterionische Verbindung, die formal auch den Aminosäuren zugeordnet wird (Albert et al., 1984; Zapala et al., 2009). In Abhängigkeit des pH-Wertes ergeben sich somit vier Formen, die über ein chemisches Gleichgewicht ineinander überführt werden können. Diese sind: Kation, Zwitterion, Neutralform und Anion (Sun et al., 2009; Zapala et al., 2009). Für die reduktive Aminierung der Kohlenhydrate muss 2-AA die Neutralform aufweisen, da nur so die Voraussetzungen des ungeladenenamins unter sauren Reaktionsbedingungen gegeben sind. Die höchste Konzentration der Neutralform liegt am isoelektrischen Punkt von 2-AA bei einem pH-Wert von 3,51 vor. Bei diesen Bedingungen befinden sich etwa 10% in Neutralform, wohingegen das Zwitterionen einen Anteil von 82% aufweist (Zapala et al., 2009). Weithin wurde gezeigt, dass die spezifische UV-Absorption von 2-AA abhängig von der jeweiligen Form und somit auch vom pH-Wert ist. Ab einem pH von rund 7,1 liegt 2-AA als Anion vor und verfügt über drei Absorptionsmaxima. Bei höheren pH-Werten ist die Struktur unverändert, weshalb keine weitere Variation der UV-Absorption zu erwarten ist (Zapala et al., 2009). Die Analytik der mit 2-AA reduktiv aminierten Kohlenhydrate ist somit grundsätzlich auch unter den basischen Bedingungen einer Anionenaustauschchromatographie (HPAEC) möglich (vgl. 2.4.4.1).

2.4.3.3 Reduktion

Die Aminierung von Kohlenhydraten führt zur Bildung von Schiff'schen Basen (vgl. 2.4.3.1). Da diese instabil sind, müssen sie vor der instrumentellen Analytik durch Reduktion in die stabilen Aminodesoxyalditole überführt werden. Das gewählte

Reduktionsmittel sollte spezifisch wirken, um vorhandene Aldehyde, Ketone oder Carbonsäuren nicht zusätzlich zu reduzieren. Dies hätte unter anderem die Bildung von Zuckeralkoholen zur Folge, die nicht analytisch mittels UV- oder Fluoreszenz-Detektion erfasst werden können. Als geeignete Reagenzien für die Reduktion der Imine konnten einige Borhydride etabliert werden. Neben Natriumborhydrid (Schellenberg, 1963) stellte sich Natriumcyanoborhydrid (Borch et al., 1971) als selektives Reduktionsmittel heraus. Vor allem letztere, auch als Borch-Reagenz bezeichnete Verbindung, wurde vielfach für die reduktive Aminierung von Kohlenhydraten eingesetzt. Es hat jedoch den Nachteil, dass es bei Anwendung starker Säuren die flüchtige und sehr toxische Blausäure (HCN) bildet und mit Wasser unter Freisetzung von Wasserstoff reagiert (Hutchins et al., 2001). Als Alternative wurde daher auch der Einsatz anderer Borhydride wie zum Beispiel Dimethylaminoboran (Kiguchi et al., 1999), Triacetoxyborhydrid (Dalpathado et al., 2005), Pyridinboran (Bomann et al., 1995), Morpholinboran (Unterieser et al., 2011) und 4-Methylmorpholinboran (Unterieser et al., 2011) untersucht. In neueren Untersuchungen konnte sich vor allem 2-Picolinboran (2-PB) als Alternative zu Natriumcyanoborhydrid etablieren (Schema 9) (Sato et al., 2004; Ruhaak et al., 2010; Unterieser et al., 2011).



Schema 9: 2-Picolinboran (2-PB) als Reagenz für die reduktive Aminierung von Kohlenhydraten.

Die Vorteile von 2-PB als Reduktionsmittel sind die geringe Toxizität, Temperaturbeständigkeit sowie die Stabilität in den Lösungsmitteln Wasser und Methanol. Diese Faktoren ermöglichen die Umsetzungen unter moderaten Bedingungen (Sato et al., 2004). Weiterhin ist die reduktive Aminierung mit 2-PB in wässriger Lösung vergleichbar effizient wie mit dem bis dato bevorzugten Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid (Ruhaak et al., 2010). Dies konnte auch von Unterieser et al. (2011) bestätigt werden. Die Autoren stellten außerdem fest, dass nur ein geringer Anteil des

Alditols in einer Nebenreaktion gebildet wird und die Reduktion somit sehr selektiv erfolgt (Unterrieser et al., 2011).

2.4.4 Chromatographische Analyse von Kohlenhydraten

Mono- und Oligosaccharide sowie ihre Derivate können mit instrumentellen Verfahren detektiert und quantifiziert werden. Sowohl bei nativen als auch bei chemisch modifizierten Kohlenhydraten müssen dabei Verbindungen voneinander getrennt werden, die auf der einen Seite eine große strukturelle Ähnlichkeit und auf der anderen Seite signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Ladung oder Molmasse aufweisen. Die chromatographischen Analysen von Hydrolysaten sollen Aufschluss über die exakte Zusammensetzung der zugrundeliegenden Polysaccharide geben. Neben der Gaschromatographie nach Methanolyse (Sundberg et al., 1996; Bertaud et al., 2002; Willför et al., 2009), Permethylierung (Karlsson et al., 1988) oder Silylierung (DeJongh et al., 1969; Adeuya et al., 2007) sind Methoden der Elektrophorese (Harvey, 2011) oder Flüssigchromatographie von großer Bedeutung. Im Folgenden werden die flüssigchromatographischen Verfahren mit den jeweiligen Detektionsarten näher betrachtet, die in dieser Arbeit angewandt wurden.

2.4.4.1 Anionenaustauschchromatographie (HPAEC)

Genau wie Ionenpaarchromatographie und Ionenausschlusschromatographie wird auch die HPAEC den Verfahren der Ionenchromatographie zugeordnet. Die stationäre Phase besteht dabei in der Regel aus einem Harz, das mit quartären Ammoniumionen funktionalisiert ist und somit über eine fixierte positive Ladung verfügt. Passende Gegenionen stammen aus der mobilen Phase des chromatographischen Systems und werden beispielsweise durch OH^- , HCO_3^- oder $\text{CH}_3\text{-COO}^-$ repräsentiert. Die stationäre Phase ist somit nach außen hin neutral. Wird eine Probe auf die Trennsäule gegeben, erfolgt die Retention der darin enthaltenen Verbindungen in Abhängigkeit ihrer Affinität zur stationären Phase. Dieser Vorgang entspricht einem reversiblen Gleichgewichtsprozess. Durch die spezifische Retardation der Analytmoleküle, können diese chromatographisch voneinander getrennt und schließlich einzeln detektiert werden (Weiß, 2001).

Die zu untersuchenden Xylane bestehen aus neutralen Monomereinheiten und Uronsäuren. Während die Uronsäuren im basischen Milieu des Eluenten über ein Anion verfügen und den beschriebenen Voraussetzungen für eine Trennung entsprechen, sind die übrigen Kohlenhydrate elektrisch neutral. Aufgrund der Vielzahl an Hydroxylfunktionen zeigen sie dennoch eine spezifische Affinität zu den aminierten Säulenmaterialien und können somit auch chromatographisch voneinander getrennt werden (Weiß, 2001).

Für die Detektion der Analyten nach erfolgter Chromatographie wurden verschiedene Verfahren etabliert. Die Messung der Leitfähigkeit des Eluates war dabei von außerordentlicher Bedeutung für die gesamte Entwicklung der Ionenchromatographie (Small et al., 1975) und gilt bis heute als universelles Verfahren für die Analytik von ionisierbaren Verbindungen. Daher ist sie jedoch nicht für Kohlenhydrate geeignet (Weiß, 2001). Eine weitverbreitete Methode für die Detektion von Kohlenhydraten ist die gepulste amperometrische Detektion (PAD) (Hughes et al., 1981; Johnson, 1986; Cataldi et al., 2000). Für die Messung mittels PAD werden an einer Arbeitselektrode drei sich abwechselnde elektrische Potentiale angelegt. Durch die Oxidation beziehungsweise Reduktion der Analyten wird ein Strom erzeugt, der vom Detektor erfasst werden kann. Die zusätzlichen Potentiale bewirken die Entfernung der Produkte aus erster Redoxreaktion, die sich an den Elektroden abgelagert haben. Somit kann eine konstantere Basislinie erzeugt werden (Cataldi et al., 2000). Da die Basislinie jedoch abhängig von der Eluentkonzentration ist, wird bei Gradientenelution häufig eine Drift beobachtet. Außerdem sind die Detektorresponsen spezifisch für jede Verbindung, was reine Standards für die Quantifizierung der Analyten erfordert (Weiß, 2001). Für die in den Xylanen enthaltene mGlcA sind die Standards nicht verfügbar oder müssen sehr aufwendig isoliert werden. Deshalb wird häufig auf nicht-methylierte Glucuronsäure für die Bestimmung der Konzentration zurückgegriffen. Dieses Vorgehen verursacht jedoch Messfehler von bis zu 30%, weshalb die Anwendung alternativer Detektionsmöglichkeiten sehr attraktiv ist (Chong et al., 2013). Bislang ist in der Literatur kein geeignetes Verfahren beschrieben, mit dem die Quantifizierung von mGlcA durch Flüssigchromatographie ohne Standards hoher Reinheit durchgeführt werden kann.

Ein Ansatz für diese Fragestellung ist die Analyse mittels UV-Detektion. Da Kohlenhydrate jedoch keine ungesättigten Bestandteile enthalten, weisen sie auch keine UV-Aktivität auf. Diese Art der Detektion erfordert eine Derivatisierung der Verbindungen, was beispielsweise durch die reduktive Aminierung mit 2-Aminobenzoessäure erreicht werden kann (vgl. 2.4.3). Somit wird ein molarer Detektorrespons erzeugt, der proportional zur Konzentration aber unabhängig von der chemischen Struktur ist. Neben den neutralen Kohlenhydraten kann so zusätzlich die Quantifizierung von mGlcA ermöglicht werden, obwohl keine Standards mit hoher Reinheit zur Verfügung stehen.

2.4.4.2 Borat-Komplex-Anionenaustauschromatographie (Borat-HPAEC)

Bei der Borat-HPAEC handelt es sich um eine Sonderform der HPAEC, die aufgrund ihres Trenn- und Detektionsprinzips hier gesondert beschrieben wird. Als mobile Phase werden Boratpuffer (Kaliumtetraborat/Borsäure) mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Da als stationäre Phase ein starker Anionenaustauscher verwendet wird, können die sauren Hydrolysate ohne weitere Aufarbeitung analysiert werden. Die Kohlenhydrate in den Proben werden zunächst mit der Borsäure des Eluenten komplexiert. Diese Komplexbildung ist aus kinetischer Sicht relativ langsam, was höhere Retentionszeiten als bei herkömmlichen HPAEC-Verfahren zur Folge hat. Die Detektion der Kohlenhydrate erfolgt indirekt, indem das Eluat zusammen mit einer Cu^{2+} -Bicinchoninat-Lösung bei erhöhter Temperatur (105°C) durch ein Teflon[®]-Coil geleitet wird. Bei der Elution eines reduzierenden Kohlenhydrates wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Da die Kupferkomplexe jeweils spezifische UV-Absorptionen aufweisen, kann die Änderung mittels UV/VIS-Detektion gemessen werden. Durch die lange Strecke von der Injektion bis zur Detektion findet jedoch eine Verbreiterung der Peaks statt. Außerdem ist der Anteil der reduzierten Kupfer-Verbindung spezifisch für jedes Kohlenhydrat, weshalb Standards jeder Verbindung notwendig sind. Die Vorteile dieses Verfahrens sind zum einen die hohe Spezifität durch die Ausbildung der Boratkomplexe. Zum anderen kann durch den geringen Aufwand der Probenvorbereitung ein hoher Probendurchsatz erfolgen (Sinner et al., 1975; Weiß, 2001; Willför et al., 2009).

2.4.4.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Im Gegensatz zur Ionenchromatographie werden bei der klassischen HPLC organische oder wässrige Eluenten ohne Salze verwendet (Meyer, 2009). Die chromatographische Trennung von Mono- und Oligosacchariden wird auf verschiedenen stationären Phasen erreicht. So kamen bereits polare HILIC-Materialien (Alpert et al., 1994; Mathon et al., 2017) oder Säulen mit graphitiertem Kohlenstoff (Fan et al., 1994; Westereng et al., 2016) zum Einsatz. Als besonders robust und kompatibel für eine Vielzahl von Eluenten und Analyten haben sich unpolare Umkehrphasen erwiesen (Verhaar et al., 1991; Plemat et al., 2005). Diese Säulenmaterialien beruhen auf einem Gerüst aus Kieselgel, an welches unpolare Kohlenwasserstoffen mit 18 Kohlenstoff-Atomen kovalent gebunden sind. Auch in dieser Arbeit wurden C18-Umkehrphasen für die Trennung von hydroxyalkylierten Kohlenhydraten nach Hydrolyse und reduktiver Aminierung eingesetzt.

Methoden der HPLC sind mit massenspektrometrischen Detektoren kompatibel. Als Kopplungs- und Ionisationselement von der HPLC zum Massenspektrometer ist die Elektrospray-Ionisation (ESI) das am weitesten verbreitete Verfahren. Diese sanfte Methode der Ionisierung ist vor allem für nichtflüchtige Moleküle geeignet, die leicht ionisiert werden können. Um eine akzeptable Ionisation von Kohlenhydraten für die Detektion zu erreichen, hat sich die Derivatisierung der Kohlenhydrate als probates Mittel herausgestellt. Durch die reduktive Aminierung mit 2-AA (vgl. 2.4.3) kann sowohl die negative Ionisation an der Carbonylfunktion als auch die positive Ionisation am Amin erfolgen (Zaia, 2004; Harvey, 2011). Die massenselektive Detektion der Analyten ermöglicht die Bestimmung der Molmassen einzelner Peaks. Da ESI jedoch nicht für eine nennenswerte Fragmentierung der Verbindungen sorgt, sind darüber hinaus keine Strukturinformationen abzuleiten.

Die Bildung von Ionen ist von der Struktur der gesamten Verbindung abhängig. Als Folge dessen kann die Quantifizierung der detektierten Komponenten nur durch den Einsatz reiner Standards erfolgen. Wenn diese nicht zur Verfügung stehen, muss ein weiterer Weg der Detektion gewählt werden. So kann für reduktiv aminierte Kohlenhydrate beispielsweise mit Fluoreszenz-Detektion ein molarer Detektorrespons

erzeugt werden. Mithilfe eines synthetisierten Standards aus reduktiv aminierter Xylose wird die Quantifizierung aller Kohlenhydrate ermöglicht.

3 Arbeitsschema

In der vorliegenden Arbeit sollten Methylglucuronoxylane, pflanzliche Biomasse, Zellstoffe und hydroxyalkylierte Arabinoxylane mit neuen analytischen Verfahren untersucht werden. Die dafür eingesetzten Methoden wurden in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikationen beschrieben (Lorenz et al., 2016; Lorenz et al., 2017a; Lorenz et al., 2017b). Ausgehend von den jeweiligen Ausgangsstoffen sind die dafür gewählten Analysewege und Arbeitsschritte in Abb. 1 dargestellt. Weiterhin sind die Arbeitsanweisungen der jeweiligen Verfahren im Anhang dieser Arbeit wiedergegeben.

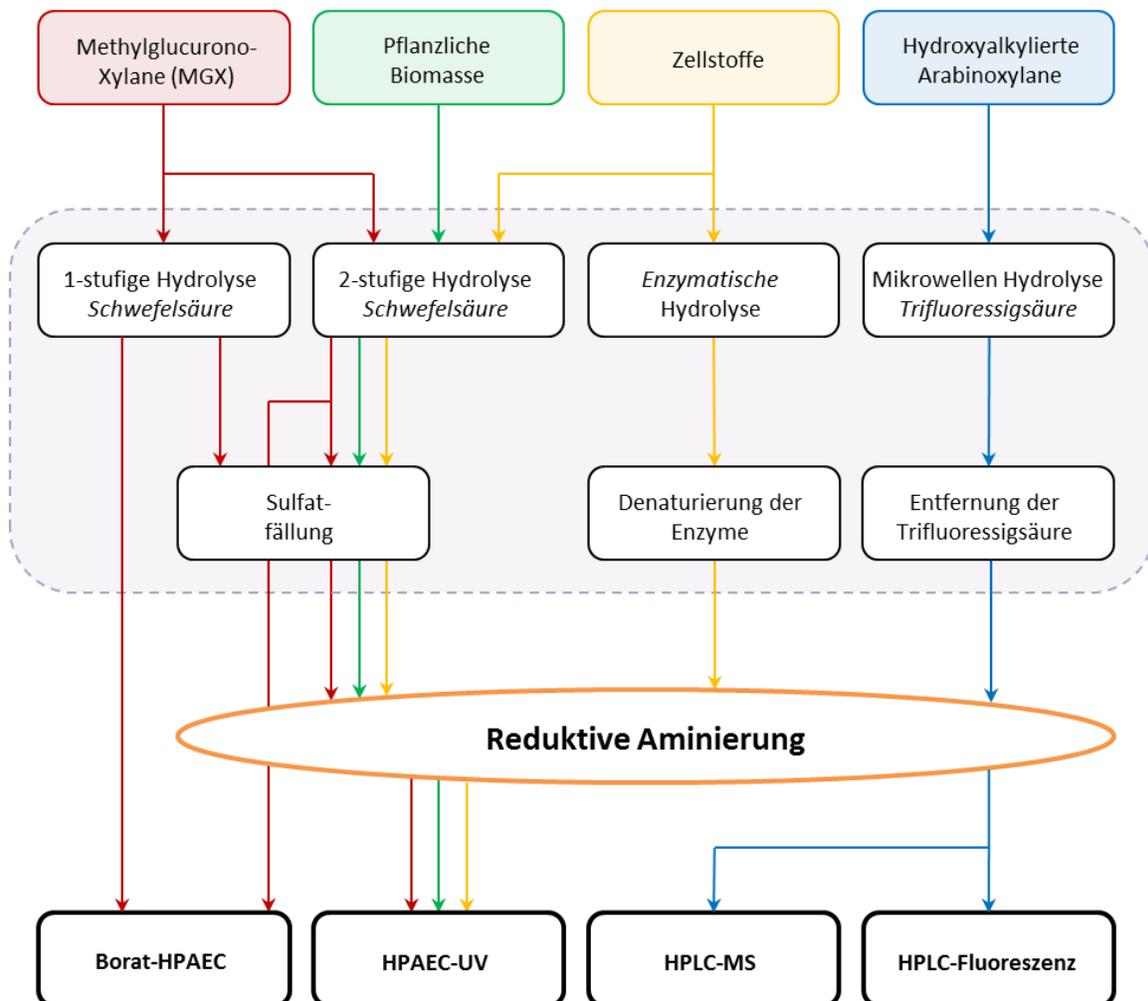


Abb. 1: Arbeitsschritte für die Charakterisierung verschiedener polysaccharidbasierter Ausgangsproben.

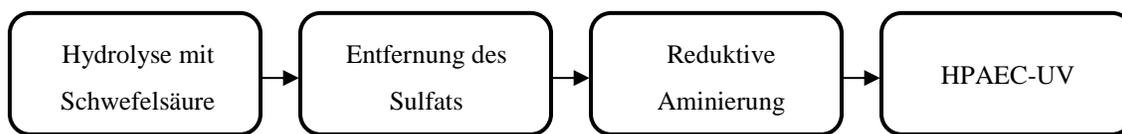
4 Ergebnisse

4.1 Analytik isolierter Methylglucuronoxylane

Für die exakte Analytik von Polysacchariden müssen diese zunächst in kleinere wasserlösliche Bestandteile gespalten werden. Bei vielen Verfahren wird dies mit der Hydrolyse zu Monomeren realisiert, da für die meisten der so erzeugten Verbindungen reine Substanzen zur externen Kalibrierung erhältlich sind. Die vollständige Hydrolyse bewirkt jedoch häufig einen sekundären Abbau der einzelnen Bestandteile. Besonders deutlich wird dies bei Heteropolysacchariden, wie Methylglucuronoxylanen (MGX), die verschiedene Bindungen (α -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch, β -(1 \rightarrow 2)-glycosidisch) mit individuellen Bindungsstärken besitzen. Zusätzlich weisen die jeweiligen Monomere unterschiedliche Stabilitäten gegenüber Säuren und thermischen Einflüssen auf. Die exakte Analytik aller Komponenten kann daher nur mit unterschiedlichen analytischen Verfahren erreicht werden, die für jeden Einzelbestandteil optimiert werden. Da dies aus praktischer Sicht oft nicht realisierbar ist, wird meist ein Kompromiss gewählt, der zulasten der vollständigen Erfassung geht. Eine zusätzliche Schwierigkeit für die Analyse von MGX stellt die exakte Bestimmung von mGlcA dar. Diese erfordert eine arbeits- und zeitaufwendige Isolierung reiner mGlcA für die externe Kalibrierung, da sie nicht kommerziell erhältlich ist. Die Darstellung von mGlcA benötigt jedoch spezielle instrumentelle und fachliche Voraussetzungen wie die präperative Größenausschlusschromatographie (SEC) sowie die Charakterisierung der Eluate mittels NMR-Spektroskopie (Puls et al., 1991). Da diese Techniken für die schnelle Routineanalytik nicht geeignet sind, wurde in der Literatur häufig die Quantifizierung mit nicht-methylierter Glucuronsäure beschrieben. Dadurch wird aber eine Unterschätzung der realen Konzentration um bis zu 30% erzeugt (Chong et al., 2013). Basierend auf diesen Grundlagen werden verschiedene Anforderungen an ein neues analytisches Verfahren gestellt:

- Hydrolyse von empfindlichen Verbindungen bei gleichzeitiger Vermeidung sekundärer Abbaureaktionen
- exakte Quantifizierung aller Komponenten trotz fehlender authentischer und reiner Standards für meGlcA.

Für die nachfolgenden Charakterisierungen wurden isolierte Xylane aus Buchen- und Birkenholz analysiert. Die einzelnen Arbeitsschritte folgten dabei Schema 10.



Schema 10: Arbeitsschritte für die Analytik von MGX.

Das Augenmerk der Analysen lag auf den Bestimmungen der Konzentrationen beider Hauptkomponenten in MGX: Xylose und meGlcA. Um einen möglichst genauen Referenzwert beider Verbindungen zu erhalten, wurden die isolierten Polymere mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert und das molare Verhältnis beider Komponenten ermittelt (Tab. 2).

Tab. 2: Referenzwerte für die molaren Verhältnisse von Xylose und meGlcA, ermittelt mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Für die Bestimmung wurden die Integrale der jeweiligen C1-Signale ausgewertet und die ermittelten Anteile auf 100% Xylose bezogen.

Signal	Chemische	Relativer Anteil	Relativer Anteil
	Verschiebung	Buchenholz MGX	Birkenholz MGX
	[ppm]	[%]	[%]
C1 _{Xyl}	101,5	100,0	100,0
C1 _{meGlcA}	97,5	7,5	5,9

4.1.1 Hydrolyse von MGX

Die Hydrolyse von Polysacchariden hat die Erzeugung kleinerer wasserlöslicher Bestandteile zum Ziel. Generell sollen Monomere freigesetzt werden, die nach

Chromatographie durch eine externe Kalibrierung mit reinen Standards quantifiziert werden können. Da die Spaltung der Polymere hydrolytisch erfolgt, ist die molare Masse der Monomere, verglichen mit den Anhydromonomeren im Polysaccharid, um die Masse von Wasser ($M = 18,02 \text{ g/mol}$) erhöht. Daher wurden alle folgenden Konzentrationen stets als Anhydrozucker berechnet. Durch diese Vorgehensweise wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass eine Monomereinheit jeder Polymerkette nicht als Anhydro-Verbindung vorlag. Bei einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 200 entstand für eine reine Xylosekette somit eine Abweichung von der tatsächlichen molaren Masse von 0,0007%. Da dieser Fehler gering ist, wurde er im Folgenden vernachlässigt.

Die Hydrolyse der MGX sollte mit Schwefelsäure im Autoklaven erfolgen. Grundsätzlich kann dies auf zwei unterschiedlichen Wegen vollzogen werden, die sich nach der Beschaffenheit der Probenmatrix richten. Das 1-stufige Verfahren erfolgt durch Erhitzung der Probenmatrix im Autoklaven mit verdünnter Schwefelsäure (0,5 mol/L) und wird bevorzugt für isolierte Xylane eingesetzt. Bei der 2-stufigen Hydrolyse wird zunächst eine Vorhydrolyse mit 72%iger Schwefelsäure durchgeführt. Diese Methode ist vor allem für komplexere Proben mit einem hohen Anteil kristalliner Cellulose geeignet. Die relativen molaren Verhältnisse von mGlcA zu Xylose wurden mit dem 1-stufigen Verfahren (120°C, 40 min) und nachfolgender Analyse mittels Borat-HPAEC ermittelt (Tab. 3). Dabei erfolgte die Wahl der Hydrolysebedingungen so, dass sie die Freisetzung der höchsten Konzentrationen an Xylose zur Folge hatten.

Tab. 3: Relative Anteile von Xylose und mGlcA, ermittelt nach 1-stufiger H_2SO_4 -Hydrolyse und Borat-HPAEC. Die festgestellten Konzentrationen wurden auf 100% Xylose bezogen.

MGX	Xylose [%]	mGlcA [%]
Buchenholz	100,0	0,8
Birkenholz	100,0	1,0

Der Vergleich mit den Referenzwerten aus ^{13}C -NMR-Spektroskopie (Tab. 2) zeigt jedoch, dass eine deutliche Diskriminierung von mGlcA stattfindet. Mit 1-stufiger

Hydrolyse und Borat-HPAEC können nur 10,7 (Buche) bzw. 16,9% (Birke) der mit NMR-Spektroskopie festgestellten meGlcA-Konzentration bestimmt werden. Ähnliche Beobachtungen sind bereits in der Literatur beschrieben worden (De Ruiter et al., 1992; Tenkanen et al., 1995). Folglich sind die Konditionen der durchgeführten Hydrolyse nicht intensiv genug, um alle α -(1→2)-glycosidischen Bindungen von meGlcA zu Xylose zu spalten.

Die Ermittlung der Bedingungen, bei denen die höchsten Konzentrationen von meGlcA freigesetzt wurden, erfolgte durch Untersuchungen mit 2-stufiger Hydrolyse. Dafür wurden die vorhydrolysierten Xylane im Autoklaven bei 120°C behandelt und die Dauer von 20 bis 90 min variiert. Die Bestimmung der Konzentrationen von Xylose und meGlcA erfolgte mittels Borat-HPAEC und wurden auf die maximal ermittelbare Xylosekonzentration nach 1-stufiger H₂SO₄-Hydrolyse bezogen. Somit erfolgte die Berechnung der jeweiligen molaren Verhältnisse (Abb. 2).

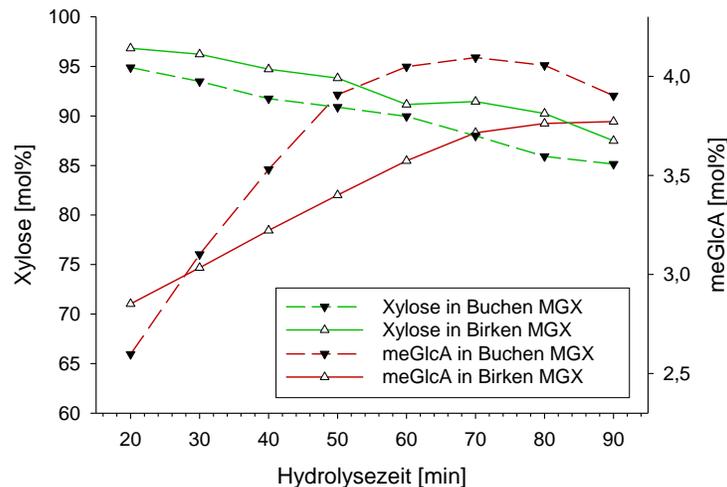


Abb. 2: Untersuchungen der Xylose- und meGlcA-Konzentrationen nach 2-stufiger Schwefelsäurehydrolyse. Die Ergebnisse wurden auf die maximale Konzentration der Xylose nach 1-stufiger Hydrolyse (30 min) bezogen und das molare Verhältnis dargestellt.

Nach 20 min im Autoklaven können in beiden Xylanen rund 5 mol% weniger Xylose ermittelt werden als nach 1-stufiger Hydrolyse. Mit zunehmender Dauer der Nachhydrolyse sinkt der quantifizierbare Xylosegehalt kontinuierlich und erreicht nach 90 min Werte zwischen 85 und 90 mol%. Diese Verringerung der Konzentration

verdeutlicht den sauer katalysierten Abbau der Xylose und gleichzeitig die Notwendigkeit für moderatere Bedingungen während der Hydrolyse. Die Konzentrationen von mGlcA zeigen einen abweichenden Verlauf. Nach kurzen Zeiten im Autoklaven von 20 min können molare Verhältnisse zwischen 2,5 und 3,0 mol% ermittelt werden. Mit Verlängerung der Nachhydrolyse steigt der bestimmbar Gehalt zunächst an und erreicht sein Maximum nach 70 min für Buchenholz MGX und 80 min für Birkenholz MGX. Dieser Anstieg bestätigt die bereits getroffene Vermutung, dass für die Hydrolyse der α -(1→2)-glycosidischen Bindungen von mGlcA zu Xylose mehr Energie notwendig ist als für die Spaltung der β -(1→4)-glycosidischen Bindungen der Xyloseeinheiten in der Hauptkette. Der maximale ermittelbare Anteil von mGlcA in Buchenholz MGX ist 4,0 mol%, der in Birkenholz MGX 3,7 mol%. Verglichen mit den Referenzwerten aus den ^{13}C -NMR-Messungen (Tab. 2), betragen die höchsten Konzentrationen nur 54,6% (Buche) bzw. 63,7% (Birke). Folglich kann trotz optimierter Bedingungen die Konzentration der Uronsäure nach Hydrolyse und Borat-HPAEC nicht quantitativ ermittelt werden. Die wahrscheinlichste Ursache für diese Beobachtung ist, dass durch die intensiven Bedingungen der Hydrolyse bereits ein deutlicher Abbau parallel zur Freisetzung von mGlcA stattfindet. Dieser kann ansatzweise auch in Abb. 2 nachvollzogen werden, da der Anteil von mGlcA in Buchenholz MGX bei langer Reaktionszeit wieder deutlich abnimmt. Weiterhin werden die Maxima der mGlcA-Konzentration in Buchen- und Birkenholz MGX nach unterschiedlichen Hydrolysedauern ermittelt. Bei den jeweils optimalen Bedingungen für mGlcA werden nur 88% (Buche) bzw. 90% (Birke) der höchsten Xylosekonzentration nach 1-stufiger Hydrolyse erfasst. Diese Untersuchungen weisen folglich darauf hin, dass es keine universelle Methode für eine schwefelsaure Hydrolyse von Xylanen gibt. Die quantitative Spaltung der Polymere in Monosaccharide bei gleichzeitiger Vermeidung eines sekundären Abbaus war nicht möglich. Für die Minimierung der Zersetzung muss demzufolge die weniger intensive 1-stufige Hydrolyse durchgeführt werden. Diese resultiert jedoch nicht in der vollständigen Spaltung zu Monomeren, wodurch zusätzlich Oligosaccharide in den Hydrolysaten verbleiben. Aufgrund der bisherigen Beobachtungen müssen diese Oligomere neben Xylose auch mGlcA enthalten.

4.1.2 Entfernung des Sulfats

Nach der säurekatalysierten Hydrolyse der MGX war die Schwefelsäure noch in den erzeugten Hydrolysaten enthalten. Wie in Vorversuchen festgestellt, wirkt sich diese jedoch negativ auf den nachfolgenden Schritt der reduktiven Aminierung aus. Durch einen zu geringen pH-Wert liegt das Derivatisierungsreagenz 2-Aminobenzoesäure vollständig protoniert vor und steht so nicht mehr für die gewünschte Reaktion zur Verfügung (Zapała et al., 2009). Weiterhin bewirken die Sulfationen eine kontinuierliche Veränderung der Retentionszeiten während der Chromatographie mittels HPAEC (Davis, 1998). Diese haben eine hohe Affinität zu den Aminen des Säulenmaterials und stehen in Konkurrenz zu den Analyten. Nach jedem Trennungsgang wäre somit ein zeitintensives Spülen notwendig, um eine gleichbleibende Säulenqualität und konstante Retentionszeiten zu garantieren.

Um die Sulfationen aus den Hydrolysaten zu entfernen, wurde eine Fällungsreaktion mit Bariumhydroxid durchgeführt (Schema 11).



Schema 11: Reaktionsgleichung der Fällung von Sulfat als Bariumsulfat.

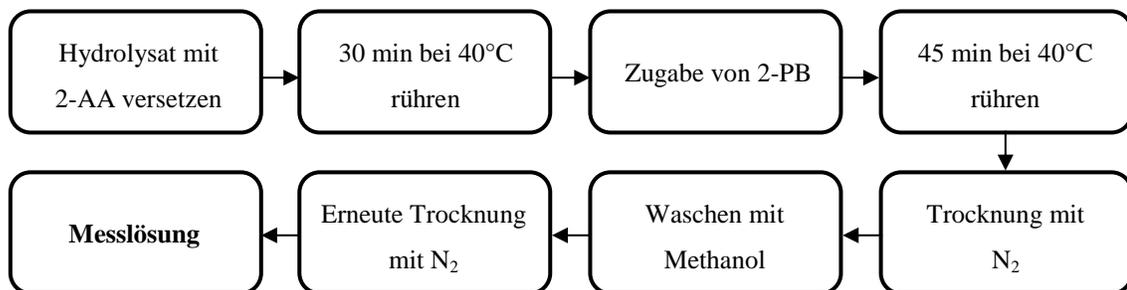
Das gebildete Bariumsulfat ist unlöslich in Wasser und konnte durch Zentrifugieren und Dekantieren entfernt werden. Für die vollständige Überführung der Kohlenhydrate wurde der Rückstand jeweils dreimal mit Wasser gewaschen und nach Zentrifugation erneut dekantiert. Der Einfluss der Sulfatfällung auf die Wiederfindungsraten ist zusammenfassend in Abb. 7 dargestellt.

4.1.3 Reduktive Aminierung

Mit dem neuen analytischen Verfahren sollten Verbindungen quantifiziert werden, für die keine reinen Standards zur externen Kalibrierung vorlagen. Dies waren insbesondere mGlcA und mGlcA-Oligomere. Durch Detektion nach einer Chromatographie kann das nur ermöglicht werden, wenn die Signalintensitäten abhängig von der molaren Konzentration aber unabhängig von den chemischen Strukturen sind. Um solch einen

molaren Detektorrespons zu erzeugen, müssen die Kohlenhydrate durch Derivatisierung mit Eigenschaften versehen werden, die sie im nativen Zustand nicht aufweisen. Dazu zählen eine spezifische UV-Absorption und die Fähigkeit der Fluoreszenz. Beides kann durch die Markierung der Kohlenhydrate an den reduzierenden Enden durch reduktive Aminierung erreicht werden. Neben dem weitverbreiteten Einsatz von 2-Aminobenzoessäure (2-AA) als Derivatisierungsreagenz konnte von Unterrieser et al. (2011) ebenfalls die Verwendung des 2-Picolinboran-Komplexes (2-PB) als Reduktionsmittel etabliert werden. Dieses ist, aufgrund seiner deutlich geringeren Toxizität bei ähnlicher Effizienz der Reduktion, gegenüber konventionellen Substanzen wie Natriumcyanoborhydrid zu bevorzugen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die reduktive Aminierung in Anlehnung an Mischnick et al. (2013). Schema 12 verdeutlicht die einzelnen Arbeitsschritte.



Schema 12: Reduktive Aminierung von hydrolysierten MGX.

Durch dieses Verfahren sollte die Quantifizierung aller relevanten Komponenten ermöglicht werden. Da Kohlenhydrate selbst keine spezifische UV-Absorption aufweisen, wurde dies unter Verwendung des Derivatisierungsreagenzes 2-AA als externen Standard erreicht.

4.1.3.1 Chromatographische Trennung

Die chromatographische Trennung der hydrolysierten und reduktiv aminierten MGX erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (HPAEC). Dafür wurde die analytische Trennsäule CarboPack PA200 eingesetzt, die ein Harz mit quaternären Ammoniumionen enthält. Sowohl neutrale als auch anionische Kohlenhydrate wiesen

eine Affinität zum gewählten Säulenmaterial auf und können folglich zurückgehalten werden.

Da zu erwarten ist, dass die Retention reaktiv aminierte Kohlenhydrate aufgrund ihrer Carboxylfunktion stark ausgeprägt ist, sind Eluenten mit entsprechend starken Anionenaustauschereigenschaften notwendig. Grundsätzlich empfiehlt sich für diese Zwecke eine Natriumhydroxid-Lösung. Da die Analyten zum Teil instabil unter basischen Bedingungen sind, sollte deren Exposition gegenüber hohen NaOH-Konzentrationen minimiert werden. Zusätzlich wird für den Gradienten der Chromatographie auch Wasser und Natriumacetat (NaOAc) eingesetzt. Um die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen in den jeweiligen Trennungsgängen konstant zu halten, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das ganze System nach jeder Messung intensiv zu spülen und zu konditionieren. Der Gradient für die Chromatographie mittel HPAEC ist in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Gradient für die chromatographische Trennung hydrolysierte und reaktiv aminierte MGX mit den Eluenten Wasser (A) und 1 M NaOAc in 200 mM NaOH (B). Flussrate: 0,4 mL/min.

Retentionszeit [min]	Anteil Eluent A [%]	Anteil Eluent B [%]
0	92,5	7,5
30	92,5	7,5
75	40,0	60,0
100	40,0	60,0
105	92,5	7,5
135	92,5	7,5

Die Detektion der eluierten Verbindungen erfolgte durch die Messung der spezifischen UV-Absorption. Für 2-AA wurden insgesamt drei Absorptionsmaxima mit den Wellenlängen $\lambda_1 = 210$ nm, $\lambda_2 = 247$ nm und $\lambda_3 = 309$ nm detektiert. Die höchste Absorption wurde bei λ_1 gemessen. Da es bei dieser Wellenlänge starke Interferenzen mit dem in Eluent B enthaltenen NaOAc gab, konnte λ_1 nicht für die Quantifizierung verwendet werden. Die UV-Absorption mit mittlerer Intensität (λ_2) hatte stark ansteigende und abfallende Flanken und konnte somit potentiell größere Messfehler hervorrufen. Daher

wurde für alle Messungen von 2-AA die Intensität der Wellenlänge λ_3 detektiert. Durch Detektion mit einem Dioden-Array-Detektor konnte festgestellt werden, dass die Maxima der UV-Absorption von reaktiv aminierten Kohlenhydraten leicht verschoben waren. Für die Detektion der Analyten wurde daher die Intensität der Wellenlänge $\lambda = 328$ nm gemessen.

Das erzeugte Chromatogramm aus isolierten Standards zeigt eine gute Trennung der meisten untersuchten Verbindungen (Abb. 3).

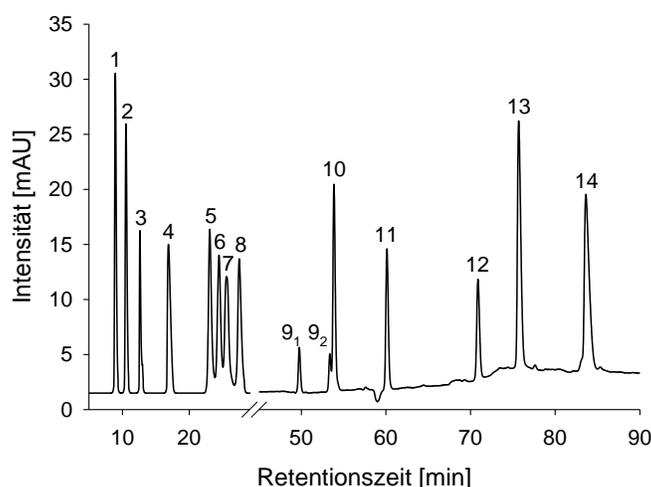


Abb. 3: HPAEC-UV-Chromatogramm isolierter Standards nach reduktiver Aminierung, gemessen bei $\lambda = 328$ nm. Zuordnung der Peaks: 1: Xylohexaose 2: Xylopentaose 3: Xylotetraose 4: Xylotriase 5: Xylose 6: Galactose 7: Glucose/Xylobiose 8: Arabinose 9₁: meGlcA-X₃-1 9₂: meGlcA-X₃-2 10: meGlcA-X 11: meGlcA-X₂ 12: meGlcA 13: Galacturonsäure 14: Glucuronsäure.

Bei relativ niedrigen Retentionszeiten werden neutrale Xylooligomere mit abnehmender Kettenlänge detektiert, gefolgt von neutralen Monomeren. Uronsäuren und Oligomere mit Uronsäuren als Substituent können erst nach deutlich längeren Retentionszeiten erfasst werden. Für die Affinität der Analyten zum Säulenmaterial und somit für die Elutionsreihenfolge stehen sich zwei Prinzipien gegenüber. Zum einen ist dies der anionische Charakter der gesamten reaktiv aminierten Verbindung, der mit zunehmender Kettenlänge geringer wird. Zum anderen steigt die Affinität mit höherem Polymerisationsgrad (DP), aufgrund der vielen zusätzlichen Hydroxylgruppen, an.

Der Einfluss beider Prinzipien konnte mit der Darstellung der Retentionszeit (t_R) als Funktion des DP veranschaulicht werden (Abb. 4).

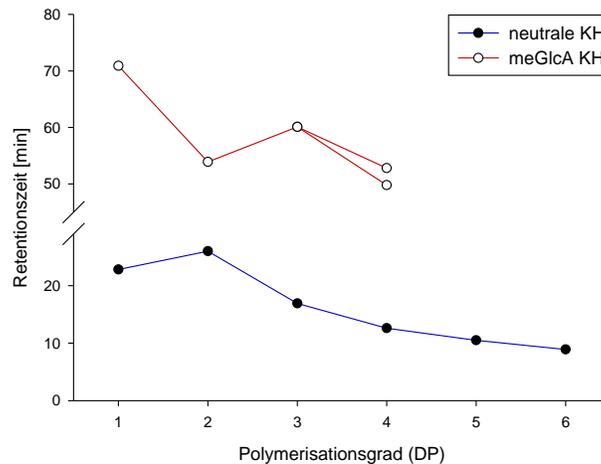


Abb. 4: Retentionszeiten neutraler und saurer (meGlcA) Kohlenhydrate (KH) in Abhängigkeit des DP nach reduktiver Aminierung.

Bei den neutralen Hydrolyseprodukten mit $DP = 1$ und $DP = 2$ bewirkt die größere Anzahl der Hydroxylgruppen einen leichten Anstieg der t_R . Mit steigendem DP überwiegt die Verringerung des anionischen Charakters und die t_R sinken kontinuierlich ab. Während der Zusammenhang zwischen t_R und DP für die neutralen Verbindungen somit erklärt werden kann, ist dies für Komponenten mit meGlcA als Bestandteil nur bedingt möglich. Zwischen $DP = 1$ und $DP = 2$ sinkt zunächst die t_R deutlich und steigt für $DP = 3$ wieder an. Bei höheren DP verringert sich die t_R erneut, wobei dieser Abfall auch für höhere Polymerisierungsgrade zu erwarten ist. Grundsätzlich werden Verbindungen mit meGlcA als Bestandteil stärker retardiert, wodurch diese auch längere t_R aufweisen. Die Ursache für diese Beobachtung liegt darin, dass die reduktiv aminierte Kohlenhydrate jeweils zwei Carboxylgruppen enthalten und daraus eine deutlich höhere Affinität zur Trennsäule resultiert.

Die meGlcA enthaltenen Standards mit $DP = 1$ bis $DP = 4$ wurden nach saurer Hydrolyse von MGX und anschließender präparativer Aufreinigung gewonnen (Puls et al., 1988). Für die Verbindung meGlcA- X_2 ($DP = 3$) sind theoretisch Isomere möglich bei denen meGlcA sowohl an der reduzierenden als auch der nicht-reduzierenden Xylose-Einheit

gebunden sein kann. Durch Untersuchungen von Cavagna et al. (1984) konnte jedoch gezeigt werden, dass durch saure Hydrolyse das Isomer mit meGlcA am C2 einer nicht-reduzierenden Xylose-Einheit mit einem Anteil von 97% erzeugt wurde. Somit trägt diese Konstitution zu einer Stabilisierung der glycosidischen Bindung bei. Eine Bestätigung dieser Erkenntnisse erfolgte durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, da ebenfalls nur ein Isomer des Standards meGlcA-X₂ detektiert wurde. Das Tetramer meGlcA-X₃ liefert hingegen Hinweise auf die Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Verbindungen (Abb. 3).

Für eine Überprüfung der Signale wurde der entsprechende Standard zusätzlich mittels HPLC-MS analysiert (Abb. 5).

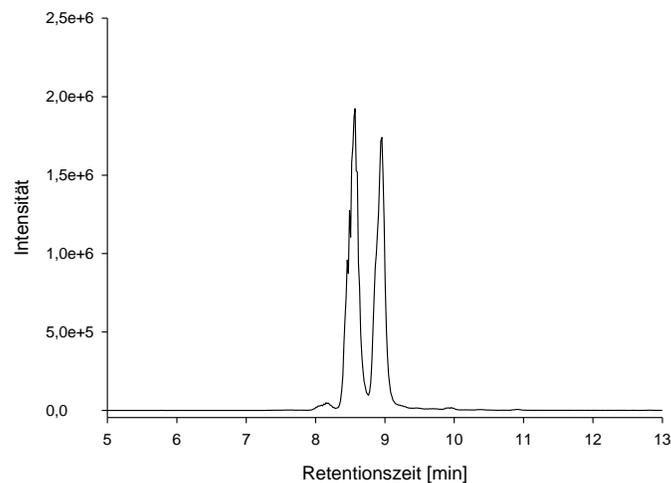


Abb. 5: Chromatogramm des meGlcA-X₃ Standards, gemessen mittels HPLC-MS. Dargestellt ist die monoisotopische Masse der reaktiv aminierten Verbindung: $M_{mi} = 726,2462$ g/mol.

Diese Untersuchung bestätigt das Vorhandensein von hauptsächlich zwei Isomeren für die Verbindung meGlcA-X₃. Aufgrund der vorangegangenen Erläuterungen kann geschlussfolgert werden, dass diese Isomere durch die Oligosaccharide mit meGlcA am nicht-reduzierenden Ende sowie der intermediären Xyloseeinheit dargestellt werden.

4.1.3.2 Optimierung der reduktiven Aminierung

Nach Ermittlung der idealen Parameter für die chromatographische Trennung aller relevanten Komponenten wurden die Bedingungen der reduktiven Aminierung optimiert. Dafür erfolgte die Zugabe von 2-AA und 2-PB in variablen Mengen, um die höchsten Wiederfindungsraten (WFR) zu erhalten. Für die Optimierungen wurde Xylose als Modellsubstanz untersucht (Abb. 6).

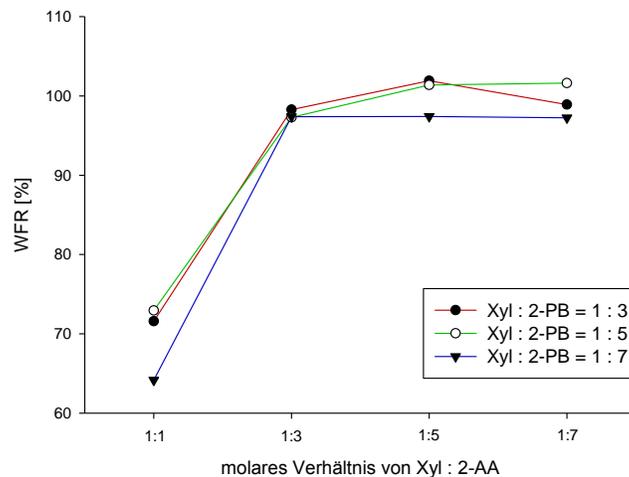


Abb. 6: Bestimmung der WFR für die Optimierung der 2-AA- und 2-PB-Konzentrationen zur reduktiven Aminierung und Messung mittels HPAEC-UV.

Mit einem molaren Verhältnis von 1:1 von Xylose zu 2-AA werden WFR zwischen 64,2 und 72,9% erreicht. Eine quantitative Umsetzung mit WFR von rund 100% kann erst mit einem molaren Verhältnis von 1:3 ermöglicht werden. Bei noch höheren Konzentrationen von 2-AA sind keine relevanten Änderungen der WFR zu beobachten. Der zweite entscheidende Parameter ist das Verhältnis von Xylose zum Reduktionsmittel 2-PB. Für die molaren Verhältnisse 1:3 und 1:5 sind signifikante Unterschiede feststellbar. Die ermittelten WFR für das Verhältnis 1:7 liegen jedoch stets unterhalb der WFR nach Umsetzung mit geringeren Anteilen an 2-PB. Eine mögliche Ursache ist die verstärkte Reduktion der Xylose zum Zuckeralkohol Xylit.

Mit den ermittelten Parametern für die quantitative Umsetzung der Xylose wurden im Folgenden die WFR aller bislang untersuchten Kohlenhydrate bestimmt. Dabei sollte der gesamte Prozess der Probenaufarbeitung mit eingeschlossen werden. Zu den Standards wurde daher so viel Schwefelsäure gegeben wie nach einer 1-stufigen Hydrolyse in den

Hydrolysaten enthalten wäre. Im Anschluss erfolgte die Entfernung des Sulfats mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ gefolgt von reduktiver Aminierung und Analyse der Proben mittels HPAEC-UV (Tab. 5).

Tab. 5: Ermittelte WFR aller untersuchten Kohlenhydrate nach Entfernung des Sulfats, reduktiver Aminierung und Messung mittels HPAEC-UV.

Verbindung	WFR [%]
Xylohexaose	55,6 ± 14,0
Xylopentaose	82,2 ± 0,2
Xylotetraose	83,2 ± 1,6
Xylotriase	90,3 ± 1,1
Xylobiose	93,4 ± 1,3
Xylose	95,9 ± 1,7
Galactose	100,7 ± 2,6
Glucose	95,9 ± 1,7
Arabinose	102,6 ± 3,1
meGlcA	94,3 ± 5,0
meGlcA-X	109,9 ± 3,6
meGlcA-X ₂	104,0 ± 3,0
meGlcA-X ₃	69,2 ± 3,6
Galacturonsäure	98,1 ± 3,4
Glucuronsäure	103,0 ± 3,2

Bei neutralen Xylooligomeren bis hin zu monomerer Xylose ist ein stetiger Anstieg der ermittelten WFR mit abnehmender Kettenlänge zu beobachten. Der höchste Wert dieser Reihe ist dabei mit 95,9% für Xylose ermittelt worden. Scheinbar sinkt mit steigendem DP auch die Reaktivität der Kohlenhydrate. Die WFR der neutralen Monomere befinden sich alle in einem Bereich zwischen 95,9 und 102,6%. Mit Ausnahme von meGlcA-X₃ haben die WFR für Kohlenhydrate mit meGlcA als Bestandteile Werte um 100%. Für die Verbindungen Galacturonsäure und Glucuronsäure sind die WFR ebenfalls um 100%.

Somit können alle untersuchten Kohlenhydrate quantitativ umgesetzt werden, ausgenommen die Xylooligomere ab einem DP von 3.

Um mögliche Fehler während der Probenaufarbeitung einschätzen zu können, wurden die Konzentrationen von Xylose und meGlcA nach den einzelnen Arbeitsschritten ermittelt (Abb. 7).

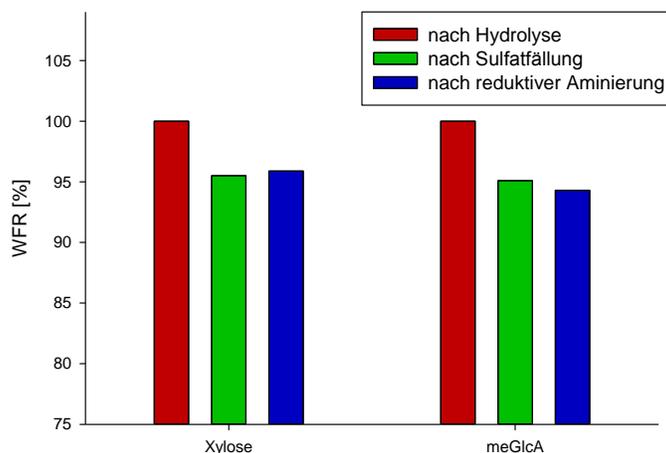


Abb. 7: WFR der Analyten Xylose und meGlcA nach Sulfatfällung und reduktiver Aminierung. Die Konzentrationen nach Hydrolyse wurden auf 100% normiert. Konzentrationen nach reduktiver Aminierung wurden mit HPAEC-UV ermittelt, die übrigen mit Borat-HPAEC.

Für beide Verbindungen bewirkt die Fällung des Sulfats einen Verlust der Analyten von rund 5%. Dieser kann durch die Inklusion in den Partikeln des ausgefällten BaSO_4 erklärt werden. Trotz intensiven Waschens gelang es nicht, diese Einschlüsse zurückzugewinnen. Es bestand die Vermutung, dass meGlcA aufgrund der Carboxylgruppe bevorzugt eine Bindung mit Ba^{2+} eingeht und somit im Übermaß aus den Hydrolysaten entfernt wird. Durch die gezeigten Ergebnisse kann dies jedoch ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zur Fällung bewirkt die reduktive Aminierung keinen signifikanten Analytverlust.

4.1.3.3 Statistische Parameter für die Analytik von MGX

Für die Bewertung der Ergebnisse realer Proben wurden statistische Kenngrößen ermittelt. Diese waren die Detektionsgrenze (*limit of detection*, LOD), die

Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) und der Variationskoeffizient (*coefficient of variation*, COV). Um die Parameter der neuen Methode (Tab. 7) einordnen zu können, wurden diese mit dem Standardverfahren Borat-HPAEC verglichen (Tab. 6).

Tab. 6: Statistische Parameter LOD, LOQ und COV für die Bestimmung verschiedener Kohlenhydrate mittels Borat-HPAEC mit drei unabhängigen Analysen.

Verbindung	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	COV [%]
Arabinose	1,15	3,52	6,02
Xylose	0,22	0,73	1,12
Galactose	0,58	1,88	2,98
Glucose	0,42	1,39	2,01
meGlcA	0,73	2,34	3,75

Tab. 7: Statistische Parameter LOD, LOQ und COV für die Bestimmung verschiedener Kohlenhydrate mittels HPAEC-UV mit drei unabhängigen Analysen.

Verbindung	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]	COV [%]
Arabinose	0,05	0,15	6,40
Xylose	0,05	0,16	5,60
Galactose	0,06	0,19	6,12
Glucose	0,11	0,33	10,11
meGlcA	0,19	0,58	6,02
meGlcA-X	0,18	0,58	3,47
meGlcA-X ₂	0,18	0,59	3,67
meGlcA-X ₃	0,15	0,47	9,45
GlcA	0,12	0,37	10,64
GalA	0,08	0,26	7,80

Die ermittelten Parameter LOD und LOQ sind deutlich niedriger bei Analyse mit HPAEC-UV - für Arabinose sogar um den Faktor 23. Demzufolge ist die neue Methode empfindlicher als das konventionelle Verfahren mit Borat-HPAEC. Im Gegensatz dazu sind die Variationskoeffizienten nach Hydrolyse, reduktiver Aminierung und Messung

mit HPAEC-UV höher als mit der Borat-HPAEC Methode. Diese größere Streuung der ermittelten Konzentrationen ist auf die hohe Anzahl einzelner Arbeitsschritte zurückzuführen, die zusätzliche Fehlerquellen beinhalten.

4.1.3.4 Quantitative Auswertung

Mit der in den vorangegangenen Kapiteln entwickelten Methode wurden reale Proben untersucht. Als Probenmatrix dienten dafür isolierte MGX aus Buchen- und Birkenholz. Exemplarisch sind die erhaltenen Chromatogramme von Buchenholz MGX dargestellt (Abb. 8). Dafür erfolgten je eine 1-stufige Hydrolyse und eine 2-stufige Hydrolyse. Die Bedingungen für letztere wurden so gewählt, um die höchste Konzentration freier meGlcA zu erhalten (vgl. Abb. 2).

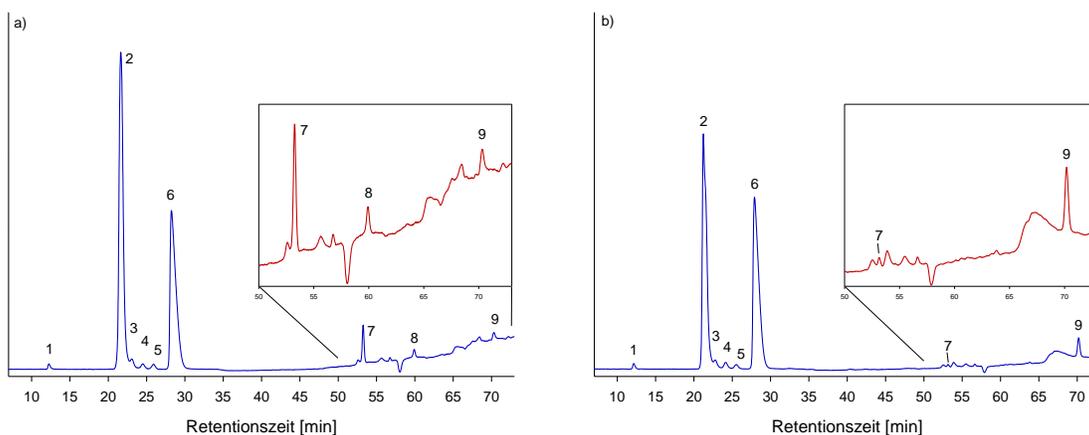


Abb. 8: Chromatogramme eines partiell hydrolysierten und reaktiv aminierten Buchenholz MGX nach 1-stufiger (a) und 2-stufiger Hydrolyse (b). Die Chromatogramme wurden nach reaktiver Aminierung und Messung mit HPAEC-UV erstellt. Folgende Verbindungen wurden detektiert: 1: 4-Aminobenzoesäure (Interner Standard), 2: Xylose, 3: Galactose, 4: Glucose, 5: Arabinose, 6: 2-AA (UV-Label), 7: meGlcA-X, 8: meGlcA-X₂, 9: meGlcA.

Im Chromatogramm des einstufig hydrolysierten Buchenholz-MGX (Abb. 8 a) sind die neutralen Monomere Xylose, Galactose, Glucose und Arabinose enthalten. Xylose ist dabei die dominierende Komponente. Im weiteren Verlauf werden die Oligosaccharide meGlcA-X sowie meGlcA-X₂ und schließlich monomere meGlcA detektiert, wobei das Dimer die Verbindung mit der höchsten Konzentration darstellt. Nach 2-stufiger

Hydrolyse (Abb. 8 b) ist der Peak freier meGlcA der intensivste der sauren Verbindungen in diesem Chromatogramm. Es können weiterhin kleine Mengen von meGlcA-X detektiert werden. Dies bestätigt die Annahme, dass die 2-stufige Hydrolyse von MGX selbst bei maximaler meGlcA-Ausbeute nicht quantitativ erfolgte.

Die Quantifizierung der Kohlenhydrate in den MGX erfolgte durch externe Kalibrierung mit 2-AA als Standard sowie 4-Aminobenzoessäure als internen Standard (IST). Durch die Division beider Peakflächen (PF) im Chromatogramm wurde für jede Konzentration der Kalibrierung ein Peakflächenverhältnis (PFV) berechnet. In den Chromatogrammen der MGX erfolgte die Ermittlung der PF von Xylose und meGlcA sowie der beschriebenen Oligosaccharide. Die Berechnung der PFV gelang durch Berücksichtigung des zugegebenen IST. Mit diesen PFV und unter Zuhilfenahme der PFV aus der Kalibration konnten nun die molaren Konzentrationen jeder Verbindung bestimmt werden. Aus den Oligosacchariden wurde weiterhin die Stoffmenge der einzelnen Monomere Xylose und meGlcA ermittelt. Die Summe aller Xylosebestandteile diente als Bezugsgröße und die übrigen Komponenten konnten auf diesen Wert bezogen werden. Mit dieser Vorgehensweise erfolgte die Ermittlung der molaren Verhältnisse von Xylose und meGlcA in Buchen- und Birken-MGX aus den Monomeren sowie den Oligosacchariden. Weiterhin wurde der Referenzwert aus der ^{13}C -NMR-Spektroskopie (Tab. 2) in nachfolgender Grafik eingefügt, um die Richtigkeit der neuen Ergebnisse zu bewerten (Abb. 9).

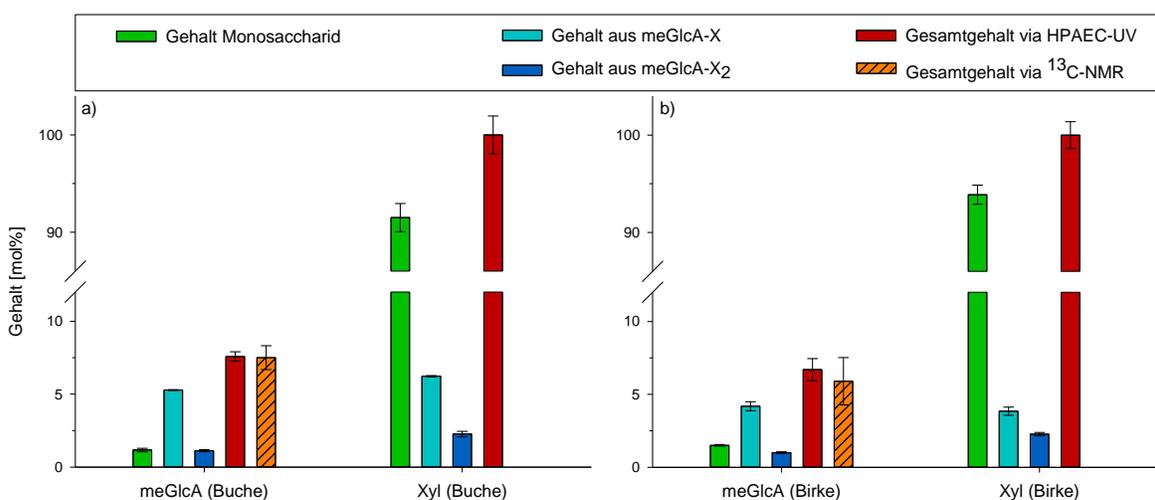


Abb. 9: Molare Anteile von meGlcA und Xylose aus den Mono- und Oligosacchariden in Buchen- (a) und Birken-MGX (b). Die Gehalte wurden mittels HPAEC-UV bestimmt und auf die jeweilige maximale Xylose Konzentration bezogen.

Die untersuchten MGX aus Birken- und Buchenholz weisen ähnliche Verteilungen von mGlcA und Xylose bezüglich ihrer einzelnen Bausteine auf. Die größten Mengen von Xylose liegen als Monomer vor und stellen zwischen 91,5 (Buche) und 93,9 mol% (Birke) der absoluten Menge dar. Weiterhin enthalten auch die noch vorhandenen Oligomere signifikante Anteile Xylose und tragen somit zu einer Erhöhung der quantifizierten Gehalte nach 1-stufiger Hydrolyse bei. Für monomere mGlcA können nur geringe molare Anteile von 1,2 (Buche) und 1,5 mol% (Birke) nachgewiesen werden. Der mit Abstand größte Gehalt ist mit 5,3 (Buche) und 3,8 mol% (Birke) noch im Dimer mGlcA-X gebunden. Weiterhin stellt auch mGlcA aus dem Trisaccharid mGlcA-X₂ einen signifikanten Beitrag zu den gesamten Konzentrationen dar. Diese belaufen sich auf 7,6 (Buche) und 6,7 mol% (Birke). Der Vergleich mit den Referenzwerten aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigt eine hohe Ähnlichkeit beider Werte. Die molaren Gehalte sind nach HPAEC-UV für beide MGX jedoch etwas höher und weisen ein geringeres Vertrauensintervall auf.

4.1.4 Zusammenfassung zur Analytik der MGX

MGX sind Heteropolysaccharide deren exakte und vollständige Analytik eine herausfordernde Aufgabe darstellt. Aufgrund fehlender Standards kann der Anteil von mGlcA mit üblichen flüssigchromatographischen Methoden bislang nur indirekt erfasst werden, wodurch ein signifikanter Messfehler entsteht. Ein weiterer kritischer Aspekt der quantitativen Analytik ist es, eine vollständige Hydrolyse ohne signifikante Zersetzung der Analyten durchzuführen. Daher wurde in dieser Arbeit das Verhalten der MGX aus Buchen- und Birkenholz während der Hydrolyse intensiv erforscht. So konnte festgestellt werden, dass die α -(1→2)-glycosidischen Bindungen von mGlcA zu Xylose deutlich stärker sind als die β -(1→4)-glycosidischen Bindungen der Xylanhauptkette. Die notwendigen intensiven Bedingungen für eine komplette säurehydrolytische Spaltung sorgen jedoch für den teilweisen strukturellen Abbau von mGlcA und Xylose. Es ist somit unmöglich, eine vollständige Hydrolyse der MGX zu monomeren Bestandteilen zu erreichen, ohne diese teilweise zu zersetzen. Als Konsequenz aus diesen Erkenntnissen muss eine schwächere partielle Hydrolyse durchgeführt werden, die neben Monomeren

auch Oligosaccharide mit mGlcA als Bestandteil erzeugt. Die Quantifizierung aller so freigesetzten Verbindungen wird durch die reduktive Aminierung mit 2-AA und 2-PB ermöglicht, da somit durch UV-Detektion nach HPAEC ein molarer Detektorrespons erzeugt werden kann. Mit dieser Vorgehensweise können die Konzentrationen aller Verbindungen mit 2-AA als externen Standard bestimmt werden. Die erfassten Oligosaccharide mit mGlcA-Bausteinen als Bestandteil tragen zu einer deutlichen Erhöhung des bestimmbar Anteils von Xylose und mGlcA bei. Weiterhin sind die so ermittelten Konzentrationen des gesamten mGlcA-Gehaltes in guter Übereinstimmung mit den Referenzwerten, die zuvor mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie festgestellt wurden. Die mit dem neuen Verfahren gewonnenen Ergebnisse weisen hingegen eine geringere Fehlerstreuung auf.

4.2 Analytik von Zellstoffen und Biomasse

Für die unter 3.1 entwickelte Methode zur Analytik von isolierten Xylanen sollte im Folgenden geprüft werden, ob diese auch auf komplexere Rohstoffe anwendbar ist. Dafür wurden xylanhaltige Zellstoffe und pflanzliche Biomasse untersucht. Für diese Materialien sind, aufgrund der vernetzten Strukturen, keine 1-stufigen Hydrolysen mit verdünnter Schwefelsäure möglich. Um eine verbesserte Zugänglichkeit der Säure zu den einzelnen Fasern und den kristallinen Bereichen der Cellulose zu erreichen müssen diese in einer Vorhydrolyse gequollen und zu Oligomeren hydrolysiert werden. Während der Nachhydrolyse im Autoklaven erfolgt dann die Spaltung zu den quantifizierbaren Mono- und Oligosacchariden.

4.2.1 Bestimmung von Kohlenhydraten in Zellstoffen

Für die Abschätzung des Einflusses der intensiveren Hydrolyse auf den Gehalt der quantifizierbaren Kohlenhydrate wurden ausgewählte Zellstoffe sowohl 2-stufig mit Schwefelsäure als auch enzymatisch hydrolysiert. Letzteres ist ein besonders schonendes Verfahren und kann ohne weitere Zersetzung der Kohlenhydrate durchgeführt werden. Für den Vergleich beider Hydrolysetechniken wurden alle relevanten Kohlenhydrate mit den beiden Methoden HPAEC-UV nach reduktiver Aminierung sowie Borat-HPAEC analysiert. Zusätzlich erfolgte die Ermittlung der Hydrolyserückstände und der Summen aller Komponenten (Tab. 8). Die eingesetzten Enzymlösungen enthielten Fructose und Glucose, sowie Spuren von Rhamnose, Mannose und Galactose. Die jeweiligen Konzentrationen wurden mittels Borat-HPAEC ermittelt und mit den Kohlenhydratgehalten in den Zellstoffen verrechnet.

Tab. 8: Analyse von Zellstoff-Hydrolysaten nach enzymatischer (EH) und 2-stufiger Säurehydrolyse (SH) sowie reduktiver Aminierung mittels HPAEC-UV. Es wurden nach dem Kraft-Verfahren (KP) sowie nach dem Sulfit-Verfahren (SP) gewonnene Zellstoffe untersucht. Außerdem wurde zwischen gebleichten (**B**) und ungebleichten Zellstoffen unterschieden.

Zellstoff <i>Method</i>	Hydro- <i>lyse</i>	Gehalt der Anhydromonomere [wt.%]						Rückst.	Summe
		Glc	Xyl	Ara	Man	GalA	meGlcA		
Fichte KP	EH	63,8	5,6	n.d.	3,8	0,3	0,7	5,4	79,6
<i>HPAEC-UV</i>	SH	74,5	6,7	0,3	5,6	0,3	0,3	6,4	94,1
Fichte KP	EH	63,8	5,0	0,3	4,6	n.d.	0,4	5,4	79,5
<i>Borat-HPAEC</i>	SH	77,3	6,3	n.d.	6,1	n.d.	n.d.	6,4	96,1
Fichte BKP	EH	73,6	6,0	n.d.	4,5	n.d.	0,6	5,8	90,5
<i>HPAEC-UV</i>	SH	78,0	8,0	0,1	5,0	0,2	n.d.	0,7	92,0
Fichte BKP	EH	74,8	6,7	0,3	5,3	n.d.	n.d.	5,8	92,9
<i>Borat-HPAEC</i>	SH	80,7	7,2	0,5	5,7	n.d.	n.d.	0,7	94,8
Buche KP	EH	60,1	20,7	n.d.	0,5	1,0	0,9	3,0	86,2
<i>HPAEC-UV</i>	SH	65,6	20,2	n.d.	0,4	1,1	0,4	2,4	90,1
Buche KP	EH	62,6	18,4	n.d.	0,3	n.d.	0,8	3,0	85,1
<i>Borat-HPAEC</i>	SH	65,8	20,8	0,1	0,4	n.d.	n.d.	2,4	89,5
Buche BSP	EH	73,8	8,7	n.d.	1,0	n.d.	0,6	7,2	91,3
<i>HPAEC-UV</i>	SH	80,4	8,4	0,2	1,3	0,3	n.d.	0,7	91,3
Buche BSP	EH	74,9	9,1	n.d.	1,4	n.d.	0,6	7,2	93,2
<i>Borat-HPAEC</i>	SH	82,3	9,5	n.d.	1,6	n.d.	n.d.	0,7	94,1

Alle Zellstoffe enthalten Glucose, Xylose und Mannose. Arabinose und meGlcA sind teilweise in sehr geringen Konzentrationen vorhanden, die nicht in allen Proben oberhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Galacturonsäure (GalA) kann nicht mittels Borat-HPAEC erfasst werden. In einigen Hydrolysaten ist aber der Nachweis mit HPAEC-UV nach reduktiver Aminierung möglich.

In allen Proben und mit beiden Analyseverfahren sind die ermittelten Konzentrationen der Glucose nach enzymatischer Hydrolyse deutlich geringer, verglichen mit der 2-stufigen Säurehydrolyse. Die Fichtenzellstoffe haben nach saurer Hydrolyse ebenfalls höhere Gehalte an Xylose als nach enzymatischer Behandlung. Deutlich ausgeglichener zwischen beiden Hydrolysearten sind die Xylosegehalte hingegen in den untersuchten Buchenzellstoffen. Gegenläufig zum beobachteten Trend der neutralen Zucker beinhalten die enzymatischen Hydrolysate höhere Gehalte an mGlcA. Nach saurer Hydrolyse liegt mGlcA nur in zwei Zellstoffen (Fichte KP – HPAEC-UV, Buche KP – HPAEC-UV) oberhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) vor. Unter Annahme der vollständigen Hydrolyse beträgt die Zersetzung von mGlcA durch saure Hydrolyse somit 43 beziehungsweise 44%. Generell können mit Borat-HPAEC höhere Gehalte erfasst werden als mit HPAEC-UV. Dies kann vor allem mit der aufwendigeren Probenaufarbeitung begründet werden, wodurch auch das Potential für größere statistische Fehler höher ist.

Die Rückstände nach saurer Hydrolyse stellen hauptsächlich den Anteil des säureunlöslichen Lignins dar. In den gebleichten Zellstoffen (**B**) ist dieser Gehalt mit 0,7% erwartungsgemäß niedrig. Ungebleichte Zellstoffe bestehen jedoch zu 6,4 beziehungsweise 2,4% aus säureunlöslichen Lignin. In allen Fällen enthalten die enzymatischen Hydrolysate Rückstände im mittleren einstelligen Bereich. Da die angegebenen Werte bereits um die Gehalte der zugegebenen Enzyme bereinigt wurden, ist dies ein deutliches Indiz für einen unvollständigen Abbau der Polysaccharide. Weiterhin ist festzustellen, dass die Zellstoffe mit hohem Ligningehalt die geringsten Summen aller Bestandteile nach enzymatischer Hydrolyse aufweisen. Somit können bis zu 20% aller Komponenten nicht erfasst werden. Aus diesen Beobachtungen resultiert die Annahme, dass komplexere Aggregate nach der Hydrolyse in den Lösungen verbleiben. Deren Partikelgröße muss jedoch kleiner sein als die Porengröße der eingesetzten Fritten zur Filtration der Hydrolysate (10 – 16 µm), diese Partikel nicht durch die Bestimmung des Hydrolyserückstandes erfasst werden. Das kann sowohl durch Xylan-Lignin-Komplexe aber auch durch Xylan-Cellulose-Komplexe erklärt werden, die durch enge Aggregation und zum Teil kovalente Quervernetzungen für Enzyme unzugänglich sind (Dammstrom et al., 2009; Hendriks et al., 2009). Für die Überprüfung dieser Thesen

wurden alle filtrierten Hydrolysate mit dynamischer Lichtstreuung untersucht (Abb. 10).

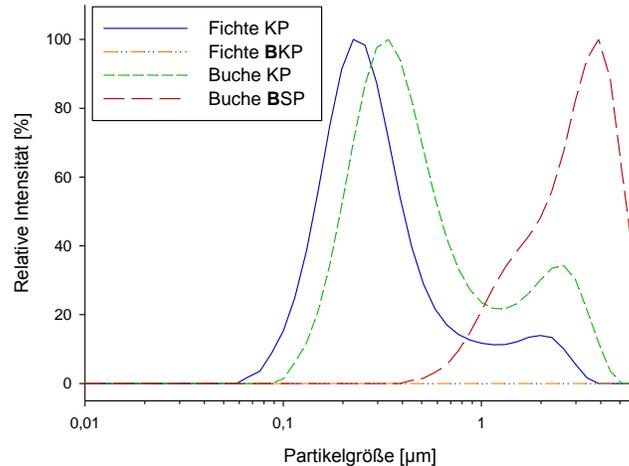


Abb. 10: Partikelgrößenverteilung in filtrierten enzymatischen Hydrolysaten, ermittelt mit dynamischer Lichtstreuung.

In den Hydrolysaten nach sauer katalysierter Spaltung konnten keine Partikel nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine vollständige Hydrolyse sowie die quantitative Abtrennung aller ungelösten Bestandteile hin. Als Folge dessen ist eine relativ vollständige Bestimmung aller Komponenten möglich, wie bereits mit den ermittelten Gehalten gezeigt werden konnte (Tab. 8). Hingegen enthalten drei der enzymatischen Hydrolysate Partikel mit einer mittleren Größe von bis zu 6 µm. Diese sind somit klein genug, dass sie während der Filtration nicht von den Fritten zurückgehalten werden können. Die Hydrolysate der ungebleichten Kraft-Zellstoffe (KP) enthalten Partikel mit einer zweistufigen Verteilung und Durchmessern zwischen 0,06 und 6 µm. Die durchschnittliche Größe der Partikel nach enzymatischer Hydrolyse des gebleichten Buchen Sulfit Zellstoffs (Buche **BSP**) ist im Durchschnitt höher als bei KP.

4.2.2 Bestimmung von Kohlenhydraten in lignocelluloser Biomasse

Für lignifizierte Biomasse ist eine enzymatische Spaltung nicht möglich. Daher kann hier nur die 2-stufige H₂SO₄-Hydrolyse zum Einsatz kommen, obwohl diese generell den

sekundären Abbau von Kohlenhydraten fördert. Die Hydrolysate wurden nach Entfernung des Sulfats und reduktiver Aminierung mittels HPAEC-UV nach der unter 4.1.3.1 beschriebenen Methode vermessen. Da bei längeren Retentionszeiten jedoch mehrere Coelutionen mit weiteren Inhaltsstoffen stattfinden, ist die eindeutige Zuordnung der Komponenten mit Uronsäureanteil nicht gewährleistet. Weiterhin überlagern sich im bereits etablierten Verfahren die Verbindungen Mannose und 2-AA. Verglichen mit der Analytik isolierter MGX musste daher der Gradient entsprechend angepasst werden (vgl. A 2.5). Verschiedene Biomasseproben wurden mit dieser Methode untersucht und die ermittelten Gehalte der einzelnen Analyten mit Referenzwerten aus Literaturdaten verglichen (Tab. 9).

Neben den Materialien der Einjahrespflanzen Bagasse und Weizenstroh entstammten die übrigen untersuchten Hölzer aus den Pflanzen der Arten Fichte (*Picea abies*), Eukalyptus (*Eucalyptus globulus*), Buche (*Fagus sylvatica*), Eiche (*Quercus alba*), Erle (*Alnus glutinosa*) und Pappel (*Populus alba*). In den untersuchten Hydrolysaten bilden Glucose und Xylose die jeweiligen größten Anteile aller Kohlenhydrate. Einzige Ausnahme ist Fichtenholz, worin der Anteil von Mannose mit 10,7% den der Xylose überwiegt. In den übrigen Proben sind die Mengen der Mannose mit Werten zwischen 1 und 3% vertreten. Eine Ausnahme stellen Bagasse und Weizenstroh dar, da in diesen Materialien Mannose nur in geringen Anteilen, teilweise unterhalb der Bestimmungsgrenze, vorhanden ist. Neben monomerer mGlcA kann in den Proben auch das Dimer aus mGlcA und Xylose detektiert werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass trotz der hydrolytischen Bedingungen ein signifikanter Anteil von mGlcA vor dem strukturellen Abbau bewahrt wird. Die Verhältnisse von mGlcA aus beiden Quellen sind etwa 1:1, mit Ausnahme des Holzes der Pappeln.

Tab. 9: Zusammensetzung der untersuchten Biomasseproben. Die angegebenen Konzentrationen der Monomere wurden jeweils als Anhydromonomere berechnet und mit Literaturangaben verglichen.

Biomasse	Gehalt der Anhydromonomere [wt.%]									Hydrolyse Rückst.	Summe
	Glc	Xyl ^a	Ara	Man	Gal	meGlcA	meGlcA-X ^b	GalA	Σ Uronsäuren		
Bagasse	40,3	28,8	3,9	0,4	n.d.	0,5	0,5	0,3	1,3	17,9	92,3
Bagasse ¹	43,1	23,8	1,5	0,3	0,4		0,8	1,2	2,0	23,2	94,3
Weizenstroh	35,6	25,1	4,6	n.d.	1,2	0,6	0,6	0,6	1,8	18,9	87,3
Weizenstroh ²	6,2*	24,4	3,4	0,3	1,1		0,9	0,6	1,5	n.d.	36,9*
<i>Picea abies</i>	41,3	9,4	2,3	10,7	1,2	0,7	0,9	0,8	2,4	25,2	92,2
<i>Picea abies</i> . ³	39,8	4,9	1,1	10,1	2,8		n.d.	0,6	0,6	29,8	89,1
<i>Eucalyptus globulus</i>	42,6	19,4	1,6	0,8	1,3	1,1	1,2	0,5	2,8	18,0	87,6
<i>Eucalyptus grandis</i> ¹	46,7	11,5	0,5	1,0	1,2		1,6	1,2	2,8	29,2	92,9
<i>Fagus sylvatica</i>	38,8	20,1	1,8	0,9	1,6	1,0	0,9	0,6	2,5	19,1	86,4
<i>Fagus sylvatica</i> ³	37,3	16,5	0,8	1,5	2,2		n.d.	1,1	1,1	24,2	83,6
<i>Quercus alba</i>	31,9	20,0	1,8	1,4	1,2	0,8	0,9	0,4	2,1	28,3	86,7
<i>Quercus falcata</i> ⁴	41,0	19,0	0,4	2,0	0,9				4,5	24,0	91,8
<i>Alnus glutinosa</i> ⁵	36,9	19,7	1,8	1,3	0,5	0,7	0,9	0,4	2,0	27,1	89,3
<i>Populus alba</i>	46,2	19,4	3,2	2,8	0,6	0,6	1,0	0,4	2,0	19,3	93,4
<i>Populus deltoides</i> ⁴	47,0	15,0	0,6	2,9	1,4				4,8	24,0	95,7

^a gesamte Xylosekonzentration: $C = C_{\text{Monomer}} + C_{\text{Xylose in meGlcA-X}}$

^b Konzentration von meGlcA, berechnet aus dem Dimer meGlcA-X

* Glc repräsentiert nicht die gesamte Cellulose, da Methanolyse-GC keine kristalline Cellulose spaltet.

Kommentare zu Literaturdaten 1-5:

¹ Alves et al. (2010), **HPLC-RID**. Konzentrationen der Uronsäuren wurden mittels **Methanolyse-GC**. Der angegebene Gehalt von GalA stellt die Summe von GalA und GlcA.

² Willför et al. (2009), bestimmt mittels **Methanolyse-GC**.

³ Altaner et al. (2016), mittels **¹H-NMR Spektroskopie**. Die Konzentrationen wurden als Monomere bestimmt. Daher wurden die Konzentrationen in dieser Tabelle angepasst und als Anhydromonomer umgerechnet.

⁴ Pettersen et al. (1984), Uronsäuren wurden nicht genauer spezifiziert.

⁵ Es standen keine Literaturangaben zur Verfügung.

Der Vergleich der erfassten Gehalte mit Werten aus der Literatur beinhaltet einige Unwägbarkeiten, da zum einen verschiedene Materialien untersucht und zum anderen diverse analytische Verfahren angewandt wurden. Dennoch können wesentliche Schlussfolgerungen aus den Vergleichen gezogen werden. So sind die ermittelten Summen von mGlcA höher als die in der Literatur beschriebenen Daten. Dies gilt ebenfalls für die Referenzwerte, die mittels Methanolyse-GC bestimmt wurden, einem weitläufig akzeptierten und verbreiteten Verfahren für die quantitative Ermittlung des mGlcA-Gehaltes. Methanolyse-GC ist jedoch nicht für die Ermittlung der Glucose-Konzentration geeignet, da die kristallinen Bereiche der Cellulose nicht gespalten werden können. Das neue Verfahren ermöglicht hingegen die quantitative Erfassung aller Komponenten in einem Analysegang. In den untersuchten Proben kann jedoch keine nicht-methylierte Glucuronsäure gefunden werden, obwohl dies in einigen Quellen beschrieben wurde. Die Gehalte der neutralen Kohlenhydrate sind in akzeptabler Übereinstimmung mit den Referenzwerten und weisen keine systematischen Abweichungen auf.

4.2.3 Zusammenfassung der Analyse lignocelluloser Biomasse

Die komplexen Strukturen sowie die Heterogenität der untersuchten Materialien erschweren die quantitative Erfassung aller Kohlenhydrate in Zellstoffen und pflanzlicher Biomasse. Um die Analytik mit HPAEC-UV nach reduktiver Aminierung dennoch durchführen zu können, wurde zunächst der Einfluss der 2-stufigen Säurehydrolyse auf die besonders kritische Komponente mGlcA untersucht. Für diesen Zweck wurden Zellstoffe mit Schwefelsäure hydrolysiert und die Ergebnisse mit denen der enzymatischen Hydrolyse verglichen. Bezüglich mGlcA können mit enzymatischer Spaltung höhere Gehalte quantifiziert werden, wohingegen Schwefelsäure einen sekundären Abbau bewirkt. Die ermittelbaren Gehalte der neutralen Kohlenhydrate sind nach enzymatischer Hydrolyse jedoch geringer als nach sauer katalysierter Spaltung der Polymere. Die Ursache dafür ist die unvollständige enzymatische Hydrolyse, wodurch kleine Partikel mit Durchmessern von bis zu 6 µm in den Hydrolysaten verbleiben. Der Beweis dafür wurde mit dynamischer Lichtstreuung erbracht. Trotz des teilweisen sekundären Abbaus der Kohlenhydrate, ist die 2-stufige Hydrolyse der enzymatischen

Hydrolyse zur Probenaufarbeitung vorzuziehen. Durch Modifikation des Gradienten, der unter 4.1 beschriebenen Methode, wurde ein neues Verfahren für die quantitative Untersuchung der Kohlenhydratbestandteile in pflanzlicher Biomasse entwickelt. Die ermittelten Gehalte sind in guter Übereinstimmung mit den Angaben in vergleichender Literatur. Grundsätzlich können mit der hier entwickelten Methode höhere Gehalte von meGlcA nachgewiesen werden.

4.3 Analytik modifizierter Xylane

Um die Produkteigenschaften von Xylanen zu erweitern, werden diese häufig chemisch modifiziert. Somit sollen neue Applikationen wie die Bildung von Hydro- und Aerogelen ermöglicht werden, die aufgrund der geringen Kettenlängen mit den nativen Polysacchariden nicht möglich sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die chemischen Veränderungen von Arabinoxylanen aus Haferspelzen nach Derivatisierung detailliert untersucht. Die Kohlenhydratzusammensetzung des Ausgangsxylans ist in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Zusammensetzung der Arabinoxylane, die für die Derivatisierungen genutzt wurden. Alle Kohlenhydratgehalte wurden nach 1-stufiger H_2SO_4 -Hydrolyse mittels Borat-HPAEC ermittelt.

Kohlenhydrat	relativer Gehalt [wt%]
Xylose	83,0
Arabinose	11,8
Glucose	2,8
Galactose	2,3
Rhamnose	0,1

Erstmals erfolgte die Hydroxyalkylierung von Xylanen mit cyclischen organischen Carbonaten (COC). Diese eingesetzten Derivatisierungsmittel haben vielfältige Vorteile, verglichen mit den herkömmlich eingesetzten Epoxiden (vgl. 2.2.2) (Akil et al., 2016a; Akil et al., 2016b).

Um die erzeugten Produkte detailliert zu beschreiben und die Prozesse während der Modifizierung besser zu verstehen, war jedoch ein neues analytisches Verfahren mit komplexen Anforderungen notwendig. Die größte Herausforderung bestand in der Unterscheidung und quantitativen Erfassung einer Vielzahl unterschiedlicher Produkte und Isomere, da keine Standards für die Ermittlung der Konzentrationen vorlagen. Ein weiterer Schwerpunkt stellte die Differenzierung der Produkte dar, die aus den beiden Pentosen Xylose und Arabinose entstanden.

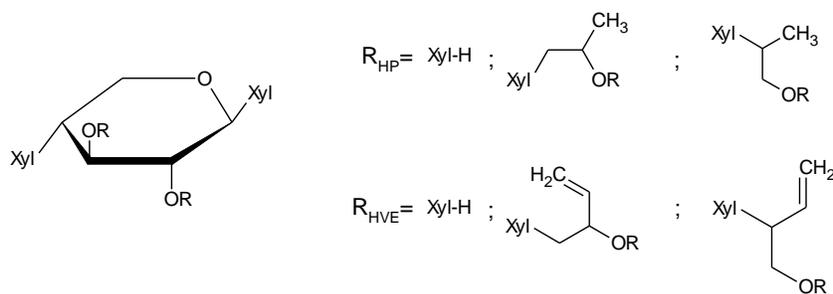
Für die Lösung der beschriebenen Fragestellungen wurden zwei Probensätze mit jeweils vier Proben unterschiedlicher DS-Werte hergestellt. Zum einen erfolgte die

Derivatisierung mit Propylencarbonat für die Herstellung von hydroxypropylierten Xylanen (HP-Xylan), zum anderen wurden die Polysaccharide mit Vinylethylencarbonat (VEC) umgesetzt, wodurch hydroxyvinylethylierte Xylane (HVE-Xylan) erhalten wurden (Tab. 11). Für die gewünschten DS-Werte mussten die Xylane bei Temperaturen von 140 beziehungsweise 160°C für bis zu 240 min unter basischen Bedingungen umgesetzt werden (Akil et al., 2016a; Akil et al., 2016b).

Tab. 11: Untersuchte Proben und deren Bezeichnungen für die Entwicklung eines analytischen Verfahrens. Die DS-Werte wurden mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie analog zu Akil et al. (2016a, b) bestimmt.

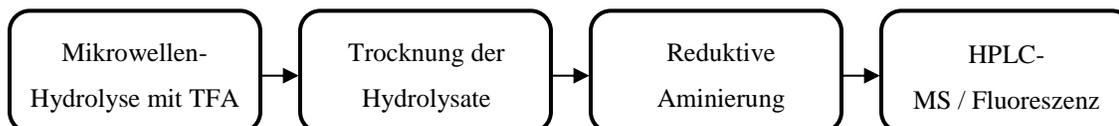
Probe	Substitutionsgrad (DS)
X _{HP} -0,2	0,2
X _{HP} -0,4	0,4
X _{HP} -0,8	0,8
X _{HP} -1,1	1,1
X _{HVE} -0,2	0,2
X _{HVE} -0,6	0,6
X _{HVE} -1,0	1,0
X _{HVE} -1,2	1,2

Die cyclischen organischen Carbonate werden unter Basenkatalyse durch Hydroxylgruppen nucleophil angegriffen. Die Xyloseeinheiten der untersuchten Arabinoxylane besitzen je eine Hydroxylgruppe an den Positionen 2 und 3 der Monomere. Zusätzlich enthält jedes nicht-reduzierende Ende der Polysaccharidketten eine freie Hydroxylgruppe an Position 4 der Xylose. Die Arabinosebausteine besitzen außerdem drei Hydroxylgruppen, die eine Reaktion mit den COC eingehen können. Neben diesen Möglichkeiten der Derivatisierung verfügen die neu entstandenen Hydroxyalkylsubstituenten ebenfalls über eine Hydroxylgruppe, die als Reaktionspartner für die COC fungieren kann. Aus all diesen beschriebenen Möglichkeiten ergibt sich eine große Anzahl unterschiedlicher Produkte mit einer Vielzahl von Isomeren (Schema 13).



Schema 13: Allgemeine Struktur hydroxyalkylierter Xylane.

Für die detaillierte Charakterisierung dieser komplexen Proben musste ein neues analytisches Verfahren entwickelt werden. Dieses beruht auf der Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) in einer Labormikrowelle. Durch die nachfolgende Trocknung kann TFA vollständig entfernt und die Rückstände in einem definierten Volumen Wasser gelöst werden. Im Anschluss erfolgt die reduktive Aminierung der hydrolysierten Kohlenhydrate mit 2-AA, was die verbesserte Analyse mittels Massenspektrometrie ermöglicht. Außerdem besitzen die so markierten Analyten fluoreszierende Eigenschaften und können somit via HPLC-Fluoreszenz quantifiziert werden (Schema 14).



Schema 14: Arbeitsschritte für die Analytik von hydroxyalkylierten Arabinoxylanen.

4.3.1 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf Arabinoxylane

Um eine eindeutige Aussage über den Anteil hydroxyalkylierter Xylose- und Arabinosebausteine treffen zu können, mussten die ermittelten Konzentrationen auf den jeweiligen Gehalt im Ausgangsxylan bezogen werden. Durch Untersuchungen des Einflusses der Reaktionsbedingungen auf die Ausbeuten der Polysaccharide sollten somit mögliche Fehlerquellen abgeschätzt werden können. Dafür wurden die Xylane ohne Zugabe von COC Konditionen ausgesetzt, die vergleichbar mit denen während der Derivatisierung waren. Zur Bestimmung der Ausbeuten musste zunächst ein Referenzwert ermittelt

werden, indem das Arabinoxylan zunächst in DMSO gelöst und analog zu Akil et al. (2016 a, b) ausgefällt wurde. Für die weiteren Proben erfolgte die Erhitzung auf 140 bzw. 160°C für 80 min sowohl mit und ohne DBU als Katalysator (Abb. 11).

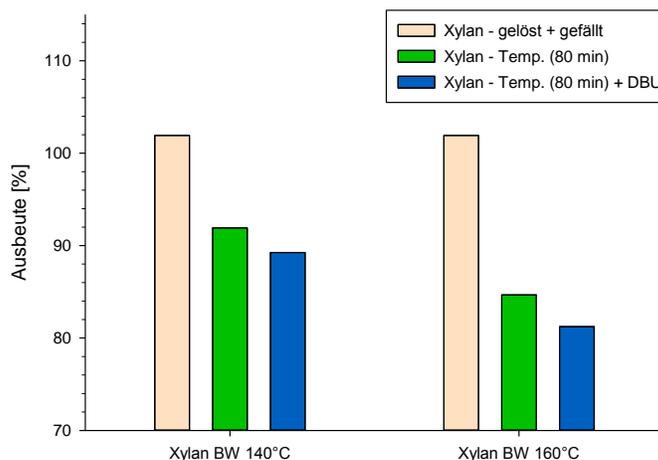


Abb. 11: Gravimetrisch bestimmte Ausbeuten von Arabinoxylanen nach Behandlung mit und ohne Katalysator (DBU) für jeweils 80 min. Zu den Xylanen wurde kein COC gegeben. Es wurden die Ausbeuten für die Temperaturen 140°C und 160°C überprüft.

Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss der gewählten Temperatur auf die Ausbeuten. So sinken diese bei 140°C auf 91,9% und bei 160°C auf 84,7%, verglichen mit der zuvor eingesetzten Masse. Eine weitere Reduktion, wenn auch deutlich geringer, bewirkt der Einsatz des basischen Katalysators auf 89,3 bzw. 81,2%.

Von diesen Proben wurden die Gehalte von Xylose und Arabinose mittels Borat-HPAEC ermittelt und sowohl mit dem Referenzxylan (Abb. 12 a) als auch mit den Ausbeuten aus Abb. 11 verrechnet (Abb. 12 b).

Bezogen auf das Referenzxylan (Abb. 12 a) steigen die Arabinosegehalte in den Proben kontinuierlich auf 102,2% bei 160°C an. Hingegen erreicht der Xylosegehalt bei 140°C sein Maximum von 103,5% und sinkt bei höherer Temperatur wieder ab. Dass die ermittelten Werte generell höher sind als im Referenzxylan, kann mit einer leichten Aufreinigung der Xylane erklärt werden. Die zusätzliche Berücksichtigung der Ausbeuten (Abb. 12 b) verdeutlicht hingegen, dass insgesamt Verluste beider Monomere zu verzeichnen sind. Da diese jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Reinheit der

Xylane haben, ist die Ergründung der Ursache für diese Beobachtungen nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

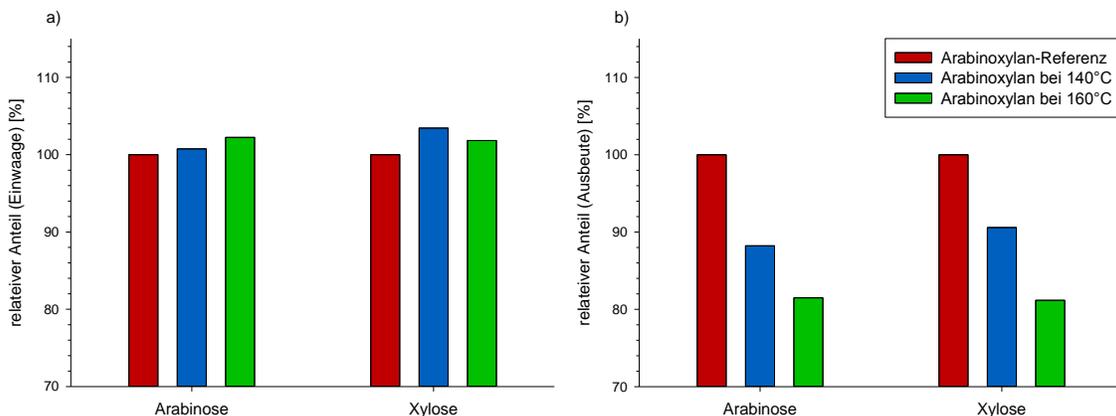


Abb. 12: Relative Gehalte von Arabinose und Xylose nach unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (Borat-HPAEC). Die Gehalte wurden auf die Einwaagen (a) und die Ausbeuten (b) bezogen.

4.3.2 Charakterisierung hydroxyalkylierter Proben mit HPAEC-UV

Die hydroxypropylierten Xylane wurden mit der unter 4.1 beschriebenen Methode analysiert. Dafür erfolgte zunächst die 1-stufige Hydrolyse der Proben mit Schwefelsäure und anschließender reduktiver Aminierung. Die analytische Erfassung wurde mit HPAEC-UV durchgeführt (Abb. 13).

Zwischen 23 und 28 min eluieren die neutralen Monosaccharide. Der Vergleich der Chromatogramme von Arabinoxylanen mit und ohne Hydroxyalkylierung zeigt, dass die Intensitäten von Xylose und Arabinose nach erfolgter Derivatisierung deutlich geringer sind. Zusätzlich erscheinen neue Peaks bei niedrigeren Retentionszeiten zwischen 6 und 18 min. Diese stammen vermutlich von den derivatisierten Kohlenhydraten. Ohne die Standards der Derivate ist eine genaue Zuordnung zu einzelnen Verbindungen jedoch nicht möglich. Die weiterführende Analytik dieser Proben erfordert folglich ein neues Verfahren, welches die Zuordnung der Peaks mittels Massenspektrometrie ermöglicht.

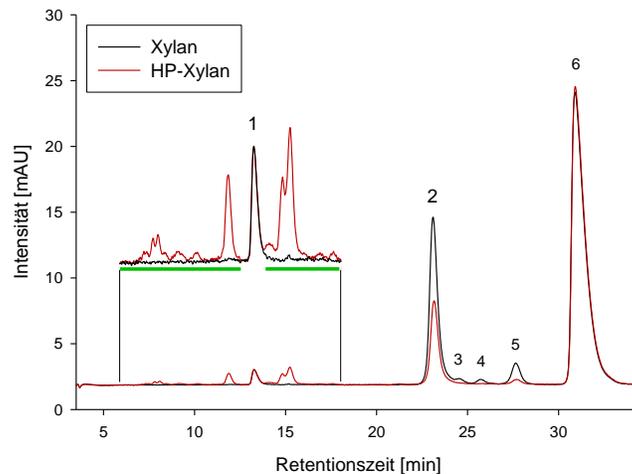


Abb. 13: HPAEC-UV-Chromatogramm von Arabinoxylan und der hydroxypropylierten Probe $X_{HP-0,8}$ nach 1-stufiger Hydrolyse und reduktiver Aminierung. Die über dem grünen Balken zusammengefassten Peaks stellen vermutlich hydroxyalkylierte Kohlenhydratderivate dar. Die übrigen Peaks sind: 1: 4-Aminobenzoessäure, 2: Xylose, 3: Galactose, 4: Glucose, 5: Arabinose, 6: 2-Aminobenzoessäure.

4.3.3 Mikrowellenbasierte TFA-Hydrolyse

Im Hinblick auf die notwendigen massenspektrometrischen Untersuchungen ist die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) ein geeignetes Verfahren zur Spaltung von Polysacchariden (Zhao et al., 2008; Ducatti et al., 2011; Liu et al., 2016). Im Gegensatz zu Schwefelsäure hat TFA den Vorteil, dass sie nach erfolgter Hydrolyse rückstandslos verdampft werden kann. Dies ist notwendig, da Schwefelsäure nicht für die Anwendung der Massenspektrometrie geeignet ist. Zusätzlich muss der Arbeitsschritt der Sulfatfällung (4.1.3.2) nicht durchgeführt werden, wodurch geringere Probenverluste während der Aufarbeitung zu erwarten sind.

Für die vollständige Spaltung von Polysaccharide sind Hydrolysedauern von bis zu 6 h angegeben (Ducatti et al., 2011). Zur Minimierung der Hydrolysezeiten sowie der Bildung unerwünschter Nebenprodukte wurde die Spaltung der Polymere mit TFA in einer Labormikrowelle durchgeführt. Um die höchsten Ausbeuten zu generieren, erfolgten die Untersuchungen über variable TFA-Konzentrationen sowie Quellzeiten vor der Hydrolyse (Abb. 14).

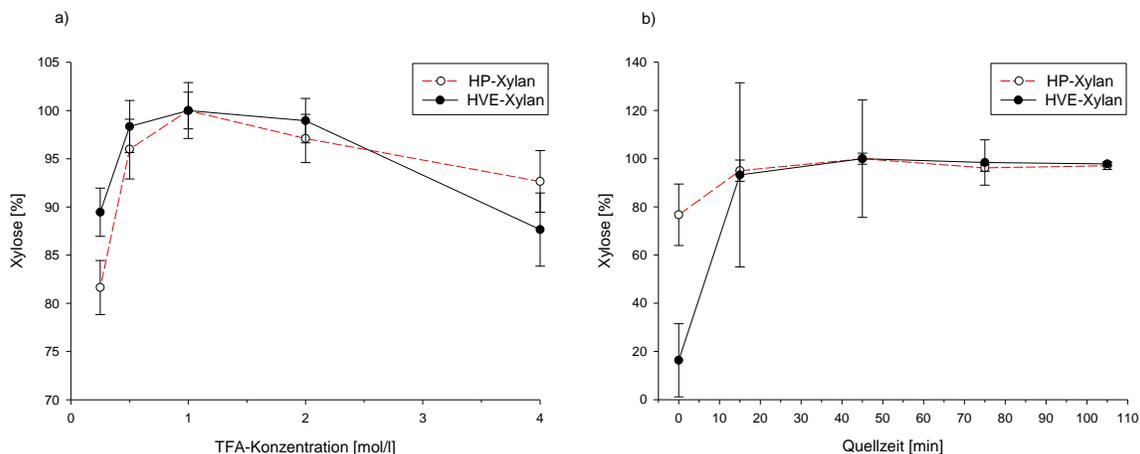


Abb. 14: Relative Xylosegehalte, bestimmt mittels Borat-HPAEC, für die Optimierung der mikrowellenbasierten TFA-Hydrolyse: a) Variation der TFA-Konzentration, b) Variation der Quellzeit. Die Gehalte wurden jeweils auf die maximale Konzentration bezogen.

Für die Untersuchungen zur Bestimmung der optimalen TFA-Konzentrationen wurde zunächst der Temperaturgradient des Mikrowellenofens festgelegt. Mit einer Leistung von maximal 1200 W sollten die in Wasser gelösten beziehungsweise suspendierten Proben innerhalb von 30 s auf 120°C erhitzt werden. Diese Temperatur wurde für weitere 30 s konstant gehalten, bevor eine anschließende Konditionierung für 10 min stattfand. Als Marker für eine möglichst vollständige Spaltung der Polymere dient die Konzentration der Xylose, welche mittels Borat-HPAEC bestimmt wurde. Die Xylane $X_{\text{HP-140-240}}$ und $X_{\text{HVE-140-240}}$ waren dabei exemplarische Proben für die Optimierungen.

Die Variation der TFA-Konzentration zwischen 0,25 und 4 mol/L (Abb. 14 a) zeigt für beide Xylane zwischen 0,25 und 1,00 mol/L TFA einen Anstieg der Xyloseausbeute. Bei höheren Konzentrationen werden die Gehalte der Xylose jedoch wieder niedriger, was mit einem säurekatalysierten Abbau der Kohlenhydrate begründet werden kann. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen, muss TFA folglich für beide Xylanderivate mit einer Konzentration von 1 mol/L vorliegen.

Für die Untersuchungen der Quellung wurde die Hydrolyse der Polymere mit einer 1 M TFA-Lösung durchgeführt (Abb. 14 b). Im Hydrolysat des HP-Xylans sind ohne Quellung 76,7% des maximalen Xylosegehaltes enthalten. Nach 45 min Quellung wird der höchste Gehalt an Xylose mit einem Konfidenzintervall von $\pm 2,3\%$ freigesetzt.

Demzufolge ist dies auch die Quellzeit, die für eine möglichst vollständige Erfassung aller Bestandteile der HP-Xylane notwendig ist. Im Hydrolysat des HVE-Xylans sind ohne Quellung nur 16,3% des maximalen Xylosegehaltes enthalten. Mit Erhöhung der Quellzeit steigt auch der detektierbare Gehalt an und erreicht sein Maximum ebenfalls nach 45 min. Verglichen mit HP-Xylan ist das Konfidenzintervall nach dieser Zeit jedoch deutlich höher ($\pm 24,3\%$). Das deutet auf ein inhomogenes Quellverhalten hin und ist auf die höhere Hydrophobizität der Xylane und eine ungleichmäßige Verteilung der Substituenten zurückzuführen. Mit steigender Quellzeit sinken die Vertrauensintervalle deutlich und haben ihren niedrigsten Wert nach 105 min mit $\pm 0,7\%$. Für HVE-Xylane ist somit eine Quellzeit von mindestens 105 min erforderlich.

4.3.4 Substitutionsmuster der Pentosen

Die mit TFA erzeugten Hydrolysate wurden getrocknet und mit einem definierten Volumen Wasser aufgefüllt. Durch anschließendes Filtrieren der Lösung erfolgte die Vorbereitung der Kohlenhydrate auf die reduktive Aminierung (4.1.3.2). Neben der bereits beschriebenen Fluoreszenz- und UV-Aktivität sollte vor allem die Empfindlichkeit für die massenspektrometrische Detektion erhöht werden. Diese war notwendig, um die Peaks im Chromatogramm bestimmten Strukturen zuordnen zu können.

Für die chromatographische Trennung der Analyten wurde zunächst ein HPLC-MS Verfahren entwickelt. Mit einer RP-18 Säule und einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril (jeweils mit 0,1% Ameisensäure) konnte so die Trennung verschiedener Komponenten mit einer Vielzahl an Isomeren erreicht werden (Abb. 15).

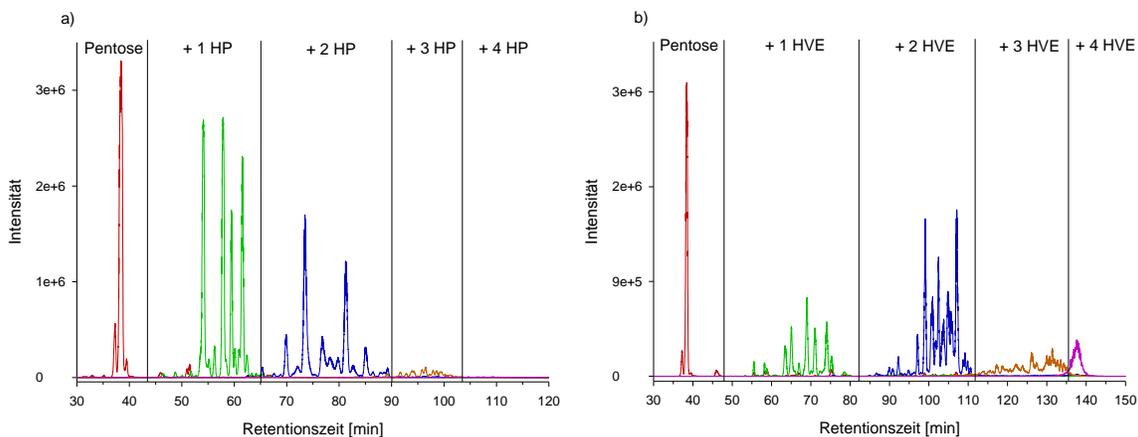


Abb. 15: Chromatogramme der derivatisierten Proben $X_{HP-0,8}$ (a) und $X_{HVE-1,0}$ (b) nach TFA-Hydrolyse und reduktiver Aminierung. Die Chromatogramme wurden durch Überlagerung der jeweiligen monoisotopischen Massenspuren aus den HPLC-MS Messungen erzeugt.

Durch Überlagerung der jeweiligen monoisotopischen Massen können Pentosen mit unterschiedlicher Substituentenzahl dargestellt werden. Dabei ist eine gute chromatographische Trennung der einzelnen Massenspuren des HP-Xylans und des HVE-Xylans zu beobachten. Die Retentionszeiten der derivatisierten Pentosen aus HVE-Xylanen sind generell höher als die der HP-Xylane. Dies kann durch die geringere Polarität und der daraus resultierenden höheren Affinität der Analyten zur Trennsäule erklärt werden. Jede dargestellte Massenspur beinhaltet mehrere Peaks. Während die unsubstituierten Pentosen durch zwei Verbindungen repräsentiert werden (Arabinose und Xylose), nimmt die Anzahl der Isomere mit steigendem Grad der Substitution zu. Hydroxyalkylierte Arabinoxylane mit hohem DS enthalten Pentosen mit bis zu sechs Substituenten in detektierbaren Mengen.

Die Quantifizierung der mittels HPLC-MS erfassten Verbindungen kann nicht mit hoher Genauigkeit erfolgen, da der erzeugte Detektorrespons für jede Komponente einzigartig ist. Die zusätzliche Durchführung der chromatographischen Messungen mittels HPLC-Fluoreszenz ermöglicht hingegen einen molaren Detektorrespons. Als Standard für die externe Kalibrierung kann vollständig reduktiv aminierte Xylose verwendet werden. Dies ist möglich, da für die Umsetzung der Xylose eine WFR von fast 100% erreicht wird (vgl. Tab. 5). Die Quantifizierung der einzelnen Pentosederivate mit den jeweiligen

molaren Massen zeigt eine deutliche Abhängigkeit der relativen Anteile der Derivate von den DS-Werten auf (Abb. 16).

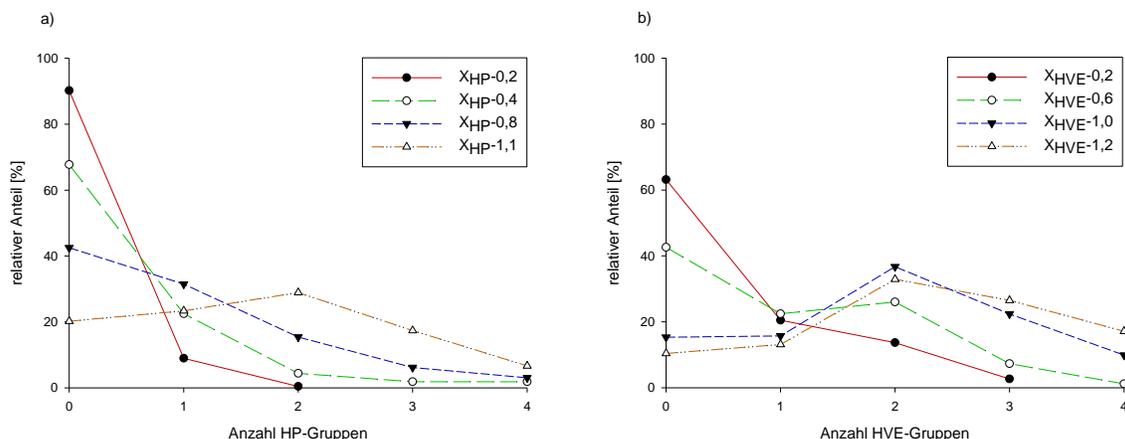


Abb. 16: Substitutionsverteilung hydroxyalkylierter Anhydropentosen der Hydrolysate von HP-Xylanen (a) und HVE-Xylanen (b). Die Konzentrationen wurden mittels HPLC-Fluoreszenz ermittelt und auf die jeweilige Summe aller quantifizierbaren Kohlenhydrate bezogen.

Mit steigendem DS werden in beiden Xylanen die Gehalte der unsubstituierten Pentosen deutlich geringer. Im Gegenzug erhöhen sich die ermittelten Anteile der substituierten Kohlenhydrate. Verglichen mit HP-Xylanen ist bei den HVE-Xylanen eine Verschiebung der Substitutionskurven zu Pentosen mit größerer Anzahl an Hydroxyalkylsubstituenten zu beobachten. So sind zweifach substituierte Pentosen die häufigsten Verbindungen in HP-Xylanen mit einem DS von 1,1, während dies in HVE-Xylanen schon ab einem DS von 0,6 der Fall ist.

Aus den erfassten Daten können die mittleren molaren Substitutionen (MS) berechnet und mit den Referenzwerten aus der ^{13}C -NMR-Spektroskopie verglichen werden (Tab. 12). Der MS gibt das molare Verhältnis der Substituenten zu den Monomeren an. Mit steigendem DS erhöht sich folglich auch der MS der Kohlenhydrate. Für HVE-Xylane ergeben sich dabei stets deutlich höhere MS-Werte als für HP-Xylane. Für letztere sind die Ergebnisse aus HPLC-Fluoreszenz etwas geringer als die MS-Werte aus der ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Hingegen wurden für HVE-Xylane mit großem DS, verglichen mit den Referenzwerten aus der NMR-Spektroskopie, höhere MS-Werte mittels HPLC-Fluoreszenz ermittelt.

Tab. 12: Vergleich der berechneten MS-Werte mittels LC-Fluoreszenz und ^{13}C -NMR-Spektroskopie.

Probe	MS (HPLC- Fluoreszenz)	MS (^{13}C -NMR)
X _{HP} -0,2	0,1	0,2
X _{HP} -0,4	0,5	0,6
X _{HP} -0,8	1,0	1,3
X _{HP} -1,1	1,8	1,9
X _{HVE} -0,2	0,6	0,7
X _{HVE} -0,6	1,0	1,0
X _{HVE} -1,0	2,0	1,8
X _{HVE} -1,2	2,3	2,1

NMR-spektroskopische Methoden haben generell den Vorteil, dass die Experimente ohne vorherige saure Hydrolyse der Polysaccharide durchgeführt werden können. Dadurch sind keine Nebenreaktionen zu erwarten, welche die ermittelten Werte für DS und MS negativ beeinflussen. Jedoch handelt es sich um ein Verfahren mit relativ geringer Empfindlichkeit. Dies hat zur Folge, dass Bestandteile mit niedrigen Konzentrationen nicht erfasst werden. Hinzu kommt, dass aufgrund der langen Messzeiten Mehrfachbestimmungen oft nicht praktikabel sind, wodurch die ermittelten Ergebnisse größere statistische Fehler aufweisen. Weiterhin wird durch die begrenzte Auflösung der NMR-Spektren nur die Ermittlung eines Mittelwertes für die Parameter DS und MS ermöglicht. Für die Durchführung der Messungen mit HPLC-Fluoreszenz ist eine säurehydrolytische Spaltung der Polysaccharide notwendig, die ein gewisses Potential für Nebenreaktionen aufweist. Durch die chromatographische Auftrennung der einzelnen Bestandteile ist jedoch eine viel detailliertere Betrachtung der erzeugten Derivate möglich. So können die Produkte nach der Anzahl ihrer Substituenten getrennt quantifiziert werden. Jedoch ist die Bestimmung der derivatisierten Kohlenhydrate nur für Pentosen mit maximal vier Hydroxyalkylgruppen möglich, da bei höherem MS die Konzentrationen der meisten Isomere unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen.

Die einzelnen Proben der beiden Probensätze HP- und HVE-Xylan besitzen keine identischen DS-Werte. Für die bessere Vergleichbarkeit der molaren Substitutionen ist die Abhängigkeit der MS- (HPLC-Fluoreszenz) von den DS-Werten (^{13}C -NMR-Spektroskopie) graphisch dargestellt (Abb. 17).

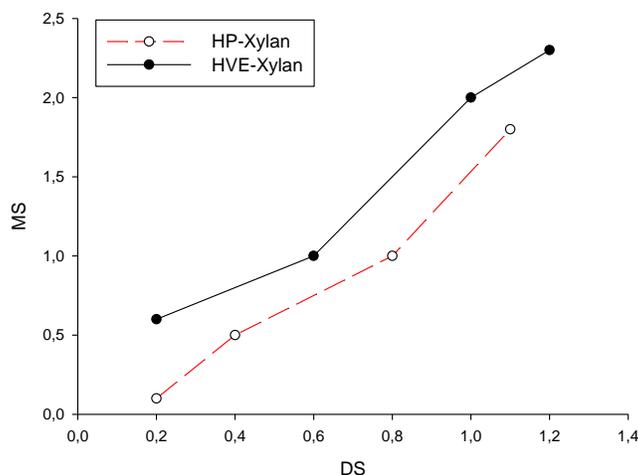


Abb. 17: Abhängigkeit von MS (HPLC-Fluoreszenz) und DS (^{13}C -NMR-Spektroskopie) für HP- und HVE-Xylane.

Mit zunehmendem DS steigt auch der mittlere MS in beiden hydroxyalkylierten Xylanen. Neben dieser logischen Tatsache wird weiterhin verdeutlicht, dass HVE-Xylane bei gleichem DS einen höheren durchschnittlichen MS als HP-Xylane aufweisen. Dies deutet auf eine bevorzugte Verlängerung der Seitenketten bei der Derivatisierung mit VEC hin. Ein weiteres Indiz für diese These ist das Verhältnis von di- zu monosubstituierten Pentosen (Tab. 13).

Tab. 13: Prozentualer Anteil von di- (MS_2) zu monosubstituierten (MS_1) Pentosederivaten.

HP-Xylan	$\text{MS}_2 : \text{MS}_1$	HVE-Xylan	$\text{MS}_2 : \text{MS}_1$
$X_{\text{HP}-0,2}$	5,0%	$X_{\text{HVE}-0,2}$	66,8%
$X_{\text{HP}-0,4}$	19,6%	$X_{\text{HVE}-0,6}$	115,9%
$X_{\text{HP}-0,8}$	48,9%	$X_{\text{HVE}-1,0}$	233,8%
$X_{\text{HP}-1,1}$	123,5%	$X_{\text{HVE}-1,2}$	251,1%

Mit steigendem DS nimmt in beiden Xylanen der Anteil disubstituierter Pentosen, bezogen auf die monosubstituierten, stetig zu. Auf diese Weise wird verdeutlicht, dass die berechneten Verhältnisse für HVE-Xylan erheblich höher sind als für HP-Xylan. Da die Proben annähernd gleiche DS-Werte besitzen, ist dieser große Unterschied nicht auf eine bevorzugte Substitution der Pentosen an den Positionen 2 und 3 zurückzuführen. Dies ist somit ein weiterer Beweis der präferierten Verlängerung der Alkylketten in HVE-Xylanen. Das Kettenwachstum kann mit der chemischen Struktur der Substituenten erklärt werden. Die Vinylfunktion des HVE-Xylans hat einen geringeren elektronenschiebenden Effekt (+I) als die Methylgruppe des HP-Xylans. Dadurch lässt sich die Hydroxylfunktion im alkalischen Reaktionsmedium leichter polarisieren beziehungsweise deprotonieren und ist folglich reaktiver als die HP-Seitenkette.

4.3.5 Differenzierung zwischen derivatisierter Xylose und Arabinose

Neben der Hauptkomponente Xylose wiesen die für die Derivatisierung eingesetzten Arabinoxylane auch einen Anteil von 11,8% Arabinose auf. Da beide Monosaccharide die gleiche molare Masse haben und in der Massenspektrometrie keine spezifischen Fragmentierungsmuster zeigten, konnte in den vorangegangenen Untersuchungen mit HPLC-MS nicht zwischen ihnen oder den resultierenden Derivaten unterschieden werden. Zur Differenzierung wurde daher ein Arabinogalactan sowohl mit PC als auch mit VEC hydroxyalkyliert. Die Aufarbeitung der erzeugten Derivate wurde analog zu den Arabinoxylanen durchgeführt – nach TFA-Hydrolyse erfolgte die reduktive Aminierung mit 2-AA. Mittels HPLC-MS erfolgte die Analyse der derivatisierten und aufgearbeiteten Arabinogalactane.

Durch Auftragung der monoisotopischen Massen für mono- und disubstituierte Pentosen und Vergleich mit denen der Arabinoxylane kann eine Unterscheidung beider Pentosen erreicht werden (Abb. 18). Wie in Voruntersuchungen festgestellt wurde, enthält das eingesetzte Arabinogalactan keine Xylose. Daher sind die Peaks im Chromatogramm mit den molaren Massen der Pentose und deren Derivaten auf Arabinose zurückzuführen.

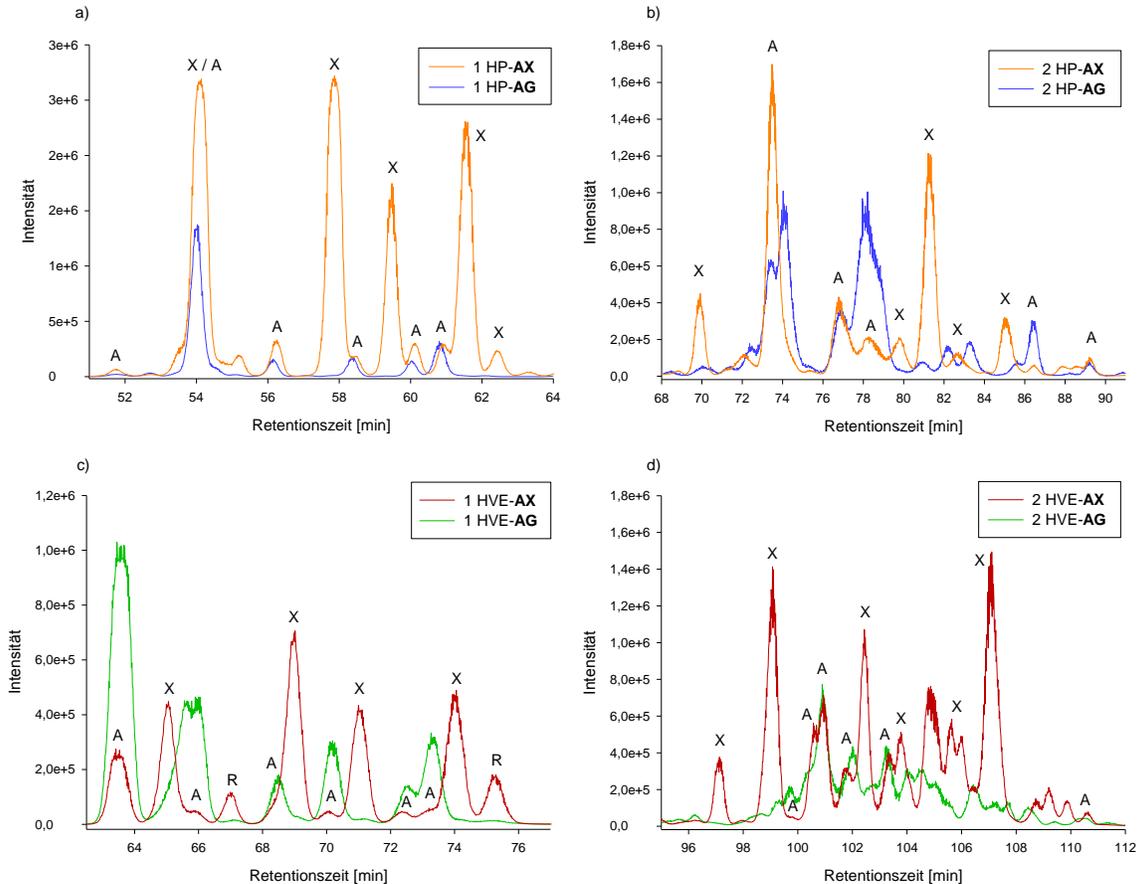


Abb. 18: HPLC-MS Chromatogramme von hydrolysierten und reaktiv aminierten Arabinoxylanen (**AX**) und Arabinogalactanen (**AG**), die zuvor mit PC (a; b) bzw. VEC (c; d) modifiziert wurden. Es sind jeweils die monoisotopischen Massen für einfach (a; c) und zweifach (b; d) substituierte Pentosen dargestellt. Die Beschriftung *A* steht für Derivate der Arabinose, *X* für die der Xylose.

Die Peaks, die sowohl im derivatisierten Arabinoxylan als auch im Arabinogalactan detektiert werden können, sind den Derivaten der Arabinose zuzuordnen. Demzufolge entsprechen die Peaks mit der gleichen monoisotopischen Masse, die nur im Arabinoxylan sichtbar sind, den xylosebasierten Komponenten. Diese Unterscheidung ist sowohl für mono- als auch für disubstituierte Pentosen möglich. Bei höheren Graden der Derivatisierung nimmt die Anzahl der Isomere und somit auch der Peaks signifikant zu. Da dies gleichzeitig mit abnehmenden Konzentrationen und einer nicht mehr zufriedenstellenden chromatographischen Trennung einhergeht, kann keine eindeutige Differenzierung mehr gewährleistet werden. Durch die Untersuchungen der Hydroxyalkylierung homopolymerer Xylane (Daten nicht angegeben) wurde festgestellt, dass sich im Chromatogramm der monosubstituierten HP-Pentosen zwei Peaks

überlagern (Abb. 18 a). Für die anschließenden Quantifizierungen wird dieses Signal der Xylose zugeordnet, was mit der zu erwartenden höheren Konzentration begründet werden kann. Im dargestellten Chromatogramm monosubstituierter HVE-Pentosen (Abb. 18 c) befinden sich neben den Derivaten der Monomere außerdem Fragmente von unhydrolysierten Oligomeren (R). Aufgrund der geringen Konzentrationen werden diese für die quantitative Auswertung jedoch vernachlässigt.

Die Untersuchungen mittels HPLC-MS dienen als Grundlage für die Quantifizierungen der Derivate von Xylose und Arabinose. Dafür wurde die Messungen mit HPLC-Fluoreszenz durchgeführt, gefolgt von der Zuordnung der Peaks mithilfe der zuvor festgestellten Retentionszeiten. Die Berechnung mono- und disubstituierter Xylose- bzw. Arabinosederivate ermöglicht neue detaillierte Einblicke in das Reaktionsverhalten dieser Komponenten während der Hydroxyalkylierung (Abb. 19). Verglichen mit den HVE-Xylanen ist mehr monosubstituierte Xylose in HP-Xylanen vorhanden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine monosubstituierte HP-Xylose mit einer HP-Arabinose coeluiert (Abb. 18 a). Der reelle Anteil ist folglich etwas niedriger, wobei dieser Fehler aufgrund der deutlich geringeren Konzentration von Arabinose als klein einzuschätzen ist. Der relative Gehalt monosubstituierter HVE-Xylose erreicht Werte von maximal 11,4 mol% bei $DS = 0,2$. Mit steigendem DS nimmt der Anteil beider monosubstituierter Derivate signifikant ab. Während dies für HVE-Xylose ab einem DS von 0,6 der Fall ist, sinkt der Gehalt von HP-Xylose erst ab $DS = 0,8$ (Abb. 19 a). Diese Reduktion kann beobachtet werden, da bei fortschreitender Derivatisierung die monosubstituierten Bausteine mit einem weiteren COC reagieren. Dadurch entsteht disubstituierte Xylose, deren Anteil mit zunehmendem DS deutlich höher wird. Verglichen mit dem Gehalt der Xylose im Ausgangsxylan liegen im HP-Xylan bis zu 12,9% ($DS = 1,1$) und im HVE-Xylan 13,6% ($DS = 1,0$) der Xylose disubstituiert vor. In HVE-Xylanen sinkt der Gehalt ab einem DS von 1,0 jedoch wieder ab. Erneut ist diese Verringerung auf einen steigenden Anteil höhersubstituierter Xylosebausteine zurückzuführen. Der Anteil disubstituierter HVE-Xylose ist stets höher verglichen mit HP-Xylose. Dies wird mit der bereits erörterten höheren Reaktivität der HVE-Seitenketten und der damit einhergehender Verlängerung begründet (Abb. 19 b).

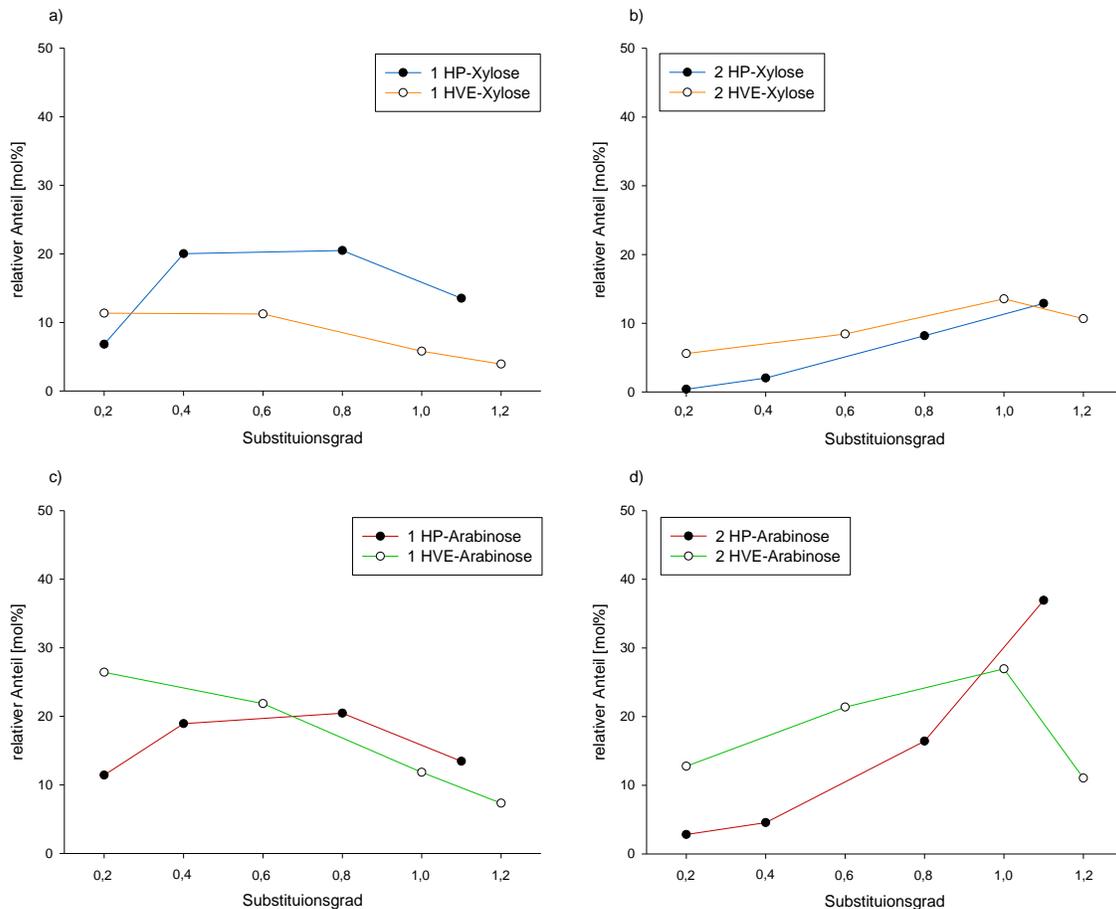


Abb. 19: Relative Anteile mono- (a; c) und disubstituierter (b; d) Xylose- (a; b) und Arabinosederivate (c; d) in X_{HP} und X_{HVE} . Die ermittelten molaren Konzentrationen wurden mittels HPLC-Fluoreszenz ermittelt und auf den jeweiligen Gehalt im Ausgangsxyylan bezogen.

Die relativen Anteile monosubstituierter Arabinose sind weitestgehend ähnlich in HP- und HVE-Xylanen. Auch hier muss jedoch beachtet werden, dass im Chromatogramm (Abb. 18 a) zwei Verbindungen coeluierten und die realen Gehalte monosubstituierter HP-Arabinose folglich etwas höher sind als angegeben. Aufgrund der geringeren Konzentration von Arabinose ist der relative Fehler hier jedoch größer einzuschätzen als im zuvor diskutierten Fall der Xylose. Der Gehalt von monosubstituierter HVE-Arabinose ist mit Werten von bis zu 26,4 mol% bei DS = 0,2 deutlich höher verglichen mit den analogen Verbindungen der Xylose. Von den DS-Werten 0,2 bis 1,2 verringert sich der relative Anteil signifikant um 72,3%, wobei diese Reduzierung größer ist als bei monosubstituierter HVE-Xylose (65,4%) (Abb. 19 c). Wie bereits bei den Xylose-derivaten erläutert, ist diese Verringerung durch die Reaktion eines weiteren COC mit

den Kohlenhydraten zu erklären. Verglichen mit dem Arabinosegehalt im Ausgangsxylan liegen im HP-Xylan bis zu 36,9% (DS = 1,1) und im HVE-Xylan bis zu 30,0% (DS = 1,0) der Arabinose disubstituiert vor. Der Grad der Derivatisierung ist somit deutlich größer als bei den analogen Xylosebausteinen. Weiterhin ist der Anteil von HVE-Arabinose generell höher als der von HP-Arabinose. Ab DS = 1,0 verringert sich der Gehalt im HVE-Xylan zugunsten der Dreifachsubstitution wieder deutlich.

Durch diese Untersuchungen können zwei grundlegende Tatsachen festgestellt werden. Zum einen ist der Anteil zweifachsubstituierter Pentosen im HVE-Xylan höher als im HP-Xylan, wohingegen dies für monosubstituierte Bausteine nicht der Fall ist. Dadurch wird die These bestätigt, dass die HVE-Seitenketten reaktiver sind als die der HP-Substituenten und somit bevorzugt durch weitere Substitution verlängert werden. Zum anderen hat sich herausgestellt, dass die relative Umsetzung von Arabinose deutlich größer ist als die von Xylose. Diese höheren Umsetzungsraten könnten mit den nach außen gerichteten Positionen der Seitenketten und somit der besseren sterischen Zugänglichkeit erklärt werden.

4.3.6 Statistische Parameter für die Analytik derivatisierter Xylane

Da für die Quantifizierung aller Komponenten nur reduktiv aminierte Xylose als externer Standard verwendet wurde, erfolgte auch die Ermittlung der Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) mit dieser Verbindung. Der LOD wurde mit 1,59 $\mu\text{mol/L}$ und der LOQ mit 7,77 $\mu\text{mol/L}$ bestimmt. Die daraus resultierenden Konzentrationen in mg/L der jeweiligen Verbindungen sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14: LOD und LOQ von Xylose und Derivaten [mg/L].

Verbindung	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
Xylose	0,24	1,17
+1 HP	0,33	1,62
+2 HP	0,42	2,07
+3 HP	0,52	2,52
+4 HP	0,61	2,97
+1 HVE	0,35	1,71
+2 HVE	0,46	2,25
+3 HVE	0,57	2,80
+4 HVE	0,68	3,34

4.3.7 Zusammenfassung der Untersuchungen hydroxyalkylierter Arabinoxylane

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktionsprodukte untersucht, die durch Hydroxyalkylierung von Arabinoxylanen mit den cyclischen organischen Carbonaten PC und VEC erzeugt werden. Bei den Derivatisierungen der Heteropolysaccharide entstehen Monomereinheiten mit hoher Vielfalt und großer Anzahl an Isomeren. So tragen zum einen die verschiedenen Hydroxylgruppen von Xylose und Arabinose, zum anderen die Verlängerung der Seitenketten durch weitere Substitution mit COC, zur Erweiterung des Produktspektrums bei.

Für die detaillierte Analytik der hydroxyalkylierten Arabinoxylane wurde ein neues Verfahren auf Grundlage der mikrowellenbasierten TFA-Hydrolyse entwickelt. Die Variation der TFA-Konzentrationen sowie der Quellzeit vor der Hydrolyse ermöglichte die Optimierung des Verfahrens, sodass die maximalen Mengen an Xylose freigesetzt wurden. Durch die nachfolgende reduktive Aminierung mit 2-AA wurden die Analyten mit einem fluoreszenz-aktiven Marker versehen, der zugleich auch die Empfindlichkeit für Detektion durch massenspektrometrische Verfahren erhöht.

Messungen mit HPLC auf einer RP-18-Säule ermöglichen eine gute chromatographische Trennung der Bestandteile. Durch die Detektion mit ESI-MS können die Peaks im

Chromatogramm den unsubstituierten und den substituierten Pentosen hinsichtlich der Anzahl ihrer Substituenten zugeordnet werden. Somit wird die Detektion von Monomeren mit bis zu sechs Substituenten erreicht. Die Quantifizierung der Verbindungen erfolgt durch zusätzliche Messungen mittels HPLC-Fluoreszenz und ermöglicht die Darstellung von Substituentenverteilungen. Dies verdeutlicht, dass die Pentosen in HVE-Xylanen bei ähnlichen DS-Werten häufiger höhersubstituiert vorliegen als in HP-Xylanen. Aus diesen Resultaten kann weiterhin die mittlere molare Substitution berechnet werden. Diese ist für HVE-Xylane deutlich höher. Die Ursache für diese Beobachtung ist die höhere Reaktivität der HVE- verglichen mit den HP-Substituenten, die mit einem geringeren +I-Effekt der in Nachbarschaft zur Hydroxylgruppe stehenden Vinylfunktion erklärt werden kann. Als Folge dessen ist eine bevorzugte Verlängerung mit einem Seitenkettenwachstum zu beobachten.

Um eine Differenzierung zwischen xylose- und arabinosebasierten Derivaten durchführen zu können, wurden hydroxyalkylierte Arabinogalactane in die bestehende Methode eingearbeitet. Somit kann eine Unterscheidung der Derivate mit bis zu zwei Substituenten erreicht werden. Neben der Bestätigung der bevorzugten Seitenkettenverlängerung in HVE-Xylanen kann die präferierte Derivatisierung der Arabinosesubstituenten in den Arabinoxylanen gezeigt werden. Diese beruht auf der geringeren sterischen Hinderung dieser Bausteine.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Xylane und Xylanderivate charakterisiert und dafür verschiedene analytische Verfahren entwickelt. Der Fokus lag auf isolierten Methylglucuronoxylanen, Xylanen als Bestandteil von Zellstoffen und Biomasse sowie durch Hydroxyalkylierung mit COC gewonnenen Derivaten von Arabinoxylanen. Aufgrund der Komplexität der Heteropolysaccharide und der jeweiligen Probenmatrix waren für jedes der genannten Ausgangsprodukte spezifische analytische Methoden notwendig. Deren Entwicklung sowie die ermittelten Ergebnisse sind in den einzelnen Kapiteln detailliert zusammengefasst (vgl. 4.1.4, 4.2.3, 4.3.7). Aufbauend auf diesen gewonnenen Erkenntnissen ergeben sich neue Möglichkeiten, mit denen die entsprechenden Polysaccharide weiterführend untersucht werden können.

Untersuchungen von MGX ergaben, dass die α -(1→2)-glycosidische Bindung von mGlcA zu Xylose deutlich stärker ist als die β -(1→4)-glycosidische Bindung zwischen den Xyloseeinheiten. Als Folge dessen ist es nicht möglich ein säurehydrolytisches Verfahren zu entwickeln, das eine vollständige Spaltung in Monomere bei gleichzeitiger Minimierung des sekundären Abbaus bewirkt. Somit ist auch keine quantitative Erfassung der beiden Hauptbestandteile möglich. Die Anwendung schonender Hydrolysebedingungen hat die partielle Spaltung von Oligosacchariden zur Folge. Um diese auch ohne reine Standards quantifizieren zu können, muss die reduktive Aminierung mit 2-AA und 2-PB angewandt werden, die eine Markierung der Kohlenhydrate mit einem UV-Label zur Folge hat. Nach chromatographischer Trennung mittels HPAEC können die Kohlenhydrate mit einem UV-Detektor erfasst werden. Durch den erzeugten molaren Detektorrespons ist es möglich, alle Verbindungen nur mit 2-AA als externen Standard zu quantifizieren. Die erfassten Oligosaccharide leisten einen signifikanten Beitrag zur gesamten Xylose und mGlcA-Konzentration, wodurch deren Bestimmung als annähernd quantitativ bezeichnet werden kann.

Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens wäre die Ausweitung auf Arabinoxylane. Für die Zuordnung der Retentionszeiten bei Messung mittels HPAEC ist jedoch zunächst die Isolierung der entsprechenden oligomeren Standards notwendig. Aufgrund der gleichen molaren Masse von Xylo- und Arabinoxyloligomeren mit gleichem Polymerisationsgrad

ist die Darstellung der Standards nicht analog zu den meGlcA-haltigen Verbindungen mittels SEC möglich. Es könnte hingegen eine präparative HPLC mit anschließender Charakterisierung der Eluate mittels NMR und MALDI-MS durchgeführt werden. Alternativ zu HPAEC könnte auch die Analytik von partiell hydrolysierten Arabinoxylanen mittels HPLC-MS/MS und UV-Detektion erfolgen.

Der Vergleich von Kohlenhydratgehalten in Zellstoffen nach enzymatischer Hydrolyse und 2-stufiger Säurehydrolyse sowie reduktiver Aminierung ergab, dass nach Behandlung mit Enzymen zwar mehr meGlcA detektiert werden kann, jedoch eine Diskriminierung der neutralen Kohlenhydrate stattfindet. Während meGlcA einem signifikanten sekundären Abbau unter stark sauren Bedingungen unterliegt, ist die Hydrolyse mit Enzymen generell nicht quantitativ erfolgt. Dies konnte durch die Detektion von Partikeln in den Hydrolysaten mit einem Durchmesser von bis zu 6 µm bestätigt werden. Schließlich wurden durch Anwendung der 2-stufigen Hydrolyse, reduktiver Aminierung und Analyse mittels HPAEC-UV verschiedene Hölzer und Einjahrespflanzen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht.

In weiterführenden Arbeiten kann die Integration von HexA, dem Abbauprodukt von meGlcA in basisch hergestellten Zellstoffen, in die bestehende Methode erfolgen. Dafür muss zunächst geprüft werden, ob HexA unter den sauren Bedingungen der reduktiven Aminierung stabil ist. Dies kann jedoch als wenig wahrscheinlich eingeschätzt werden. Weiterhin können Untersuchungen bezüglich des enzymatischen Abbaus von lignocellulöser Biomasse durchgeführt werden. Dafür müssen die Enzyme aus den Pilzen und Bakterien tiefgründig erforscht werden, die einen Abbau der Biomasse zur Folge haben. Für die quantitative Analytik sind dann kombinierte Verfahren aus enzymatischer und schwacher saurer Hydrolyse denkbar.

Die Charakterisierung hydroxyalkylierter Arabinoxylane erfolgte durch mikrowellenbasierte Hydrolyse mit TFA, reduktive Aminierung sowie Analyse mittels HPLC-MS und HPLC-Fluoreszenz. Durch diese Untersuchungen konnten die Substituentenverteilung von HP- und HVE-Xylanen dargestellt werden. Daraus wurde abgeleitet, dass HVE-Xylane größere molare Substitutionen aufweisen und folglich während der

Derivatisierung eine höhere Verlängerung der Seitenketten stattfindet als bei HP-Xylanen. Weiterhin konnte die bevorzugte Derivatisierung von Arabinose gegenüber der Xylose beschrieben werden.

Die Analytik von hydroxyalkylierten Arabinoxylanen mit HPLC-MS zeigte die Anwesenheit verschiedener Isomere. Durch zusätzliche Messungen mit HPLC-MS/MS können die im Chromatogramm detektierten Peaks spezifischen Verbindungen zugeordnet werden. Neben der Detektion mit ESI-MS/MS stellt auch die Kopplung von HPLC mit MALDI-MS eine vielversprechende Alternative dar. Die gewonnenen Informationen würden weitere sehr interessante Einblicke in die Hydroxyalkylierung von Xylanen geben. So könnten die bevorzugten Positionen der Derivatisierung erfasst und weitere charakteristische Unterschiede hinsichtlich der Substituenten und deren Verlängerung ermittelt werden. In weiterführenden Arbeiten kann das hier vorgestellte Verfahren auf Produkte angewandt werden, die mit anderen COC derivatisiert wurden.

Literatur

- Ackerman, D. L., Craft, K. M., & Townsend, S. D. (2017). Infant food applications of complex carbohydrates: Structure, synthesis, and function. *Carbohydrate Research*, 437, 16-27.
- Adeuya, A., & Price, N. P. J. (2007). Enumeration of carbohydrate hydroxyl groups by silylation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(13), 2095-2100.
- Akil, Y., Lehnen, R., & Saake, B. (2016a). Novel synthesis of hydroxyvinylethyl xylan using 4-vinyl-1,3-dioxolan-2-one. *Tetrahedron Letters*, 57(37), 4200-4202.
- Akil, Y., Lorenz, D., Lehnen, R., & Saake, B. (2016b). Safe and non-toxic hydroxyalkylation of xylan using propylene carbonate. *European Polymer Journal*, 77, 88-97.
- Albert, A., & Serjeant, E. P. (1984). Introduction. In A. Albert & E. P. Serjeant (Eds.). *The Determination of Ionization Constants: A Laboratory Manual* (pp. 2-13). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Albuquerque, T. L. d., da Silva Jr, I. J., de Macedo, G. R., & Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*, 49(11), 1779-1789.
- Alpert, A. J., Shukla, M., Shukla, A. K., Zieske, L. R., Yuen, S. W., Ferguson, M. A. J., Mehlert, A., Pauly, M., & Orlando, R. (1994). Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 676(1), 191-202.
- Altaner, C. M., & Saake, B. (2016). Quantification of the chemical composition of lignocellulosics by solution ¹H NMR spectroscopy of acid hydrolysates. *Cellulose*, 23(1), 1003-1010.

Alves, E. F., Bose, S. K., Francis, R. C., Colodette, J. L., Iakovlev, M., & Van Heiningen, A. (2010). Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. *Carbohydrate Polymers*, 82(4), 1097-1101.

Andersson, S.-I., Samuelson, O., Ishihara, M., & Shimizu, K. (1983). Structure of the reducing end-groups in spruce xylan. *Carbohydrate Research*, 111(2), 283-288.

Anumula, K. R. (1994). Quantitative Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by High-Performance Liquid Chromatography with Highly Sensitive Fluorescence Detection. *Analytical Biochemistry*, 220(2), 275-283.

Anumula, K. R. (2008). Unique anthranilic acid chemistry facilitates profiling and characterization of Ser/Thr-linked sugar chains following hydrazinolysis. *Analytical Biochemistry*, 373(1), 104-111.

Batista, R. M. F., Oliveira, E., Costa, S. P. G., Lodeiro, C., & Raposo, M. M. M. (2008). Synthesis and evaluation of bipendant-armed (oligo)thiophene crown ether derivatives as new chemical sensors. *Tetrahedron Letters*, 49(46), 6575-6578.

Bayati, F., Boluk, Y., & Choi, P. (2014). Diffusion Behavior of Water at Infinite Dilution in Hydroxypropyl Xylan Films with Sorbitol and Cellulose Nanocrystals. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1305-1311.

Bayati, F., Boluk, Y., & Choi, P. (2015). Inverse Gas Chromatography Study of the Permeability of Aroma through Hydroxypropyl Xylan Films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(12), 3114-3122.

Bayati, F., Boluk, Y., & Choi, P. (2016). Effect of Humidity on the Permeability of Alcohols in Hydroxypropyl Xylan Films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(5), 2578-2583.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer.

- Bertaud, F., Sundberg, A., & Holmbom, B. (2002). Evaluation of acid methanolysis for analysis of wood hemicelluloses and pectins. *Carbohydrate Polymers*, 48(3), 319-324.
- Beyer, H., Walter, W., & Francke, W. (2004). *Lehrbuch der Organischen Chemie*. Stuttgart: Hirzel.
- Bigge, J. C., Patel, T. P., Bruce, J. A., Goulding, P. N., Charles, S. M., & Parekh, R. B. (1995). Nonselective and Efficient Fluorescent Labeling of Glycans Using 2-Amino Benzamide and Anthranilic Acid. *Analytical Biochemistry*, 230(2), 229-238.
- Blumentritt, M., Gardner Douglas, J., Cole Barbara, J. W., & Shaler Stephen, M. (2016). Influence of hot-water extraction on ultrastructure and distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem as detected by gold immunolabeling. *Holzforschung* (Vol. 70, pp. 243-252).
- Bomann, M. D., Guch, I. C., & DiMare, M. (1995). A mild, pyridine-borane-based reductive amination protocol. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(18), 5995-5996.
- Borch, R. F., Bernstein, M. D., & Durst, H. D. (1971). Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society*, 93(12), 2897-2904.
- Bouveng, H. O., Garegg, P. J., & Lindberg, B. (1960). POSITION OF THE O-ACETYL GROUPS IN BIRCH XYLAN. *Acta Chemica Scandinavica*, 14(3), 742-748.
- Buchanan, C. M., Buchanan, N. L., Debenham, J. S., Gatenholm, P., Jacobsson, M., Shelton, M. C., Watterson, T. L., & Wood, M. D. (2003). Preparation and characterization of arabinoxylan esters and arabinoxylan ester/cellulose ester polymer blends. *Carbohydrate Polymers*, 52(4), 345-357.
- Burne, J. (1840). *A Treatise on the Causes and Consequences of Habitual Constipation*. Haswell, Barrington and Haswell.
- Carpita, N. C., & Whittern, D. (1986). A highly substituted glucuronoarabinoxylan from developing maize coleoptiles. *Carbohydrate Research*, 146(1), 129-140.

Cataldi, T. R. I., Campa, C., & De Benedetto, G. E. (2000). Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *368*(8), 739-758.

Cavagna, F., Deger, H., & Puls, J. (1984). 2D-analysis of the structure of an aldetriouronic acid obtained from birch wood. *Carbohydrate Research*, *129*(JUL), 1-8.

Ceusters, J., Londers, E., Brijs, K., Delcour, J. A., & De Proft, M. P. (2008). Glucuronoarabinoxylan structure in the walls of Aechmea leaf chlorenchyma cells is related to wall strength. *Phytochemistry*, *69*(12), 2307-2311.

Chen, H.-L., Fan, Y.-H., Chen, M.-E., & Chan, Y. (2005). Unhydrolyzed and hydrolyzed konjac glucomannans modulated cecal and fecal microflora in Balb/c mice. *Nutrition*, *21*(10), 1059-1064.

Chong, S.-L., Koutaniemi, S., Virkki, L., Pynnönen, H., Tuomainen, P., & Tenkanen, M. (2013). Quantitation of 4-O-methylglucuronic acid from plant cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *91*(2), 626-630.

Cipriani, T. R., Mellinger, C. G., de Souza, L. M., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marques, M. C. A., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L., & Iacomini, M. (2008). Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. *Carbohydrate Polymers*, *74*(2), 274-278.

Cummings, J. H. (2001). The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition*, *3*, 183-252.

Dahlman, O., Jacobs, A., Liljenberg, A., & Olsson, A. I. (2000). Analysis of carbohydrates in wood and pulps employing enzymatic hydrolysis and subsequent capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, *891*(1), 157-174.

Dalpathado, D. S., Jiang, H., Kater, M. A., & Desaire, H. (2005). Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *381*(6), 1130-1137.

- Damaskos, D., & Kolios, G. (2008). Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora 'on the scope'. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *65*(4), 453-467.
- Dammstrom, S., Salmen, L., & Gatenholm, P. (2009). On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. *BioResources*, *4*(1), 3-14.
- Daus, S., Petzold-Welcke, K., Kötteritzsch, M., Baumgaertel, A., Schubert, U. S., & Heinze, T. (2011). Homogeneous Sulfation of Xylan from Different Sources. *Macromolecular Materials and Engineering*, *296*(6), 551-561.
- Davis, M. W. (1998). A rapid modified method for compositional carbohydrate analysis of lignocellulosics by high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD). *Journal of Wood Chemistry and Technology*, *18*(2), 235-252.
- De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., & Rombouts, F. M. (1992). Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry*, *207*(1), 176-185.
- DeJongh, D. C., Radford, T., Hribar, J. D., Hanessian, S., Bieber, M., Dawson, G., & Sweeley, C. C. (1969). Analysis of trimethylsilyl derivatives of carbohydrates by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, *91*(7), 1728-1740.
- Deutschmann, R., & Dekker, R. F. H. (2012). From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1627-1640.
- Ducatti, D. R. B., Colodi, F. G., Gonçalves, A. G., Duarte, M. E. R., & Nosedá, M. D. (2011). Production of agaro- and carra-oligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *21*, 296-304.

Duval, A., & Avérous, L. (2016). Oxyalkylation of Condensed Tannin with Propylene Carbonate as an Alternative to Propylene Oxide. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(6), 3103-3112.

Duval, A., & Avérous, L. (2017). Solvent- and Halogen-Free Modification of Biobased Polyphenols to Introduce Vinyl Groups: Versatile Aromatic Building Blocks for Polymer Synthesis. *ChemSusChem*, 10(8), 1813-1822.

Ebringerova, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542-556.

Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In T. Heinze (Ed.). *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (pp. 1-67). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Ekhart, P. F., Van, D. S. H., Possemiers, S., Van, D. A. P., & Van, D. W. T. (2010). Arabinoxylans for modulating the barrier function of the intestinal surface. Google Patents.

Eliel, E. L. (1956). *Substitution at Saturated Carbon Atoms*. New York: Wiley.

Evtugin, D., Tomás, J., Silva, A. S., & Neto, C. (2003). Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, 338(7), 597-604.

Fan, J. Q., Kondo, A., Kato, I., & Lee, Y. C. (1994). High-Performance Liquid Chromatography of Glycopeptides and Oligosaccharides on Graphitized Carbon Columns. *Analytical Biochemistry*, 219(2), 224-229.

Fincher, G., & Stone, B. (1974). A Water-soluble Arabinogalactan-Peptide From Wheat Endosperm. *Australian Journal of Biological Sciences*, 27(2), 117-132.

- Fischer, M. H., Yu, N., Gray, G. R., Ralph, J., Anderson, L., & Marlett, J. A. (2004). The gel-forming polysaccharide of psyllium husk (*Plantago ovata* Forsk). *Carbohydrate Research*, 339(11), 2009-2017.
- Fishman, M. L., Doner, L. W., Chau, H. K., & Hoagland, P. D. (2000). Characterization of Hemicellulose B from Corn Fiber by High-Performance Size Exclusion Chromatography with On-Line Molar Mass and Viscometric Detection. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 5(4-6), 359-379.
- Friebolin, H. (2013). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fundador, N. G. V., Enomoto-Rogers, Y., Takemura, A., & Iwata, T. (2012). Syntheses and characterization of xylan esters. *Polymer*, 53(18), 3885-3893.
- García-González, C. A., Jin, M., Gerth, J., Alvarez-Lorenzo, C., & Smirnova, I. (2015). Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 117, 797-806.
- Geissmann, T., & Neukom, H. (1971). Vernetzung von Phenolcarbonsäureestern von Polysacchariden durch oxydative phenolische Kupplung. *Helvetica Chimica Acta*, 54(4), 1108-1112.
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2017). *Ethylenoxid*. [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/012000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/012000.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0): 14.08.2017
- Glasser, W. G. (1995). Chemical modification of wood, pulp, and wood constituents. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry* (Vol. I, pp. 55-67). Helsinki, Finland.
- Glasser, W. G., Ravindran, G., Jain, R. K., Samaranayake, G., & Todd, J. (1995). Comparative Enzyme Biodegradability of Xylan, Cellulose, and Starch Derivatives†. *Biotechnology Progress*, 11(5), 552-557.

Glasser, W. G., & Wright, R. S. (1998). Steam-assisted biomass fractionation. II. fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 219-235.

Goksu, E. I., Karamanlioglu, M., Bakir, U., Yilmaz, L., & Yilmazer, U. (2007). Production and Characterization of Films from Cotton Stalk Xylan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10685-10691.

Gullón, P., Moura, P., Esteves, M. P., Girio, F. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2008). Assessment on the Fermentability of Xylooligosaccharides from Rice Husks by Probiotic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7482-7487.

Han, W., Zhao, C., Elder, T., Chen, K., Yang, R., Kim, D., Pu, Y., Hsieh, J., & Ragauskas, A. J. (2012). Study on the modification of bleached eucalyptus kraft pulp using birch xylan. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 719-725.

Hänsel, R., Sticher, O., & Steinegger, E. (1999). *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Berlin: Springer.

Harder, H., Khol-Parisini, A., & Zebeli, Q. (2015). Treatments with organic acids and pullulanase differently affect resistant starch and fiber composition in flour of various barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.). *Starch - Stärke*, 67(5-6), 512-520.

Hartley, R. D., & Ford, C. W. (1989). Phenolic Constituents of Plant Cell Walls and Wall Biodegradability. *Plant Cell Wall Polymers* (Vol. 399, pp. 137-145): American Chemical Society.

Harvey, D. J. (2011). Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879(17-18), 1196-1225.

Hase, S., Ikenaka, T., & Matsushima, Y. (1978). Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 85(1), 257-263.

Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *100*(1), 10-18.

Herges, R., & Winkler, T. (2017). Reaktionen von Carbonyl-Verbindungen mit N-Nucleophilen. *Bildung von Iminen* (Vol. 2017). http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/2/vlu/carbonyle/nucleophile_n.vlu/Page/vsc/de/ch/2/oc/stoffklassen/systematik_funktionelle_gruppen/carbonyle/carbonylreaktionen/n_nucl_imine.vscml.html: 11.09.

Hettrich, K., Drechsler, U., Loth, F., & Volkert, B. (2017). Preparation and Characterization of Water-Soluble Xylan Ethers. *Polymers*, *9*(4).

Höije, A., Sternemalm, E., Heikkinen, S., Tenkanen, M., & Gatenholm, P. (2008). Material Properties of Films from Enzymatically Tailored Arabinoxylans. *Biomacromolecules*, *9*(7), 2042-2047.

Hromádková, Z., Kováčiková, J., & Ebringerová, A. (1999). Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. *Industrial Crops and Products*, *9*(2), 101-109.

Hughes, S., & Johnson, D. C. (1981). Amperometric detection of simple carbohydrates at platinum electrodes in alkaline solutions by application of a triple-pulse potential waveform. *Analytica Chimica Acta*, *132*(Supplement C), 11-22.

Huisman, M. M. H., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2000). Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *43*(3), 269-279.

Hüsing, N., & Schubert, U. (1998). Aerogels—Airy Materials: Chemistry, Structure, and Properties. *Angewandte Chemie International Edition*, *37*(1-2), 22-45.

Hutchins, R. O., Hutchins, M. K., Crawley, M. L., Mercado-Marin, E. V., & Sarpong, R. (2001). Sodium Cyanoborohydride. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*: John Wiley & Sons, Ltd.

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

Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127(2), 111-127.

IUPAC. (2014). *Compendium of Chemical Terminology*. International Union of Pure and Applied Chemistry.

Jacobs, A., Lundqvist, J., Stålbrand, H., Tjerneld, F., & Dahlman, O. (2002). Characterization of water-soluble hemicelluloses from spruce and aspen employing SEC/MALDI mass spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337(8), 711-717.

Jain, H., & Mulay, S. (2014). A review on different modes and methods for yielding a pentose sugar: xylitol. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(2), 135-143.

Jain, R. K., Sjöstedt, M., & Glasser, W. G. (2000). Thermoplastic Xylan Derivatives with Propylene Oxide. *Cellulose*, 7(4), 319-336.

Jenzer, G., Mallat, T., Maciejewski, M., Eigenmann, F., & Baiker, A. (2001). Continuous epoxidation of propylene with oxygen and hydrogen on a Pd–Pt/TS-1 catalyst. *Applied Catalysis A: General*, 208(1), 125-133.

Jiang, Z. H., Van Lierop, B., & Berry, R. (2000). Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi Journal*, 83(1), 167-175.

Jin, H., Nishiyama, Y., Wada, M., & Kuga, S. (2004). Nanofibrillar cellulose aerogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 240(1–3), 63-67.

Johansson, M. H., & Samuelson, O. (1977). Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Science and Technology*, 11(4), 251-263.

Johnson, D. C. (1986). Carbohydrate detection gains potential. *Nature*, 321(6068), 451-452.

- Jonnalagadda, S. S., Thye, F. W., & Robertson, J. L. (1993). Plasma total and lipoprotein cholesterol, liver cholesterol and fecal cholesterol excretion in hamsters fed fiber diets. *The Journal of nutrition*, 123(8), 1377-1382.
- Kappe, C. O. (2004). Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(46), 6250-6284.
- Karlsson, H., & Hansson, G. C. (1988). Gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry for the characterization of complex mixtures of large oligosaccharides. *Journal of High Resolution Chromatography*, 11(11), 820-824.
- Kerley, M. S., Fahey, G. C., Gould, J. M., & Iannotti, E. L. (1988). Effects of Lignification, Cellulose Crystallinity and Enzyme Accessible Space on the Digestibility of Plant Cell Wall Carbohydrates by the Ruminant. *Food Structure*, 7(1), 59-65.
- Kiguchi, M., Hamase, K., Wu, W., Yamamoto, K., & Zaitso, K. (1999). Sensitive Anion-Exchange HPLC of Aminopyrazine Derivatives of Saccharides Having *N*-Acetylated Monosaccharide at the Reducing End. *Analytical Sciences*, 15(9), 903-905.
- Kilpelainen, P., Leppanen, K., Spetz, P., Kitunen, V., Ilvesniemi, H., Pranovich, A., & Willfor, S. (2012). Pressurised hot water extraction of acetylated xylan from birch sawdust. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 27(4), 680-688.
- Koch, F. (1886). Experimentelle Prüfung des Holzgummi und dessen Verbreitung im Pflanzenreiche. *Pharmaceutische Zeitschrift Für Russland*, 38-43, 45-47.
- Kühnel, I., Podschun, J., Saake, B., & Lehnen, R. (2015). Synthesis of lignin polyols via oxyalkylation with propylene carbonate. *Holzforschung* (Vol. 69, p. 531).
- Kühnel, I., Saake, B., & Lehnen, R. (2017). Oxyalkylation of lignin with propylene carbonate: Influence of reaction parameters on the ensuing bio-based polyols. *Industrial Crops and Products*, 101, 75-83.
- Kumar, S., de A. e Silva, J., Wani, M. Y., Gil, J. M., & Sobral, A. J. F. N. (2017). Carbon dioxide capture and conversion by an environmentally friendly chitosan based meso-

tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin. *Carbohydrate Polymers*, 175(Supplement C), 575-583.

Laine, C., Harlin, A., Hartman, J., Hyvärinen, S., Kammiovirta, K., Krogerus, B., Pajari, H., Rautkoski, H., Setälä, H., Sievänen, J., Uotila, J., & Vähä-Nissi, M. (2013). Hydroxyalkylated xylans – Their synthesis and application in coatings for packaging and paper. *Industrial Crops and Products*, 44, 692-704.

Lamari, F. N., Kuhn, R., & Karamanos, N. K. (2003). Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography B*, 793(1), 15-36.

Lawoko, M., & van Heiningen, A. R. P. (2011). Fractionation and Characterization of Completely Dissolved Ball Milled Hardwood. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31(3), 183-203.

Lawther, J. M., Sun, R., & Banks, W. B. (1996). Effects of extraction conditions and alkali type on yield and composition of wheat straw hemicellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 60(11), 1827-1837.

Li, H., Wu, H., Xiong, L., Chen, X., Wang, C., Qi, G., Huang, C., Guo, H., Luo, M., Liu, J., Long, M., & Chen, X. (2017). The hydrolytic efficiency and synergistic action of recombinant xylan-degrading enzymes on xylan isolated from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, 175(Supplement C), 199-206.

Liu, J., Kisonen, V., Willför, S., Xu, C., & Vilaplana, F. (2016). Profiling the substitution pattern of xyloglucan derivatives by integrated enzymatic hydrolysis, hydrophilic-interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1463, 110-120.

Lorenz, D., Erasmy, N., Akil, Y., & Saake, B. (2016). A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydrate Polymers*, 140, 181-187.

Lorenz, D., Janzon, R., & Saake, B. (2017a). Determination of uronic acids and neutral carbohydrates in pulp and biomass by hydrolysis, reductive amination and HPAEC-UV. *Holzforschung*.

Lorenz, D., Knöpfle, A., Akil, Y., & Saake, B. (2017b). Quantitative investigations of xylose and arabinose substituents in hydroxypropylated and hydroxyvinylethylated arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 175(Supplement C), 671-678.

Marcelino, H., da Silva, A., Gomes, M., Oliveira, E., Nagashima-Junior, T., Pinheiro, G., da Silva, A., Timoteo, A., Agnez-Lima, L., Ayala, A., Oliveira, A., & do Egito, E. (2015). Leads from Physical, Chemical, and Thermal Characterization on Cytotoxic Effects of Xylan-Based Microparticles. *Polymers*, 7(11), 1515.

Mason, W. H. (1926). Process and apparatus for disintegration of wood and the like. USA (Mississippi): Google Patents.

Mathon, C., Barding Jr, G. A., & Larive, C. K. (2017). Separation of ten phosphorylated mono-and disaccharides using HILIC and ion-pairing interactions. *Analytica Chimica Acta*, 972, 102-110.

Meiers, R., Dingerdissen, U., & Hölderich, W. F. (1998). Synthesis of Propylene Oxide from Propylene, Oxygen, and Hydrogen Catalyzed by Palladium–Platinum–Containing Titanium Silicalite. *Journal of Catalysis*, 176(2), 376-386.

Mellerowicz, E. J., & Sundberg, B. (2008). Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 293-300.

Meyer, V. R. (2009). *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*. Weinheim: Wiley-VCH.

Mikkonen, K. S., Heikkinen, S., Soovre, A., Peura, M., Serimaa, R., Talja, R. A., Helén, H., Hyvönen, L., & Tenkanen, M. (2009). Films from oat spelt arabinoxylan plasticized with glycerol and sorbitol. *Journal of Applied Polymer Science*, 114(1), 457-466.

Mikkonen, K. S., Laine, C., Kontro, I., Talja, R. A., Serimaa, R., & Tenkanen, M. (2015). Combination of internal and external plasticization of hydroxypropylated birch xylan tailors the properties of sustainable barrier films. *European Polymer Journal*, *66*, 307-318.

Mikkonen, K. S., Parikka, K., Ghafar, A., & Tenkanen, M. (2013). Prospects of polysaccharide aerogels as modern advanced food materials. *Trends in Food Science & Technology*, *34*(2), 124-136.

Mikkonen, K. S., Yadav, M. P., Cooke, P., Willför, S., Hicks, K. B., & Tenkanen, M. (2008). Films from spruce salactoglucomannan blended with poly(vinyl alcohol), corn arabinoxylan, and konjac glucomannan. *BioResources; Vol 3, No 1 (2008)*.

Mischnick, P., Unterrieser, I., Voiges, K., Cuers, J., Rinken, M., & Adden, R. (2013). A New Method for the Analysis of the Substitution Pattern of Hydroxyethyl(methyl)-Celluloses Along the Polysaccharide Chain. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *214*(12), 1363-1374.

Morais de Carvalho, D., Martínez-Abad, A., Evtuguin, D. V., Colodette, J. L., Lindström, M. E., Vilaplana, F., & Sevastyanova, O. (2017). Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. *Carbohydrate Polymers*, *156*, 223-234.

Nagashima, T., Oliveira, E. E., da Silva, A. E., Marcelino, H. R., Gomes, M. C. S., Aguiar, L. M., de Araujo, I. B., Soares, L. A. L., de Oliveira, A. G., & do Egito, E. S. T. (2008). Influence of the Lipophilic External Phase Composition on the Preparation and Characterization of Xylan Microcapsules-A Technical Note. *Aaps Pharmscitech*, *9*(3), 814-817.

Naran, R., Chen, G. B., & Carpita, N. C. (2008). Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. *Plant Physiol*, *148*(1), 132-141.

- Nuyken, O., Samarian, H., & Wurdack, I. (2017). Gelpermeationschromatographie. (Vol. 2017). <http://www.chemgappedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/9/mac/charakterisierung/d3/gpc/gpc.vlu.html>: 06.09.
- Nypelö, T., Laine, C., Aoki, M., Tammelin, T., & Henniges, U. (2016). Etherification of Wood-Based Hemicelluloses for Interfacial Activity. *Biomacromolecules*, *17*(5), 1894-1901.
- Pabst, M., Kolarich, D., Pörtl, G., Dalik, T., Lubec, G., Hofinger, A., & Altmann, F. (2009). Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method. *Analytical Biochemistry*, *384*(2), 263-273.
- Pahimanolis, N., Kilpeläinen, P., Master, E., Ilvesniemi, H., & Seppälä, J. (2015). Novel thiol- amine- and amino acid functional xylan derivatives synthesized by thiol-ene reaction. *Carbohydrate Polymers*, *131*, 392-398.
- Pahimanolis, N., Sorvari, A., Luong, N. D., & Seppälä, J. (2014). Thermoresponsive xylan hydrogels via copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Carbohydrate Polymers*, *102*, 637-644.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, *74*(1), 25-33.
- Parikka, K., Nikkilä, I., Pitkänen, L., Ghafar, A., Sontag-Strohm, T., & Tenkanen, M. (2017). Laccase/TEMPO oxidation in the production of mechanically strong arabinoxylan and glucomannan aerogels. *Carbohydrate Polymers*, *175*, 377-386.
- Pauly, M., & Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, *54*(4), 559-568.
- Pena, M. J., Zhong, R., Zhou, G. K., Richardson, E. A., O'Neill, M. A., Darvill, A. G., York, W. S., & Ye, Z. H. (2007). Arabidopsis irregular xylem8 and irregular xylem9: implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell*, *19*(2), 549-563.

- Penttilä, P. A., Várnai, A., Pere, J., Tammelin, T., Salmén, L., Siika-aho, M., Viikari, L., & Serimaa, R. (2013). Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. *Bioresource Technology*, *129*, 135-141.
- Pettersen, R. C. (1984). The Chemical Composition of Wood. In R. Rowell (Ed.). *The chemistry of solid wood* (Vol. 207, pp. 57-126). Washington: American Chemical Society.
- Pitkänen, L., Aseyev, V., Laine, C., Tuomainen, P., & Tenkanen, M. (2017). Size-exclusion chromatography of xylan derivatives—the critical evaluation of macromolecular data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(20), 4811-4817.
- Plematl, A., Demelbauer, U. M., Josic, D., & Rizzi, A. (2005). Determination of the site-specific and isoform-specific glycosylation in human plasma-derived antithrombin by IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS. *PROTEOMICS*, *5*(15), 4025-4033.
- Pope, B. G. (1984). Hydroxyalkylation of polysaccharides. Google Patents.
- Pristov, J. B., Mitrović, A., & Spasojević, I. (2011). A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *346*(14), 2255-2259.
- Przybylski, P., Schroeder, G., & Brzezinski, B. (2002). The Schiff base of gossypol with 2-(aminomethyl)-15-crown-5 complexes with monovalent cations studied by MS, ¹H NMR, FT-IR and PM5 semiempirical methods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *4*(24), 6137-6143.
- Puls, J., Borchmann, A., Gottschalk, D., & Wiegel, J. (1988). Xylobiose and Xylooligomers. *Methods in Enzymology*, *160*, 528-536.
- Puls, J., Tenkanen, M., Korte, H. E., & Poutanen, K. (1991). Products of hydrolysis of beechwood acetyl-4-O-methylglucuronoxylan by a xylanase and an acetyl xylan esterase. *Enzyme and Microbial Technology*, *13*(6), 483-486.
- Rakete, S., & Glomb, M. A. (2013). A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for

Precolumn Derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3828-3833.

Ralph, J., Helm, R. F., Quideau, S., & Hatfield, R. D. (1992). Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(21), 2961-2969.

Ramírez, F., Puls, J., Zúñiga, V., & Saake, B. (2008). Sorption of corn cob and oat spelt arabinoxylan onto softwood kraft pulp. *Holzforschung* (Vol. 62, p. 329).

Reid, J. S. G. (1985). Cell Wall Storage Carbohydrates in Seeds—Biochemistry of the Seed “Gums” and “Hemicelluloses”. In J. A. Callow & H. W. Woolhouse (Eds.). *Advances in Botanical Research* (Vol. Volume 11, pp. 125-155): Academic Press.

Rosenau, T., Potthast, A., Zwirchmayr, N. S., Hettegger, H., Plasser, F., Hosoya, T., Bacher, M., Krainz, K., & Dietz, T. (2017). Chromophores from hexeneuronic acids: identification of HexA-derived chromophores. *Cellulose*, 24(9), 3671-3687.

Ruhaak, L. R., Steenvoorden, E., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2010). 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *PROTEOMICS*, 10(12), 2330-2336.

Saake, B., Kruse, T., & Puls, J. (2001). Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Bioresource Technology*, 80(3), 195-204.

Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millett, M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi*, 37(8), 336-343.

Sakakura, T., Choi, J.-C., & Yasuda, H. (2007). Transformation of Carbon Dioxide. *Chemical Reviews*, 107(6), 2365-2387.

- Salam, A., Venditti, R. A., Pawlak, J. J., & El-Tahlawy, K. (2011). Crosslinked hemicellulose citrate–chitosan aerogel foams. *Carbohydrate Polymers*, *84*(4), 1221-1229.
- Sánchez-Bastardo, N., Romero, A., & Alonso, E. (2017). Extraction of arabinoxylans from wheat bran using hydrothermal processes assisted by heterogeneous catalysts. *Carbohydrate Polymers*, *160*, 143-152.
- Sato, S., Sakamoto, T., Miyazawa, E., & Kikugawa, Y. (2004). One-pot reductive amination of aldehydes and ketones with α -picoline-borane in methanol, in water, and in neat conditions. *Tetrahedron*, *60*(36), 7899-7906.
- Saxena, A., Elder, T. J., Pan, S., & Ragauskas, A. J. (2009a). Novel nanocellulosic xylan composite film. *Composites Part B: Engineering*, *40*(8), 727-730.
- Saxena, A., Elder, T. J., & Ragauskas, A. J. (2011). Moisture barrier properties of xylan composite films. *Carbohydrate Polymers*, *84*(4), 1371-1377.
- Saxena, A., & Ragauskas, A. J. (2009b). Water transmission barrier properties of biodegradable films based on cellulosic whiskers and xylan. *Carbohydrate Polymers*, *78*(2), 357-360.
- Schäffner, B., Schäffner, F., Verevkin, S. P., & Börner, A. (2010). Organic Carbonates as Solvents in Synthesis and Catalysis. *Chemical Reviews*, *110*(8), 4554-4581.
- Schellenberg, K. A. (1963). The Synthesis of Secondary and Tertiary Amines by Borohydride Reduction1. *The Journal of Organic Chemistry*, *28*(11), 3259-3261.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, *61*(1), 263-289.
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F., Dignum, M. J. W., Grabber, J. H., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (1999). Studies on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans from wheat flour and wheat bran. *Carbohydrate Polymers*, *38*(4), 309-317.

Schooneveld-Bergmans, M. E. F., Hopman, A. M. C. P., Beldman, G., & Voragen, A. G. J. (1998). Extraction and partial characterization of feruloylated glucuronarabinoxylans from wheat bran. *Carbohydrate Polymers*, 35(1–2), 39-47.

Schulze, E. (1891a). Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 24(2), 2277-2287.

Schulze, E. (1891b). Zur Kenntniss der chemischen Zusammensetzung der pflanzlichen Zellmembranen. [Dritte Mittheilung.]. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 24(2), 2277-2287.

Schulze, E., Steiger, E., & Maxwell, W. (1890). Zur Chemie der Pflanzenmembranen. I. Abhandlung. *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 14, 227-273.

Schütt, F., Haas Nils, P., Dehne, L., Koch, G., Janzon, R., & Saake, B. (2013). Steam pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar wood: comparison of optimal conditions with and without SO₂ impregnation. *Holzforschung*, 67, 9-17.

Shatalov, A. A., Evtugin, D. V., & Pascoal Neto, C. (1999). (2-O- α -d-Galactopyranosyl-4-O-methyl- α -d-glucurono)-d-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, 320(1–2), 93-99.

Shimizu, K., Ishihara, M., & Ishihara, T. (1976). Hemicellulases of Brown Rotting Fungus, *Tyromyces palustris*. II. The Oligosaccharides from the Hydrolysate of a Hardwood Xylan by the Intracellular Xylanase. *Mokuzai Gakkaishi*, 22(11), 618-625.

Shimizu, K., Sudo, K., Ono, H., Ishihara, M., Fujii, T., & Hishiyama, S. (1998). Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 195-203.

Si, W., Li, Y., Zheng, J., Wei, S. a., & Wang, D. (2017). Enhanced hydrolysis of bamboo biomass by chitosan based solid acid catalyst with surfactant addition in ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*, 174, 154-159.

Silva, A. K. A., da Silva, É. L., Oliveira, E. E., Nagashima Jr, T., Soares, L. A. L., Medeiros, A. C., Araújo, J. H., Araújo, I. B., Carriço, A. S., & Egito, E. S. T. (2007). Synthesis and characterization of xylan-coated magnetite microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 334(1–2), 42-47.

Silva, A. K. A., Juenet, M., Meddahi-Pellé, A., & Letourneur, D. (2015). Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 116, 267-277.

Šimkovic, I., Kelnar, I., Mendichi, R., Bertok, T., & Filip, J. (2017). Composite films prepared from agricultural by-products. *Carbohydrate Polymers*, 156, 77-85.

Sinner, M., Simatupang, M. H., & Dietrichs, H. H. (1975). Automated quantitative analysis of wood carbohydrates by borate complex ion exchange chromatography. *Wood Science and Technology*, 9(4), 307-322.

Small, H., Stevens, T. S., & Bauman, W. C. (1975). Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Analytical Chemistry*, 47(11), 1801-1809.

Smith, B. G., & Harris, P. J. (2001). Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry*, 56(5), 513-519.

Soignet, D. M., Benerito, R. R., & McKelvey, J. B. (1967). Diethylaminoethyl cellulose-epoxide reactions. *Journal of Applied Polymer Science*, 11(7), 1155-1172.

Speelmans, G., Knol, J., Haarman, M., Garsson, J., Vriesema, A. J. M., & Alles, M. S. (2016). Nutritional composition with probiotics. (Vol. 9314047). Netherlands.

Staudinger, H., & Reinecke, F. (1939). Über makromolekulare VVerbindungen. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 2(9), 321-323.

Stephen, A. M. (1983). 3 - Other Plant Polysaccharides A2 - ASPINALL, GERALD O. *The Polysaccharides* (pp. 97-193): Academic Press.

Stergar, J., & Maver, U. (2016). Review of aerogel-based materials in biomedical applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 77(3), 738-752.

Stevanic, J. S., Joly, C., Mikkonen, K. S., Pirkkalainen, K., Serimaa, R., Rémond, C., Toriz, G., Gatenholm, P., Tenkanen, M., & Salmén, L. (2011). Bacterial nanocellulose-reinforced arabinoxylan films. *Journal of Applied Polymer Science*, *122*(2), 1030-1039.

Striegel, A. M., Yau, W. W., Kirkland, J. J., & Bly, D. D. (2009). Background. *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography* (pp. 1-17): John Wiley & Sons, Inc.

Strnad, S., Velkova, N., Saake, B., Doliška, A., Bračić, M., & Zemljič, L. F. (2013). Influence of sulfated arabino- and glucuronoxylans charging-behavior regarding antithrombotic properties. *Reactive and Functional Polymers*, *73*(12), 1639-1645.

Sun, R., & Tomkinson, J. (2003). Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. *European Polymer Journal*, *39*(4), 751-759.

Sun, R., Wang, X. Y., Sun, X. F., & Sun, J. X. (2002a). Physicochemical and thermal characterisation of residual hemicelluloses isolated by TAED activated peroxide from ultrasonic irradiated and alkali organosolv pre-treated wheat straw. *Polymer Degradation and Stability*, *78*(2), 295-303.

Sun, R. C., & Tomkinson, J. (2002b). Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, *50*(3), 263-271.

Sun, Z. C., Wei, Z., & Wei, K. M. (2009). A Model for Predicting the Optimal Conditions for Labeling the Carbohydrates with the Amine Derivatives by Reductive Amination. *Letters in Organic Chemistry*, *6*(7), 549-551.

Sundberg, A., Sundberg, K., Lillandt, C., & Holmbom, B. (1996). Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, *11*(4), 216-219.

Surek, E., & Buyukkileci, A. O. (2017). Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell. *Carbohydrate Polymers*, *174*, 565-571.

Szejtli, J. (1976). *Säurehydrolyse glykosidischer Bindungen*. Budapest: VEB Fachbuchverlag Leipzig.

Takao, T., Tambara, Y., Nakamura, A., Yoshino, K.-i., Fukuda, H., Fukuda, M., & Shimonishi, Y. (1996). Sensitive Analysis of Oligosaccharides Derivatized with 4-Aminobenzoic Acid 2-(Diethylamino)ethyl Ester by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(6), 637-640.

Teleman, A., Hausalo, T., Tenkanen, M., & Vuorinen, T. (1996). Identification of the acidic degradation products of hexenuronic acid and characterisation of hexenuronic acid-substituted xylooligosaccharides by NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 280(2), 197-208.

Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stålbrand, H., & Dahlman, O. (2000). Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 329(4), 807-815.

Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A., & Dahlman, O. (2002). Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research*, 337(4), 373-377.

Tenkanen, M., Hausalo, T., Siika-aho, M., Buchert, J., & Viikari, L. (1995). Use of Enzymes in Combination with Anion Exchange Chromatography in the Analysis of Carbohydrate Composition of Kraft Pulps. *The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, III*, 189-194.

Thomas, J. R., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1987). Structure of plant-cell walls. 29. Isolation and characterization of wall polysaccharides from suspension-cultured douglas-fir cells. *Plant Physiol*, 83(3), 659-671.

Timell, T. E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*, 1(1), 45-70.

- Toshiaki, K., Shiiba, K., & Tsuji, K. (1996). Suppressive Effect of Wheat-bran Hemicellulose on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Shokuryo Gakkaishi*, 49(2), 101-105.
- Unterrieser, I., & Mischnick, P. (2011). Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 346(1), 68-75.
- Várnai, A., Huikko, L., Pere, J., Siika-aho, M., & Viikari, L. (2011). Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource Technology*, 102(19), 9096-9104.
- Várnai, A., Siika-aho, M., & Viikari, L. (2010). Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3), 185-193.
- Venkateswar Rao, L., Goli, J. K., Gentela, J., & Koti, S. (2016). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*, 213, 299-310.
- Verbruggen, M. A., Spronk, B. A., Schols, H. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J., Thomas, J. R., Kamerling, J. P., & Vliegthart, J. F. G. (1998). Structures of enzymically derived oligosaccharides from sorghum glucuronarabinoxylan. *Carbohydrate Research*, 306(1-2), 265-274.
- Verhaar, L. A. T., Hendriks, H. E. J., Groenland, W. P. T., & Kuster, B. F. M. (1991). High-performance liquid chromatography of reaction mixtures from the oxidation and degradation of lactose. *Journal of Chromatography A*, 549(Supplement C), 113-125.
- Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 301-307.
- Weiß, J. (2001). *Ionenchromatographie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Westereng, B., Arntzen, M. Ø., Aachmann, F. L., Várnai, A., Eijsink, V. G. H., & Agger, J. W. (2016). Simultaneous analysis of C1 and C4 oxidized oligosaccharides, the

products of lytic polysaccharide monooxygenases acting on cellulose. *Journal of Chromatography A*, 1445, 46-54.

Wheeler, H. J., & Tollens, B. (1889). V. Ueber die Xylose oder den Holzzucker, eine zweite Penta-Glycose. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 254(3), 304-320.

Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H., Hemming, J., & Holmbom, B. (2009). Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Ind. Crop. Prod.*, 29(2–3), 571-580.

Wrigstedt, P., Kylli, P., Pitkänen, L., Nousiainen, P., Tenkanen, M., & Sipilä, J. (2010). Synthesis and Antioxidant Activity of Hydroxycinnamic Acid Xylan Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6937-6943.

Zabotina, O. A., Van De Ven, W. T. G., Freshour, G., Drakakaki, G., Cavalier, D., Mouille, G., Hahn, M. G., Keegstra, K., & Raikhel, N. V. (2008). Arabidopsis XXT5 gene encodes a putative α -1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *The Plant Journal*, 56(1), 101-115.

Zaia, J. (2004). Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*, 23(3), 161-227.

Zapała, L., Kalembkiewicz, J., & Sitarz-Palczak, E. (2009). Studies on equilibrium of anthranilic acid in aqueous solutions and in two-phase systems: Aromatic solvent–water. *Biophysical Chemistry*, 140(1), 91-98.

Zhang, X., Chen, M., Liu, C., Zhang, A., & Sun, R. (2015). Ring-Opening Graft Polymerization of Propylene Carbonate onto Xylan in an Ionic Liquid. *Molecules*, 20(4), 6033.

Zhao, J., & Monteiro, M. A. (2008). Hydrolysis of bacterial wall carbohydrates in the microwave using trifluoroacetic acid. *Carbohydrate Research*, 343(14), 2498-2503.

Anhang

A1 Vorschrift – Analytik isolierter Methylglucuronoxylane (MGX).....	112
A2 Vorschrift – Analytik von Zellstoff und Biomasse.....	117
A3 Vorschrift – Untersuchung derivatisierter Xylane mittels LC-MS.....	123
A4 Vorschrift – quantitative Analytik derivatisierter Xylane.....	127

A 1 **Vorschrift - Analytik isolierter Methylglucuronoxylane (MGX)**

A 1.1 **Hydrolyse**

- Es werden **50 mg** des Xylans exakt in einen **25 mL** Erlenmeyerkolben eingewogen und mit **4 mL** Wasser (dest.) durch kurzes Aufkochen suspendiert.
- Die Suspension wird mit 1,02 mL einer 0,5 molaren Schwefelsäure versetzt und der Erlenmeyerkolben mit einer „Nachtmütze“ lose verschlossen.
- Der Temperaturfühler des Autoklaven muss in einen **25 mL** Erlenmeyerkolben mit **5 mL** Wasser gegeben werden. Die Probe wird im Autoklaven bei **120°C** für **40 min** und einem Druck von **1,2 bar** hydrolysiert.
- Nach dem Abkühlen wird die Probe quantitativ in einen **50 mL** Messkolben überführt und dieser bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- Evtl. vorhandener Rückstand wird mit einer zuvor getrockneten und ausgewogenen G4-Sinterglasfritte aus den Hydrolysaten abgetrennt und nach Trocknung exakt ausgewogen.

A 1.2 **Fällung des Sulfats**

- **5 mL** des Hydrolysats werden in ein Kunststoff-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit **800 µL** einer Lösung von $\text{Ba(OH)}_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ in Wasser (dest.) mit dem Gehalt $\beta = 20 \text{ g/L}$ versetzt. Das $\text{Ba(OH)}_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ wird möglicherweise nicht komplett gelöst.
- Die Zentrifugenröhrchen werden mit der erhaltenen weißen Suspension für **30 s** auf einem Vortex-Schüttler gemischt und anschließend für **5 min** bei **20 000 U/min** zentrifugiert (Sorvall-RC5Cplus; Rotor: SS-34). Die Temperatur in der Zentrifuge wird dabei auf **4°C** eingestellt.
- Das Zentrifugat wird durch einen Glastrichter langsam in einen **10 mL** Maßkolben dekantiert.
- Der Rückstand wird **3x** mit je **1 mL** Wasser (dest.) versetzt, **30 s** auf dem Vortex geschüttelt und wie beschrieben zentrifugiert. Alle Zentrifugate werden im gleichen **10 mL** Maßkolben gesammelt.
- Die vereinigten Lösungen werden im **10 mL** Maßkolben bis zum Eichstrich mit Wasser (dest.) aufgefüllt.

A 1.3 Reduktive Aminierung

Folgende Lösungen werden vor der reduktiven Aminierung frisch hergestellt:

- 2-Aminobenzoesäure (2-AA, Anthranilsäure): in einem **25 mL** Maßkolben werden **100 mg** 2-AA eingewogen und der Maßkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- 4-Aminobenzoesäure (4-AA): in einem **25 mL** Maßkolben werden **50 mg** 4-AA eingewogen und der Maßkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- 2-Picolinboran Komplex (2-PB): in einem Glasvial (**1,5 mL**) werden **42,8 mg** 2-PB eingewogen und der Maßkolben mit **1 mL** Methanol aufgefüllt.

➔ Die so angesetzten Lösungen reichen für die reduktive Aminierung von etwa 18 Hydrolysaten.

Durchführung

- Je **500 µL** der hydrolysierten und entsalzten Proben werden in Glasreaktoren (Pierce; **2,0 mL**) mit dreieckigen Magnetrührern gegeben.
- Die Proben werden auf **40°C** vorgeheizt (entspricht dem oberen roten Bereich der Temperaturregelung).
- Zu den temperierten Proben werden je **200 µL** Eisessig und **200 µL** der 2-AA-Lösung gegeben.
- Die fest verschlossenen Gefäße werden **30 min** bei **40°C** gerührt (Stufe 5).
- Im Anschluss werden je **50 µL** der 2-PB-Lösung zugegeben und die verschlossenen Gefäße für **45 min** bei **40°C** gerührt.
- Zu den so erzeugten Lösungen werden je **50 µL** der 4-AA-Lösung als interner Standard zugegeben.
- Die Proben werden im Stickstoff-Strom getrocknet, mit je **1 mL** Methanol versetzt und erneut mit Stickstoff getrocknet.
- Durch Zugabe von je **1 mL** Wasser (dest.) erhält man die Messlösung für die chromatographische Messung.

- Zur Quantifizierung der Analyten werden zusätzlich Standards für eine Kalibriergerade mit 2-AA angefertigt, die den zu erwartenden Konzentrationen in den Hydrolysaten entsprechen. Pro mL eines Standards müssen vor dem Auffüllen bis zur Eichlinie je 50 µL der 4-AA Lösung zugegeben werden.

A 1.4 Chromatographie

- Die chromatographische Trennung erfolgt mittels HPAEC auf einer ICS 3000 (Dionex) mit anschließender UV-Detektion.
- Es werden die Vorsäule **CarboPacTM PA200 3 x 50 mm** und die analytische Trennsäule **CarboPacTM PA200 3 x 250 mm** verwendet.
- Vor der Chromatographie wird der Säulenofen auf **30°C** temperiert.
- Die benötigten Eluenten für **Pumpe 1** sind:

A – Wasser (bidest.)
B – 1 M Natriumacetat in 200 mM NaOH
- Für Eluent B werden **82 g** Natriumacetat (NaOAc) in einen **1 L** Maßkolben eingewogen und dieser bis etwa 2/3 mit Wasser (bidest.) aufgefüllt. NaOAc löst sich sehr gut im Ultraschallbad. Die Lösung wird mit Wasser (bidest.) bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- Die vorbereiteten Eluenten A und B werden in die dafür vorgesehenen Vorratsbehälter aus Kunststoff mit einem Fassungsvermögen von **2 L** gegeben.
- An **Pumpe 2** werden weiterhin die Eluenten A sowie C (**200 mM NaOH**) gegeben.
- Für C werden **1979 g** Wasser (bidest.) in einen Vorratsbehälter abgewogen.
- Um gelöste Gase wie CO₂ zu entfernen, werden die Gefäße mit den Eluenten an die entsprechende Position für die Chromatographie gebracht und sprudelnd für **15 min** mit Helium durchströmt.
- Im Anschluss werden zu B **10 ml** und zu C **21 ml** einer **50%**igen NaOH-Lösung gegeben und die Gefäße fest verschlossen, sodass sich ein Druck durch das Helium aufbauen kann.
- Für Pumpe 2 werden isokratische Bedingungen gewählt mit einem Fluss von **0,2 mL/min** und **60% C**.

- Der Gradient für Pumpe 1 ist in Tab. 15 dargestellt. Die Flussrate beträgt **0,4 mL/min**.

Tab. 15: Gradient für die chromatographische Trennung hydrolysierter und reaktiv aminierte MGX.

Retentionszeit [min]	Anteil Eluent A [%]	Anteil Eluent B [%]	Anteil Eluent C [%]
0	92,5	7,5	0
30	92,5	7,5	0
75	40,0	60,0	0
100	40,0	60,0	0
105	0	0	100
135	0	0	100
140	92,5	7,5	0
150	92,5	7,5	0

- Für die Detektion der Standards 2-AA und 4-AA wird die Wellenlänge $\lambda = 309 \text{ nm}$ und für die Detektion der reaktiv aminierte Analyten die Wellenlänge $\lambda = 328 \text{ nm}$ gewählt.

Tab. 16: Retentionszeiten relevanter Verbindungen für die Analyse von MGX.

Verbindung	Retentionszeit [min]
4-AA	13,3
Xylose	22,8
Galactose	24,1
Glucose	25,2
Arabinose	27,1
2-AA	30,9
meGlcA- X ₃	49,8 + 52,8
meGlcA-X	53,9
meGlcA-X ₂	60,1
meGlcA	70,9
Galacturonsäure	75,7
Glucuronsäure	83,6

- Aus den PFV von 2-AA zu 4-AA der Standardlösungen wird eine Kalibriergerade in Abhängigkeit der Konzentration erstellt. Anhand der Geradengleichung können die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen in den Proben ermittelt werden.
- Die quantitative Auswertung erfolgt über die Ermittlung der Peakflächenverhältnisse (PFV) von den reaktiv aminierten Analyten zu 4-AA.

A 2 **Vorschrift - Analytik von Zellstoffen und Biomasse**

A 2.1 **Hydrolyse**

- Es werden **100 mg** der Probe exakt in ein kurzes Reagenzglas (Reaktionsgefäß) eingewogen und mit **1 mL** einer **72%**igen Schwefelsäure versetzt.
- Bei **30°C** wird dieser Ansatz für exakt **60 min** hydrolysiert. Die Probe kann dabei hin und wieder mit einem Glasstab vorsichtig gegen die Glaswand des Reaktionsgefäßes gerieben werden, um eine gleichmäßige Benetzung mit der Säure zu gewährleisten.
- Diese Vorhydrolyse wird durch Zugabe von **3 mL** Wasser (dest.) gestoppt.
- Mit **25 mL** Wasser (dest.) wird die Probe quantitativ in einen **50 mL** Messkolben überführt und mit einer „Nachtmütze“ lose verschlossen.
- Der Temperaturfühler des Autoklaven muss in einen **50 mL** Messkolben mit **29 mL** Wasser gegeben werden. Die Probe wird im Autoklaven bei **120°C** für **30 min** und einem Druck von **1,2 bar** hydrolysiert.
- Nach dem Abkühlen wird der Maßkolben bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- Vorhandener Rückstand wird mit einer zuvor getrockneten und ausgewogenen G4-Sinterglasfritte aus den Hydrolysaten abgetrennt und nach Trocknung exakt ausgewogen.

A 2.2 **Fällung des Sulfats**

- **5 mL** des Hydrolysats werden in ein Kunststoff-Zentrifugenröhrchen gegeben und mit **10 mL** einer Lösung von $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ in Wasser (dest.) mit dem Gehalt $\beta = 40 \text{ g/L}$ versetzt. Das $\text{Ba}(\text{OH})_2 \times 8\text{H}_2\text{O}$ wird möglicherweise nicht komplett gelöst.
- Die Zentrifugenröhrchen werden mit der erhaltenen weißen Suspension für **30 s** auf einem Vortex-Schüttler gemischt und anschließend für **5 min** bei **20 000 U/min** zentrifugiert (Sorvall-RC5Cplus; Rotor: SS-34). Die Temperatur in der Zentrifuge wird dabei auf **4°C** eingestellt.
- Das Zentrifugat wird durch einen Glastrichter langsam in einen **20 mL** Maßkolben dekantiert.

- Der Rückstand wird **3x** mit je **1 mL** Wasser (dest.) versetzt, **30 s** auf dem Vortex geschüttelt und wie beschrieben zentrifugiert. Alle Zentrifugate werden im gleichen **20 mL** Maßkolben gesammelt.
- Die vereinigten Lösungen werden im **20 mL** Maßkolben bis zum Eichstrich mit Wasser (dest.) aufgefüllt.

A 2.3 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse kann alternativ zur sauren Hydrolyse für Zellstoffe angewandt werden. Dabei entfällt der Schritt A 2.2 der Sulfatfällung. Die enzymatische Hydrolyse vor allem für die Bestimmung von mGlcA in Zellstoffen geeignet.

- **100 mg** der gefluften Zellstoffe werden in 250 mL Duranglas-Gefäßen eingewogen
- Die Proben werden in **100 mL** Ammoniumacetatpuffer (pH 4,8) suspendiert
- Hinzu werden **300 µL** Cellic-C Tec 2 (Cellulase-Komplex mit Filterpapieraktivität von 101 FPU/mL; Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) und **50 µL** Novozymes 188 (β -Glucosidase mit einer Aktivität von 227 CBU/mL; Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark)
- Die Hydrolysen werden für **72 h** bei **45°C** auf einem Rollmischer durchgeführt
- Nach Abschluss werden die Gefäße für **5 min** in kochendes Wasser gegeben um die Enzyme zu denaturieren
- Vorhandener Rückstand wird mit einer zuvor getrockneten und ausgewogenen G4-Sinterglasfritte aus den Hydrolysaten abgetrennt und nach Trocknung exakt ausgewogen.

A 2.4 Reduktive Aminierung

Folgende Lösungen werden vor der reduktiven Aminierung frisch hergestellt:

- 2-Aminobenzoesäure (2-AA, Anthranilsäure): in einem **25 mL** Maßkolben werden **100 mg** 2-AA eingewogen und der Maßkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.

- 4-Aminobenzoesäure (4-AA): in einem **25 mL** Maßkolben werden **50 mg** 4-AA eingewogen und der Maßkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.
 - 2-Picolinboran Komplex (2-PB): in einem Glasvial (**1,5 mL**) werden **42,8 mg** 2-PB eingewogen und der Maßkolben mit **1 mL** Methanol aufgefüllt.
- ➔ Die so angesetzten Lösungen reichen für die reduktive Aminierung von etwa 18 Hydrolysaten.

Durchführung

- Je **500 µL** der hydrolysierten und entsalzten Proben werden in Glasreaktoren (Pierce; **2,0 mL**) mit dreieckigen Magnetrührern gegeben.
- Die Proben werden auf **40°C** vorgeheizt (entspricht dem oberen roten Bereich der Temperaturregelung).
- Zu den temperierten Proben werden je **200 µL** Eisessig und **200 µL** der 2-AA-Lösung gegeben.
- Die fest verschlossenen Gefäße werden **30 min** bei **40°C** gerührt (Stufe 5).
- Im Anschluss werden je **50 µL** der 2-PB-Lösung zugegeben und die verschlossenen Gefäße für **45 min** bei **40°C** gerührt.
- Zu den so erzeugten Lösungen werden je **50 µL** der 4-AA-Lösung als interner Standard zugegeben.
- Die Proben werden im Stickstoff-Strom getrocknet, mit je **1 mL** Methanol versetzt und erneut mit Stickstoff getrocknet.
- Durch Zugabe von je **1 mL** Wasser (dest.) erhält man die Messlösung für die chromatographische Messung.
- Zur Quantifizierung der Analyten werden zusätzlich Standards für eine Kalibriergerade mit 2-AA angefertigt, die den zu erwartenden Konzentrationen in den Hydrolysaten entsprechen. Pro mL eines Standards müssen vor dem Auffüllen bis zur Eichlinie je **50 µL** der 4-AA Lösung zugegeben werden.

A 2.5 Chromatographie

- Die chromatographische Trennung erfolgt mittels HPAEC auf einer ICS 3000 (Dionex) mit anschließender UV-Detektion.
- Es werden die Vorsäule **CarboPac™ PA200 3 x 50 mm** und die analytische Trennsäule **CarboPac™ PA200 3 x 250 mm** verwendet.
- Vor der Chromatographie wird der Säulenofen auf **30°C** temperiert.
- Die benötigten Eluenten für **Pumpe 1** sind:
A – Wasser (bidest.)
B – **1 M** Natriumacetat in
200 mM NaOH
- Für Eluent B werden **82 g** Natriumacetat (NaOAc) in einen **1 L** Maßkolben eingewogen und dieser bis etwa 2/3 mit Wasser (bidest.) aufgefüllt. NaOAc löst sich sehr gut im Ultraschallbad. Die Lösung wird mit Wasser (bidest.) bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- Die vorbereiteten Eluenten A und B werden in die dafür vorgesehenen Vorratsbehälter aus Kunststoff mit einem Fassungsvermögen von **2 L** gegeben.
- An **Pumpe 2** werden weiterhin die Eluenten A sowie C (**200 mM NaOH**) gegeben.
- Für C werden **1979 g** Wasser (bidest.) in einen Vorratsbehälter abgewogen.
- Um gelöste Gase wie CO₂ zu entfernen, werden die Gefäße mit den Eluenten an die entsprechende Position für die Chromatographie gebracht und sprudelnd für **15 min** mit Helium durchströmt.
- Im Anschluss werden zu B **10 ml** und zu C **21 ml** einer **50%**igen NaOH-Lösung gegeben und die Gefäße fest verschlossen, sodass sich ein Druck durch das Helium aufbauen kann.
- Für Pumpe 2 werden isokratische Bedingungen gewählt mit einem Fluss von **0,2 mL/min** und **60% C**.
- Der Gradient für Pumpe 1 ist in Tab. 17 dargestellt. Die Flussrate beträgt **0,4 mL/min**.

Tab. 17: Gradient für die chromatographische Messung hydrolysierter und reaktiv aminierte Zellstoffe und Biomasse.

Retentionszeit [min]	Anteil Eluent A	Anteil Eluent B	Anteil Eluent C
	[%]	[%]	[%]
0	92,5	7,5	0,0
35	92,5	7,5	0,0
95	40,0	60,0	0,0
120	40,0	60,0	0,0
125	0,0	0,0	100,0
155	0,0	0,0	100,0
160	92,5	7,5	0,0
170	92,5	7,5	0,0

- Für die Detektion der Standards 2-AA und 4-AA wird die Wellenlänge $\lambda = 309 \text{ nm}$ und für die Detektion der reaktiv aminierte Analyten die Wellenlänge $\lambda = 328 \text{ nm}$ gewählt.

Tab. 18: Retentionszeiten relevanter Verbindungen für die Analyse von Zellstoffen und Biomasse.

Verbindung	Retentionszeit [min]
2-AA	12,8
Xylose	22,2
Galactose	23,5
Glucose	24,4
Arabinose	26,4
Mannose	28,9
4-AA	30,1
meGlcA-X	69,3
meGlcA	87,5
Galacturonsäure	92,2

- Aus den PFV von 2-AA zu 4-AA der Standardlösungen wird eine Kalibriergerade in Abhängigkeit der Konzentration erstellt. Anhand der Geradengleichung können die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen in den Proben ermittelt werden.
- Die quantitative Auswertung erfolgt über die Ermittlung der Peakflächenverhältnisse (PFV) von den reduktiv aminierten Analyten zu 4-AA.

A 3 **Vorschrift - Untersuchung derivatisierter Xylane mittels LC-MS**

Diese Vorschrift dient der Ermittlung von Retentionszeiten der derivatisierten Monomereinheiten nach Hydrolyse. Es handelt sich **nicht** um ein quantitatives Verfahren. Die Bedingungen der Probenvorbereitung müssen für jedes Polymer neu entwickelt werden.

A 3.1 **Hydrolyse der Proben**

- Die Hydrolyse findet in einer Labormikrowelle statt
- In ein Teflon-Reaktionsgefäß wird **50 mg** des trockenen Probenmaterials eingewogen
- Es werden **4,625 mL** Wasser (bidest.) hinzugegeben und die Suspension für mindestens **15 min** gequollen. Dabei kann das Reaktionsgefäß regelmäßig geschwenkt werden um eine gute Durchmischung zu erreichen.
- Im Anschluss werden **0,375 mL** Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben. Somit ergibt sich eine TFA-Konzentration von **1 mol/L**.
- Das Reaktionsgefäß wird zusammen mit dem Kunststoffmantel fest verschlossen indem es auf dem Drehteller der Mikrowelle befestigt wird. Dieser Drehteller wird in der Mikrowelle platziert und das Gefäß mit der Nummer 1 mit einem Temperaturfühler versehen.
- Für die Hydrolyse wird ein Temperaturgradient eingestellt (Tab. 19).

Tab. 19: Temperaturgradient für die TFA-Hydrolyse derivatisierter Xylane (qualitative Analytik).

Zeit [hh:mm:ss]	Temperatur [°C]	Leistung [W]
00:00:30	120	1200
00:01:00	120	1200
00:10:00	25	0

- Die angegebenen Bedingungen mit dem gewählten Temperaturgradienten gelten für die Bestückung der Mikrowelle mit 6 Reaktionsgefäßen á **5 mL** Volumen. Bei geringerer Probenanzahl müssen die übrigen Reaktionsgefäße mit je **5 mL** Wasser (bidest.) gefüllt werden.

- Nach der Hydrolyse wird die Probe in einen **100 mL** Rundkolben überführt und das Reaktionsgefäß dreimal mit je **5 mL** Wasser (bidest.) gespült. Die Spüllösungen werden ebenfalls im gleichen Rundkolben vereinigt.
- Die Hydrolysate werden im Rundkolben im Kältebad bei **-20°C** eingefroren und sofort an die Gefriertrocknung angeschlossen
- Zwischen Gefriertrocknung und Vakuumpumpe muss unbedingt vorher eine Säurefalle mit Kaliumhydroxid eingebaut werden.
- Bei einem Druck von rund **0,0010 atm** werden die Proben über Nacht getrocknet
- Die getrockneten Proben werden in **10 mL** Wasser (bidest.) aufgenommen.
- Nicht gelöste Rückstände werden mit zuvor getrockneten und ausgewogenen G4 Sinterglasfritten entfernt und gravimetrisch bestimmt.

A 3.2 Reduktive Aminierung

Folgende Lösungen werden vor der reduktiven Aminierung frisch hergestellt:

- 2-Aminobenzoesäure (2-AA, Anthranilsäure): in einem **25 mL** Maßkolben werden **100 mg** 2-AA eingewogen und der Maßkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- 2-Picolinboran Komplex (2-PB): in einem Glasvial (**1,5 mL**) werden **42,8 mg** 2-PB eingewogen und mit **1 mL** Methanol aufgefüllt.

➔ Die so angesetzten Lösungen reichen für die reduktive Aminierung von etwa 18 Hydrolysaten.

Durchführung

- Je **200 µL** der hydrolysierten Proben werden in Glasreaktoren (Pierce; **2,0 mL**) mit dreieckigen Magnetrührern gegeben.
- Die Proben werden auf 40°C vorgeheizt (entspricht dem oberen roten Bereich der Temperaturregelung).
- Zu den temperierten Proben werden je **200 µL** Eisessig und **500 µL** der 2-AA-Lösung gegeben.
- Die fest verschlossenen Gefäße werden **30 min** bei **40°C** gerührt (Stufe 5).

- Im Anschluss werden je **50 µL** der 2-PB-Lösung zugegeben und die verschlossenen Gefäße für **45 min** bei **40°C** gerührt.
- Die Proben werden im Stickstoff-Strom getrocknet, mit je **1 mL** Methanol versetzt und erneut mit Stickstoff getrocknet.
- Durch Zugabe von je **1 mL** Wasser (bidest.) erhält man die Messlösung für die chromatographische Messung.

A 3.3 Chromatographie

- Die chromatographische Trennung erfolgt mittels HPLC auf einer Agilent HPLC 1200 mit anschließender MS-Detektion.
- Es wird die analytische Trennsäule **Phenomenex Luna C18 (3 µm; 4,6 x 150 mm)** verwendet.
- Vor der Chromatographie wird der Säulenofen auf **30°C** temperiert.
- Die benötigten Eluenten sind:
 - A – Wasser (bidest.) + **0,1%** Ameisensäure
 - B – Acetonitril + **0,1%** Ameisensäure
- Der Gradient ist in Tab. 20 dargestellt. Die Flussrate beträgt **0,3 mL/min**.

Tab. 20: Gradient für die chromatographische Trennung hydrolysierter und reaktiv aminierter Xylanderivate mittels HPLC-MS.

Retentionszeit [min]	Anteil Eluent A [%]	Anteil Eluent B [%]
0	90	10
10	90	10
50	80	20
70	80	20
100	70	30
120	70	30
135	40	60
145	40	60
150	0	100
160	0	100
165	90	10
180	90	10

- Die Detektion nach Chromatographie erfolgt mit dem massenselektiven Detektor Agilent 6224 ESI-TOF und folgenden Einstellungen: Gas Temperatur 325°C, drying gas flow 10 L/min, nebulizer gas 15 psig, VCap 400 V, fragmentor voltage 200 V, skimmer 65 V, Oct 1 RF Vpp 750 V, mass range 110-3200 m/z und acquisition rate 1.03 spectra/s.
- Für die Darstellung der relevanten Peaks im Chromatogramm müssen die **monoisotopischen Massen** angegeben werden. Diese können mithilfe eines Online-Rechners ermittelt werden: <http://www.lfd.uci.edu/~gohlke/molmass/>
- Es gilt zu beachten, dass die Detektion im positiven MS-Modus stattfindet. Die zu berechnende Masse der Analyten ist somit um die Masse eines Wasserstoffs erhöht.
- Die somit ermittelten Retentionszeiten können auf quantitative Messungen mit Fluoreszenzdetektion übertragen werden.

A 4 Vorschrift – quantitative Analytik derivatisierter Xylane

Mit dieser Vorschrift können chemisch modifizierte Xylane quantitativ charakterisiert werden. Die angegebenen Bedingungen für die Hydrolyse müssen für neue Derivate der Polysaccharide gegebenenfalls neu ermittelt werden. Dies beinhaltet die Konzentration der TFA-Lösung sowie die Quellzeit vor der Hydrolyse. Vor der quantitativen Analytik muss zunächst die Bestimmung der Retentionszeiten nach A 3 erfolgen.

A 4.1 Hydrolyse der Proben

- Die Hydrolyse findet in einer Labormikrowelle statt
- In ein Teflon-Reaktionsgefäß wird **50 mg** des trockenen Probenmaterials eingewogen
- Es werden **4,625 mL** Wasser (bidest.) zugegeben und die Suspension für mindestens **15 min** (HP-Xylane) bzw. **105 min** (HVE-Xylane) gequollen. Dabei kann das Reaktionsgefäß regelmäßig geschwenkt werden um eine gute Durchmischung zu erreichen.
- Im Anschluss werden **0,375 mL** Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben. Somit ergibt sich eine TFA-Konzentration von **1 mol/L**.
- Das Reaktionsgefäß wird zusammen mit dem Kunststoffmantel fest verschlossen indem es auf dem Drehteller der Mikrowelle befestigt wird. Dieser Drehteller wird in der Mikrowelle platziert und das Gefäß mit der Nummer 1 mit einem Temperaturfühler versehen.
- Für die Hydrolyse wird ein Temperaturgradient eingestellt (Tab. 21).

Tab. 21: Temperaturgradient für die TFA-Hydrolyse derivatisierter Xylane (quantitative Analytik).

Zeit [hh:mm:ss]	Temperatur [°C]	Leistung [W]
00:01:00	120	1200
00:00:30	120	1200
00:10:00	25	0

- Die angegebenen Bedingungen mit dem gewählten Temperaturgradienten gelten für die Bestückung der Mikrowelle mit 6 Reaktionsgefäßen á **5 mL** Volumen. Bei

geringerer Probenanzahl müssen die übrigen Reaktionsgefäße mit je **5 mL** Wasser (bidest.) gefüllt werden.

- Nach der Hydrolyse wird die Probe in einen **100 mL** Rundkolben überführt und das Reaktionsgefäß dreimal mit je **5 mL** Wasser (bidest.) gespült. Die Spüllösungen werden ebenfalls im gleichen Rundkolben vereinigt.
- Die Hydrolysate werden im Rundkolben im Kältebad bei **-20°C** eingefroren und sofort an die Gefriertrocknung angeschlossen
- Zwischen Gefriertrocknung und Vakuumpumpe muss unbedingt vorher eine Säurefalle mit Kaliumhydroxid eingebaut werden.
- Bei einem Druck von rund **0,0010 atm** werden die Proben über Nacht getrocknet
- Die getrockneten Proben werden in **10 mL** Wasser (bidest.) aufgenommen.
- Nicht gelöste Rückstände werden mit zuvor getrockneten und ausgewogenen G4 Sinterglasfritten entfernt und gravimetrisch bestimmt.

A 4.2 Reduktive Aminierung

Folgende Lösungen werden vor der reduktiven Aminierung frisch hergestellt:

- 2-Aminobenzoesäure (2-AA, Anthranilsäure): in einem **25 mL** Maßkolben werden **100 mg** 2-AA eingewogen und der Maßkolben mit Methanol bis zum Eichstrich aufgefüllt.
- 2-Picolinboran Komplex (2-PB): in einem Glasvial (**1,5 mL**) werden **42,8 mg** 2-PB eingewogen und mit **1 mL** Methanol aufgefüllt.

➔ Die so angesetzten Lösungen reichen für die reduktive Aminierung von etwa 18 Hydrolysaten.

Durchführung

- Je **200 µL** der hydrolysierten Proben werden in Glasreaktoren (Pierce; **2,0 mL**) mit dreieckigen Magnetrührern gegeben.
- Die Proben werden auf 40°C vorgeheizt (entspricht dem oberen roten Bereich der Temperaturregelung).
- Zu den temperierten Proben werden je **200 µL** Eisessig und **500 µL** der 2-AA-Lösung gegeben.
- Die fest verschlossenen Gefäße werden **30 min** bei **40°C** gerührt (Stufe 5).
- Im Anschluss werden je **50 µL** der 2-PB-Lösung zugegeben und die verschlossenen Gefäße für **45 min** bei **40°C** gerührt.
- Die Proben werden im Stickstoff-Strom getrocknet, mit je **1 mL** Methanol versetzt und erneut mit Stickstoff getrocknet.
- Durch Zugabe von je **1 mL** Wasser (bidest.) erhält man die Messlösung für die chromatographische Messung.
- Zur Quantifizierung der Analyten werden zusätzlich Standards für eine Kalibriergerade mit reduktiv aminierter Xylose angefertigt. Die Konzentrationen der Standards sollen dabei in etwa den zu erwartenden Konzentrationen in den Hydrolysaten entsprechen.

A 4.3 Chromatographie

- Die chromatographische Trennung erfolgt mittels HPLC auf einer Jasco HPLC mit anschließender Fluoreszenz-Detektion.
- Es wird die analytische Trennsäule **Phenomenex Luna C18 (3 µm; 4,6 x 150 mm)** verwendet.
- Vor der Chromatographie wird der Säulenofen auf **30°C** temperiert.
- Die benötigten Eluenten sind:
A – Wasser (bidest.) + **0,1%** Ameisensäure
B – Acetonitril + **0,1%** Ameisensäure
- Der Gradient ist in Tab. 22 dargestellt. Die Flussrate beträgt **0,3 mL/min**.

Tab. 22: Gradient für die chromatographische Trennung hydrolysierter und reaktiv aminierter Xylanderivate mittels HPLC-Fluoreszenz.

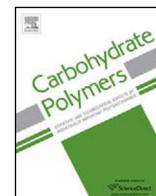
Retentionszeit [min]	Anteil Eluent A [%]	Anteil Eluent B [%]
0	90	10
10	90	10
50	80	20
70	80	20
100	70	30
120	70	30
135	40	60
145	40	60
150	0	100
160	0	100
165	90	10
180	90	10

- Die Detektion erfolgte mit einem Jasco FP-2020 *plus* Fluoreszenz-Detektor mit der Absorptionswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ und der Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$.

**A new method for the quantification of monosaccharides,
uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed
xylans by HPAEC-UV/VIS**

Dominic Lorenz, Nicole Erasmy, Youssef Akil, Bodo Saake

Carbohydrate Polymers, 2016, 140, 181-187



A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS



Dominic Lorenz^a, Nicole Erasmy^b, Youssef Akil^a, Bodo Saake^{a,*}

^a Department of Wood Science, University of Hamburg, Leuschnerstr. 91 b, 21031, Hamburg, Germany

^b Thünen-Institute of Wood Research, Leuschnerstr. 91 b, 21031, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2015

Received in revised form 7 December 2015

Accepted 10 December 2015

Available online 17 December 2015

Chemical compounds studied in this article:

2-Aminobenzoic acid (PubChem CID: 227)

Borane-2-picoline (PubChem CID:

16217944)

4-O-Methyl- α -D-glucuronic acid (PubChem

CID: 446874)

Keywords:

Anthranilic acid

HPAEC-UV/VIS

Borate-HPAEC

4-O-Methyl- α -D-glucuronic acid

Partial hydrolysis

Reductive amination

ABSTRACT

A new method for the chemical characterization of xylans is presented, to overcome the difficulties in quantification of 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid (meGlcA). In this regard, the hydrolysis behavior of xylans from beech and birch wood was investigated to obtain the optimum conditions for hydrolysis, using sulfuric acid. Due to varying linkage strengths and degradation, no general method for complete hydrolysis can be designed. Therefore, partial hydrolysis was applied, yielding monosaccharides and small meGlcA containing oligosaccharides. For a new method by HPAEC-UV/VIS, these samples were reductively aminated by 2-aminobenzoic acid. By quantification of monosaccharides and oligosaccharides, as well as comparison with borate-HPAEC and ¹³C NMR-spectroscopy, we revealed that the concentrations meGlcA are significantly underestimated compared to conventional methods. The detected concentrations are 85.4% (beech) and 76.3% (birch) higher with the new procedure. Furthermore, the quantified concentrations of xylose were 9.3% (beech) and 6.5% (birch) higher by considering the unhydrolyzed oligosaccharides as well.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One of the major components of plant biomass are hemicelluloses, which include xylans as an important constituent. Those carbohydrates represent essential parts of plant cell walls, and are therefore relevant for physical stability of plant tissues (Scheller & Ulvskov, 2010). With regard to the species, tissue type, and plant development stage xylans differ strongly in chemical composition of the monosaccharide residues as well as structural properties i.e. the degree of polymerization (DP) and the degree of substitution (DS) (Ebringerova, 2006). Consequently, detailed chemical characterization is required, to understand the biological functions and the potential for advanced technical applications of this biopolymer.

The most abundant xylan in the secondary cell wall of dicotyledons, including hardwood plants, is 4-O-methyl- α -glucurono-D-xylan (MGX) with an average amount of 20–30%. These heteropolimeric carbohydrates consist of a xylose (Xyl) based β -(1 \rightarrow 4)-glycosidic linked backbone. Some of the Xyl units are branched with 4-O-methyl- α -D-glucuronic acids (meGlcA) at position 2 (Ebringerova & Heinze, 2000). Telemann, Tenkanen, Jacobs, and Dahlman (2002) investigated MGX from birch and beech wood and found 4.0 mol% and 4.5 mol% meGlcA, respectively, after enzymatic hydrolysis. Furthermore, up to 70% of the Xyl units were found to be O-acetylated (Coughlan & Hazlewood, 1993). In addition, the presence of several minor compounds such as arabinose, glucose, galactose, rhamnose, galacturonic acid, glucuronic acid and ferulic acid, has been shown previously in xylans (Garleb, Bourquin, & Fahey, 1989; Mueller-Harvey, Hartley, Harris, & Curzon, 1986; Pena et al., 2007; Shatalov, Evtuguin, & Pascoal Neto, 1999). However, it has to be pointed out that the detected concentrations of specific compounds are intensely effected by the conditions during MGX isolation, since modifications and partial degradation are triggered by high temperatures as well as acidic and alkaline milieu (Ebringerová, Hromádková, & Heinze, 2005).

* Corresponding author.

E-mail addresses: dominic.lorenz@uni-hamburg.de (D. Lorenz), nicole.erasmy@ti.bund.de (N. Erasmy), youssef.akil@uni-hamburg.de (Y. Akil), bodo.saake@uni-hamburg.de (B. Saake).

For analytical identification and quantification of the monosaccharide composition, the polymers need to be hydrolyzed. Due to easy handling and cheap reagents, hydrolysis with sulfuric acid, based on the procedure presented by Saeman, Moore, Mitchell, and Millett (1954), is prevalent besides enzymatic methods and acid methanolysis (Willför et al., 2009). However, the intense conditions during the treatment with sulfuric acid cause decarboxylation of the uronic acids (Leschinsky, 2009). In contrast, there is evidence that the linkage [4-O-me- α -D-GlcpA]-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Xylp] is stronger compared to the bonds [β -D-Xylp]-(1 \rightarrow 4)-[β -D-Xylp] of the Xyl backbone and hydrolysis occurs incomplete (De Ruiter, Schols, Voragen, & Rombouts, 1992; Tenkanen, Hausalo, Siika-aho, Buchert, & Viikari, 1995). As a result, meGlcA and Xyl containing oligosaccharides are supposed to remain unhydrolyzed and thus, the determined concentrations of these components are underestimated.

The first quantitative method for the analysis of uronic acids, via photometric measurement, was established by Dische (1947). Though, several improvements have been made in the following years, no specific compounds could be determined out of a mixture of uronic acids by these colorimetric assays (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991; van den Hoogen et al., 1998). Nowadays, high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) is commonly used for the analysis of uronic acids as well as neutral carbohydrates. The PAD shows high sensitivity for the detection of carbohydrates; however, it provides no molar detector response, so standards of each analyzed structure must be provided for quantitative determinations (Davis, 1998; Lee, 1996; Manns, Deutschle, Saake, & Meyer, 2014). Furthermore, the presence of sulfate ions, which are introduced during hydrolysis, influences the chromatographic separation. Though, the removal of sulfate prior to chromatography can be realized by ion exchange columns or precipitation by Ba(OH)₂, it is reported that both clean-up steps are not suitable for uronic acids, since these structures would be removed as well, due to the negative charge (Quigley & Englyst, 1992). For carbohydrate analysis, borate complex anion exchange chromatography (borate-HPAEC) can be used; however, this method is only suitable for monosaccharides and meGlcA, not for GlcA and GalA. The benefit of this analytical approach is the low expenditure of time and work during sample preparation, since the hydrolysates can be analyzed without the prior removal of sulfate (Sinner & Puls, 1978; Sinner, Simatupang, & Dietrichs, 1975; Willför et al., 2009).

Due to the lack of pure commercially available standards, GlcA is usually used for the quantification of meGlcA for all of the presented methods. However, Chong et al. (2013) recently investigated the effect of this quantification procedure by gas chromatography and showed that this handling results in an underestimation of meGlcA by 30%. Furthermore, they revealed that the peak area of meGlcA is only 31% compared to that of GlcA by injecting the same amount in a HPAEC-PAD instrument. They concluded that only authentic standards of meGlcA should be used for exact quantification, but these need to be prepared during a complex process.

For HPAEC a suitable alternative is UV-detection. Since carbohydrates have no chromophores and show no specific UV-absorption, the analytes must be derivatized prior to determination (Harvey, 2011). The most commonly used technique for this purpose is the reductive amination of the reducing terminal. Many tags such as 1-naphthylamine (Rakete & Glomb, 2013), 2-aminobenzamide (Bigge et al., 1995), and procaine (Takao et al., 1996) have already been introduced for this reaction. However, 2-aminobenzoic acid (2-AA), also named anthranilic acid, is the most frequently used labeling reagent. The good recoveries of the reaction are caused by the carboxyl group in the direct chemical environment, which stabilizes the intermediate product (Anumula, 2014). In most

studies the reduction of this intermediate was carried out by sodium cyanoborohydride, as first published by Borch, Bernstein, and Durst (1971); however, the high toxicity causes difficulties in reaction handling. The procedure presented by Unterjeser and Mischnick (2011), with 2-picoline-borane complex as reducing reagent, is a nontoxic alternative to the conventional used methods.

This work deals with the detailed investigation of a new analytical strategy for the quantitative determination of meGlcA, meGlcA containing oligosaccharides, as well as monosaccharides. Therefore, the isolated MGX of beech and birch wood were partially hydrolyzed by sulfuric acid, labeled by 2-AA and analyzed by a new HPAEC-UV/VIS procedure. Furthermore, the properties of meGlcA and Xyl, during hydrolysis with sulfuric acid, are investigated. Therefore, the concentrations of meGlcA and the monosaccharide residues in beech and birch wood MGX were determined via standard borate-HPAEC. These results were compared with the molar ratios of Xyl:meGlcA, obtained by ¹³C NMR-spectroscopy. The applied methods were statistically validated by determination of characteristic parameters such as the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), and the coefficient of variation (COV).

2. Materials and methods

2.1. MGX preparation

3 kg of milled beech wood was delignified with a solution of sodium chlorite (45 g/L; Roth) and acetic acid (ChemSolute) to adjust a pH of 4.0. After 400 h, the suspension has been filtrated and the xylan was extracted by KOH (10%) for 1 h at 25 °C. The xylan was precipitated by a mixture of MeOH/water (60/40 wt%/wt%) and subsequently dried. The molar weights (M_w) and the dispersities (D) were determined according to Janzon, Puls, Bohn, Potthast, and Saake (2008): ($M_w = 19100$ g/mol, $D = 1.5$).

Birch xylan was purchased by Karl Roth GmbH (charge no. 32360219) ($M_w = 7900$ g/mol, $D = 1.8$).

2.2. meGlcA containing standards

The standards for peak identification in the chromatograms were obtained according to Cavagna, Deger, and Puls (1984) and Puls, Borchmann, Gottschalk, and Wiegel (1988). These standards are: 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid (meGlcA), 2-O-(4-O-methyl- α -D-glucuronic acid)-xylose (meGlcA-X), 2-O-(4-O-methyl- α -D-glucuronic acid)-xylobiose (meGlcA-X₂), and 2-O-(4-O-methyl- α -D-glucuronic acid)-xylotriose (meGlcA-X₃). In short: the standards have been obtained after partial hydrolysis (90 °C, 15 h) of larch wood xylan by sulfuric acid (0.125 M). The acidic sugars were separated from the neutral structures by a Dowex 1-X4 ion-exchange resin and the uronic acid containing carbohydrates subsequently separated by gel-permeation chromatography on Sephadex G-15. Structural identification was performed by NMR-analysis.

2.3. Hydrolysis of polysaccharides

MGX from beech and birch wood were hydrolyzed by two different methods. For 1-stage acid hydrolysis 100 mg of the dried material was suspended in 8 ml water. 2 ml sulfuric acid (0.5 M; Roth) was added and the samples were autoclaved (Systec VX-75) for 40 min at 120 °C and 0.12 MPa.

To investigate the hydrolysis behavior of meGlcA and Xyl, the xylans were treated by a 2-stage acid hydrolysis. 2 ml sulfuric acid (72%, Fisher Scientific) were added to 200 mg of the dried matter. The xylans were suspended and pre-hydrolyzed at 30 °C. After 1 h, the hydrolysis was stopped by addition of 6 ml water. The suspensions were transferred with 50 ml water into volumetric flasks and

the samples have been post-hydrolyzed by autoclave at 120 °C and 0.12 MPa for 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90 min.

The hydrolysis products from both methods were filtered over a G4 sinter glass frit, the residues washed with distilled water, dried at 105 °C and determined gravimetrically. The filtrates of both hydrolysis procedures have been used for further analytical investigations. All samples have been hydrolyzed for three times and the respective averages are displayed in Section 3.

2.4. Reductive amination

Prior to reductive amination, sulfate was precipitated by addition of an equimolar amount of Ba(OH)₂. BaSO₄ was removed by centrifugation for 5 min at 20,000 rpm (Sorvall RC 5C plus). The residues were washed with water and centrifuged – this clean-up procedure was repeated for three times. For reductive amination the samples were treated according to Mischnick et al. (2013). Heating and continuous stirring was realized by Reacti-Therm III (Pierce). The obtained solutions have been diluted by 200 mM sodium hydroxide (Fluka Analytical). For instrumental analysis 50 µl of a solution with 4-aminobenzoic acid (4-AB) (Sigma–Aldrich) in methanol (2 mg/ml) was added as internal standard.

2.5. HPAEC-UV/VIS analysis

Chromatograms were obtained using the HPAEC-system ICS 3000 from Dionex. For chromatography the guard column CarboPac™ PA200 3 × 50 mm and the analytical column CarboPac™ PA200 3 × 250 mm, both from Dionex, were used. The chromatographic separation was carried out at 30 °C and with a flow rate of 0.4 ml/min. Two eluents were used: one with deionized water (A) and the other one with 1 M sodium acetate in 200 mM sodium hydroxide (B). Ion exchange columns were equilibrated with 7.5% of eluent B for 15 min. After injection of the samples (10 µl) the separation was performed with a rate of 7.5% B for 30 min, which was subsequently increased to 60% within 45 min. This rate was kept constant for further 25 min. Afterwards the chromatographic columns were conditioned with 200 mM sodium hydroxide for 30 min and equilibrated with 7.5% B for the next measurement. The detection was performed by a diode array detector of the ICS-series from Dionex and with the wavelengths $\lambda = 309$ nm for 2-AA and the internal standard 4-AB as well as $\lambda = 328$ nm for reductively aminated analytes.

2.6. Borate-HPAEC analysis

Dionex Ultimate 3000 and anion exchange resin MCL Gel CA08F (Mitsubishi Chemical), in a column with the dimensions 5 × 120 mm (Omnifit) (packed at 65 °C), was used for chromatographic separation. The mobile phase consisted of two potassium tetraborate/boric acid-buffers in water: 0.3 M (C; pH 8.6) and 0.9 M (D; pH 9.5). Separation was performed at 65 °C with a flow rate of 0.7 ml/min. The elution program started with 90% C and 10% D and changed to 10% C and 90% D within 35 min. This rate was kept constant for 8 min and changed back to 90% C and 10% D within 7 min. Prior to detection, a post-column derivatization by Cubicinchoninate (0.35 ml/min) was applied at 105 °C in a Teflon® coil of 30 m length and 0.3 mm diameter. The analytes were detected at 560 nm via UV/VIS-detection.

2.7. ¹³C NMR-spectroscopy

NMR-spectroscopy was performed on a Bruker Avance III HD 400 MHz instrument. For quantitative ¹³C NMR-spectroscopy 80–100 mg of the samples were dissolved at 80 °C in 1 ml DMSO-*d*₆

Table 1

¹³C NMR-spectra of birch-MGX and beech-MGX. The integrals of the C1_{Xyl} signals were set at 100%.

Signal	Chemical shift [ppm]	f – beech	f – birch
C1 _{Xyl}	101.5	100	100
C1 _{meGlcA}	97.5	7.5	5.9

(99.8%, Deutero). As relaxation agent 6 mg chromium(III) acetylacetonate were added. Spectra were acquired with inverse-gated decoupling Puls-sequence at 80 °C, with an acquisition time of 1.4 s and a delay between scans of 2.5 s. For each spectrum 20,000 scans were collected.

2.8. Statistical verification

The parameters limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and the coefficient of variation (COV) were calculated according to DIN 32645 (2008). In short: $LOD = 3 \cdot SD/s \cdot F_D$ and $LOQ = 10 \cdot SD/s \cdot F_D$ with SD for the standard deviation of the overall blank, *s* for the slope of the linear calibration curve (with *n* = 10) and *F_D* for the dilution factor. Furthermore, we calculated the coefficient of variation by $COV = SD/\mu \cdot 100$ and with μ for the mean.

3. Results and discussion

3.1. ¹³C NMR-measurements

In order to investigate the molar ratios of the main components Xyl:meGlcA, ¹³C NMR-spectra of beech and birch wood MGX were applied (Table 1). The exact quantification of the monosaccharide units by NMR-analysis is inappropriate, due to high standard deviations. However, it is a suitable option to determine the ratios of specific components within one measurement.

The signals were identified according to Daus et al. (2011) and Šimkovic, Gedeon, Uhliriková, Mendichi, and Kirschnerová (2011). C1_{Xyl} caused a signal splitting that indicates Xyl units which are branched by meGlcA. Evaluation of the integrated C1-signals of Xyl and meGlcA showed ratios of 7.5 mol% and 5.9 mol% for beech and birch MGX, respectively. The corresponding ¹³C NMR-spectra are shown in the supplementary data (A).

3.2. Investigation of hydrolysis specificity

To preserve carbohydrates from degradation, gentle hydrolysis conditions are indispensable. The highest amounts of Xyl, detected by borate-HPAEC analysis, were found by 1-stage hydrolysis and autoclaving the samples for 40 min – 67.3 g/100 g in beech wood MGX and 76.6 g/100 g in birch wood MGX. However, the concentrations of meGlcA were underestimated significantly compared to ¹³C NMR-analysis, since only 0.8 mol% were detected in beech wood MGX and 1.0 mol% in birch wood MGX. All further calculations of the molar ratios of meGlcA and Xyl were referred to these maximum concentrations of Xyl which are set to 100 mol%.

To obtain complete cleavage of meGlcA from the Xyl backbone, hydrolysis conditions needed to be intensified and optimized. Therefore, 2-stage hydrolysis was applied and durations of post-hydrolysis varied from 20 to 90 min. The amounts of Xyl decreased continuously, from 94.9 mol% (20 min) to 85.1 mol% (90 min) for beech wood MGX and from 96.8 mol% (20 min) to 87.5 mol% (90 min) for birch wood MGX. In contrast, the detected concentrations of meGlcA increased within short hydrolysis times for both investigated xylans. In beech wood MGX 2.6 mol% meGlcA were detected after 20 min of 2-stage hydrolysis. This concentration rose with elongating durations and reached its maximum after 70 min (4.1 mol%). With hydrolysis times up to 90 min the detected content

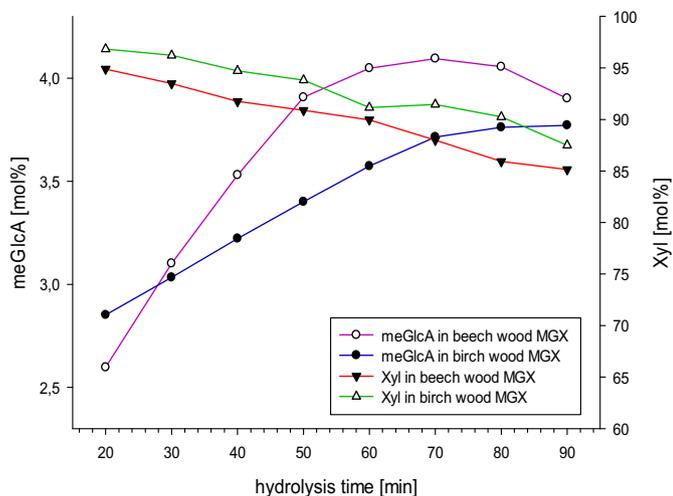


Fig. 1. Molar percentage of Xyl and meGlcA in beech and birch wood MGX after 2-stage hydrolysis and varying post-hydrolysis times. The maximum concentrations of Xyl, detected after 1-stage hydrolysis for 40 min, were used as reference (100 mol%).

decreased to 3.9 mol%. In birch wood MGX the amount of meGlcA increased from 2.9 mol% after 20 min, reached its maximum after 80 min (3.8 mol%) and stagnated until 90 min (Fig. 1). We compared these results with the findings obtained via ^{13}C NMR-analysis and found that the maximum meGlcA concentrations, detected via borate-HPAEC, were only 55% for beech and 64% for birch wood MGX related to ^{13}C NMR-measurements.

The increasing meGlcA concentration in both samples illustrates the strong linkage of meGlcA to the Xyl backbone, since intense conditions are required for complete cleavage. In addition, the degradation of meGlcA is observable in beech wood MGX, due to the decreasing concentration of meGlcA. Furthermore, the maxima of meGlcA were reached after different hydrolysis times, according to the source of MGX. That leads to the conclusion that specific conditions for each xylan are required. With the comparison to ^{13}C NMR-spectroscopy, it is noticeable that degradation of meGlcA is relevant even at less drastic conditions. Furthermore, the concentrations of Xyl were strongly affected by intense hydrolysis. Compared to the Xyl content, determined after 1-stage hydrolysis, only 88% were found in beech wood MGX and 90% in birch wood MGX at the particular maxima of meGlcA. Accordingly, the hydrolysis conditions, required for optimal Xyl and meGlcA yields, cannot be harmonized.

Thus, a new analytical method is introduced that combines gentle acid hydrolysis with identification and quantification of the remaining meGlcA-related oligosaccharides.

3.3. Detailed characterization by HPAEC-UV/VIS

The selected monosaccharides and oligosaccharides, relevant for the investigation of hydrolyzed MGX, were reductively aminated and analyzed by HPAEC-UV/VIS to determine the retention time of each compound (Table 2). To prove that labeling of these carbohydrates proceeded quantitatively, the recovery rates were calculated. Therefore, standards of each investigated carbohydrate have been reductively aminated by 2-AA and analyzed by the presented HPAEC-UV/VIS method. The concentrations of all substances were determined by using 2-AA as an external standard. For calculation of the recoveries, the analyzed concentrations were referred to the actual amounts of the carbohydrate standards. A chromatogram of these carbohydrate standards is attached to the supporting information (B).

Table 2

Retention times and recovery rates of selected carbohydrates. Two isomers needed to be considered for meGlcA-X₃, thus there are two retention times mentioned.

Carbohydrate	Retention time [min]	Recovery rate [%]
Xylose	22.8	95.9 ± 1.7
Galactose	24.1	100.7 ± 2.6
Glucose	25.2	95.9 ± 1.7
Arabinose	27.1	102.6 ± 3.1
meGlcA-X ₃	49.8 + 52.8	69.2 ± 3.6
meGlcA-X	53.9	109.9 ± 3.6
meGlcA-X ₂	60.1	104.0 ± 3.0
meGlcA	70.9	94.3 ± 5.0
Galacturonic acid	75.7	98.1 ± 3.4
Glucuronic acid	83.6	103.0 ± 3.2

All relevant carbohydrates could be introduced into the new chromatographic method. The monosaccharide mannose coeluted with the labeling reagent 2-AA and could not be integrated in this procedure. This could cause challenges when analyzing samples that contain the hemicellulose glucomannan, which mainly affects xylans from softwood plants. However, the analysis of xylans from hardwood plants is not influenced. The recovery rates of all compounds, except of meGlcA-X₃, varied between 94.3 and 109.9%; the confidences between 1.7 and 5.0%. Only the recovery rate of meGlcA-X₃ (69.2%) is reduced, compared to the other carbohydrates (Table 2). This observation can be explained due to less intense reactivity during reductive amination, based on larger molecule size.

Since the investigated meGlcA containing oligosaccharides are obtained after sulfuric acid hydrolysis, several isomers might occur for each structural compound. For the trisaccharide meGlcA-X₂, two isomers need to be considered. However, the isomer 2'-O-(4-O-methyl- α -D-glucosyluronic acid)xylobiose, with meGlcA attached to the non-reducing xylose unit, is the dominating compound with an occurrence of 97%, as published previously (Cavagna, Deger, & Puls, 1984). Accordingly, this particular linkage between Xyl units with an attached meGlcA shows an increased strength compared to the linkages between two unsubstituted Xyl units. Thus, only this structure was considered during the analysis. For the carbohydrate meGlcA-X₃, three possible isomers need to be investigated. However, only two relevant peaks were detected in the chromatogram. Referring to the mentioned linkage strength effects observed for meGlcA-X₂, these structures might be the isomers with meGlcA linked to the non-reducing terminal Xyl as well as to the intermediate Xyl unit.

Since there is no significant variation of the recoveries between acidic and neutral structures, the postulated negative effect of sulfate precipitation by Ba(OH)₂ could not be confirmed in this particular case. Thus, the chosen conditions for derivatization are suitable for quantification of these relevant carbohydrates with the exception of meGlcA-X₃.

The MGX's of beech and birch wood were treated by gentle 1-stage hydrolysis and 2-stage hydrolysis with the respective duration at which the maxima of meGlcA were detected by borate-HPAEC. These samples were desulfated, reductively aminated and analyzed by HPAEC-UV/VIS. The differences in presence as well as concentration of the monosaccharides, oligosaccharides and uronic acids are observable in both analytes (Fig. 2).

After 1-stage hydrolysis the monomers xylose, galactose, glucose, arabinose, and meGlcA as well as the disaccharide meGlcA-X and the trisaccharide meGlcA-X₂ were detected in both MGX's. Besides the mentioned strong linkage of meGlcA to Xyl, which resulted in incomplete cleavage and the remainder meGlcA-X, significant amounts of meGlcA-X₂ were identified in the hydrolysates after gentle hydrolysis conditions. The oligomer meGlcA-X₃ was not detected in either of the samples. After 70 min (beech) and

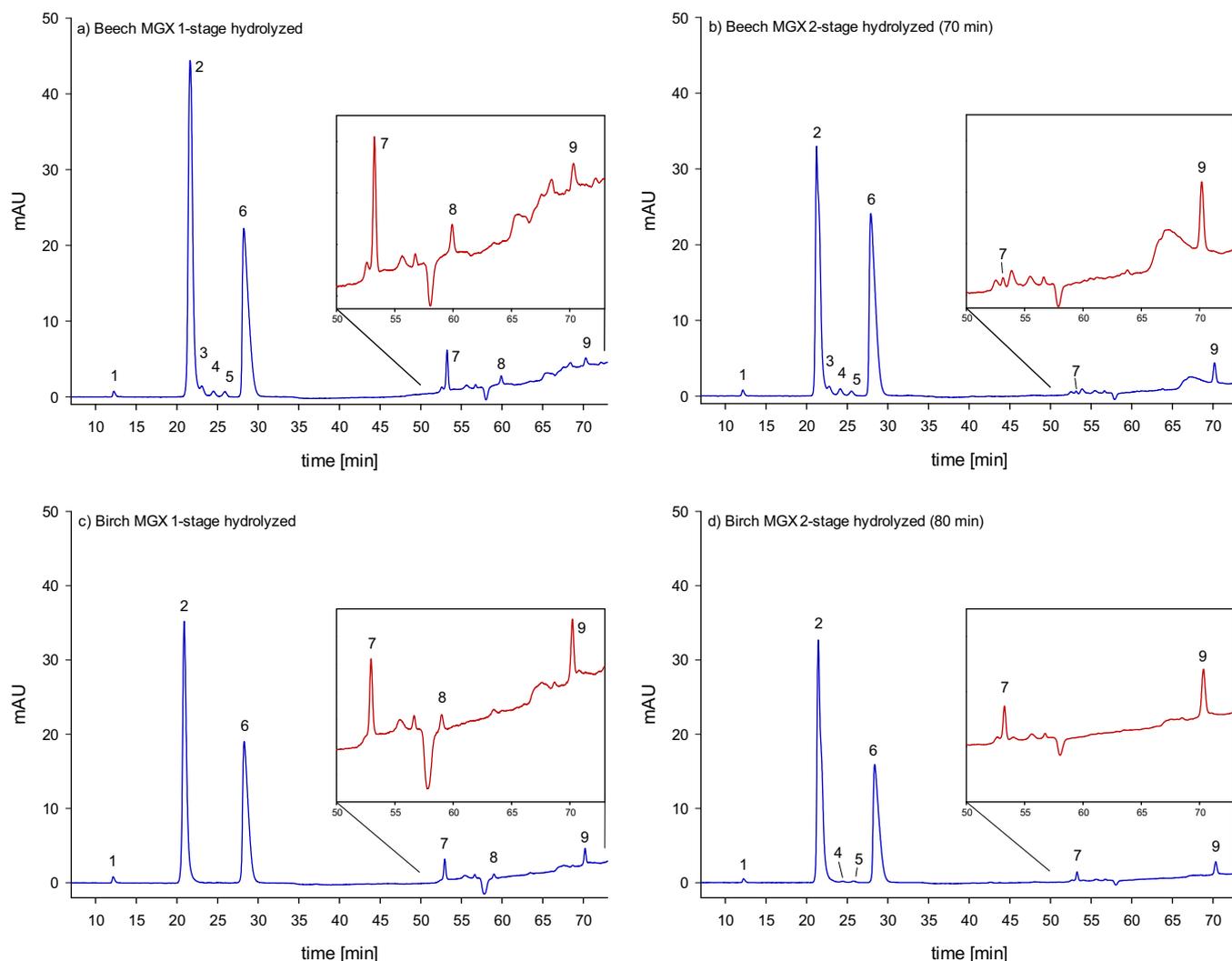


Fig. 2. HPAEC-UV/VIS-chromatograms of hydrolyzed and reductively aminated beech and birch wood MGX, detected at $\lambda = 328$ nm. 1-stage hydrolyzed samples are compared with 2-stage hydrolyzed, with the post-hydrolysis conditions for which the highest amounts of meGlcA were detected. Following substances have been identified: 1 – 4-AB (internal standard); 2 – xylose; 3 – galactose; 4 – glucose; 5 – arabinose; 6 – 2-AA (UV-label); 7 – meGlcA-X; 8 – meGlcA-X₂; 9 – meGlcA.

80 min (birch) of 2-stage hydrolysis, the detected concentrations of the monosaccharides decreased due to degradation. Furthermore, the amount of meGlcA-X was reduced, whereas no meGlcA-X₂ could be detected anymore. In return, the yielded concentrations of meGlcA increased due to further fragmentation of the oligosaccharides. After 2-stage hydrolysis further unknown peaks appeared, mainly at retention times between 50 and 57 min. This is an additional indicator for uncontrolled degradation during intense hydrolysis conditions. Though, the maximum of meGlcA was detected at the chosen conditions, hydrolysis was still incomplete, since small amounts of the disaccharide remained.

For complete quantification of the monosaccharide composition, the 1-stage hydrolyzed MGX were analyzed. Since the UV-label is the only structure component with a specific UV-absorption at the investigated wavelength ($\lambda = 328$ nm), the applied UV-detector provides a molar detector response. Thus, any labeled carbohydrates with identical molar amounts, result in peaks with the same peak areas. Furthermore, all carbohydrates can be quantified by using only 2-AA as standard. In order to minimize errors, caused by the HPAEC-UV/VIS instrument, 50 μ l of the internal standard 4-AB were added to the analyte solutions and to the 2-AA-standards, prior to chromatography. The detected peak areas of the carbohydrates and of 2-AA have been referred to those of

4-AB. With the mentioned external calibration by 2-AA, the molar amounts of the carbohydrates were determined. This procedure can also be used for the quantification of both monosaccharides out of the unhydrolyzed oligosaccharides. Since the trisaccharide meGlcA-X₂ contains two units of Xyl ($n=2$), the molar amount of meGlcA-X₂ was considered twice for the determination of the Xyl concentration. For the comparison of the quantified amounts of Xyl and meGlcA to the data obtained by NMR-spectroscopy, all detected concentrations were referred to the total amount of Xyl, which was set to 100% (Fig. 3).

By taking the additional amounts of the remaining oligosaccharides into account, the determined concentrations of Xyl were 9.3% higher for beech and 6.5% higher for birch MGX compared to the quantified monomers. Based on these results, the molar ratios of Xyl:meGlcA were calculated. The direct quantification of meGlcA yielded an amount of 1.2 mol% and 1.5 mol% for beech and birch, respectively. The largest fraction of meGlcA was quantified out of meGlcA-X – 6.2 mol% in beech and 3.8 mol% in birch MGX, respectively. Still, 1.1 mol% and 1.0 mol% of meGlcA were found due to unhydrolyzed meGlcA-X₂. The total molar ratio of meGlcA:Xyl added up to 7.6 mol% and 6.7 mol%. These results have been compared to the molar ratios determined by ¹³C NMR-measurements. With respect to measurement inaccuracy of NMR and HPAEC

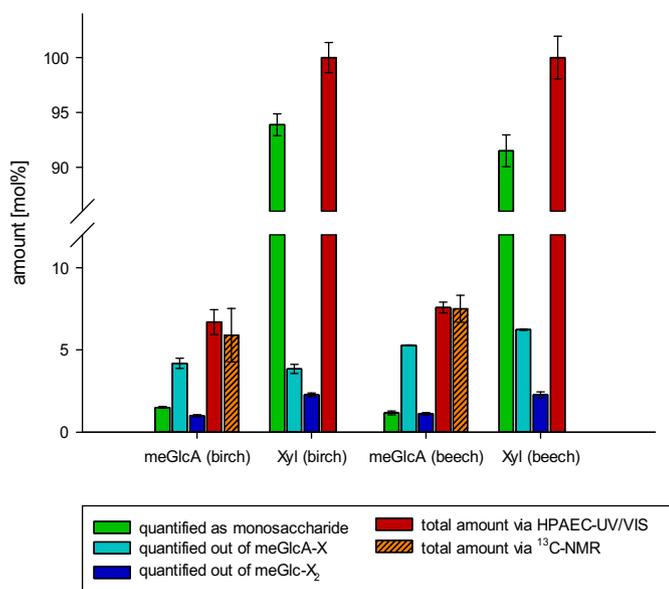


Fig. 3. Calculated amounts of meGlcA and Xyl after 1-stage hydrolysis and reductive amination, analyzed via HPAEC-UV/VIS. These results are compared with the molar ratios of meGlcA:Xyl obtained by ^{13}C NMR-measurements.

Table 3
LOD, LOQ and COV of carbohydrates investigated by borate-HPAEC.

Compound	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]	COV [%]
Arabinose	1.15	3.52	6.02
Xylose	0.22	0.73	1.12
Galactose	0.58	1.88	2.98
Glucose	0.42	1.39	2.01
meGlcA	0.73	2.34	3.75

Table 4
LOD, LOQ and COV of carbohydrates investigated by HPAEC-UV/VIS.

Compound	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]	COV [%]
Arabinose	0.05	0.15	6.40
Xylose	0.05	0.16	5.60
Galactose	0.06	0.19	6.12
Glucose	0.11	0.33	10.11
meGlcA	0.19	0.58	6.02
meGlcA-X	0.18	0.58	3.47
meGlcA-X2	0.18	0.59	3.67
meGlcA-X3	0.15	0.47	9.45
GlcA	0.12	0.37	10.64
GalA	0.08	0.26	7.80

analysis, the molar ratios, determined by both methods, are comparative for the two xylans. Compared to standard borate-HPAEC measurements, we detected concentration of meGlcA which are 85.4% higher in beech MGX and 76.3% in birch wood MGX.

Though, the quantification of all carbohydrates can be done by using only 2-AA as standard, authentic carbohydrates are still needed for peak identification. However, the requirements to these substances are less intense in terms of purity and quantity.

3.4. Statistical verification

Both analytical methods, borate-HPAEC and HPAEC-UV/VIS, were validated by determination of the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ) and the process coefficient of variation (COV) for the investigated analytes. The results are summarized in Tables 3 and 4. Both, the LOD and the LOQ were significantly lower by HPAEC-UV/VIS than by borate-HPAEC. Furthermore, the uronic acids GlcA and GalA as well as the meGlcA related oligosaccharides

could not be analyzed by borate-HPAEC. In contrast, the COV were higher by analysis via HPAEC-UV/VIS, compared to borate-HPAEC, due to more complex sample preparation prior to measurements.

4. Conclusions

The presented method for the analysis of uronic acids, monosaccharides and oligosaccharides, by HPAEC-UV/VIS, is a new tool for the exact quantification of the polysaccharide composition after partial acid hydrolysis. Since linkage strengths between specific components are strongly varying, no general method for complete acid hydrolysis can be designed, while preventing the carbohydrates from secondary degradation. By using a gentle partial acid hydrolysis, we yielded a mixture of monosaccharides, uronic acids and short oligosaccharides up to a degree of polymerization of 3. The new presented method was developed to detect and quantify all of these carbohydrate structures by HPAEC-UV/VIS after reductive amination by 2-AA within one chromatographic measurement. Since the labeled carbohydrates have its UV-absorption maxima at 328 nm and the investigated carbohydrates show no UV-activity at this wavelength, all carbohydrates provided a molar detector response. Thus, all structures could be quantified by using only 2-AA as a standard. Accordingly, substances with no pure commercially available standards, such as meGlcA and its oligosaccharides, can easily be determined. By detection and quantification of oligosaccharides, we detected significant higher amounts of meGlcA as well as Xyl compared to direct quantification of these monosaccharides. Furthermore, the new method is more sensitive than standard borate-HPAEC, which is illustrated in the considerably lower determined limits of detection and the limits of quantification. The presented chromatographic method by HPAEC-UV/VIS can also be applied for the detailed characterization of xylan containing biomass, technical products as pulp and paper and various polysaccharides. However, this requires further investigations of the specific hydrolysis procedure and the resulted carbohydrate residues.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the WoodWisdom-EraNet (Aerowood project), the German funding agency "Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe" (FNR, ref. no. 2202214), and the federal ministry "Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft" (BMEL) for financial support. We would also like to thank Dr. Jürgen Puls for providing the standards meGlcA, meGlcA-X, meGlcA-X₂, and meGlcA-X₃.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.027](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.027).

References

- Anumula, K. R. (2014). Single tag for total carbohydrate analysis. *Analytical Biochemistry*, 457(0), 31–37.
- Bigge, J. C., Patel, T. P., Bruce, J. A., Goulding, P. N., Charles, S. M., & Parekh, R. B. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Analytical Biochemistry*, 230(2), 229–238.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489.
- Borch, R. F., Bernstein, M. D., & Durst, H. D. (1971). Cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society*, 93(12), 2897–2904.
- Cavagna, F., Deger, H., & Puls, J. (1984). 2D-NMR analysis of the structure of an aldotriuronic acid obtained from birch wood. *Carbohydrate Research*, 129(July), 1–8.

- Chong, S.-L., Koutaniemi, S., Virkki, L., Pynnönen, H., Tuomainen, P., & Tenkanen, M. (2013). Quantitation of 4-O-methylglucuronic acid from plant cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 626–630.
- Coughlan, M. P., & Hazlewood, G. P. (1993). Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17(3), 259–289.
- Daus, S., Petzold-Welcke, K., Kötteritzsch, M., Baumgaertel, A., Schubert, U. S., & Heinze, T. (2011). Homogeneous sulfation of xylan from different sources. *Macromolecular Materials and Engineering*, 296(6), 551–561.
- Davis, M. W. (1998). A rapid modified method for compositional carbohydrate analysis of lignocelluloses by high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD). *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 18(2), 235–252.
- De Ruiter, G. A., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., & Rombouts, F. M. (1992). Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry*, 207(1), 176–185.
- DIN 32645:2008-11. (2015). *Chemical analysis – decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions – terms, methods, evaluation*. Berlin: Beuth.
- Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 167(1), 189–198.
- Ebringerová, A. (2006). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, 232, 1–12.
- Ebringerová, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives – Biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In T. Heinze (Ed.), *Polysaccharides I* (Vol. 186) (pp. 1–67). Heidelberg: Springer Berlin.
- Filissetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 157–162.
- Garleb, K. A., Bourquin, L. D., & Fahey, G. C. (1989). Neutral monosaccharide composition of various fibrous substrates: A comparison of hydrolytic procedures and use of anion-exchange high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection of monosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1287–1293.
- Harvey, D. J. (2011). Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879(17–18), 1196–1225.
- Janzon, R., Puls, J., Bohn, A., Potthast, A., & Saake, B. (2008). Upgrading of paper grade pulps to dissolving pulps by nitren extraction: Yields, molecular and supramolecular structures of nitren extracted pulps. *Cellulose*, 15(5), 739–750.
- Lee, Y. C. (1996). Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 720(1–2), 137–149.
- Leschinsky, M., Sixta, H., & Patt, R. (2009). Detailed mass balances of the autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* at 170 °C. *BioResources*, 4(2), 687–703.
- Manns, D., Deutschle, A. L., Saake, B., & Meyer, A. S. (2014). Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (Laminariaceae). *RSC Advances*, 4(49), 25736–25746.
- Mischnick, P., Unterrieser, I., Voiges, K., Cuers, J., Rinken, M., & Adden, R. (2013). A new method for the analysis of the substitution pattern of hydroxyethyl(methyl)-celluloses along the polysaccharide chain. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214(12), 1363–1374.
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R. D., Harris, P. J., & Curzon, E. H. (1986). Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research*, 148(1), 71–85.
- Pena, M. J., Zhong, R. Q., Zhou, G. K., Richardson, E. A., O'Neill, M. A., Darvill, A. G., et al. (2007). Arabidopsis irregular xylem8 and irregular xylem9: Implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell*, 19(2), 549–563.
- Puls, J., Borchmann, A., Gottschalk, D., & Wiegel, J. (1988). Xylobiose and xylooligomers. *Methods in Enzymology*, 160, 528–536.
- Quigley, M. E., & Englyst, H. N. (1992). Determination of neutral sugars and hexosamines by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Analyst*, 117(11), 1715–1718.
- Rakete, S., & Glomb, M. A. (2013). A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3828–3833.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millett, M. A. (1954). Techniques For the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi*, 37(8), 336–343.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263–289.
- Shatalov, A. A., Evtuguin, D. V., & Pascoal Neto, C. (1999). (2-O- α -D-Galactopyranosyl-4-O-methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate Research*, 320(1–2), 93–99.
- Šimkovic, I., Gedeon, O., Uhlířiková, I., Mendichi, R., & Kirschnerová, S. (2011). Xylan sulphate films. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 214–218.
- Sinner, M., & Puls, J. (1978). Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 156(1), 197–204.
- Sinner, M., Simatupang, M. H., & Dietrichs, H. H. (1975). Automated quantitative analysis of wood carbohydrates by borate complex ion exchange chromatography. *Wood Science and Technology*, 9(4), 307–322.
- Takao, T., Tambara, Y., Nakamura, A., Yoshino, K.-I., Fukuda, H., Fukuda, M., et al. (1996). Sensitive analysis of oligosaccharides derivatized with 4-aminobenzoic Acid 2-(diethylamino)ethyl ester by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(6), 637–640.
- Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A., & Dahlman, O. (2002). Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research*, 337(4), 373–377.
- Tenkanen, M., Hausalo, T., Siika-aho, M., Buchert, J., & Viikari, L. (1995). Use of enzymes in combination with anion exchange chromatography in the analysis of carbohydrate composition of kraft pulps. *The 8th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry*, III, 189–194.
- Unterrieser, I., & Mischnick, P. (2011). Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 346(1), 68–75.
- van den Hoogen, B. M., van Weeren, P. R., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L. M. G., Barneveld, A., & van de Lest, C. H. A. (1998). A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 257(2), 107–111.
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., et al. (2009). Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides – A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 571–580.

**Determination of uronic acids and neutral carbohydrates in
pulp and biomass by hydrolysis, reductive amination and
HPAEC-UV**

Dominic Lorenz, Ron Janzon, Bodo Saake

Holzforschung, 2017, 71, 767-775

Dominic Lorenz, Ron Janzon and Bodo Saake*

Determination of uronic acids and neutral carbohydrates in pulp and biomass by hydrolysis, reductive amination and HPAEC-UV

DOI 10.1515/hf-2017-0020

Received February 2, 2017; accepted April 20, 2017; previously published online May 25, 2017

Abstract: The exact quantification of all carbohydrate constituents in wood and pulp is a challenge because of the various glycosidic linkages of the polysaccharides with different stabilities. The individual detector responses for the compounds in the hydrolysates additionally complicate the quantification as pure standards for 4-*O*-methyl- α -D-glucuronic acid (meGlcA) and related oligosaccharides are not commercially available for calibration. In the present paper, a new analytical procedure is presented, based on the reductive amination of the carbohydrates obtained via acidic and enzymatic hydrolysis of the polysaccharides before quantification by means of high performance anion exchange chromatography (HPAEC) and UV-detection. This approach was suitable for the analysis of neutral carbohydrates and uronic acids obtained via enzymatic hydrolysis from bleached pulps. In the case of unbleached pulps, the enzymatic hydrolysis was not complete and unhydrolyzed nano-scaled and micro-scaled particles remained in the hydrolysates as detected by dynamic light scattering (DLS) measurements. The new HPAEC-UV methodology was also applied to kraft pulps and a sulfite pulp; six different kinds of wood as well as wheat straw and bagasse. All relevant monosaccharides and the dimer of meGlcA and xylose could be detected in the hydrolysates. Accordingly, significantly higher yields of meGlcA were found compared to literature data.

Keywords: 2-aminobenzoic acid, anthranilic acid, biomass, dynamic light scattering, enzymatic hydrolysis, HPAEC-UV/VIS, labeling, 4-*O*-methyl- α -D-glucuronic acid, particle size, reductive amination, xylan

*Corresponding author: Bodo Saake, Department of Wood Science-Chemical Wood Technology, University of Hamburg, Leuschnerstraße 91b, Hamburg 21031, Germany, e-mail: bodo.saake@uni-hamburg.de

Dominic Lorenz and Ron Janzon: Department of Wood Science-Chemical Wood Technology, University of Hamburg, Leuschnerstraße 91b, Hamburg 21031, Germany

Introduction

The traditional production of pulp and paper became a new impetus by the new biorefinery technologies, with many of them aiming at hemicelluloses prehydrolysis and a value added hemicelluloses utilization (Fernando et al. 2006; Park and Um Byung 2015; Reyes et al. 2015; Kleen et al. 2016; Lloyd and Murton 2016; Nebreda et al. 2016; Rivas et al. 2016; Roselli et al. 2016; Zhou et al. 2016). For an optimal process design in these new approaches, a detailed knowledge about the chemical composition of the feedstocks is necessary, which is also relevant for new products such as films and aerogels (Liebner et al. 2012; Alekhina et al. 2014; Zhao et al. 2016). Lignocellulosic materials consist of polysaccharides and lignin, while cellulose is the most abundant polymer followed by several hemicelluloses (xylan, mannan, and galactan) and pectin (Kačuráková et al. 2000; Ebringerová et al. 2005).

The analysis of the polysaccharide moiety of lignocellulosics and pulps requires a hydrolysis step, which is usually achieved via hydrolysis with sulfuric acid (Saeman et al. 1954; Willför et al. 2009). It is well known that a complete hydrolysis into monosaccharides is difficult to realize due to the side-reactions leading to furfural, 5-hydroxymethyl furfural, formic acid and levulinic acid (Dahlman et al. 2000; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000; Pilath et al. 2010; Lorenz et al. 2016). On the other hand, too gentle conditions result in a partial hydrolysis, mainly with residual oligosaccharides of 4-*O*-methyl- α -D-glucuronic acid (meGlcA) and xylose. Moreover, xylose and meGlcA related oligosaccharides in the hydrolysates are difficult to identify and quantify as such compounds are not commercially available (Lorenz et al. 2016).

Delignified or steam treated biomass as well as the application of co-solvent systems enable the hydrolysis by mild enzymatic procedures, which minimize the structural modification (Dahlman et al. 2000; Schütt et al. 2013; Han et al. 2017). According to Dahlman et al. (2000), the total determined carbohydrate amounts are between 4.4% and 12.1% higher in case of enzymatic hydrolysis (EH) compared to acid hydrolysis (AH) of pulps. Though EH in combination with fermentation processes for ethanol or biogas

production is well developed in the meanwhile, there are still limiting factors detracting from this approach for quantitative analysis. For example, modification of the biomass surface after drying (crustification) may prevent close surface contact with the enzymes. Chemical interactions between lignin, cellulose and xylan may form complexes not accessible for the enzymes and an incomplete hydrolysis is the result (Hendriks and Zeeman 2009; Penttilä et al. 2013).

For the chromatographic separation and quantification of the products in the hydrolysates, high performance anion exchange chromatography (HPAEC), frequently used in combination with pulsed amperometric detection (PAD), is an established method (Gullón et al. 2011; Manns et al. 2014; Anders et al. 2015). PAD is known for high sensitivity and selectivity for oxidizable molecules, but its response to various compounds is very different. Therefore, PAD detection must be calibrated by pure standards. This procedure is suitable for most of the monosaccharides, but its application for mGlcA (or related oligosaccharides) quantification is aggravated, because pure standards are not commercially available. Therefore, these and similar compounds are significantly underestimated in the course of polysaccharide analysis.

Another analytical method is the depolymerization of polysaccharides combined with a simultaneous derivatization of the produced monomers by acid methanolysis followed by GC analysis (Bertaud et al. 2002). This approach is suitable for pectins and hemicelluloses leading to the exact quantification of uronic acids, including mGlcA. However, the method is not appropriate for the hydrolysis of cellulose in biomass and pulp feedstocks. According to Willför et al. (2009), the determined carbohydrate yields are around 23% for birch kraft pulp and between 33% and 49% for several other biomass samples, showing the

incomplete quantification rate. Altaner and Saake (2016) published data regarding the characterization of lignocellulosics by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. Though less sensitive than chromatographic procedures, this approach enables the fast and simultaneous analysis of carbohydrates and their degradation products such as furfural, 5-hydroxymethyl furfural and levulinic acid.

Lorenz et al. (2016) published a new approach for the analysis of isolated 4-*O*-methyl- α -glucurono-D-xylans, where the quantification of acidic oligosaccharides after partial acid hydrolysis has been described. The essence of the method is the reductive amination of all carbohydrates in the hydrolysates, which allows the quantification of the monomer mGlcA and oligosaccharides of mGlcA linked to xylose as well as of the other relevant monosaccharides. One of the appropriate derivatization agents for reductive amination is 2-aminobenzoic acid (2-AA) (Anumula 2014). The reduction of the unstable intermediate, which is produced during the reaction, is usually realized by sodium cyanoborohydride, as introduced by Borch et al. (1971). However, this compound is highly toxic. The substitution of this reducing agent with the non-toxic 2-picolineborane complex (Figure 1) is a good alternative (Unterieser and Mischnick 2011).

The aim of the present study is the adaptation of the HPAEC-UV analysis to more complex pulp and biomass samples for a more precise determination of the total carbohydrate composition via hydrolysis in combination with the reductive amination. The recovery rates of carbohydrates by this approach were determined previously and the results are summarized in Table 1. The hydrolysis of pulps should be realized by means of AH and EH and the cleavage efficiencies should be compared. For comparison, pulps will also be analyzed by the established standard borate-HPAEC.

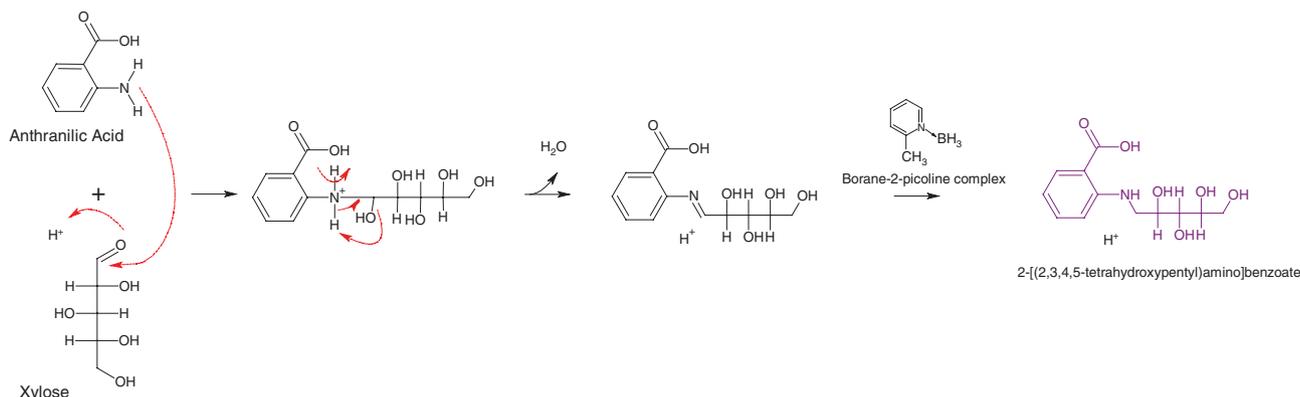


Figure 1: Reductive amination of carbohydrates, using the example of xylose. The amine compound is anthranilic acid (2-AA), the reducing agent is borane-2-picoline complex.

Table 1: Recovery rates of carbohydrates after reductive amination and analysis by HPAEC-UV/VIS, adapted from Lorenz et al. (2016).

Carbohydrate	Recovery rate (%)
Xylose	95.9 ± 1.7
Galactose	100.7 ± 2.6
Glucose	95.9 ± 1.7
Arabinose	102.6 ± 3.1
meGlcA-Xyl	109.9 ± 3.6
meGlcA	94.3 ± 5.0
GalA	98.1 ± 3.4
GlcA	103.0 ± 3.2

Materials and methods

Preparation of pulps: The following kraft pulps (KPs) were analyzed: spruce unbleached KP (Zellstoff Rosenthal, Germany), spruce bleached (BKP) (Zellstoff Rosenthal, Germany), and beech unbleached KP (technical plant at Hamburg University, Germany; T_{\max} 165°C, t 90 min, L:W ratio 4:1, NaOH 20%, Na_2S 30%). A bleached sulfite pulp (BSP) from beech (SAPPI, Stockstadt am Main, Germany) was also analyzed. The feedstocks were fluffed with a lab mill (A10, Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau, Germany) for 90 s. Remaining alkali from the pulping or bleaching process was removed completely with a 0.1 M HCl solution and the purified pulps were dried before further treatment.

Preparation of wood and annual plants: Wood from *Picea abies* (L.) H. KARST, *Eucalyptus globulus* LABILL., *Fagus sylvatica* L., *Quercus alba* L., *Alnus glutinosa* (L.) GAERTN., and *Populus alba* L. was chopped into chips. The feedstocks wheat straw and bagasse were shred into 2–3 cm long pieces. The raw materials were dried for 72 h at 45°C. Afterwards, homogeneous matrices were produced by milling with a swing mill HP-M 100P (Herzog, Osnabrück, Germany) for 60 s.

Enzymatic hydrolysis (EH): The prepared pulps were submitted to EH (72 h, 45°C) by addition of 300 µl Cellic-C Tec 2 (cellulase complex with a filter paper activity of 101 FPU ml⁻¹; Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) and 50 µl Novozymes 188 (β-glucosidase with an activity of 227 CBU ml⁻¹; Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) per gram of sample material. The experiments were performed in ammonium acetat (Merck, Darmstadt, Germany) buffer (pH 4.8).

Two-stage acid hydrolysis (AH): The milled and dried biomass was hydrolyzed according to Lorenz et al. (2016). In short, 100 mg of each matter were treated with 1 ml of 72% H₂SO₄ (Honeywell, Seelze, Germany). The suspensions were conditioned to 30°C and pre-hydrolyzed for exactly 60 min. This first hydrolysis was stopped by adding 3 ml of water. After dilution with 25 ml water (leading to H₂SO₄ conc. of 2.5%), the samples were treated in an autoclave (Systex VX-75 from Systec GmbH, Linden, Germany) for 30 min at 120°C. The hydrolysis residues were filtrated, washed, dried and weighed (lignin content); the filtrated solutions were filled up to 50 ml.

Analysis of carbohydrates by borate-HPAEC: Borate-HPAEC was applied (Lorenz et al. 2016) as the standard procedure.

Analysis of reductively aminated carbohydrates by HPAEC-UV: Sulfate ions are detrimental for HPAEC-UV analysis and the sample preparation, thus, 5 ml of each hydrolyzed sample was mixed with 10 ml Ba(OH)₂ (40 gl⁻¹) (Merck Suchardt, Hohenbrunn, Germany) for sulfate removal. The precipitated BaSO₄ was removed after centrifugation and the residue was rinsed with 2 ml of water three times. The solutions were pooled and water was added up to a total volume of 25 ml. For UV-detection of carbohydrates, the analytes were reductively aminated according to Lorenz et al. (2016). Derivatization with 2-aminobenzoic acid (Merck Suchardt, Hohenbrunn, Germany) was catalyzed with acetic acid (Fisher Chemical, Loughborough, UK) and reduction was carried out with 2-picoline borane complex (Aldrich Chemical, Steinheim, Germany).

Subsequently, the solutions were dried with a N₂ stream to remove all volatile compounds, 50 µl of the internal standard 4-aminobenzoic acid (2 gl⁻¹) (Aldrich Chemistry, Steinheim, Germany) was added and the residue was dissolved in 1 ml of water. For chromatographic analysis, 10 µl of each sample was injected in a HPAEC-system ICS 3000 (Dionex). The system was operated with a guard column CarboPac™ PA200 3 × 50 mm (Dionex) and an analytical column CarboPac™ PA200 3 × 250 mm (Dionex) and two eluents, namely deionized water (A) and 1 M sodium acetate (ChemSolute, Renningen, Germany) in 200 mM NaOH (B) (Fluka Analytical, Steinheim, Germany). The gradient development was as follows: 7.5% of B for 30 min → increasing B within 30 min to 60% → keeping constant for 25 min. To clean the system, it was flushed with 200 mM NaOH for 20 min. The subsequent equilibration was done with 7.5% B for 10 min. The flow rate in the system was 0.4 ml min⁻¹ at 30°C. UV detection occurred at 328 nm and quantified by means of calibration with 2-AA as an internal standard (IS), detected at 309 nm. All integrated peak areas are referred to that of 2-AA as IS. For quantification, the molar masses of the respective compounds were reduced by the mass of water and used for the calculations. In this way, the condensed forms of the saccharides in the polymer were taken into account. One end-group of each polysaccharide is not included in these calculations. Referring to the total mass of the polysaccharides, the influence of one water molecule can be neglected. Based on the general quantification limits determined previously (Lorenz et al. 2016), the limits of quantification for the applied conditions were around 0.15% referred to sample dry weight. Coefficients of variation were between 3% and 10%.

Kappa number (KN): The determination was done according to TAPPI (1999). If the KN is multiplied by a factor of 0.13, the Klason lignin content can be approximated.

Particle size analysis: The distribution of the particle size in the hydrolysates of EH and AH was determined with a dynamic light scattering particle size analyzer Horiba LB-550 (Retsch Technology, Haan, Germany). For this purpose, 1.5 ml of each hydrolysate was placed in a disposable cuvette (Plastibrand, Brand GmbH, Wertheim, Germany) and the light-scattering intensity was detected 3 times for each sample. For graphical reports, the respective means were calculated.

Results and discussion

Determination of lignin

The data of acid hydrolysis (AH) with the weight of the unhydrolysable residues (equivalent to Klason lignin) are presented in the Tables 1–3. The kappa number (KN) is a parameter for the oxidizable unsaturated bonds and thus also for the remaining lignin content in a pulp by multiplication with the factor 0.13 (TAPPI 1999). In all the samples, the KN derived lignin contents were less than those determined based on the hydrolysis residues. This means that the residues might include further constituents as acid insoluble inorganic matter and extractives. The KN and AH based lignin contents are listed in Table 2.

Table 2: Kappa numbers (KN), calculated lignin amounts and hydrolysis residues of kraft pulps (KP) and a sulfite pulp (SP) obtained after two-stage sulfuric acid hydrolysis.

Pulp	Kappa number	Calculated lignin (%) ^a	Hydr. res. (%)
Spruce KP	23.2	3.0	6.4
Spruce BKP	1.7	0.2	0.7
Beech KP	17.2	2.2	2.4
Beech BSP	5.1	0.7	0.7

^aKN × 0.13; B refers to bleaching, i.e. to bleached pulps.

Determination of carbohydrates in pulps

Bleached and unbleached pulps were also hydrolyzed by EH and AH. The subsequent analysis with the conventional borate-HPAEC and the new HPAEC-UV method resulted in the data presented in Table 3. The commercial enzyme mixtures contained significant amounts of fructose and glucose as well as traces of rhamnose, mannose and galactose. These carbohydrates were quantified by borate-HPAEC (data not shown) and offset against the carbohydrate content analyzed in pulp samples. In all hydrolysates, glucose, xylose and mannose were detected. Arabinose was found in some samples as well as galacturonic acid and meGlcA. Their yield depends on the natural source, sample preparation and the kind of analytical measurement. MeGlcA was detected in all EH samples analyzed by the standard and novel HPAEC approaches. MeGlcA was only absent in BKP_{spruce} (borate-HPAEC). As the dimer of meGlcA and xylose was not detected in any EH samples, it can be assumed that the applied enzyme mixtures also contained glucuronidase. On the other hand, meGlcA could be detected in two samples after AH in combination with the HPAEC-UV approach, indicating a structural degradation of this compound. KP_{spruce} contained 0.3% and KP_{beech} contained 4% meGlcA. Compared to the results of EH, the degradation rate of meGlcA during AH was between 43% and 44%. The behavior of meGlcA is in contrast to that of all neutral carbohydrates, as the amounts determined in EH treated pulps are generally lower than those in AH

Table 3: Analysis of enzymatic and acidic pulp hydrolysates.

Pulp Method	Hydrolysis ^a	Yields of hydrolysis products (wt%)							Resid.	Sum
		Glc	Xyl	Ara	Man	GalA	meGlcA			
Spruce KP	EH	63.8	5.6	n.d.	3.8	0.3	0.7	5.4	79.6	
HPAEC-UV	AH	74.5	6.7	0.3	5.6	0.3	0.3	6.4	94.1	
Spruce KP	EH	63.8	5.0	0.3	4.6	n.d.	0.4	5.4	79.5	
Borate-HPAEC	AH	77.3	6.3	n.d.	6.1	n.d.	n.d.	6.4	96.1	
Spruce BKP	EH	73.6	6.0	n.d.	4.5	n.d.	0.6	5.8	90.5	
HPAEC-UV	AH	78.0	8.0	0.1	5.0	0.2	n.d.	0.7	92.0	
Spruce BKP	EH	74.8	6.7	0.3	5.3	n.d.	n.d.	5.8	92.9	
Borate-HPAEC	AH	80.7	7.2	0.5	5.7	n.d.	n.d.	0.7	94.8	
Beech KP	EH	60.1	20.7	n.d.	0.5	1.0	0.9	3.0	86.2	
HPAEC-UV	AH	65.6	20.2	n.d.	0.4	1.1	0.4	2.4	90.1	
Beech KP	EH	62.6	18.4	n.d.	0.3	n.d.	0.8	3.0	85.1	
Borate-HPAEC	AH	65.8	20.8	0.1	0.4	n.d.	n.d.	2.4	89.5	
Beech BSP	EH	73.8	8.7	n.d.	1.0	n.d.	0.6	7.2	91.3	
HPAEC-UV	AH	80.4	8.4	0.2	1.3	0.3	n.d.	0.7	91.3	
Beech BSP	EH	74.9	9.1	n.d.	1.4	n.d.	0.6	7.2	93.2	
Borate-HPAEC	AH	82.3	9.5	n.d.	1.6	n.d.	n.d.	0.7	94.1	

^aEH, Enzymatic hydrolysis; AH, acid hydrolysis; KP, unbleached kraft pulp; BKP, bleached kraft pulp; BSP, bleached sulfite pulp; n.d., not determined. Resid. is the hydrolysis residue. The yields are based on dry material.

pulps. This observation is different from that of Dahlman et al. (2000), probably because of differences between the enzyme mixtures. Both bleached pulps show significantly more AH residues after enzymatic pretreatment, but this observation does not apply to unbleached pulps. This is partly due to the fragmentary enzymatic breakdown of the polysaccharides. The presence of xylan can additionally hinder the enzymatic hydrolysis of pulps by forming crystallite structures with cellulose (Dammstrom et al. 2009; Penttilä et al. 2013), which is not only affected by the amount of hemicelluloses but also by the steric orientation of their polymer chains to each other.

The monosaccharide yields are in the same range, but altogether the results obtained by borate-HPAEC are slightly higher. The sum of all total carbohydrate contents and the hydrolysis residues are in the range of 80%–95%. With the exception of KP_{spruce}, the cumulative amounts of AH yields are maximal about 5% higher than those of EH. This observation is surprising, because in case of an incomplete cleavage, the missing carbohydrates should be among the hydrolysis residues. The interpretation is that a large amount of carbohydrates within the dissolved polymeric structures are small enough to pass the sinter glass frits (pore size: 10–16 µm) used for filtration of the hydrolysis residue.

Therefore, dynamic light scattering (DLS) experiments were performed for the characterization of oligomeric and polymeric fragments in the hydrolysates (Figure 2). In the AH hydrolysates, no particles could be observed in the

diameter range of 0.001 µm–6.000 µm. But in case of EH, particles with varying sizes are seen in three of the enzymatically treated samples. These particles might be due to unhydrolyzed xylan-lignin and xylan-cellulose complexes (Dammstrom et al. 2009; Hendriks and Zeeman 2009). KP hydrolysates contained particles with average sizes between 0.1 µm and 3 µm. These pulps also have significantly lower overall recovery rates compared to the BKP samples (Table 3). This might be explained by the circumstance that certain carbohydrate containing particles could not be analyzed by the HPAEC techniques applied. Particles with an average size >1 µm were detected in SP_{beech}, while the hydrolysate BKP_{spruce} does not contain any particles. Accordingly, DLS revealed that EH of pulps is not quantitative and unhydrolyzed particles may elude HPAEC quantification.

It can be safely concluded that EH is not appropriate for more complex matrices such as biomass, though it conserves the labile compound mGlcA in pulps. Thus, the wood and other lignocellulosics in the following section were analyzed only by AH with subsequent HPAEC-UV detection.

Determination of carbohydrates in biomass

Figure 3 shows exemplarily the AH analysis by HPAEC-UV. As visible, a big variety of monosaccharides and one short oligosaccharide are present. With retention

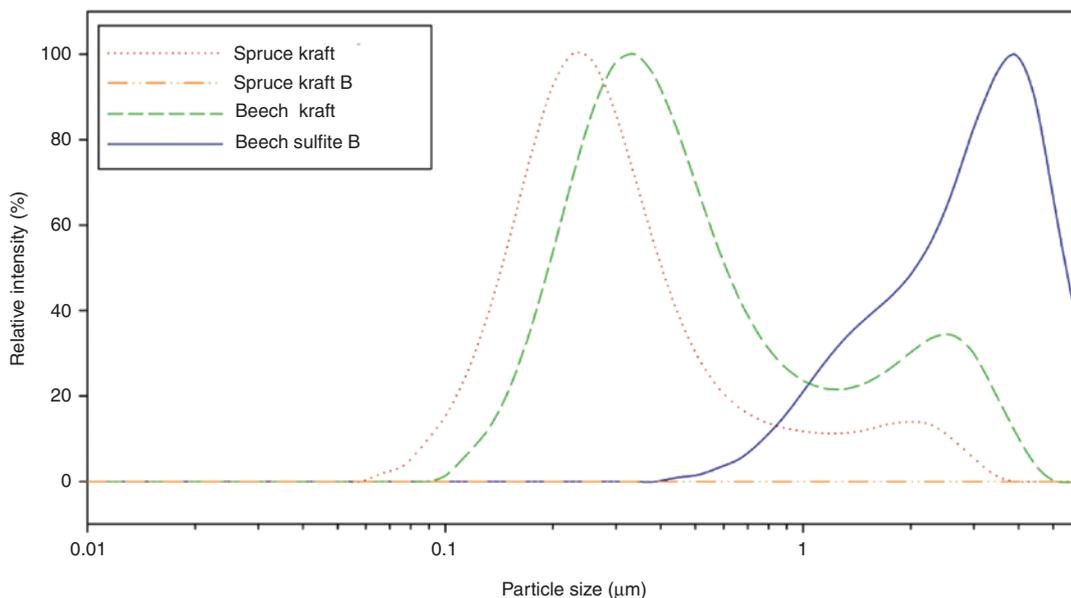


Figure 2: Normalized distribution of the particle size, as determined in the filtrates of enzymatic hydrolysis of pulps via dynamic light scattering (DLS).

The suffix B indicates bleached pulps. If not labeled, the pulps are unbleached.

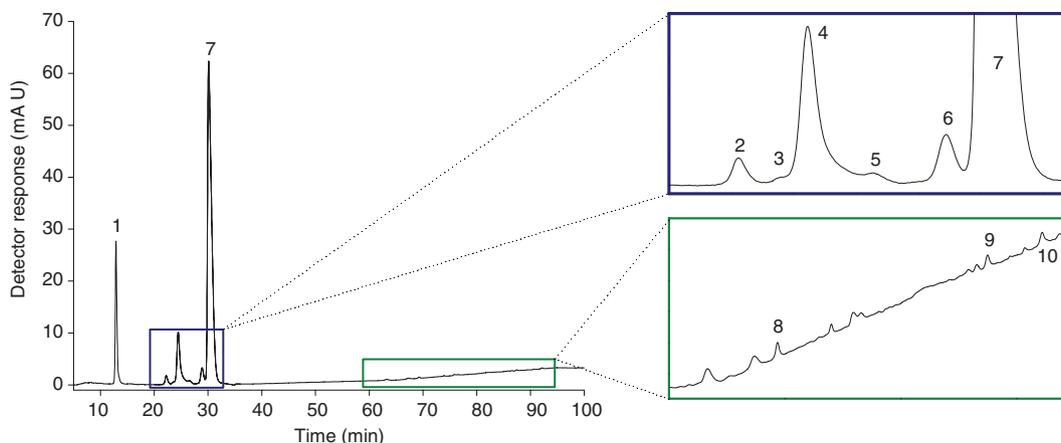


Figure 3: Chromatographic separation of reductively aminated carbohydrates in hydrolyzed *Picea abies* (spruce). The following peaks have been assigned: (1) 4-aminobenzoic acid (internal standard), (2) xylose, (3) galactose, (4) glucose, (5) arabinose, (6) mannose, (7) 2-aminobenzoic acid (derivatization agent), (8) meGlcA-xylose, (9) meGlcA, (10) galacturonic acid.

times (RTs) between 20 min and 30 min, the neutral monosaccharides xylose, galactose, glucose, arabinose and mannose are detectable. Galactose and glucose are not baseline separated, which could detract from the accuracy of the galactose quantification. Acidic carbohydrates eluted with significantly longer RTs (60 min to 95 min). In this range, the dimer of meGlcA and one xylose unit (meGlcA-X) and the uronic acids meGlcA and galacturonic acid are detected. Neutral oligosaccharides as well as acidic oligosaccharides with higher degrees of polymerization (DPs) and non-methylated GlcA were absent in all the samples. The acidic oligosaccharide was detected at lower RTs than the acidic monosaccharides. The affinity of anionic compounds for the resin in the column could explain this finding. With increasing chain lengths, the overall ionic character, introduced by the 2-AA tag, decreased and accordingly, the corresponding compound eluted earlier in the chromatogram. Furthermore, several peaks were detected between 60 min and 70 min, which could not be assigned to particular structures. These signals may be observable due to further acidic oligosaccharides from pectins or from uronic acid containing polysaccharides. The HPAEC-UV detectable polysaccharides are compiled together with literature data in Table 4.

With the exception of poplar wood, the amounts of monomeric and dimeric meGlcA are in a ratio around 1:1. The monomeric glucose is the most abundant hydrolysis product followed by xylose. Only spruce wood hydrolysate contains more mannose than xylose. Mannose is originated from glucomannans, which is a typical marker for softwoods. While bagasse contains only traces of mannose (0.4%), this compound was not detected in wheat straw.

The determined amounts of mannose in the remaining samples were between 1% and 3%. Bagasse and wheat straw contain the highest amounts of arabinose due to the high amounts of arabinoxylan in these feedstocks. In all wood samples, the amounts of arabinose were around 2%; only *Populus alba* contained more of this pentose sugar (3.2%). Low contents of galactose were quantified in alder as well as in poplar wood; in bagasse, the galactose content was below the detection limit. Relatively constant amounts of galactose between 1.2% and 1.6% are seen in the other lignocellulosic materials. The pectin typical galacturonic acid is detectable in all samples with yields below 1%. In spruce, this compound amounted to 0.8%. The cumulative analysis resulted to total yields around 90%, accordingly, a representative moiety the biomass could be characterized by.

The comparison with literature data, as presented in Table 3, is difficult because of the differences in raw materials and the analytical methods. The habitat of the original plant and its development stage and tissue type also influence the results (Ebringerova 2006). The comparison in Table 3 shows that the sum of meGlcA is higher compared to all reference values. The monomeric yields from oak and poplar are lower than those from the literature, probably because of the quantification of the uronic acids meGlcA, GalA and GlcA and due to different species compared. The galacturonic acid data are not in a systematic relation to each other. The wheat straw and spruce data are in good accordance with the literature, but bagasse, eucalyptus and beech have lower yields than those of the literature. The literature also reported on the presence of non-methylated glucuronic acid, which was not detectable in any of the analyzed materials.

Table 4: Monosaccharide compositions as detected by HPAEC-UV in comparison with literature data designated in the upper case indices d–h.

Biomass	Quantitative yields of the products in the hydrolysates (wt%)										
	Glc	Xyl ^a	Ara	Man	Gal	meGlcA monom.	meGlcA-X dimer ^b	GalA	Σ Uronic acids	Residue	Sum total
Bagasse	40.3	28.8	3.9	0.4	n.d.	0.5	0.5	0.3	1.3	17.9	92.3
Bagasse ^d	43.1	23.8	1.5	0.3	0.4		0.8	1.2	2.0	23.2	94.3
Wheat straw	35.6	25.1	4.6	n.d.	1.2	0.6	0.6	0.6	1.8	18.9	87.3
Wheat straw ^e	6.2 ^c	24.4	3.4	0.3	1.1		0.9	0.6	1.5	n.d.	36.9 ^c
<i>Picea abies</i>	41.3	9.4	2.3	10.7	1.2	0.7	0.9	0.8	2.4	25.2	92.2
<i>Picea abies</i> ^f	39.8	4.9	1.1	10.1	2.8		n.d.	0.6	0.6	29.8	89.1
<i>Eucalyptus globulus</i>	42.6	19.4	1.6	0.8	1.3	1.1	1.2	0.5	2.8	18.0	87.6
<i>Eucalyptus grandis</i> ^d	46.7	11.5	0.5	1.0	1.2		1.6	1.2	2.8	29.2	92.9
<i>Fagus sylvatica</i>	38.8	20.1	1.8	0.9	1.6	1.0	0.9	0.6	2.5	19.1	86.4
<i>Fagus sylvatica</i> ^f	37.3	16.5	0.8	1.5	2.2		n.d.	1.1	1.1	24.2	83.6
<i>Quercus alba</i>	31.9	20.0	1.8	1.4	1.2	0.8	0.9	0.4	2.1	28.3	86.7
<i>Quercus falcata</i> ^g	41.0	19.0	0.4	2.0	0.9				4.5	24.0	91.8
<i>Alnus glutinosa</i> ^h	36.9	19.7	1.8	1.3	0.5	0.7	0.9	0.4	2.0	27.1	89.3
<i>Populus alba</i>	46.2	19.4	3.2	2.8	0.6	0.6	1.0	0.4	2.0	19.3	93.4
<i>Populus deltoides</i> ^g	47.0	15.0	0.6	2.9	1.4				4.8	24.0	95.7

^aTotal xylose concentration, $c = c_{\text{monomer}} + c_{\text{xylose in meGlcA-X}}$; ^bconcentration of meGlcA linked in the meGlcA-X dimer; ^cGlc concentration does not represent the total amount of cellulose; n.d., not determined. Comments to literature data d to h:

^dAlves et al. (2010), HPLC-RID. Concentrations of uronic acids were quantified with methanolysis and GC. The amount of GalA represents the total concentration of GalA and GlcA.

^eWillför et al. (2009), by methanolysis and GC.

^fAltaner and Saake (2016), by ¹H-NMR spectroscopy. Concentrations were quantified as monomers, thus the results indicated in this table are adapted and calculated as homopolymers.

^gPettersen (1984), uronic acids were not specified in detail.

^hNo data available in the literature.

The determined glucose yields are very similar to literature values. The only significant discrepancy was seen in case of wheat straw with 35.6 mg Glc compared to 6.2 mg per 100 mg reported in the literature. Literature data are frequently determined via methanolysis and GC, a method, better suited for hemicelluloses analysis and less appropriate for cellulose characterization. The amounts of xylose in the present work are higher than those from the literature. All concentrations of arabinose were higher compared to literature data and no systematic differences concerning mannose and galactose yields are visible.

Conclusions

Reductive amination after two-stage acid hydrolysis and analysis by HPAEC-UV allows the detection of monomeric and dimeric meGlcA. To test the analytical power of this new approach, softwood and hardwood kraft pulps, which were also bleached and a sulphite pulp were analyzed via enzymatic and acid hydrolysis, while the traditional borate-HPAEC technique served for comparison.

After acid hydrolysis, lower amounts of monomeric meGlcA were monitored compared to enzymatic cleavage, due to secondary degradation reactions in the acidic medium. But the yields of the other carbohydrates are higher after acid hydrolysis because of the incomplete enzymatic hydrolysis. As proved by dynamic-light scattering measurements, enzymatic hydrolysis releases small particles into the hydrolysate with sizes between 0.2 μm and 3 μm. Enzymatic hydrolysis is well suited for the determination of uronic acids. However, further improvements of the enzymatic cleavage protocols are needed for pulp analysis. Definitely, the performance of enzymatic hydrolysis in case of more complex biomasses than pulps is not satisfactory. This is the reason why six softwoods and hardwoods and wheat straw and bagasse were analyzed by acid hydrolysis followed by reductive amination of the hydrolysis products with subsequent HPAEC-UV analysis. The determined amounts of all neutral carbohydrates are in good accordance with literature data. In contrast to pulps, a disaccharide of meGlcA and xylose was detected in hydrolyzed biomass. This resulted in significantly higher amounts of meGlcA, referred to the literature data.

Acknowledgments: The authors would like to thank the woodWisdom-EraNet (Aerowood project), the German funding agency “Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe” (FNR, ref. no. 2202214), and the federal ministry “Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft” (BMEL) for financial support.

References

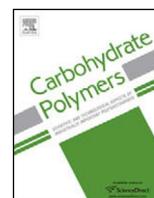
- Alekhina, M., Mikkonen, K.S., Alén, R., Tenkanen, M., Sixta, H. (2014) Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films. *Carbohydr. Polym.* 100:89–96.
- Altaner, C.M., Saake, B. (2016) Quantification of the chemical composition of lignocellulose by solution ¹H NMR spectroscopy of acid hydrolysates. *Cellulose* 23:1003–1010.
- Alves, E.F., Bose, S.K., Francis, R.C., Colodette, J.L., Iakovlev, M., Van Heiningen, A. (2010) Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. *Carbohydr. Polym.* 82:1097–1101.
- Anders, N., Humann, H., Langhans, B., Spiess, A.C. (2015) Simultaneous determination of acid-soluble biomass-derived compounds using high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. *Anal. Methods-UK* 7:7866–7873.
- Anumula, K.R. (2014) Single tag for total carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.* 457:31–37.
- Bertaud, F., Sundberg, A., Holmbom, B. (2002) Evaluation of acid methanolysis for analysis of wood hemicelluloses and pectins. *Carbohydr. Polym.* 48:319–324.
- Borch, R.F., Bernstein, M.D., Durst, H.D. (1971) Cyanohydrinoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* 93:2897–2904.
- Dahlman, O., Jacobs, A., Liljenberg, A., Olsson, A.I. (2000) Analysis of carbohydrates in wood and pulps employing enzymatic hydrolysis and subsequent capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 891:157–174.
- Dammstrom, S., Salmen, L., Gatenholm, P. (2009) On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. *BioResources* 4:3–14.
- Ebringerová, A. (2006) Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol. Sy.* 232:1–12.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T. (2005) Hemicellulose. In: *Polysaccharides I*. 1-67. Ed. Heinze, T. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005.
- Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C., Murali, N. (2006) Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energ. Fuel.* 20:1727–1737.
- Gullón, P., González-Muñoz, M.J., Gool, M.P.V., Schols, H.A., Hirsch, J., Ebringerová, A., Parajó, J.C. (2011) Structural features and properties of soluble products derived from Eucalyptus globulus hemicelluloses. *Food Chem.* 127:1798–1807.
- Han, S.Y., Park, C.-W., Kim, N.-H., Lee, S.-H. (2017) Co-solvent system of [EMIM]Ac and DMF to improve the enzymatic saccharification of pussy willow (*Salix gracilistyla* Miq.). *Holzforchung* 71:43–50.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 100:10–18.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43:195–203.
- Kleen, M., Pranovich, A., Willför, S. (2016) Statistical modeling of pressurized hot-water batch extraction (PHWE) to produce hemicelluloses with desired properties. *Holzforchung* 70:633–640.
- Liebner, F., Dunareanu, R., Opietnik, M., Haimer, E., Wendland, M., Werner, C., Maitz, M., Seib, P., Neouze, M.A., Potthast, A., Rosenau, T. (2012) Shaped hemocompatible aerogels from cellulose phosphates: preparation and properties. *Holzforchung* 66:317–321.
- Lloyd, J., Murton, K. (2016) Preparation of prehydrolysis-TMPs with different severity factors and analysis of the pulps and byproducts. *Holzforchung* 70:1003–1013.
- Lorenz, D., Erasmý, N., Akil, Y., Saake, B. (2016) A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydr. Polym.* 140:181–187.
- Manns, D., Deutschle, A.L., Saake, B., Meyer, A.S. (2014) Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (Laminariaceae). *RSC Adv.* 4:25736–25746.
- Nebreda, A.P., Grénman, H., Mäki-Arvela, P., Eränen, K., Hemming, J., Willför, S., Murzin, D.Y., Salmi, T. (2016) Acid hydrolysis of O-acetyl-galactoglucomannan in a continuous tube reactor: a new approach to sugar monomer production. *Holzforchung* 70:187–194.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.* 74:25–33.
- Park, S.J., Um Byung, H. (2015) Optimization study on acid hydrolysis of hardwood-derived hemicellulosic extract for alcohol fermentation using response surface methodology. *Holzforchung* 69:135–141.
- Penttilä, P.A., Várnai, A., Pere, J., Tammelin, T., Salmén, L., Siika-aho, M., Viikari, L., Serimaa, R. (2013) Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose. *Bioresource Technol.* 129:135–141.
- Pettersen, R.C. (1984) The chemical composition of wood. In: *The Chemistry of Solid Wood*. Ed. Rowell, R. American Chemical Society, Washington. pp. 57–126.
- Pilath, H.M., Nimlos, M.R., Mittal, A., Himmel, M.E., Johnson, D.K. (2010) Glucose reversion reaction kinetics. *J. Agr. Food Chem.* 58:6131–6140.
- Reyes, P., Ferraz, A., Pereira, M., Rodríguez, J., Mendonça, R.T. (2015) Chemithermomechanical and kraft pulping of *Pinus radiata* wood chips after the hydrothermal extraction of hemicelluloses. *Holzforchung* 69:33–40.
- Rivas, S., Vila, C., Santos, V., Parajó, J.C. (2016) Furfural production from birch hemicelluloses by two-step processing: a potential technology for biorefineries. *Holzforchung* 70:901–910.
- Roselli, A., Asikainen, S., Stepan, A., Monshizadeh, A., von Weymarn, N., Kovasin, K., Wang, Y., Xiong, H., Turunen, O., Hummel, M., Sixta, H. (2016) Comparison of pulp species in IONCELL-P: selective hemicellulose extraction method with ionic liquids. *Holzforchung* 70:291–296.
- Saeman, J.F., Moore, W.E., Mitchell, R.L., Millett, M.A. (1954) Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi* 37:336–343.

- Schütt, F., Haas Nils, P., Dehne, L., Koch, G., Janzon, R., Saake, B. (2013) Steam pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar wood: comparison of optimal conditions with and without SO₂ impregnation. *Holzforschung* 67:9–17.
- TAPPI (1999) T 236 om-99. Kappa number of pulp. <https://research.cnr.ncsu.edu/wpsanalytical/documents/T236.PDF>: TAPPI.
- Unterieser, I., Mischnick, P. (2011) Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry. *Carbohyd. Res.* 346:68–75.
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H., Hemming, J., Holmbom, B. (2009) Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Ind. Crop. Prod.* 29:571–580.
- Zhao, H.B., Yuan, L., Fu, Z.B., Wang, C.Y., Yang, X., Zhu, J.Y., Qu, J., Chen, H.B., Schiraldi, D.A. (2016) Biomass-based mechanically strong and electrically conductive polymer aerogels and their application for supercapacitors. *ACS Appl. Mater. Inter.* 8:9917–9924.
- Zhou, H., Zhu, J.Y., Gleisner, R., Qiu, X., Horn, E., Negrón, J. (2016) Pilot-scale demonstration of SPORL for bioconversion of lodgepole pine to bioethanol and lignosulfonate. *Holzforschung* 70:21–30.

**Quantitative investigations of xylose and arabinose
substituents in hydroxypropylated and
hydroxyvinylethylated arabinoxylans**

Dominic Lorenz, Anna Knöpfle, Youssef Akil, Bodo Saake

Carbohydrate Polymers, 2017, 175, 671-678



Research paper

Quantitative investigations of xylose and arabinose substituents in hydroxypropylated and hydroxyvinylethylated arabinoxylans



Dominic Lorenz, Anna Knöpfle, Youssef Akil, Bodo Saake*

Department of Wood Science, University of Hamburg, Leuschnerstr. 91 b, 21031 Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2017

Received in revised form 7 August 2017

Accepted 8 August 2017

Available online 13 August 2017

Chemical compounds studied in this article:

2-aminobenzoic acid (PubChem CID: 227)

2-Picolineborane (PubChem CID:

11320914)

Trifluoroacetic acid (PubChem CID: 6422)

Propylene carbonate (PubChem CID: 7924)

4-Vinyl-1,3-dioxolan-2-one (PubChem CID: 2735038)

Keywords:

Arabinoxylan

Hydroxyalkylation

Cyclic carbonate

Microwave-assisted hydrolysis

Reductive amination

Substitution pattern

ABSTRACT

The chemical structures obtained by the modification of arabinoxylans with the cyclic carbonates propylene carbonate (PC) and 4-vinyl-1,3-dioxolan-2-one (VEC) with varying degrees of substitution were investigated. Therefore, a new analytical method was developed that is based on a microwave-assisted hydrolysis of the polysaccharides with trifluoroacetic acid and the reductive amination with 2-aminobenzoic acid. The peak assignment was achieved by HPLC–MS and the carbohydrate derivatives were quantified by HPLC–fluorescence. The obtained maximum molar substitution of PC-derivatized xylan (X_{HP}) was 1.8; the molar substitution of VEC-derivatized xylan (X_{HVE}) was 2.3. Investigations of xylose and arabinose based mono- and disubstituted derivatives revealed a preferred reaction of the cyclic carbonates with arabinose. Conversion rates were up to 2.4 times higher for monosubstitution and up to 3.0 times for disubstitution compared to xylose. Furthermore, the reaction with VEC was preferred due to higher reactivity of the newly introduced side chains.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polysaccharides are of interest for new technologies based on renewable materials. Since many of these applications are focused on the production of cellulose and starch based products, these technologies often provide a great potential for the isolation of hemicelluloses as byproducts (Alvira, Tomás-Pejó, Ballesteros, & Negro, 2010; Abdul Khalil, Bhat, & Ireana Yusra, 2012; Klímek, Wimmer, Kumar Mishra, & Kúdela, 2017; Raghavan & Emekalam, 2001; Weber, Hugaard, Festersen, & Bertelsen, 2002). In grains like oat and wheat, the predominant fractions of hemicelluloses are arabinoxylans. These biopolymers are characterized by a β -(1 → 4)

linked xylopyranosyl backbone which is partly branched with arabinofuranosyl units via α -(1 → 3) and α -(1 → 2) glycosidic linkages (Izydorczyk & Biliaderis, 1995). To gain new chemical properties of these feedstocks, functionalization of the arabinoxylans is an appropriate method and therefore the fundament for a big variety of possible applications such as films and aerogels (Mikkonen & Tenkanen, 2012; Mikkonen, Parikka, Ghafar, & Tenkanen, 2013; Parikka et al., 2017). A frequently used type of modification is the hydroxyalkylation with epoxides (Laine et al., 2013; Mikkonen et al., 2015) or as recently published with cyclic carbonates as propylene carbonate (PC) and 4-vinyl-1,3-dioxolan-2-one (VEC) (Akil, Lehnen, & Saake, 2016; Akil, Lorenz, Lehnen, & Saake, 2016). These cyclic carbonates are of increasing interest since they can be synthesized out of renewable resources. The simplified reaction pathways of hydroxyalkylation with cyclic carbonates are summarized in Fig. 1.

Since the arabinose substituents are in an exposed position in the arabinoxylans, these monomer units are highly accessible for chemical reactions. Accordingly, its analytical consideration is desirable for the characterization of the end products. The hydroxyl group derivatization of xylose (2 available OH-groups) and ara-

Abbreviations: 2-AA, 2-aminobenzoic acid; PC, propylene carbonate; VEC, vinyl ethylene carbonate, 4-vinyl-1,3-dioxolan-2-one; DS, degree of substitution; X_{HP} , hydroxypropylated xylan; X_{HVE} , hydroxyvinylethylated xylan; TFA, trifluoroacetic acid.

* Corresponding author.

E-mail addresses: dominic.lorenz@uni-hamburg.de (D. Lorenz), anna.knoepfle@uni-hamburg.de (A. Knöpfle), youssef.akil@uni-hamburg.de (Y. Akil), bodo.saake@uni-hamburg.de (B. Saake).

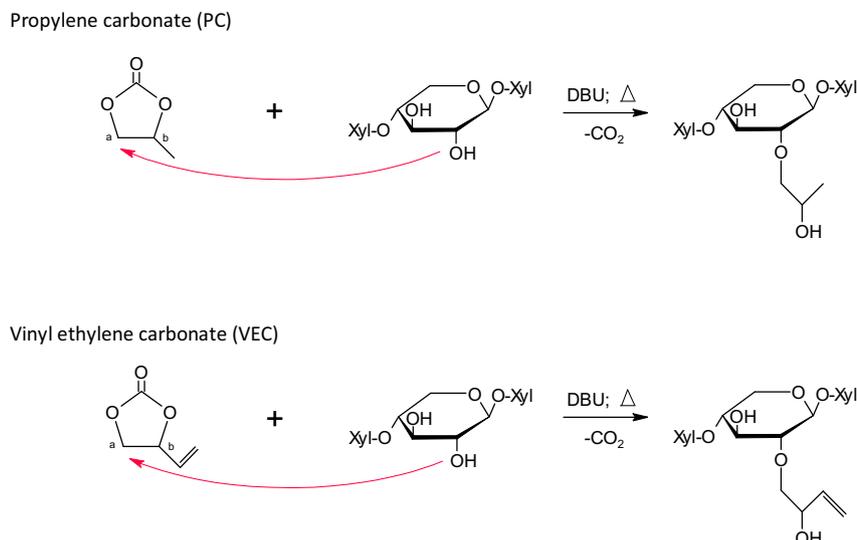


Fig. 1. General reaction schemes for the hydroxyalkylation of xylans with propylene carbonate (PC) and vinyl ethylene carbonate (VEC).

binose (3 available OH-groups) yields a high amount of different carbohydrate structures with plenty of isomers. In addition, the derivatization with the cyclic carbonates PC and VEC results the formation of products with a new hydroxyl group, accessible for a further carbonate. Accordingly, an elongation along the introduced side chain increases the number of possible pentose structures (Akil, Lehnen et al., 2016; Akil, Lorenz et al., 2016). An adequate option for the investigation of hydroxyalkylated xylans is the application of NMR-based methods. NMR spectroscopy is appropriate for the determination of characteristic values as the degree of substitution and the molar substitution (Akil, Lehnen et al., 2016; Akil, Lorenz et al., 2016; Laine et al., 2013). However, based on the lower sensitivity compared to chromatographic procedures, compounds with relatively small concentrations cannot be displayed in a proper way and thus the view on these complex polysaccharides can be limited.

A new analytical approach for the characterization of hydroxyalkylated xylans is the hydrolysis of the polysaccharides followed by reductive amination and chromatographic separation. The hydrolysis of the derivatized xylans can be achieved with trifluoroacetic acid (TFA). Depending on the hydrolysis conditions, the total cleavage lasts between 1 h and 6 h (Ducatti, Colodi, Gonçalves, Duarte, & Noseda, 2011; Liu, Kisonen, Willför, Xu, & Vilaplana, 2016; Zhao & Monteiro, 2008). An improvement of this procedure is the microwave assisted hydrolysis with clearly reduced reaction times. Furthermore, chemical conversions in microwaves are known for less side reactions, caused by the short exposure to heat and the direct heating (Kappe, 2004; Zhao & Monteiro, 2008). Due to the weak acidic character of carbohydrates, an efficient ionization in mass spectrometric methods is hard to realize (Harvey, 2011; Reinhold, Reinhold, & Costello, 1995). Thus, the selective and sensitive detection of the chemically modified carbohydrates by MS is hindered. Furthermore, the quantification of the obtained compounds is difficult, since responses by many usual detection methods are unique for each compound and no pure standards are available for calibration. In order to overcome these challenges, the labeling of carbohydrates by reductive amination is an appropriate method for sample preparation (Harvey, 2011). Thereby, the derivatization of the carbohydrate residues with 2-aminobenzoic acid (2-AA) and reduction with the non-toxic 2-picoline borane complex is a suitable reaction (Mischnick et al., 2013; Unterrieser & Mischnick, 2011) and was currently applied for the analysis and characterization of isolated xylans as well as more complex pulp

and biomass samples (Lorenz, Erasmy, Akil, & Saake, 2016; Lorenz, Janzon, & Saake, 2017). This introduced tag significantly improves the ionization behavior of carbohydrates which enables the peak identification after chromatography by mass spectrometry. Furthermore, the 2-AA label provides fluorescence activity and can thus be analyzed by selective and sensitive fluorescence detection (Anumula, 2006). The quantification of all compounds can be achieved with a synthesized standard, obtained by the reductive amination of xylose. This is possible due to the xylose conversion rate with 2-AA of $96 \pm 2\%$ (Lorenz et al., 2016).

In this work, the structure of chemically derivatized xylans, modified with PC and VEC was investigated. Therefore, the tools of microwave assisted TFA hydrolysis, labeling of carbohydrate residues by reductive amination, chromatographic separation on reversed-phase columns as well as fluorescence and mass spectrometric detection were applied. Special attention was paid to the method development, the quantitative analysis of pentose derivatives, and the differentiation of modified xylose and arabinose units. The obtained results will give novel insights into the reaction of hydroxyalkylation and hydroxyvinylethylation with cyclic carbonates and the chemical structures of the obtained products.

2. Material and methods

2.1. Sample material

Arabinoxylan was extracted from sheared oat spelt with 5% NaOH at 90 °C for 90 min. The obtained suspension was filtered and the xylan precipitated by a mixture of MeOH/water (60/40 wt%/wt%). The dried material was used as feedstock for the subsequent hydroxyalkylation. The carbohydrate composition, determined by borate-HPAEC after 1-stage acid hydrolysis (Lorenz et al., 2016), resulted in the relative amounts: xylose – 83.0%, arabinose – 11.8%, glucose – 2.8%, galactose – 2.4%, mannose – 0.0%. The differentiation of xylose and arabinose related derivatives was realized with an arabinogalactan (abcr GmbH, Karlsruhe, Germany) with the determined relative carbohydrate amounts: xylose – 0.0%, arabinose – 13.1%, glucose – 0.8%, galactose – 85.8%, mannose – 0.3%.

Xylans, modified with two different organic carbonates were used as analytical feedstocks. Hydroxypropylated xylans (X_{HP}) were obtained according to Akil, Lorenz et al. (2016). Therefore, oat spelt xylan was derivatized with propylene carbonate (PC)

Table 1

Investigated samples with the respective DS as well as the reaction temperatures and times. DS's were determined by ^{13}C NMR according to Akil, Lehnen et al. (2016), Akil, Lorenz et al. (2016).

Sample-DS	Reaction temperature [$^{\circ}\text{C}$]	Reaction time [min]
X _{HP} -0.2	140	80
X _{HP} -0.4	140	240
X _{HP} -0.8	160	80
X _{HP} -1.1	160	160
X _{HVE} -0.2	140	80
X _{HVE} -0.6	140	240
X _{HVE} -1.0	160	80
X _{HVE} -1.2	160	160

under different reaction conditions (Table 1). The second set of samples was derivatized with 4-vinyl-1,3-dioxolan-2-one (VEC) in order to introduce the functionalization of a double bond (X_{HVE}) (Akil, Lehnen et al., 2016) (Table 1). Furthermore, an arabinogalactan, that was required for the differentiation of xylose and arabinose related monomers, was derivatized under heterogeneous conditions. Thereby, the polysaccharides were suspended directly in the respective carbonate. This was carried out by mixing 600 mg of arabinogalactan with 6 g of the respective carbonate. 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) was used as alkaline catalyst (33 μl). After a reaction time of 160 min at 140 $^{\circ}\text{C}$, the suspensions were filtered subsequently and the residue washed with acetone (PC) or ethyl acetate (VEC), respectively. The derivatized arabinogalactans were finally washed with diethyl ether and the obtained products were dried in vacuum. The degree of substitution (DS) was determined by ^{13}C NMR spectroscopy according to Akil, Lorenz et al. (2016).

2.2. Microwave-assisted TFA hydrolysis

The chemically modified xylans were hydrolyzed into monomers by a solution of trifluoroacetic acid (TFA) using a microwave oven (MLS T640) with a maximum power of 1200 W. Hydrolysis was carried out in Teflon reaction vials with 50 mg dried sample material that was suspended in 5 ml of TFA solution. All hydrolysates were obtained by heating the samples to 120 $^{\circ}\text{C}$ within 60 s and keeping this temperature for 30 s. Subsequently, the hydrolysates were cooled down to 25 $^{\circ}\text{C}$. The maximum power of the microwave oven was set to 1200 W. However, it was automatically adjusted according to the temperature gradient. In order to determine the optimum concentration of TFA, solutions with the concentrations 0.25 mol/l, 0.50 mol/l, 1.00 mol/l, 2.00 mol/l, and 4.00 mol/l were prepared for the hydrolysis. Investigations of sample swelling were realized by swelling the modified xylans in 4.625 ml water for 0 min, 15 min, 45 min, 75 min, and 105 min and subsequent addition of 0.375 ml TFA before microwave treatment. The optimum conditions for hydrolysis were achieved with six filled reaction vessels. In case a lower amount of sample material was treated, the remaining reactors were filled with 5 ml water in order to produce constant hydrolysis results. The samples were dried after hydrolysis by a rotation evaporator. For the total removal of TFA, 5 ml toluene was added for 2 times and the hydrolysates were dried again. The residues were solved in 10 ml water for further treatment.

2.3. Borate-HPAEC

The investigations of the optimal hydrolysis conditions were realized by determination of the xylose amounts. Therefore, the analysis was realized with the established method of borate-HPAEC (Lorenz et al., 2016). Furthermore, the relative concentrations of

different xylose and arabinose derivatives were related to the initial concentration determined by borate-HPAEC.

2.4. Reductive amination

The hydrolyzed sample materials were reductively aminated according to Lorenz et al. (2016). Therefore, 0.200 ml of the hydrolysates were pipetted to reaction vials and added with 0.200 ml acetic acid as well as 0.500 ml of a methanolic 2-aminobenzoic acid solution ($c = 4 \text{ g/l}$). After 30 min at 40 $^{\circ}\text{C}$, 0.050 ml of a 2-picoline-borane complex containing methanol solution ($c = 40 \text{ mg/ml}$) was added. The reaction time for the reduction step was 45 min at 40 $^{\circ}\text{C}$. The samples were dried with nitrogen, solved in methanol and dried again. The residues were dissolved in 1 ml water for further analysis. For the quantification of all compounds, a standard with a defined xylose concentration was synthesized with the same conditions as described.

2.5. Chromatographic separation

The chromatographic separation of monosaccharides after total hydrolysis and reductive amination was performed on an Agilent HPLC 1200 Series for mass spectrometric detection and on a Jasco HPLC system for fluorescence detection, both with a phenomenex Luna C18 column (particle size 3 μm , $4.6 \times 150 \text{ mm}$). A gradient with two eluents was used for separation: Eluent A: H_2O Millipore, Eluent B: Acetonitrile; both with 0.1% formic acid. The chromatography started with 10% eluent B for 10 min. Within 40 min, the rate of B was raised to 20% and stagnated for further 20 min. Subsequently, B was increased to 30% within 30 min. After further 20 min the rate was increased to 60% within 15 min. These conditions were constant for 10 min. In order to flush the column, the amount of B was adjusted to 100% in 5 min, was kept constant for 10 min and decreased to the starting conditions of 10% B within further 5 min. To prepare the system for the next run, it was conditioned for 15 min with the final eluent composition. The flow rate was set to 0.3 ml/min

2.6. Mass spectrometric detection

Mass spectrograms were recorded with a Agilent 6224 ESI-TOF and the following adjustments: Gas temperature 325 $^{\circ}\text{C}$, drying gas flow 10 l/min, nebulizer gas 15 psig, VCap 400 V, fragmentor voltage 200 V, skimmer 65 V, Oct 1 RF Vpp 750 V, mass range 110–3200 m/z and acquisition rate 1.03 spectra/s.

2.7. Fluorescence detection

The detection of the reductively aminated carbohydrate derivatives after chromatographic separation was performed on a Jasco FP-2020 plus fluorescence detector with the excitation wave length $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ and the emission wave length $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$. The quantification of all compounds was realized with a standard solution of reductively aminated xylose. Therefore, various dilutions were prepared, in order to generate a calibration curve. Considering the water addition during hydrolysis, the molar masses of the respective monomers were reduced by the mass of one water molecule (18.02 g/mol) for all quantifications.

2.8. Statistical verification

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined in order to validate the developed analytical method of LC-fluorescence. Therefore, a procedure according to DIN 32645 (2008) was applied. Solutions of reductively aminated xylose were prepared with the concentrations 0.04, 0.08,

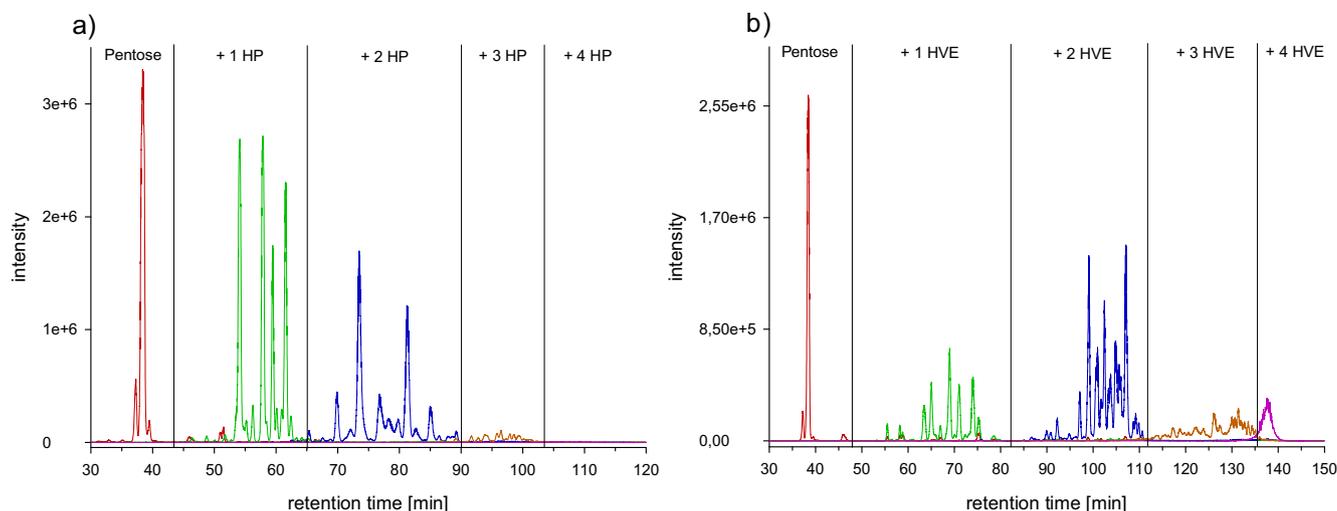


Fig. 2. LC-MS chromatograms of the samples a) $X_{HP-0.8}$ and b) $X_{HVE-1.0}$ with isolated mass traces for reductively aminated pentoses and the respective derivatives with 1, 2, 3, and 4 alkyl units per pentose.

0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.28, 0.32, 0.36, and 0.40 mg/l and analyzed by LC-fluorescence. The used equations for the respective calculations were: $LOD = 3 \cdot SD/s \cdot F_D$ and $LOQ = 10 \cdot SD/s \cdot F_D$ with SD = standard deviation, s = slope of the linear calibration and F_D = dilution factor.

3. Results and discussions

3.1. Optimization of TFA hydrolysis

The method of choice for the cleavage of derivatized xylans was the hydrolysis with TFA. In order to minimize the duration of the acidic treatment, the hydrolysis was carried out in a microwave oven at the temperature of 120 °C for 30 s. The determination of the optimal conditions was achieved by exemplary investigations of the samples $X_{HP-0.4}$ as well as $X_{HVE-0.6}$. In a first step, the optimal concentration of TFA was determined by treatment of the modified xylans with solutions of five different concentrations. The amounts of xylose were quantified by borate-HPAEC and referred to the respective maximum concentration (Appendix A in Supplementary material). Both investigated samples had the highest concentration of xylose after treatment with a 1 M TFA solution. Caused by a structural degradation, a decrease of the determined xylose amount was observed, when the hydrolysis was applied with more concentrated TFA solutions. Accordingly, for all further investigations, HP-xylans and HVE-xylans were hydrolyzed with a 1 M TFA solution. In addition to the optimum TFA-concentration, the effect of swelling prior to hydrolysis was investigated. Therefore, the samples were swollen in water with durations between 0 and 105 min and TFA was added subsequently in order to gain a 1 M solution (Appendix B in Supplementary material). Already 76.7% of the maximum xylose concentration was detected in HP-xylan without swelling. This value increased slightly until 45 min of

swelling to $100.0 \pm 2.3\%$ of xylose. A similar trend was observed for the HVE-xylan, although on a lower level. Without swelling, 16.3% of the total xylose concentration was quantified. The maximum of $100.0 \pm 24.3\%$ was found after 45 min. However, with increasing swelling times, the confidence intervals decreased significantly and were lowest after 105 min of swelling ($97.8 \pm 0.7\%$).

3.2. Chromatographic separation

In order to determine the retention times of the reductively aminated carbohydrate derivatives, samples were analyzed by LC-MS. The isolation of the respective mass traces enabled the presentation of several peak groups, displaying pentose with up to 4 substitutions per carbohydrate unit (Fig. 2).

Both investigated xylans showed a high amount of separated peaks. The determined retention times of the respective mass traces are listed in Table 2. The retention times were strongly affected by the number of substitutions per pentose and therefore also by a decreased polarity. Accordingly, the non-substituted pentoses eluted first, followed by the mono-, di-, tri and tetrasubstituted monomers. In addition, a baseline separation between the different mass traces was observed for both samples. Hydroxyalkylated xylans with elevated DS contained pentose units with up to 6 alkyl chains in detectable amounts. The high amount of alkyl chains was caused by the elongation of the introduced side chains. Furthermore, the chromatograms of the derivatized pentoses show a big variety of isomers that could be separated on the RP-18 column. An acceptable separation was achieved for the isomers of mono- and disubstituted units. Both chromatograms contain a high amount of peaks. This observation can be caused by different reaction pathways during the hydroxyalkylation, resulting in diverse end products. Though, the preferred position of the cyclic

Table 2
Retention times and monoisotopic masses of derivatized, hydrolyzed and reductively aminated xylans. The index n indicates the type of hydroxyalkyl chain. The monoisotopic masses were calculated as protonated in positive ion mode for MS detection.

n	Monoisotopic mass [g/mol]		Retention time [min]	
	HP	HVE	HP	HVE
Pentose	272.1	272.1	38.5	38.5
Pentose + 1 n	330.2	342.2	50.0–65.0	54.0–81.0
Pentose + 2 n	388.2	412.2	65.0–90.0	86.0–111.0
Pentose + 3 n	446.2	482.2	91.0–103.0	112.0–135.2
Pentose + 4 n	504.3	552.3	107.0–112.0	135.2–141.0

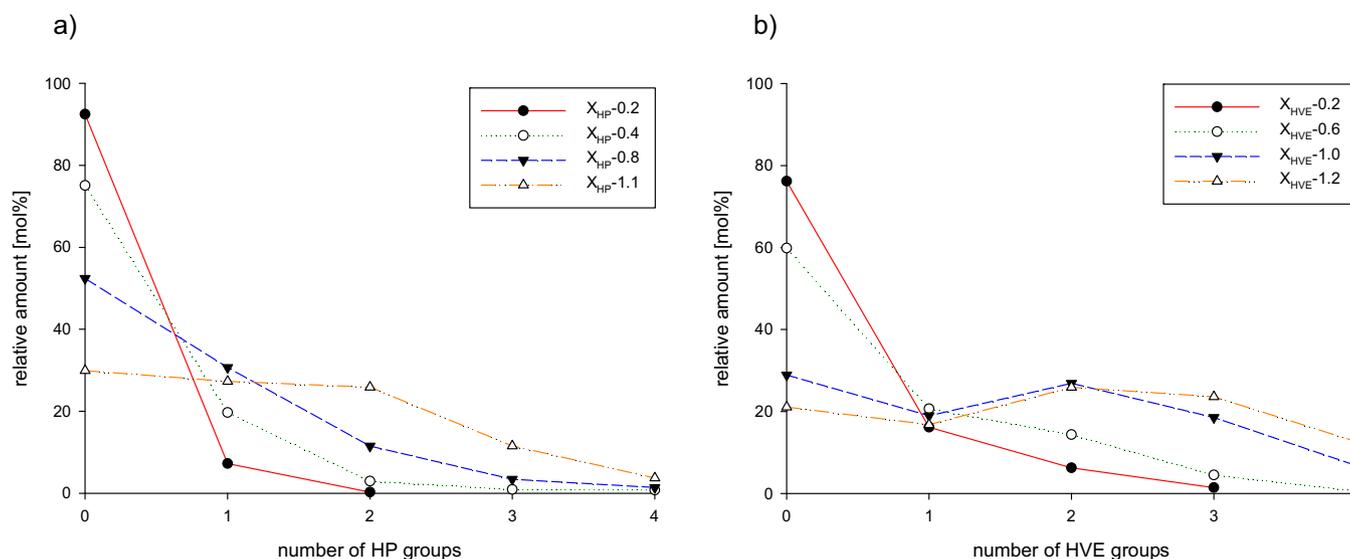


Fig. 3. Pentose substitution patterns of hydrolyzed and reductively aminated a) HP-xylan and b) HVE-xylan. The results are illustrated as molar ratios referred to the respective sums of all quantifiable pentose monomers.

carbonates for the nucleophilic attack is the carbon without the alkyl side chain (a in Fig. 1), a substitution on the neighboring carbon (b in Fig. 1) is also possible (Akil, Lehnen et al., 2016; Akil, Lorenz et al., 2016). The retention times of HVE-xylan hydrolysates are in general higher compared to those of HP-xylan. This can be explained by a decreased polarity and thus higher affinity to the utilized chromatographic column. Investigations by HPLC–MS and HPLC–MS/MS showed no characteristic fragments. The only visible fragment ions were those of the compounds with the reduced mass of OH. Accordingly, a distinct assignment of the peaks to particular compounds was not possible.

3.3. Quantitative pentose investigations

These chromatographic separations were transferred to a LC-system with fluorescence detection in order to quantify peaks with the same molar mass. While this worked out for most derivatized pentoses, difficulties occurred for the quantification of units with 5 or more alkyl chains. The total amounts of these monomers were relatively small and the yields were furthermore divided on a high number of isomers. Therefore, the concentration of each particular compound was below the limit of quantification (LOQ) or even the limit of detection (LOD). Accordingly, the determined values for the LOD (1.59 $\mu\text{mol/l}$) and LOQ (7.77 $\mu\text{mol/l}$) are not meaningful for the quantification of all isomers with the same molar mass. HP-xylans and HVE-xylans, produced with different reaction conditions, were analyzed as described and all pentoses with up to 4 introduced hydroxyalkyl chains were quantified by LC-fluorescence (Fig. 3).

The results show a clear correlation of the DS to the pentose substitution patterns. In HP-xylan, the relative amount of non-substituted pentoses decreased with increasing DS from 92.5 mol% to 29.9 mol%. Contrarily to this observation, the amounts of mono-substituted pentoses increased with increasing DS. Only the sample $X_{\text{HP}}-1.1$ had a lower ratio of monosubstitution compared to $X_{\text{HP}}-0.8$. In return, significantly higher concentrations were determined for the disubstituted pentoses. The samples with a small DS below 0.4 had only small degrees of disubstitution. In general for all samples the relative amounts of pentoses with 3 and 4 HP-groups were small. However, the respective concentrations were elevated for samples with higher DS. In HVE-xylans the amounts of non-substituted pentoses also decreased with increasing DS. Concentrations of monosubstituted pentoses were quite similar

Table 3

Molar substitutions of hydroxyalkylated xylans determined by LC-fluorescence and ^{13}C NMR spectroscopy. DS's were determined by ^{13}C NMR according to Akil, Lehnen et al. (2016), Akil, Lorenz et al. (2016).

Sample-DS	Molar substitutions by LC-fluorescence	Molar substitutions by ^{13}C NMR
$X_{\text{HP}}-0.2$	0.1	0.2 ^a
$X_{\text{HP}}-0.4$	0.5	0.6 ^a
$X_{\text{HP}}-0.8$	1.0	1.3 ^a
$X_{\text{HP}}-1.1$	1.8	1.9 ^a
$X_{\text{HVE}}-0.2$	0.6	0.7 ^b
$X_{\text{HVE}}-0.6$	1.0	1.0 ^b
$X_{\text{HVE}}-1.0$	2.0	1.8 ^b
$X_{\text{HVE}}-1.2$	2.3	2.1 ^b

^a Determined according to Akil, Lorenz et al. (2016).

^b Determined according to Akil, Lehnen et al. (2016).

(16.2–20.7 mol%) and lead to the conclusion that these compounds act as reactive intermediates. This assumption is supported by increased concentrations of pentoses with higher MS values compared to HP-xylan. In addition, the xylans with a DS of 1.0 or bigger had its respective highest relative amounts of pentoses with 2 and 3 HVE side chains.

Based on these results, the molar substitutions of all samples were calculated (Table 3). While the DS gives information about the converted hydroxyl groups of the carbohydrates, the molar substitution is the molar ratio of the average number of substitutions per monomer. Thus, this value includes also these alkyl groups that caused an elongation of the side chains.

In general, the molar substitutions, quantified by LC-fluorescence, are in good accordance to those calculated by NMR spectroscopy. However, it has to be pointed out that the pentose units with an isolated molar substitution higher than 4 could not be included into the LC-fluorescence determinations. This results into an underestimation of these parameters. The calculated molar substitutions implicate a dependence on the degree of substitution. In general, the molar substitutions of HVE-xylans are higher compared to HP-xylans. In combination with the observations of the pentose substitution patterns, conclusions regarding the reaction behavior can be drawn. Compared to HP-xylan, the higher amounts of monomers with molar substitutions of 3 and 4 in hydrolyzed HVE-xylans lead to the conclusion that these polymers are subject of a preferred side chain elongation. This

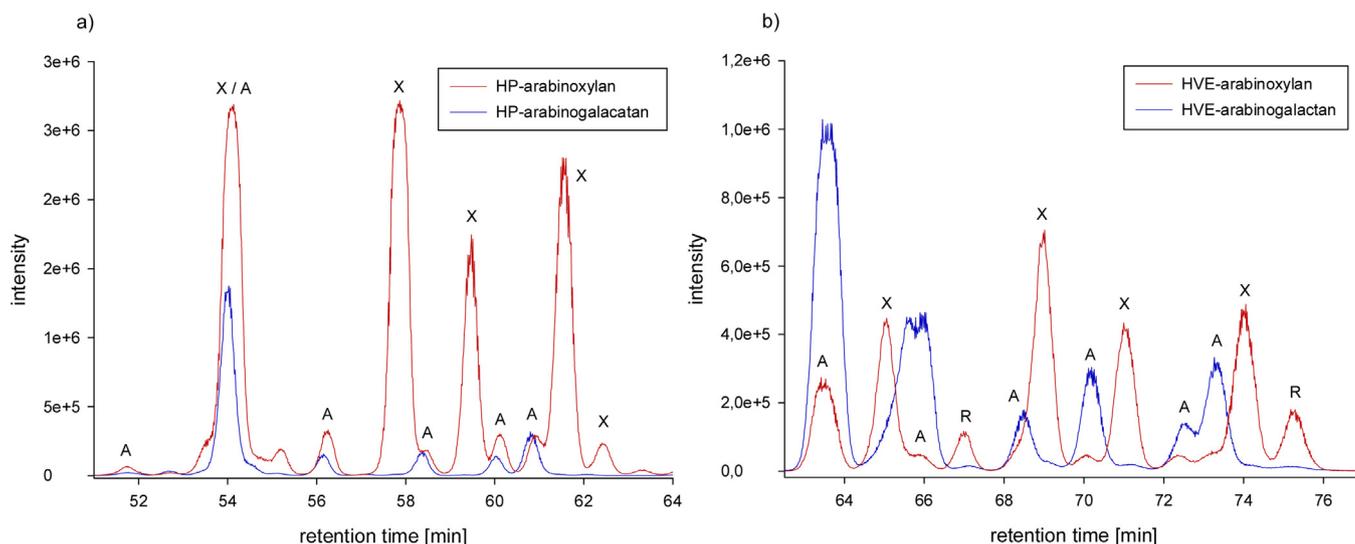


Fig. 4. Chromatograms of monosubstituted xylose (X) and arabinose (A) units obtained by LC–MS of hydroxypropylated (a) and hydroxyvinylethylated (b) arabinoxyylans and arabinogalactans. The peaks at 67.0 and 75.3 min (R) in the HVE-arabinoxyylan were assigned to unhydrolyzed oligosaccharides that were fragmented during mass spectrometry.

observation can be explained by an enhanced reactivity of the HVE side chain, promoted by an intense electron donating effect (+I) of the vinyl group. Thus, the nucleophilic character of the hydroxyl group is higher compared to the HP side chain and the tendency for nucleophilic reactions with VEC is increased.

3.4. Differentiation between xylose and arabinose monomers

The differentiation between monomer derivatives based on xylose and arabinose is essential for the comprehension of the end product structure and thus also for the product properties (Fig. 4).

For this purpose, an arabinogalactan without xylose was derivatized with PC as well as VEC and the samples were hydrolyzed and reductively aminated analogously to the modified arabinoxyylans. All samples were analyzed by LC–MS and the respective pentose based mass traces were compared to each other. Since the investigated arabinogalactans contained no xylose, the peaks visible in both chromatograms were assigned to arabinose structures. Accordingly, all remaining peaks in the arabinoxyylan

chromatograms were caused by monosubstituted xylose. The carbohydrate residues of HP-xyylan were separated acceptably with exception of the peak at 54.0 min. By analysis of a HP-xyylan without arabinose (data not shown) the coelution of a HP-xylose and a HP-arabinose was revealed. For quantification, this peak was assigned to a xylose related structure, due to an expectable higher concentration. However, this affects the quantification and causes a slight underestimation of monosubstituted arabinose units. No coelution was observed in hydrolyzed and reductively aminated HVE-xyylans. However, the chromatograms revealed the presence of oligosaccharides due to incomplete cleavage of the polymers. Since the intensities in the respective LC-fluorescence chromatograms were low, these compounds can be neglected for the quantitative analysis. The differentiation between xylose and arabinose can be applied for mono- and disubstituted pentoses. However, the isomers of the monosaccharide residues with higher isolated values for molar substitution than 2 cannot be separated by the applied chromatography in a proper way. This is caused by a significant increase of the compound number, the low concentration as well as the coelution of many isomers. Nevertheless, the mono- and disubstituted ara-

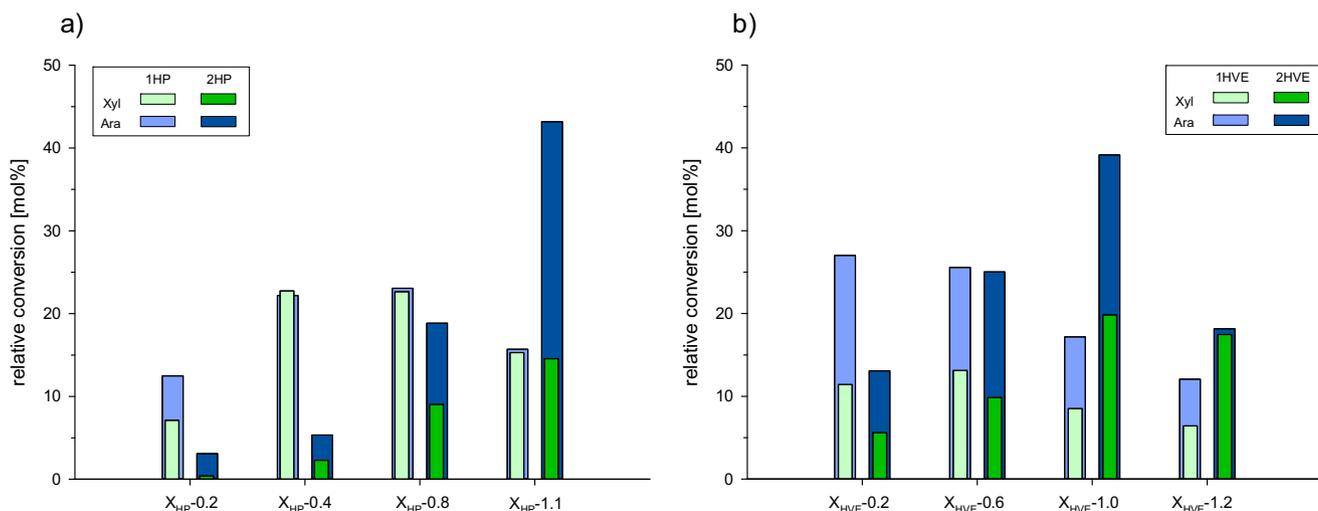


Fig. 5. Comparison of the relative conversions between xylose and arabinose. The determined concentrations were referred to the initial amount of the respective pentose in the native xyylan.

binose and xylose compounds were quantified by LC-fluorescence (Fig. 5).

The amount of monosubstituted xylose in HP-xylan rose from 7.1 mol% (DS=0.2) to 22.8 mol% (DS=0.4) and decreased subsequently to 15.3 mol% (DS=1.1). This reduction in the high DS-samples was observed for the benefit of disubstitution. The amount of xylose units with 2 HP-chains increased significantly from 0.4 mol% (DS=0.2) to 14.6 mol% (DS=1.1). The relative amounts of monosubstituted arabinose were in the same range as the determined ratios for xylose. Due to coelution, the exact values for arabinose should be slightly higher compared to xylose related derivatives. The amounts of disubstituted arabinose units increased from 3.1 mol% (DS=0.2) to 43.2 mol% (DS=1.1). Hence, disubstitution of arabinose was clearly preferred compared to xylose. The HVE-xylans showed essential differences compared to the HP-xylans. The amount of monosubstituted xylose rose slightly from 11.4 mol% (DS=0.2) to 13.1 mol% (DS=0.6) and decreased subsequently to 6.4 mol% (DS=1.2). The concentrations of monosubstituted xylose were lower compared to HP-xylan. In contrast, the amount of disubstituted xylose was significantly higher with the maximum molar ratio of 19.8 mol% (DS=1.0). The amount decreased for the sample X_{HVE}-1.1, due to tri- and tetrasubstitutions. Arabinose was more often monosubstituted than xylose but the determined values decreased over the whole DS range from 27.0 mol% (DS=0.2) to 12.1 mol% (DS=1.2). In contrast, a preferred disubstitution was observed with increasing DS and a maximum molar ratio of 39.2 mol% (DS=1.0).

The results of both sample sets illustrated that arabinose is the preferred reaction partner for hydroxyalkylation. This higher reactivity compared to xylose can be explained by less steric hindrance as well as differences in the chemistry of pyranoid and furanoid structures. This causes in a higher isolated molar substitutions of arabinose compared to xylose. Furthermore, the pentose units in HVE-xylan have a tendency for higher molar substitutions and thus also for a preferred chain elongation. This observation is in good accordance to the obtained pentose substitution patterns (Fig. 3) and show a higher reactivity of the HVE-side chain compared to the HP-groups.

4. Conclusions

The hydroxyalkylation of xylans with cyclic carbonates offers the opportunity to expand the xylan properties for novel applications. Due to the chemical modification of xylose and arabinose constituents, new analytical methods are required for the quantitative analysis of the new compounds. Conventional NMR methods enable the determination of important values as the degree of substitution and the molar substitution but provide only limited information on the detailed structure of the compounds. This applies especially to components present in small concentrations. In this study, xylans were hydroxyalkylated with the cyclic carbonates PC and VEC under different conditions and the products were analyzed with LC-MS and LC-fluorescence after microwave-assisted TFA hydrolysis and reductive amination. The LC-MS chromatograms revealed the synthesis of a high variety of different isomers, caused by the various hydroxyl groups per pentose, the elongation of the introduced side chain and the different possible reaction pathways. Quantitative LC-fluorescence analysis showed that higher molar substitution was obtained with more intense derivatization conditions. The xylan modification with VEC resulted in a higher average molar substitution compared to PC, which can be explained by an increased reactivity of the generated HVE-side chain compared to the HP-side chain. The differentiation of mono- and disubstituted xylose and arabinose units revealed that arabinose is by far the preferred reaction partner for the

cyclic carbonates. Accordingly, an isolated analysis of both initial compounds is indispensable in order to describe the structure of chemically modified xylans. With the utilization of further cyclic organic carbonates, a wide spectrum of functionalization will be accessible for xylan and other polysaccharides. The developed analytical pathway will be an adequate tool for the characterization of these polysaccharide derivatives.

Funding

This work was part of the WoodWisdom-EraNet project “Aerowood” and was supported by the German funding agency “Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe” and the federal ministry “Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL)” [grant number: 2202214].

Acknowledgement

The authors would also like to thank Dr. Maria Riedner and Dany Gellert (Department of mass spectrometry, University of Hamburg, Germany) for execution of the LC-MS measurements and Dr. Christiane Laine (VTT, Espoo, Finland) for providing hydroxypropylated xylans without arabinose substituents.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.034>.

References

- Abdul Khalil, H. P. S., Bhat, A. H., & Ireana Yusra, A. F. (2012). Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 963–979.
- Akil, Y., Lehnen, R., & Saake, B. (2016). Novel synthesis of hydroxyvinylethyl xylan using 4-vinyl-1,3-dioxolan-2-one. *Tetrahedron Letters*, 57(37), 4200–4202.
- Akil, Y., Lorenz, D., Lehnen, R., & Saake, B. (2016). Safe and non-toxic hydroxyalkylation of xylan using propylene carbonate. *European Polymer Journal*, 77, 88–97.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861.
- Anumula, K. R. (2006). Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 350(1), 1–23.
- DIN. (2008). *DIN 32645:2008–11. Chemical analysis—decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions—terms, methods, evaluation*. pp. 2008–2011. Berlin: Beuth.
- Ducatti, D. R. B., Colodi, F. G., Gonçalves, A. G., Duarte, M. E. R., & Nosedá, M. D. (2011). Production of agaro- and carra-oligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 21, 296–304.
- Harvey, D. J. (2011). Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879(17–18), 1196–1225.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 33–48.
- Kappe, C. O. (2004). Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(46), 6250–6284.
- Klímeček, P., Wimmer, R., Kumar Mishra, P., & Kúdela, J. (2017). Utilizing brewer's spent-grain in wood-based particleboard manufacturing. *Journal of Cleaner Production*, 141, 812–817.
- Laine, C., Harlin, A., Hartman, J., Hyvärinen, S., Kammiovirta, K., Krogerus, B., et al. (2013). Hydroxyalkylated xylans—Their synthesis and application in coatings for packaging and paper. *Industrial Crops and Products*, 44, 692–704.
- Liu, J., Kisonen, V., Willför, S., Xu, C., & Vilaplana, F. (2016). Profiling the substitution pattern of xyloglucan derivatives by integrated enzymatic hydrolysis, hydrophilic-interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1463, 110–120.
- Lorenz, D., Erasmý, N., Akil, Y., & Saake, B. (2016). A new method for the quantification of monosaccharides, uronic acids and oligosaccharides in partially hydrolyzed xylans by HPAEC-UV/VIS. *Carbohydrate Polymers*, 140, 181–187.
- Lorenz, D., Janzon, R., & Saake, B. (2017). Determination of uronic acids and neutral carbohydrates in pulp and biomass by hydrolysis, reductive amination and HPAEC-UV. *Holzforchung*, <http://dx.doi.org/10.1515/hf-2017-0020>

- Mikkonen, K. S., & Tenkanen, M. (2012). Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends in Food Science & Technology*, 28(2), 90–102.
- Mikkonen, K. S., Parikka, K., Ghafar, A., & Tenkanen, M. (2013). Prospects of polysaccharide aerogels as modern advanced food materials. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 124–136.
- Mikkonen, K. S., Laine, C., Kontro, I., Talja, R. A., Serimaa, R., & Tenkanen, M. (2015). Combination of internal and external plasticization of hydroxypropylated birch xylan tailors the properties of sustainable barrier films. *European Polymer Journal*, 66, 307–318.
- Mischnick, P., Unterrieser, I., Voiges, K., Cuers, J., Rinken, M., & Adden, R. (2013). A new method for the analysis of the substitution pattern of hydroxyethyl(methyl)-celluloses along the polysaccharide chain. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214(12), 1363–1374.
- Parikka, K., Nikkilä, I., Pitkänen, L., Ghafar, A., Sontag-Strohm, T., & Tenkanen, M. (2017). Laccase/TEMPO oxidation in the production of mechanically strong arabinoxylan and glucomannan aerogels. *Carbohydrate Polymers*, 175, 377–386.
- Raghavan, D., & Emekalam, A. (2001). Characterization of starch/polyethylene and starch/polyethylene/poly(lactic acid) composites. *Polymer Degradation and Stability*, 72(3), 509–517.
- Reinhold, V. N., Reinhold, B. B., & Costello, C. E. (1995). Carbohydrate molecular weight profiling, sequence, linkage, and branching data: ES-MS and CID. *Analytical Chemistry*, 67(11), 1772–1784.
- Unterrieser, I., & Mischnick, P. (2011). Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 346(1), 68–75.
- Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., & Bertelsen, G. (2002). Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Additives & Contaminants*, 19(Suppl. 1), 172–177.
- Zhao, J., & Monteiro, M. A. (2008). Hydrolysis of bacterial wall carbohydrates in the microwave using trifluoroacetic acid. *Carbohydrate Research*, 343(14), 2498–2503.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift