

**Charakterisierung von lager- und reifebedingten Zellwandveränderungen
pflanzlicher Lebensmittel mittels spektroskopischer und
chromatographischer Methoden**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

staatlich geprüfte Diplom-Lebensmittelchemikerin

Judith Schäfer

aus

Bühl

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeiner Aufbau der pflanzlichen Zellwand	2
1.2	Zellwandpolysaccharide.....	3
1.2.1	Cellulose.....	4
1.2.2	Hemicellulosen	4
1.2.2.1	Xylane	4
1.2.2.2	Xyloglucane	5
1.2.2.3	Mixed-linked β -Glucane	6
1.2.2.4	Mannane	6
1.2.3	Pektine.....	7
1.3	Lignin.....	9
1.3.1	Vorkommen und Funktion in der Pflanze	9
1.3.2	Ligninmonomere.....	9
1.3.3	Biosynthese der Ligninmonomere	12
1.3.4	Transport der Monomere in die Zelle	14
1.3.5	Ligninbildung	14
1.4	Zellwandgebundene Phenolcarbonsäuren – Ausbildung von Zellwand Cross-Links...	17
1.5	Zellwandbestandteile als Ballaststoffe	19
1.6	Einfluss der pflanzlichen Zellwand auf die Textur pflanzlicher Lebensmittel	22
2	Fragestellung	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Ausgangsmaterialien	27
3.1.1	Spargel (<i>Asparagus officinalis</i> L., Sorte Backlim)	27
3.1.2	Brokkoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> , Sorte Ironman).....	27
3.1.3	Kohlrabi (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> , Sorte Delikatess Weißer).....	28
3.1.4	Radieschen (<i>Raphanus sativus</i> var. <i>sativus</i> , Sorte Saxa 3).....	28
3.1.5	Karotten (<i>Daucus carota</i> , Sorte Nantasie 2)	28

3.2	Ballaststoffbestimmung und -isolierung.....	28
3.3	Bestimmung des Restprotein- und Restaschegehaltes.....	30
3.4	Analytik der Zellwandpolysaccharide	31
3.4.1	Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	31
3.4.2	Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharide.....	32
3.5	Ligninanalytik.....	35
3.5.1	Bestimmung des Ligningehaltes	35
3.5.2	Charakterisierung von Ligninstrukturen	39
3.5.2.1	Bestimmung der Monomierzusammensetzung.....	39
3.5.2.2	Entwicklung einer GC-SIM-MS Methode zur Bestimmung von DFRC- Produkten aus gering lignifizierten Proben	41
3.5.2.3	Strukturcharakterisierung von Ligninen mittels 2D-NMR Analyse.....	46
3.6	Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile ..	50
4	Ergebnisse und Diskussion.....	53
4.1	Charakterisierung von Zellwandveränderungen während der Lagerung.....	53
4.1.1	Zellwandcharakterisierung von Spargel.....	53
4.1.1.1	Sensorische Beurteilung des Probenmaterials	53
4.1.1.2	Bestimmung des Ballaststoffgehaltes	54
4.1.1.3	Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe.....	55
4.1.1.4	Bestimmung des Ligningehaltes.....	60
4.1.1.5	Charakterisierung von Ligninstrukturen	62
4.1.1.6	Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile und Zellwand Cross-Links	65
4.1.2	Zellwandcharakterisierung von Brokkolistrunk.....	70
4.1.2.1	Sensorische Beurteilung des Probenmaterials	70
4.1.2.2	Bestimmung des Ballaststoffgehaltes	71
4.1.2.3	Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe.....	72
4.1.2.4	Bestimmung des Ligningehaltes.....	80

4.1.2.5	Charakterisierung von Ligninstrukturen	81
4.2	Charakterisierung von Zellwandveränderungen während der Reifung.....	86
4.2.1	Zellwandcharakterisierung von Kohlrabi	86
4.2.1.1	Sensorische Beurteilung des Probenmaterials	86
4.2.1.2	Bestimmung des Ballaststoffgehaltes	86
4.2.1.3	Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe	88
4.2.1.4	Bestimmung des Ligningehaltes	91
4.2.1.5	Charakterisierung von Ligninstrukturen	92
4.2.2	Zellwandcharakterisierung von Radieschen.....	98
4.2.2.1	Sensorische Beurteilung des Probenmaterials	98
4.2.2.2	Bestimmung des Ballaststoffgehaltes	98
4.2.2.3	Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe	100
4.2.2.4	Bestimmung des Ligningehaltes	107
4.2.2.5	Charakterisierung von Ligninstrukturen	108
4.2.3	Zellwandcharakterisierung von Karotten.....	114
4.2.3.1	Sensorische Beurteilung des Probenmaterials	114
4.2.3.2	Bestimmung des Ballaststoffgehaltes	114
4.2.3.3	Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe	115
4.2.3.4	Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Monomere	118
4.2.3.5	Bestimmung des Ligningehaltes	119
4.2.3.6	Charakterisierung von Ligninstrukturen	121
4.3	Zusammenfassende Diskussion	128
5	Zusammenfassung	135
6	Literaturverzeichnis.....	139
7	Chemikalien und Instrumente	155
7.1	Chemikalien.....	155

7.2	Enzyme.....	159
7.3	Instrumente.....	159
8	Arbeitsvorschriften	162
8.1	Präparative Ballaststoffisolierung.....	162
8.2	Analytische Ballaststoffbestimmung.....	163
8.3	Bestimmung des Restaschegehaltes	164
8.4	Bestimmung des Restproteingehaltes	164
8.5	Monosaccharidanalyse	165
8.6	Methylierungsanalyse	166
8.7	Arabinan- und Galactan-Screening.....	167
8.8	Bestimmung des Klason-Ligningehaltes	169
8.9	Bestimmung des ABSL-Gehaltes.....	169
8.10	DFRC-Methode.....	169
8.10.1	Synthese der Standardsubstanzen.....	169
8.10.2	Durchführung DFRC-Methode	171
8.11	Lignincharakterisierung mittels 2D-NMR Analyse	172
8.12	Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile	174
9	Anhang	177
9.1	Tabellen.....	177
9.2	Abbildungen.....	189

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarat-CoA-Ligase
4-HBS	4-Hydroxybenzoesäure
A	β -Aryl-Ether
AACCI	American Association of Cereal Chemists International
ABSL	Acetylbromidlösliches Lignin
ADL	Säure-Detergens-Lignin
AOAC	Association of Analytical Chemists
Ara	Arabinose
B	Phenylcumarin
BG	Bestimmungsgrenze
BS	Gesamtballaststoffgehalt
c	Cyclisch
C	Resinol
C3H	<i>para</i> -Cumarat-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CAD	Zimtalkohol-Dehydrogenase
CCoAOMT	Kaffeealkohol-CoA-O-Methyltransferase
CCR	Zimtsäure-CoA-Reductase
COMT	Kaffeesäure-O-Methyltransferase
D	Dibenzodioxin
d_6	Sechsfach deuteriert
DAD	Diodenarraydetektor
dc	Decarboxyliert
DFRC	Derivatization Followed by Reductive Cleavage
DFS	Diferulasäure
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
E	Ernte
<i>f</i>	Furanose

F	klassische β -1-Strukturen
F5H	Ferulasäure-5-Hydroxylase
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Ferulasäure
Fuc	Fucose
G	Guaiacyl
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GB	Gaussian Broadening Factor
GC	Gaschromatographie
GD ₆ Ac (-d ₆)	Coniferylalkoholdiacetat (sechsfach deuteriert)
Glc	Glucose
GM	Gaussian Multiplication
H	Hydroxyphenyl
HAAs	Heterocyclische aromatische Amine
HCT	<i>para</i> -Hydroxyzimtsäure-CoA-Quinat-Shikimat- <i>para</i> -Hydroxyzimtsäuretransferase
HD ₆ Ac (-d ₆)	<i>para</i> -Cumarylalkoholdiacetat (sechsfach deuteriert)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (High Performance Anion Exchange Chromatography)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
LB	Exponential Broadening Factor
LBS	Lösliche Ballaststoffe
Man	Mannose
MS	Massenspektrometer
nc	Nicht-cyclisch
ng	Nachgewiesen

NG	Nachweisgrenze
NMLBS	Niedermolekulare lösliche Ballaststoffe
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
<i>p</i>	Pyranose
PAD	Gepulst amperometrischer Detektor
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
pCS	<i>para</i> -Cumarsäure
PMAA	Partiell methyliertes Alditolacetat
QSINE	Cosine-Bell Apodization
Rha	Rhamnose
RI	Brechungsindexdetektor
SD	Spirodienon
S	Syringyl
SAD	Sinapylalkohol-Dehydrogenase
SDiAc (<i>-d₆</i>)	Sinapylalkoholdiacetat (sechsfach deuteriert)
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
SSB	Sine-Bell Shift
T	Tage
t	Terminal
TetraFS	Tetraferulasäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TriFS	Triferulasäure
UBS	Unlösliche Ballaststoffe
X1	Zimtalkoholendgruppen
Xyl	Xylose

1 Einleitung

Pflanzliche Zellwände stellen einen wichtigen Bestandteil in der menschlichen Ernährung dar. Da die Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand zum Ballaststoffkomplex gehören, decken sie einen Teil der empfohlenen Ballaststoffaufnahme ab. Laut der nationalen Verzehrsstudie II stellt die Hauptquelle für die Aufnahme von Ballaststoffen neben Brot der Gemüse- und Obstverzehr dar. Obwohl der Anteil von Obst und Gemüse in der Ernährung in den letzten Jahren gestiegen ist, wird die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Aufnahmemenge von 30 g Ballaststoffen pro Tag von den meisten Konsumenten unterschritten. Die mit der Aufnahme von Ballaststoffen verbundenen ernährungsphysiologisch positiven Wirkungen sind jedoch stark abhängig von der Menge und Art der Ballaststoffe. So werden u.a. lignifizierte Ballaststoffe mit einer Senkung des Krebsrisikos in Verbindung gebracht, da diese *in vitro* bestimmte Kanzerogene wie heterocyclische aromatische Amine adsorbieren können. Das Ausmaß der Adsorption ist dabei vom Ligningehalt aber auch von der Ligninstruktur abhängig. Allerdings sind nicht nur einzelne Komponenten und deren strukturelle Zusammensetzung ausschlaggebend. Bei der Bewertung von ernährungsphysiologischen Eigenschaften muss zudem auch das Zusammenspiel aller Bestandteile betrachtet werden. Hierbei sind insbesondere Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren zu nennen, die u.a. die Fermentation der Ballaststoffe im Dickdarm beeinträchtigen können. Für eine Bewertung von Ballaststoffen aus Lebensmitteln sind daher eine detaillierte Strukturanalyse aller Komponenten sowie eine Betrachtung der Interaktionen von großer Bedeutung.

Neben der Bedeutung als Ballaststoffe spielen die Zellwände pflanzlicher Lebensmittel auch eine große Rolle bei der Lebensmittelqualität, da Menge und Art der einzelnen Komponenten die Textur von Obst und Gemüse beeinflussen. Bekannt ist das Holzigidwerden von verschiedenen Gemüsesorten, das häufig mit einer vermehrten Einlagerung von Lignin in die pflanzliche Zellwand assoziiert wird. Ein weiteres Beispiel ist das Weichwerden von Früchten, das vermutlich vor allem auf einen Abbau von Pektinen der Mittellamelle zurückzuführen ist. Für den Konsumenten spielt die Textur eines pflanzlichen Lebensmittels eine ausschlaggebende Rolle bei der Kaufentscheidung. Daher ist das Verständnis von Prozessen während der Reifung oder Lagerung, die sich auf die Textur auswirken, von großem Interesse.

Pflanzliche Produkte sind hinsichtlich ihrer Zellwandzusammensetzung sehr variabel, da diese sich während des Wachstums und der Entwicklung einer Pflanze auf verschiedenste Weise ändern kann. Aber auch durch nacherntephysiologische Prozesse während der Lagerung kann sich die Zusammensetzung der pflanzlichen Zellwand maßgeblich verändern. Im Hinblick auf die Bewertung von ernährungsphysiologischen Eigenschaften, aber auch für die

chemische Beschreibung von Texturveränderungen ist es daher unumgänglich, Pflanzenzellwände detailliert zu charakterisieren.

1.1 Allgemeiner Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Pflanzliche Zellwände stellen hoch komplexe Strukturen dar. Sie bilden das Grundgerüst einer jeden Pflanzenzelle, wodurch dieser Stabilität verliehen wird. Des Weiteren schützt die Zellwand die Zelle vor äußeren Einflüssen, wie z.B. vor Infektionen oder Austrocknung. Sie grenzt die Zellen untereinander ab, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei Signalübertragungsprozessen sowie beim Stofftransport zwischen den Zellen. Trotz der Komplexität und Individualität jeder Zellwand lässt sich deren Aufbau durch einige Grundaspekte beschreiben. So bestehen pflanzliche Zellwände generell aus Mittellamelle und Primärwand. Zusätzlich kann nach Beendigung des Zellwachstums, je nach Funktion der Zellen, eine Sekundär- und auch Tertiärwand aufgelagert werden. Die Ausprägung der Schichten sowie deren Zusammensetzung variiert je nach Pflanzenart, Zell- und Gewebetyp und Reifezustand der Pflanze (McDougall et al. 1996). Grundsätzlich bestehen pflanzliche Zellwände aus Polysacchariden, wie Cellulose, Hemicellulosen und Pektinen, sowie aus Strukturproteinen, Lignin und weiteren aufgelagerten aliphatischen bzw. phenolischen Substanzen wie Cutin oder Suberin (McDougall et al. 1996). Die Mittellamelle, welche die Zellen untereinander abgrenzt, besteht dabei hauptsächlich aus Pektinen. Die Primärwand ist auf die Mittellamelle aufgelagert und bildet eine Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen und Strukturproteinen, in die Cellulose eingebettet ist. Primärzellwände können in zwei Typen eingeteilt werden. Typ I Zellwände, die typisch für dikotyle und einige monokotyle (nicht-commelinide) Pflanzen sind, weisen neben Cellulosemikrofibrillen hauptsächlich Pektine, Xyloglucane und Strukturproteine auf (Carpita und Gibeaut 1993; Harris und Smith 2006; Vogel 2008). Im Unterschied dazu dominieren in Typ II Zellwänden, die bei commeliniden Monokotyledonen (*Poaceae*) vorkommen, neben Cellulose hauptsächlich Heteroxylane, wie z.B. (Glucurono-) Arabinoxylane (Carpita und Gibeaut 1993; Harris und Smith 2006; Vogel 2008). Je nach Funktion der Zelle kann nach Beendigung des Zellwachstums die Sekundärzellwand aufgelagert werden. Diese besteht bei beiden Zelltypen neben einem sehr hohen Anteil an Cellulose aus einer Matrix aus Hemicellulosen (vorwiegend (Hetero-) Xylane). Außerdem kann es zu einer Einlagerung von Lignin kommen. Sekundärzellwände monokotyler Pflanzen weisen dabei meist einen höheren Lignifizierungsgrad auf als Sekundärzellwände dikotyler Pflanzen (Vogel 2008). Die Einlagerung von Lignin verleiht der Pflanze eine erhöhte Stabilität, bildet einen Schutz vor Pathogenen und führt zur Ausbildung von wasserundurchlässigen Schichten, was vor allem in Leitgeweben wie Xylem und Phloem von großer Bedeutung ist (Gibson 2012).

Strukturproteine sind vor allem in der Primärwand dikotyler Pflanzen zu finden und liegen häufig als Glykoproteine vor (McNeil et al. 1984; Vogel 2008). Ein bekanntes Beispiel stellt

das sogenannte Hydroxyprolin-reiche Glykoprotein Extensin dar, das in pflanzlichen Zellen einen Anteil von bis zu 10% der Trockenmasse ausmachen kann (McNeil et al. 1984). Neben der Klasse der Hydroxyprolin-reichen Strukturproteinen sind weitere Klassen, wie z.B. Glycin- und Prolin-reiche Proteine, bekannt (Deepak et al. 2010). Strukturproteine liegen in der Zellwand an Zellwandpolymere assoziiert vor und spielen daher eine wichtige Rolle beim Aufbau und Erhalt der Zellwandarchitektur und -stabilität. Die Beteiligung kovalenter Bindungen wird in der Literatur diskutiert, konnte jedoch noch nicht eindeutig in Pflanzenzellwänden gezeigt werden. Diskutiert werden hierbei kovalente Bindungen zwischen Strukturproteinen untereinander aber auch zwischen Strukturproteinen und Polysacchariden, insbesondere Pektinen (Hijazi et al. 2014; Nunez et al. 2009; Tan et al. 2013). Modell-Studien lieferten zudem Hinweise darauf, dass auch die Ausbildung von Cross-Links zwischen Strukturproteinen und Lignin möglich ist (Cong et al. 2013). Strukturproteine sind zudem an der Kontrolle verschiedener physiologischer Prozesse, wie z.B. der abiotischen oder biotischen Stressantwort, beteiligt (Deepak et al. 2010; Nguema-Ona et al. 2014).

1.2 Zellwandpolysaccharide

Die Polysaccharide der pflanzlichen Zellwand sind im Allgemeinen hauptsächlich aus den Monosacchariden L-Arabinofuranose, D-Xylopyranose, D-Mannopyranose, D-Glucopyranose, D-Galactopyranose, L-Rhamnopyranose und L-Fucopyranose sowie den Uronsäuren D-Glucopyranuronsäure, D-Galactopyranuronsäure und 4-O-Methyl-D-Glucopyranuronsäure zusammengesetzt. Diese Monomereinheiten sind in Abbildung 1 dargestellt.

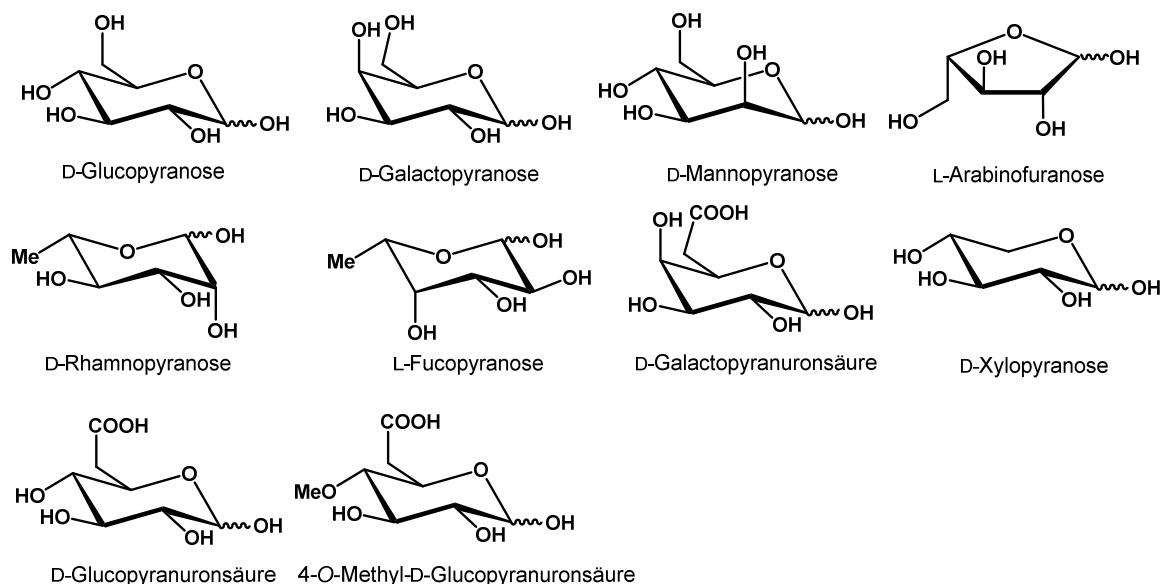


Abbildung 1: Übersicht der hauptsächlich vorkommenden Monosaccharideinheiten von Polysacchariden der pflanzlichen Zellwand.

1.2.1 Cellulose

Cellulose ist ein lineares Polymer, das aus β -(1→4)-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten besteht und einen Polymerisationsgrad von bis zu 6000 in Primärzellwänden und mehr als 10000 in Sekundärzellwänden aufweisen kann (Waldron et al. 2003). Die Cellulosemoleküle liegen als Mikrofibrillen vor. Durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen können sie dabei in unterschiedlichem Ausmaß kristalline Bereiche ausbilden (Carpita und Gibeaut 1993). Sekundärzellwände enthalten einen höheren Anteil an kristalliner Cellulose als Primärzellwände (McDougall et al. 1996). Cellulose bildet zusammen mit Xyloglucanen (Typ I Zellwände) bzw. mit (Hetero-) Xylanen (Typ II Zellwände) das Grundgerüst der Zellen. Xyloglucane bzw. Xylane sind dabei nicht-kovalent über Wasserstoffbrückenbindungen an die Cellulosemikrofibrillen gebunden, wodurch die Cellulosemikrofibrillen untereinander verknüpft werden können (Carpita und Gibeaut 1993). Dieses Netzwerk liegt in einer Matrix aus Pektinen und Proteinen eingebettet vor.

1.2.2 Hemicellulosen

Unter dem Begriff Hemicellulosen ist eine Gruppe verschiedener Heteropolysaccharide zusammengefasst. Hemicellulosen liegen, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, eng an Cellulose (nicht-kovalent) gebunden vor bzw. dienen zur Verknüpfung von Cellulosemikrofibrillen untereinander (Carpita und Gibeaut 1993). Das Vorkommen von Hemicellulosen unterscheidet sich je nach Pflanzenklasse und Zellschicht. In der Primär- und Sekundärwand monokotyler Pflanzen überwiegen Heteroxylane, wie (Glucurono-) Arabinoxylane (Vogel 2008). In Primärwänden dikotyler und nicht-commelinider monokotyler Pflanzen dominieren Xyloglucane, in den Sekundärzellwänden sind dagegen hauptsächlich Xylane zu finden (Selvendran 1984).

1.2.2.1 Xylane

Die in Pflanzen vorkommenden Xylane stellen in der Regel Heteroxylane dar, die aus einem Rückgrat aus β -(1→4)-glykosidisch verknüpften Xylopyranoseeinheiten bestehen. Das Xyloserückgrat liegt in unterschiedlichem Ausmaß in Position O-2 und/oder O-3 substituiert vor (McNeil et al. 1984). Bei neutralen Arabinoxylanen liegen die Xyloseeinheiten in Position O-2 und/oder O-3 mit α -L-Arabinose substituiert vor. Glucuronoarabinoxylane weisen neben Arabinoseeinheiten in O-3 Position zusätzlich Glucuronsäure und/oder 4-O-Methyl-Glucuronsäure in Position O-2 der Xyloseeinheiten auf (Carpita und Gibeaut 1993). Außerdem können Heteroxylane auch an Position O-2 oder O-3 des Xyloserückgrats acetyliert vorliegen (Carpita und Gibeaut 1993). Arabinoxylane stellen die Haupthemcellulosen von Primärzellwänden monokotyler Pflanzen dar (Vogel 2008). (Hetero-)Xylane sind jedoch auch zu größeren Anteilen in den Sekundärzellwänden dikotyler Pflanzen zu finden. Hier

erfolgt die Substitution des Xyloserückgrats bevorzugt mit (4-*O*-Methyl-) Glucuronsäure anstatt mit Arabinose (Rennie und Scheller 2014).

Ein weiteres wichtiges Strukturmerkmal, insbesondere von Arabinoxylanen, ist die mögliche Veresterung der *O*-5 Position der Arabinoseeinheiten mit phenolischen Säuren, wobei hierbei hauptsächlich die Ferulasäure zu finden ist (Ishii 1997). Durch radikalische Kopplungsreaktionen können Cross-Links zwischen Polysacchariden, aber auch zwischen Polysacchariden und Lignin ausgebildet werden, was zur Festigkeit der Pflanzenzellwand beiträgt (Piber und Koehler 2005; Ralph et al. 1995). Heteroxylane sind hinsichtlich Substitutionsgrad und Art der Substituenten sehr variabel und weisen dadurch unterschiedliche physikalische sowie funktionelle Eigenschaften auf. So beeinflusst der Substitutionsgrad u.a. die Löslichkeit der Xylane sowie auch die Fähigkeit an Cellulose zu binden (McNeil et al. 1984). Dabei fördert eine geringe Substitution die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Xylanen untereinander aber auch zwischen Xylanen und Cellulose. Bei hohem Substitutionsgrad steigt dagegen die Wasserlöslichkeit der Heteroxylane an (Carpita und Gibeaut 1993).

1.2.2.2 Xyloglucane

Xyloglucane sind sowohl in Primärzellwänden von mono- als auch von dikotylen Pflanzen vertreten, allerdings spielen sie bei der Zusammensetzung der Primärzellwände monokotyler Pflanzen nur eine untergeordnete Rolle (Vogel 2008). In Typ I Zellwänden stellen sie dagegen die dominierenden Hemicellulosen dar. Dort sind sie, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, nicht-kovalent an Cellulose gebunden, sie spielen aber auch eine Rolle bei der Verknüpfung der Cellulosemikrofibrillen untereinander und stellen dadurch zusammen mit Cellulose das Grundgerüst der Primärzellwand dikotyler Pflanzen dar (Carpita und Gibeaut 1993). Das Rückgrat der Xyloglucane besteht aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten, die an Position *O*-6 in unterschiedlichem Ausmaß mit α -D-Xylose substituiert sind. Der Substitutionsgrad hängt dabei stark von der Pflanzenspezies ab. Ein häufig zu findendes Strukturelement ist die Substitution von drei aufeinanderfolgenden Glucoseeinheiten mit einzelnen Xylopyranosen, gefolgt von einer nicht-substituierten Glucoseeinheit (Park und Cosgrove 2015). Die Xyloseeinheiten können in Position *O*-2 zusätzlich mit weiteren Zuckern, wie β -D-Galactose, α -L-Arabinose und α -L-Fucose, substituiert sein (Carpita und Gibeaut 1993). In den meisten Dikotyledonen liegt die Xylose dabei häufig sowohl mit einem Disaccharid, bestehend aus Arabinose und Galactose, als auch mit einem Trisaccharid, bestehend aus Galactose, Arabinose und Fucose, substituiert vor. Dennoch variiert die Zusammensetzung dieser Seitenketten sehr stark je nach Pflanzenspezies (Tuomivaara et al. 2015). Daneben ist auch eine Acetylierung der Xyloglucane möglich, die bei dikotylen Pflanzen häufig in Position *O*-3 oder *O*-2 der Glucoseeinheiten zu finden ist (Park und Cosgrove 2015).

In den Zellwänden monokotyle Pflanzen können neben Arabinoxylanen auch Xyloglucane an Position *O*-4 der Xyloseeinheiten mit Ferulasäure verestert vorliegen (Ishii und Hiroi 1990; Ishii et al. 1990). Im Vergleich zu den Arabinoxylanen spielt die Veresterung von Xyloglucanen mit Ferulasäure bei monokotylen Pflanzen verhältnismäßig jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

1.2.2.3 Mixed-linked β -Glucane

Mixed-linked β -Glucane sind ausschließlich in Primärzellwänden monokotyle Pflanzen vorhanden und bestehen aus einer unverzweigten Kette aus β -(1 \rightarrow 3)- und β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten (Vogel 2008). Durch die β -(1 \rightarrow 3)-Verknüpfungen, welche zu etwa 30% vorkommen, wird die Kette aus β -(1 \rightarrow 4)-Verknüpfungen in regelmäßigen Abständen unterbrochen (McNeil et al. 1984). Das Vorkommen von β -Glucanen variiert stark zwischen unterschiedlichen Getreiden. So sind z.B. im Endosperm von Hafer oder Gerste sehr hohe Gehalte an mixed-linked β -Glucanen enthalten. Hierbei fungieren sie vermutlich als Speicherpolysaccharide (Vogel 2008). Des Weiteren wird ihnen auch eine Rolle während des Zellwachstums nachgesagt, da sie insbesondere in der frühen Entwicklungsphase in der Primärwand vorhanden sind und während des Wachstumsprozesses abgebaut werden (Obel et al. 2002; Vega-Sanchez et al. 2013).

1.2.2.4 Mannane

Mannane sind vorwiegend in Primär- und Sekundärzellwänden von dikotylen Pflanzen zu finden (5-10%), wobei der größte Anteil in der Sekundärzellwand vorliegt (Melton et al. 2009; Vogel 2008). Mannane bestehen aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Mannopyranoseeinheiten. Außerdem können sie zusätzlich an Position *O*-6 der Mannoseeinheiten mit α -D-Galactose substituiert vorliegen (Galactomannane) (Melton et al. 2009). Glucomannane bestehen aus einem Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfter D-Glucopyranose und D-Mannopyranose welche in unregelmäßiger Reihenfolge vorliegen. Zusätzlich können die Mannoseeinheiten ebenso mit α -D-Galactose substituiert vorliegen, wodurch Galactoglucomannane entstehen (Melton et al. 2009). Eine Acetylierung der Mannoseeinheiten ist ebenfalls häufig zu finden (Capek et al. 2002; Rodriguez-Gacio et al. 2012). Die Löslichkeit, Viskosität und die Interaktion mit weiteren Zellwandpolysacchariden wird auch bei den Mannanen durch den Substitutionsgrad beeinflusst, der je nach Pflanzenart sehr variabel sein kann (Rodriguez-Gacio et al. 2012). Glucomannane kommen in den meisten Zellwänden nur in sehr geringen Mengen vor und bestehen aus einem Rückgrat alternierender (1 \rightarrow 2)-verknüpfter α -D-Mannopyranose- und β -D-Glucopyranuronsäureeinheiten (Waldron et al. 2003).

Mannane übernehmen strukturelle Aufgaben in der Architektur von Primär- und Sekundärzellwänden. So können sie Cellulose-ähnliche Mikrofibrillen ausbilden, wodurch sie neben

Cellulose am Aufbau des Grundgerüsts der Zelle beteiligt sein können (Mackie und Preston 1968). Außerdem tragen sie vermutlich ebenfalls durch Verknüpfung von Cellulosemikrofibrillen, aber auch durch mögliche Verknüpfung mit Lignin, zur Struktur und Stabilität der Zellwand bei (Lawoko et al. 2005; Melton et al. 2009). Darüber hinaus sind Mannane vor allem als Speicherpolysaccharide im Endosperm von Samen, insbesondere bei der Familie der Leguminosen, bekannt. Dort dienen sie sowohl als Nährstoff während der Keimung, als auch, aufgrund der guten Wasserbindungsfähigkeit, als Wasserspeicher (Bento et al. 2013; Prajapati et al. 2013).

1.2.3 Pektine

Pektine sind Hauptbestandteil der Mittellamelle, sind aber auch zu unterschiedlichen Anteilen in Primär- und Sekundärzellwänden mono- und dikotyler Pflanzen vertreten. Dabei sind insbesondere in Primärzellwänden dikotyler Pflanzen mit bis zu 35% größere Anteile an Pektinen vorhanden (Vogel 2008). Pektine sind essentiell für den Aufbau, das Wachstum und die Differenzierung der Pflanzenzellwand (Mohnen 2008; Voragen et al. 2009). Aufgrund ihres anionischen Charakters beeinflussen sie zudem den Ionentransport, das Wasserbindevermögen sowie die Permeabilität der Zellwand (Voragen et al. 2009). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen (Voragen et al. 2009). Pektine besitzen gelbildende und stabilisierende Eigenschaften (Powell et al. 1982), aufgrund dessen sie in der Lebensmittelindustrie vielfach eingesetzt werden.

Bei Pektinen handelt es sich um einen Sammelbegriff für eine Gruppe sehr komplexer Polysaccharide. Wichtige Strukturelemente bilden dabei Homogalacturonane und die Typ I und II Rhamnogalacturonane. Daneben zählen auch Polysaccharide wie Apio- und Xylogalacturonane zu den Pektinstrukturelementen. Diese verschiedenen Strukturelemente sind vermutlich kovalent miteinander verknüpft (Ridley et al. 2001). Ein schon lange bekanntes Modell dafür ist, dass Homogalacturonane und Typ I Rhamnogalacturonane ein kontinuierliches Rückgrat bilden. Aufgrund der linearen Struktur der Homogalacturonane werden die Homogalacturonan-Bereiche als „smooth regions“ bezeichnet. Typ I Rhamnogalacturonane bilden dagegen die „hairy regions“, da diese Strukturelemente neutrale Seitenketten besitzen (de Vries et al. 1983). Ein alternatives Modell beschreibt dagegen Homogalacturonane als Seitenketten von Typ I Rhamnogalacturonanen (Vincken et al. 2003).

Homogalacturonane stellen mit etwa 65% den Hauptteil der Pektine dar. Sie sind aus α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Galactopyranuronsäureeinheiten aufgebaut, wobei ein Teil der Carboxygruppen als Methylester vorliegen. Außerdem kann, je nach Pflanzenart, Position O-2 und/oder O-3 der Galacturonsäure acetyliert sein (Ridley et al. 2001). Der Methylierungsgrad beeinflusst die Gelbildungseigenschaften der Homogalacturonane. Je geringer dieser ist,

desto eher können die freien Carboxygruppen über Ca^{2+} mit weiteren Pektinmolekülen stabile Gele ausbilden (Caffall und Mohnen 2009).

Typ I Rhamnogalacturonane besitzen ein Rückgrat aus alternierenden α -(1→4)-verknüpften D-Galactopyranuronsäure- und α -(1→2)-verknüpften L-Rhamnopyranoseeinheiten (Caffall und Mohnen 2009). Zwischen 20-80% der Rhamnoseeinheiten sind an Position O-4 durch lineare oder verzweigte Arabinan-, Galactan- und/oder Arabinogalactanseitenketten substituiert (Mohnen 2008). Arabinane bestehen aus einem Rückgrat aus α -(1→5)-verknüpften L-Arabinofuranoseeinheiten, welche in Position O-2 und/oder O-3 mit einzelnen α -L-Arabinoseeinheiten verzweigt vorliegen können. Anstelle von einzelnen Arabinoseeinheiten kann das Rückgrat auch mit Ketten aus α -(1→3)-verknüpften L-Arabinofuranosen verzweigt sein (Voragen et al. 2009). Galactane besitzen ein Rückgrat aus β -(1→4)-verknüpften D-Galactopyranoseeinheiten. Durch Arabinosesubstitution an O-3 Position der Galactoseeinheiten entstehen Typ I Arabinogalactane, wobei einzelne terminale Arabinoseeinheiten und/oder α -(1→5)-verknüpfte Arabinoseketten vorkommen können (Caffall und Mohnen 2009; Carpita und Gibeaut 1993). Typ II Arabinogalactane bestehen aus β -(1→3)-verknüpften Galactopyranoseeinheiten, die an Position O-6 mit β -(1→6)-verknüpften Galactopyranoseketten verzweigt sein können. Die verbleibenden O-3 bzw. O-6 Positionen sind häufig mit terminaler α -L-Arabinose substituiert (Carpita und Gibeaut 1993). Typ II Arabinogalactane liegen vorwiegend mit Strukturproteinen assoziiert vor (Carpita und Gibeaut 1993).

In Zellwänden dikotyle Pflanzen können Arabinane und Galactane zusätzlich mit Ferulasäure verestert vorliegen (Colquhoun et al. 1994; Ishii und Tobita 1993; Wefers et al. 2015a). Die Bindung der Ferulasäure erfolgt über die O-2 Position der Arabinane bzw. über die O-6 Position der Galactane (Colquhoun et al. 1994). Durch die Ausbildung von Ferulasäuredimeren können Arabinane und/oder Galactane miteinander verknüpft werden. Daneben ist auch die Bildung von Cross-Links zwischen Polysacchariden und Lignin über polysaccharidgebundene Ferulasäuren möglich (Bunzel 2010).

Die seltener vorliegenden Typ II Rhamnogalacturonane sind gekennzeichnet durch spezifische und selten vorkommende Zucker wie Apiose, Acerinsäure, 3-Desoxy-D-lyxo-2-heptulosarsäure und 2-Keto-3-Desoxy-D-manno-octonsäure (Voragen et al. 2009). Typ II Rhamnogalacturonane können über Boratester dimerisieren und Homogalacturonane untereinander verknüpfen, wodurch bestimmte Eigenschaften der Zellwand, wie z.B. die Porosität, beeinflusst werden (Cosgrove 2005; Ishii et al. 1999).

1.3 Lignin

1.3.1 Vorkommen und Funktion in der Pflanze

Lignine stellen komplexe dreidimensionale phenolische Polymere der pflanzlichen Zellwand dar. Nach Beendigung des Zellwachstums und mit Auflagerung der Sekundärzellwand kann es zur Einlagerung von Lignin kommen. Die Sekundärzellwand einer Zelle besteht aus drei Schichten (S1-3). Die Einlagerung von Lignin („Lignifizierung“) beginnt nach Ausbildung der inneren Sekundärwandschicht (S1) (Boerjan et al. 2003). Ausgangspunkte der Lignifizierung stellen die Mittellamelle und die Ecken der Primärzellwand dar (Donaldson 2001). Mit fortschreitender Entwicklung der Sekundärzellwand erfolgt anschließend deren Lignifizierung, wobei der Lignineinlagerung jeweils die Ausbildung einer Polysaccharidmatrix vorausgeht.

Die Lignineinlagerung ist verbunden mit einer erhöhten Festigkeit und Stabilität der Zellwand. Aufgrund der Hydrophobizität des Ligninpolymers wird die Zellwand zudem undurchlässig für Wasser, was für den Wassertransport insbesondere im Leitgewebe von zentraler Bedeutung ist (Boerjan et al. 2003). Die Einlagerung von Lignin in die Zellwand kann zusätzlich durch äußere Einflüsse induziert werden. So kann die Lignifizierung durch Verwundungsprozesse oder durch Pathogene hervorgerufene Infektionen ausgelöst werden (Vance et al. 1980).

1.3.2 Ligninmonomere

Lignine können aus unterschiedlichen Monomeren zusammengesetzt sein, die über verschiedene Bindungstypen miteinander verknüpft werden. Die genaue Struktur der Polymere ist sehr flexibel und kann je nach Pflanzenart und -gewebe, Zelltyp und Wachstumsstadium variieren. Zum Aufbau des Polymers werden hauptsächlich die drei Monomere *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol verwendet, die auch als Monolignole bezeichnet werden (Abbildung 2) (Ralph et al. 2004b). Nach dem Einbau in das Ligninpolymer werden diese Einheiten als Hydroxyphenyl (H)-, Guaiacyl (G)- und Syringyleinheiten (S) bezeichnet.

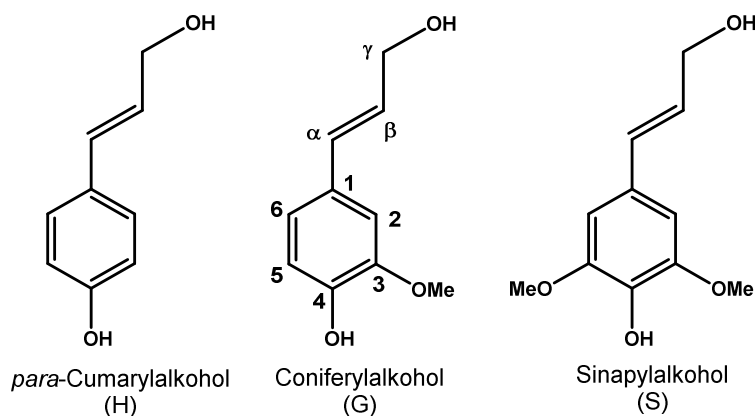


Abbildung 2: Die Monolignole *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalcohol, die zum Aufbau des Ligninpolymers verwendet werden. Eingebaut in das Polymer entstehen daraus Hydroxyphenyl (H)-, Guaiacyl (G)- und Syringyleinheiten (S).

Daneben gibt es jedoch noch eine Reihe weiterer Monomere, die in das Ligninpolymer eingebaut werden können (Boerjan et al. 2003; Ralph et al. 2004b). Diese sind in Abbildung 3 zusammengefasst. Häufig vorhanden sind in γ -Position veresterte Monolignole. Die ausschließlich an γ -Position vorkommende Veresterung lässt darauf schließen, dass die Esterbildung bereits vor dem Einbau in das Ligninpolymer erfolgt und die so entstandenen Konjugate als Monomereinheiten anzusehen sind (Lu et al. 2015; Ralph et al. 1994). So gebildete häufig vorkommende Ester sind Acetate (u.a. bei Palmen und Kenaf), *para*-Cumarate (u.a. bei Gräser) und *para*-Hydroxybenzoate (u.a. bei Palmen und Pappel) (Lu et al. 2015; Lu und Ralph 1999; Lu und Ralph 2002). Die Esterbildung mit *para*-Cumarsäure oder *para*-Hydroxybenzoesäure erfolgt bevorzugt an der γ -ständigen Hydroxygruppe von Sinapylalcohol (Grabber et al. 1996; Lu und Ralph 1999; Lu und Ralph 2002). Des Weiteren sind Cumarate bzw. Benzoate häufig als Ligninendgruppen zu finden. Dies lässt sich u.a. damit begründen, dass sie als Radikalüberträger fungieren, anstatt selbst durch radikalische Koppelungsreaktionen in das Ligninpolymer eingebaut zu werden.

Des Weiteren sind häufig auch Cinnamyl- und Benzaldehyde als endständige Gruppen im Ligninpolymer zu finden (Ralph et al. 2004b). Aldehydgruppen können jedoch auch nachträglich durch oxidative Reaktionen entstehen und fungieren daher nicht immer zwangsläufig als primäre Ligninmonomere. Dennoch ist ein direkter Einbau von Aldehyden in das Ligninpolymer möglich. Dies konnte anhand gentechnisch veränderter Pflanzen durch die Hemmung des Enzyms Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) gezeigt werden (Ralph et al. 1998a; Ralph et al. 2001b). Das Enzym CAD spielt eine Rolle bei der Synthese der Monolignole im Phenylpropanstoffwechsel und ist verantwortlich für die Reduktion der Aldehyde zu den entsprechenden Monolignolen. Nach Hemmung der CAD wurden die Aldehyde anstelle der Monolignole in das Ligninpolymer eingebaut. Neben den genannten Monomere sind auch reduzierte Monomere wie Dihydroconiferylalcohol oder das daraus entstehende Guaiacylpropan-

1,3-diol als Ligninmonomere, insbesondere in Ligninen von Nadelhölzern, zu finden (Ralph et al. 1999; Ralph et al. 2001b).

Als weiteres Ligninmonomer wurde auch 5-Hydroxyconiferylalkohol identifiziert, das nativ u.a. in Ligninen aus Kakteensamen zu finden ist (Chen et al. 2013; Ralph et al. 2001b). Ein weiteres, erst kürzlich entdecktes, spezielles Monomer ist der Kaffeealkohol, der ebenfalls in Ligninen aus Pflanzensamen von Vanille oder Kakteen vorkommt (Chen et al. 2012).

In Ligninen von monokotylen Pflanzen konnte kürzlich das Vorkommen des Flavanoids Tricin als Ligninmonomer gezeigt werden (del Río et al. 2012; Lan et al. 2015; You et al. 2013). Dies ist ungewöhnlich, da Tricin im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Monomeren kein direktes Zwischenprodukt der Monolignolsynthese darstellt. Dennoch stellt der Phenylpropanstoffwechsel den Ausgangspunkt der Tricinbiosynthese dar.

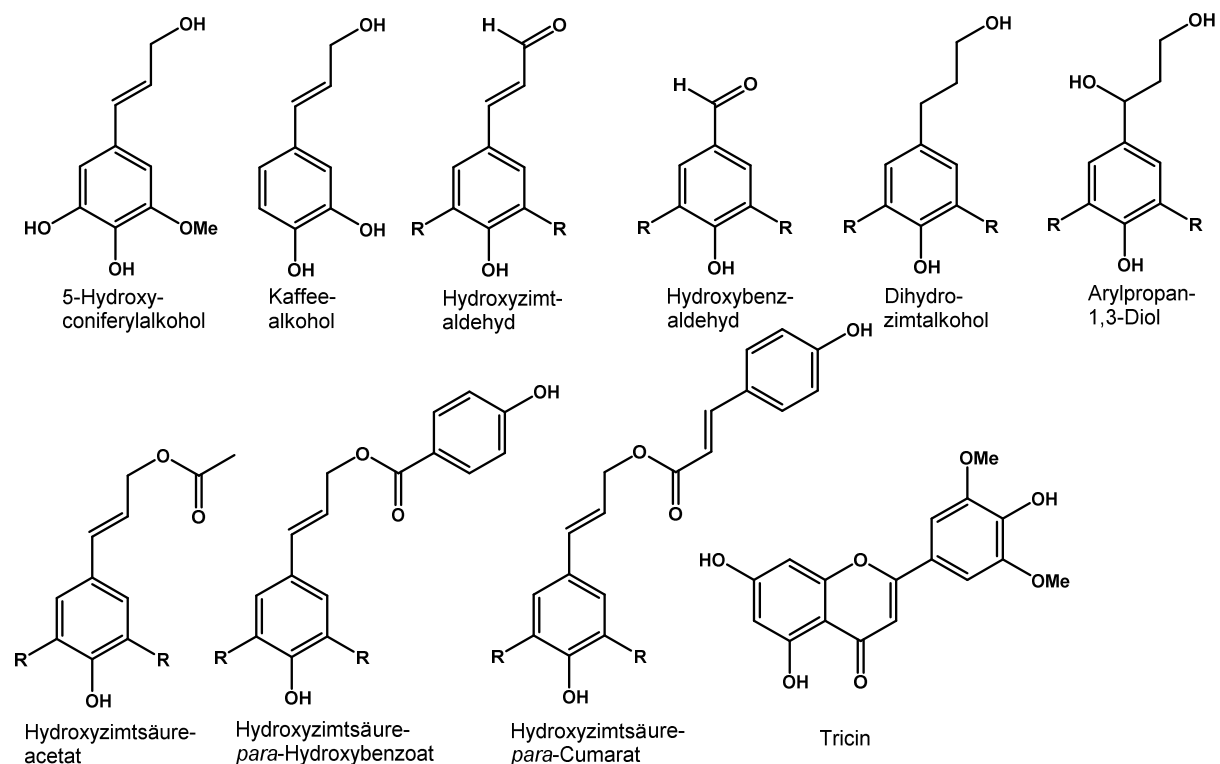


Abbildung 3: Ligninmonomere, die neben den dominierenden Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyleinheiten in geringen Mengen in Lignin eingebaut werden können. R=H oder OMe.

Die hier aufgezeigten Monomere machen deutlich, dass Lignine sehr variabel in ihrem Aufbau sein können. Die Monomerzusammensetzung variiert dabei nicht nur zwischen unterschiedlichen Pflanzenarten und Zelltypen, sondern wird auch durch den Reifezustand der Pflanze und durch verschiedene Umwelteinflüsse bestimmt. Dominierende Monomereinheiten sind allerdings immer H-, G- und S-Einheiten. Dikotyle Angiospermen weisen in der Regel G- und S-reiche Lignine auf, während Lignine von Gymnospermen G-reich sind. Monoko-

tylen Pflanzen weisen im Allgemeinen ein ausgeglichenes G/S-Verhältnis auf, zudem ist hier der Anteil der H-Einheiten höher als bei dikotylen Pflanzen (Boerjan et al. 2003). Allgemein gilt auch, dass zu Beginn der Lignifizierung H-Einheiten verstärkt eingebaut werden, während G- und vor allem S-Einheiten im späteren Verlauf der Lignifizierung dominieren (Donaldson 2001).

1.3.3 Biosynthese der Ligninmonomere

Die zum Aufbau des Polymers benötigten Monomere werden im Phenylpropanstoffwechsel gebildet. Dabei werden nach Desaminierung von Phenylalanin durch Hydroxylierungs- und O-Methylierungsreaktionen die entsprechenden Aldehyde gebildet, aus denen anschließend durch Reduktion die Monolignole *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol entstehen (Baucher et al. 1998; Boerjan et al. 2003). Die Biosynthese der Monomere ist sehr komplex und bis heute nicht abschließend geklärt. In Abbildung 4 wird ein vereinfachter Überblick über den Hauptsyntheseweg gegeben.

Wie in Abbildung 4 zu sehen, erfolgt die Desaminierung von Phenylalanin durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Anschließend kommt es zur Hydroxylierung an Position C4, wodurch *para*-Cumarsäure entsteht. Von diesem Punkt ausgehend können, nach Aktivierung durch Coenzym A, direkt *para*-Cumaraldehyd und *para*-Cumarylalkohol gebildet werden (Boerjan et al. 2003). Durch Hydroxylierungs- und O-Methylierungsreaktionen auf Ebene der aktivierten *para*-Cumarsäure kommt es zur Bildung von Coniferaldehyd, der anschließend direkt zum entsprechenden Alkohol reduziert werden kann (Dixon et al. 2001). Sinapylalkohol entsteht bevorzugt über Hydroxylierung, O-Methylierung und anschließender Reduktion ausgehend von Coniferaldehyd (Dixon et al. 2001). Die hier aufgezeigte Reaktionsabfolge ist der bevorzugte Syntheseweg der drei Hauptmonomere. Daneben können auf allen gezeigten Ebenen jedoch auch Nebenreaktionen erfolgen, was die Komplexität der Biosynthese und die große Anzahl an möglichen Ligninmonomeren nochmals verdeutlicht.

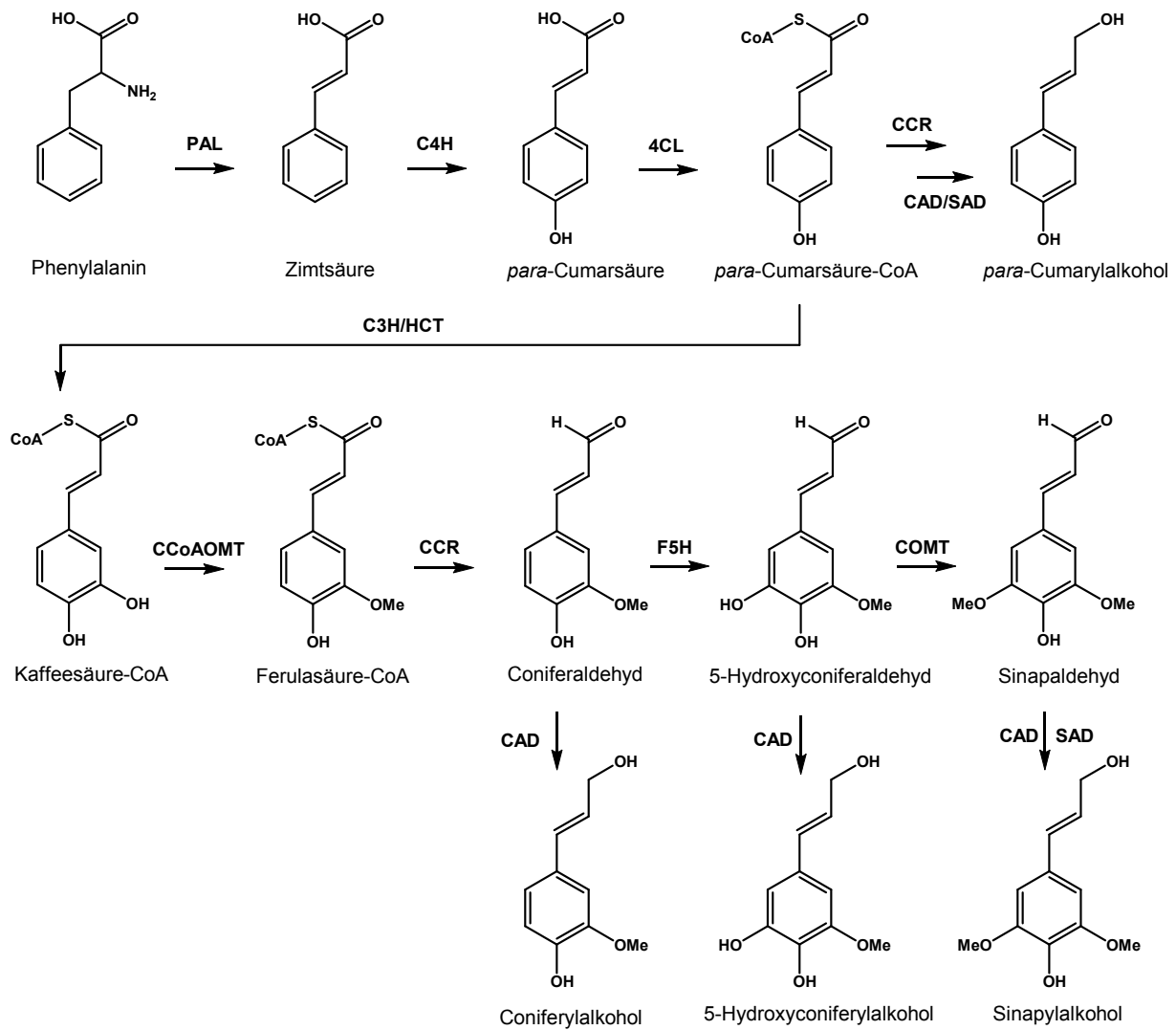


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des Hauptbiosyntheseweges der Monolignole *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol. Daneben können je nach Pflanzenspezies und Biosynthesebedingungen auf allen Stufen Nebenreaktionen stattfinden. CAD, Zimtalkohol-Dehydrogenase; 4CL, 4-Cumarat-CoA-Ligase; C3H, *para*-Cumarat-3-Hydroxylase; C4H, Zimtsäure-4-Hydroxylase; CCoAOMT, Kaffeealkohol-CoA-O-Methyltransferase; CCR, Zimtsäure-CoA-Reductase; COMT, Kaffeesäure-O-Methyltransferase; HCT, *para*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Quinat-Shikimat-*para*-Hydroxyzimtsäuretransferase; F5H, Ferulasäure-5-Hydroxylase; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; SAD, Sinapylalkohol-Dehydrogenase (Boerjan et al. 2003; Ralph et al. 2004b).

1.3.4 Transport der Monomere in die Zelle

Nach der Synthese der Ligninmonomere im Cytosol werden diese entweder zur Zellwand für den Aufbau des Ligninpolymers oder zur Speicherung in die Vakuole transportiert. Generell können die synthetisierten Monolignole frei oder glykosidisch gebunden vorliegen, wobei die genaue Funktion der Glykoside noch nicht endgültig verstanden ist. Es wird angenommen, dass sie hauptsächlich als Speicherform in der Vakuole dienen (Liu et al. 2011; Sibout und Hofte 2012). Auch der Transportmechanismus der Monolignole bzw. deren Glykoside ist noch nicht abschließend geklärt. Für den Transport durch die Zellmembranen werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert: passive Diffusion, Transport über Vesikel/Exocytose oder der Transport über Adenosintriphosphat-abhängige Transporter (Liu et al. 2011; Sibout und Hofte 2012; Vanholme et al. 2010). Die Beteiligung Adenosintriphosphat-abhängiger Transporter scheint insgesamt eine große Rolle im Transportmechanismus der Monolignole zu spielen (Liu et al. 2011). Die These über die Beteiligung von Transportern wird durch die Entdeckung eines Transporters, der spezifisch *para*-Cumarylalkohol durch die Zellmembran transportiert, unterstützt (Alejandro et al. 2012). In welchem Ausmaß weitere Mechanismen beteiligt sind, ist noch weitgehend unbekannt, sodass sich keine Aussagen über den detaillierten Transportmechanismus machen lassen.

1.3.5 Ligninbildung

In der Zellwand werden die Monolignole durch Peroxidasen und H_2O_2 oder auch Laccasen und O_2 zu Phenoxyradikalen dehydrogeniert (Baucher et al. 1998). Die dabei entstehenden Monolignolradikale können zum einen als Radikalüberträger, insbesondere auf Oligomere und/oder Polymere, fungieren. Zum anderen können sie verschiedene radikalische Koppelungsreaktion eingehen, wodurch das Ligninpolymer entsteht bzw. vergrößert wird (Boerjan et al. 2003). Dabei können sie mit weiteren Monomeren dimerisieren, aber auch an Ligninoligomere oder Ligninpolymere koppeln. Die Dimerisierung spielt in fortgeschrittenen Stadien der Lignifizierung in der Regel nur eine untergeordnete Rolle (Ralph et al. 2004b). Durch die Vielzahl der möglichen Bindungspositionen können unterschiedliche Bindungstypen entstehen. Im Allgemeinen sind folgende Kopplungen zu finden: β -O-4-, β -5-, 5-5-, 4-O-5-, β - β - und β -1-Bindungen (Abbildung 5), wobei generell die β -O-4-Bindung den Hauptbindungstyp darstellt (Ralph et al. 2004b).

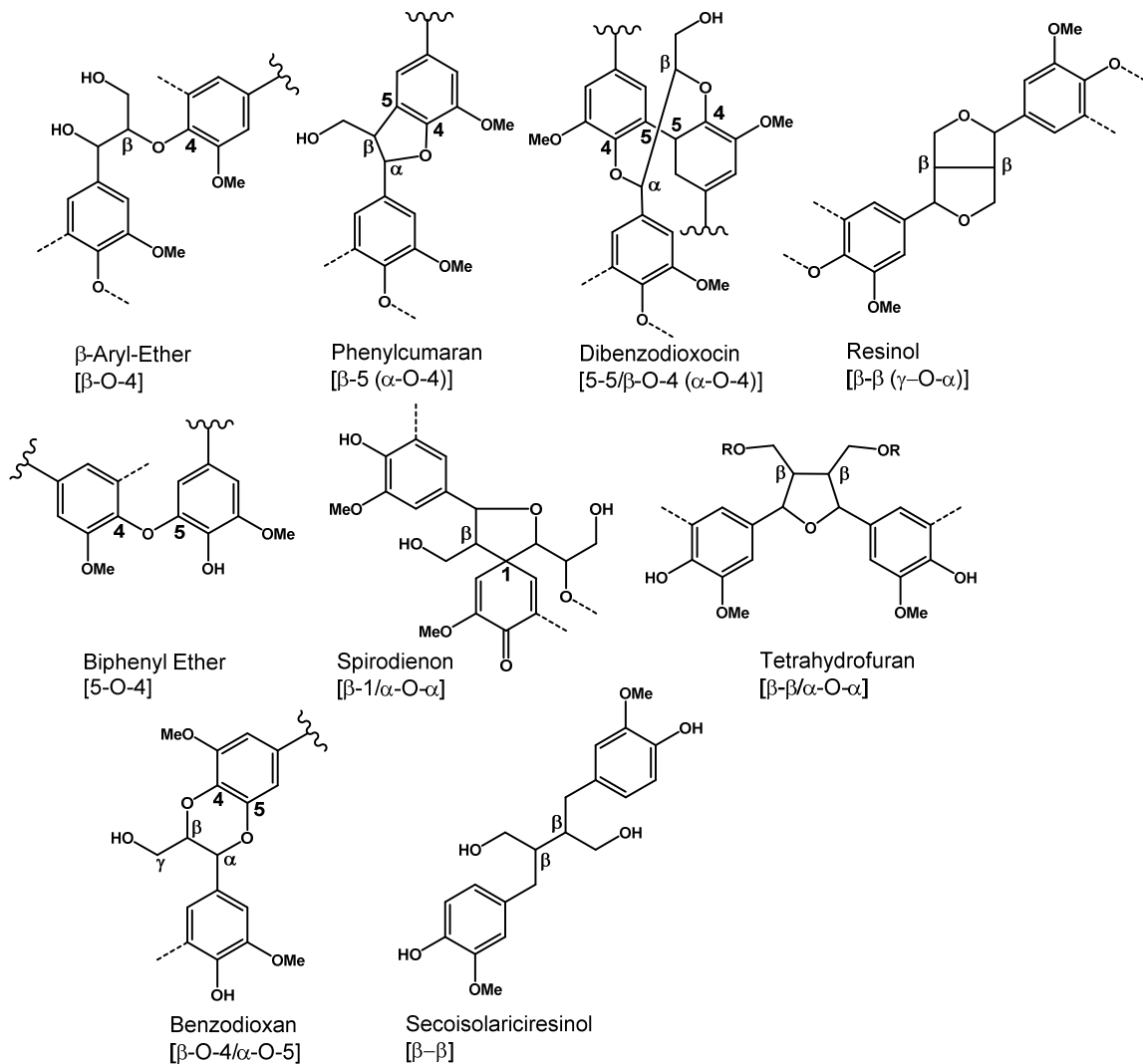


Abbildung 5: Übersicht über mögliche Bindungstypen im Ligninpolymer, die durch radikalische Kopplungsreaktionen entstehen können. Die Benzodioxanstruktur stellt eine Besonderheit dar, da diese nur unter Beteiligung der seltenen Monomere 5-Hydroxyconiferyl- bzw. Kaffeealkohol entstehen kann. R, Acyl-Rest.

Welche Bindungstypen entstehen wird durch die Art und Verfügbarkeit der Monomere sowie durch die Reaktionsbedingungen, z.B. den pH-Wert, bestimmt. So sind z.B. β-5-, 5-5- und 4-O-5-Bindungen weniger in S-reichen Ligninen vorhanden, da Sinapylalkohol in Position C5 eine Methoxygruppe besitzt, wodurch diese Position nicht zur Ausbildung einer Bindung zur Verfügung steht. Des Weiteren entstehen β-β-Bindungen hauptsächlich durch Dimerisierung zweier Monolignole, während 5-5- und auch 4-O-5-Bindungen vermehrt durch Kopplung zweier Oligomere entstehen (Ralph et al. 2004b). Der Reaktionsmechanismus einer Kopplungsreaktion ist beispielhaft für die Bildung von β-O-4-Bindungen in Abbildung 6 gezeigt. Die radikalische Kopplungsreaktion führt zunächst zur Ausbildung eines Chinonmethids, an welches im Zuge der Rearomatisierung Wasser addiert wird. Diese Rearomatisierung kann, je nachdem welcher Bindungstyp gebildet wird, auch durch die Reaktion mit internen Hydroxygruppen erfolgen. Des Weiteren können aber auch

Hydroxygruppen aus Polysacchariden oder Carboxygruppen der Uronsäuren an das Chinonmethid Intermediat addieren, wodurch es zur Ausbildung von Cross-Links zwischen Polysacchariden und Lignin kommen kann (Ralph et al. 2004b).

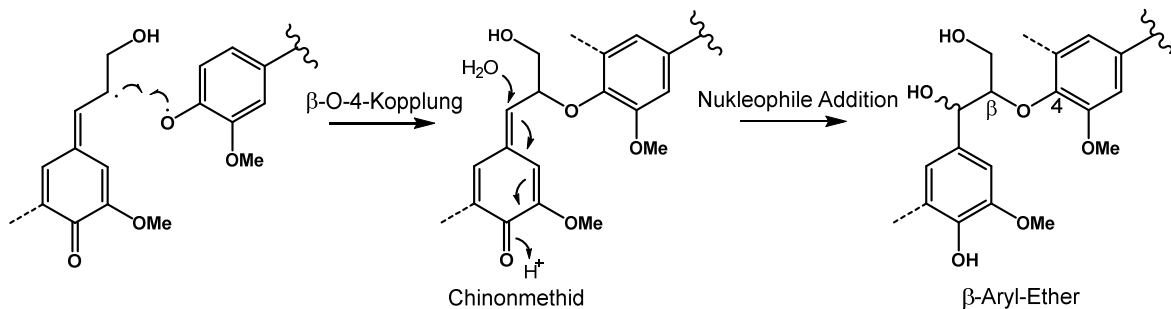


Abbildung 6: Mechanismus der radikalischen β -O-4-Kopplung eines Monolignols an ein Oligomer. Durch Wasseraddition an das entstehende Chinonmethid Intermediat entstehen zwei mögliche Isomere des β -Aryl-Ethers (Ralph et al. 2004b).

Im Rahmen der oben genannten Kopplungsmöglichkeiten gibt es einige Besonderheiten hinsichtlich der dadurch gebildeten Struktureinheiten. Durch β - β -Kopplung zweier Monomere entstehen bevorzugt Resinolstrukturen (Ralph et al. 2004b). Zusätzlich können weitere Struktureinheiten entstehen, die ebenfalls auf einer initialen β - β -Kopplung beruhen. Eine dieser Struktureinheiten stellen Tetrahydrofuranstrukturen dar, die meist durch β - β -Kopplungen von in γ -Position veresterten Monomeren unter Wasseraddition entstehen (Lu und Ralph 2008). Durch die Veresterung der γ -Hydroxygruppe steht diese nicht mehr für die interne Rearomatisierung zur Verfügung, sodass dies durch Wasseraddition an das Chinonmethid erfolgt. Das Vorkommen dieser Struktureinheiten ist zudem ein weiterer Hinweis darauf, dass veresterte Verbindungen als Monomere in das Lignin eingebaut werden und die Veresterung nicht nachträglich geschieht. Eine weitere außergewöhnliche Struktureinheit stellen Secoisolariciresinole dar, die u.a. in Ligninen aus Fichtenholz zu finden sind (Zhang et al. 2003). Wie genau diese Struktureinheit im Verlauf der Lignifizierung gebildet bzw. in das Lignin eingebaut wird, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Die meisten 5-5-gekoppelten Monomereinheiten sind in Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4/ α -O-4) involviert (Argyropoulos et al. 2002; Karhunen et al. 1995a). Diese Einheiten entstehen bevorzugt durch die β -O-4-Kopplung eines Monomers mit einer bereits bestehenden, meist endständigen 5-5-Bindung (Karhunen et al. 1995b).

β -1-gekoppelte Monomereinheiten sind vor allem in Spirodienonstrukturen (β -1/ α -O- α) zu finden. Diese Strukturen entstehen durch die β -1-Kopplung eines Monomers an eine bereits bestehende β -O-4-Struktureinheit und anschließende intramolekulare Rearomatisierung (Ralph et al. 2004b; Zhang et al. 2006). Daneben werden in der Ligninchemie auch immer wieder „klassische“ β -1-Bindungen zwischen zwei Monolignolen beschrieben. Es gilt aller-

dings als wahrscheinlich, dass diese aus der nativ vorliegenden Spirodienonstruktur während der Ligninisolierung und der Aufarbeitung unter sauren Bedingungen entstehen (Ralph und Landucci 2010; Zhang und Gellerstedt 2001; Zhang et al. 2006). Des Weiteren wurden, insbesondere nach der chemischen Spaltung der β -O-4-Bindungen, sogenannte Aryliso-chromanstrukturen (β -1/ α -O-6-Bindung) identifiziert. Diese Struktureinheiten können jedoch ebenfalls aus Dienonstrukturen entstehen, was die These unterstützt, dass Dienonstrukturen nativ vorliegen (Ralph et al. 1998b). Ob dennoch Aryliso-chromanstrukturen und klassische β -1-Bindung zusätzlich in geringen Mengen nativ vorkommen, ist nicht eindeutig geklärt (Ralph et al. 2004b).

Einen seltenen Bindungstyp stellt die Benzodioxanstruktur (β -O-4/ α -O-5-Bindung) dar. Diese wird spezifisch durch die β -O-4-Kopplung von Coniferyl- oder Sinapylalkohol mit 5-Hydroxyconiferylalkohol oder Kaffeealkohol gebildet (Ralph et al. 2001a). Anschließend erfolgt ein interner Ringschluss über die Hydroxygruppe in Position C5 dieser speziellen Monomere. Diese Struktureinheit ist insbesondere in Ligninen aus Pflanzen zu finden, in denen die Aktivität des Schlüsselenzyms zur Umwandlung von 5-Hydroxyconiferylalkohol zu Sinapylalkohol herunterreguliert wurde (Ralph et al. 2004b). Die speziellen Monomere sind jedoch auch natürlich in Ligninen aus Pflanzensamen zu finden, wodurch auch das native Vorkommen der Benzodioxanstrukturen gezeigt werden konnte (Chen et al. 2012).

1.4 Zellwandgebundene Phenolcarbonsäuren – Ausbildung von Zellwand Cross-Links

Hydroxycimtsäuren wie *para*-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure stellen Minorkomponenten der pflanzlichen Zellwand dar. Sie liegen an Zellwandpolymere gebunden vor und spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Cross-Links zwischen Polysacchariden untereinander, aber auch zwischen Polysacchariden und Lignin und/oder Proteinen (Bunzel 2010; Piber und Koehler 2005; Ralph et al. 1995). Die Ausbildung von Cross-Links trägt zur Stabilität und Flexibilität der Pflanzenzellwände bei und nimmt darüber hinaus regulatorische Aufgaben beim Zellwachstum ein (Azuma et al. 2005; Kamisaka et al. 1990). Des Weiteren können sie auch eine Rolle bei der Abwehrreaktion der Pflanzen gegen Insekten und Pilze spielen (Santiago und Malvar 2010). Bei der Ausbildung von Zellwand Cross-Links ist vor allem die Ferulasäure unter Ausbildung von Di-, Tri- und Tetrameren beteiligt. Bei Monokotyledonen liegt sie dabei häufig estergebunden an Arabinoxylane vor, wohingegen sie bei speziellen dikotylen Pflanzen an Pektine gebunden ist (Buanafina 2009; Ishii 1997).

Die Bildung von Ferulasäureoligomeren kann sowohl radikalisch als auch photochemisch erfolgen, wobei letztere eher eine untergeordnete Rolle spielt (Bunzel 2010). Die photochemische Dimerisierung verläuft über eine [2+2]-Cycloaddition, wodurch Cyclobutandimere

entstehen (Ford und Hartley 1990). Die oxidativ verlaufende Kopplungsreaktion führt zur Ausbildung unterschiedlich verknüpfter Ferulasäuredimere oder auch -Oligomere (Abbildung 7). Dabei werden die Monomere über 5-5-, 8-O-4-, 8-8-, 8-5- und 4-O-5-Verknüpfungen gekoppelt (Bunzel 2010; Bunzel et al. 2001; Dobberstein und Bunzel 2010). Bei den 8-5-verknüpften Diferulasäuren (DFS) sind 8-5-cyclische (c), 8-5-nicht-cyclische (nc) und 8-5-decarboxylierte (dc) Formen zu unterscheiden, wobei bekannt ist, dass lediglich die 8-5-c-DFS nativ vorkommt (Bunzel 2010; Bunzel et al. 2000). 8-5-nc- und 8-5-dc-DFS entstehen dagegen während der Probenaufarbeitung aus der 8-5-c-DFS. Daher werden in der Regel die 8-5-verknüpften DFS als Summe angegeben. Des Weiteren ist auch zwischen 8-8-c-, 8-8-nc- und 8-8-Tetrahydrofuran (THF)-DFS zu unterscheiden (Ralph et al. 2004a). Hierbei gilt das native Vorkommen aller drei Formen als wahrscheinlich (Ralph et al. 2004a). Die Strukturen der DFS sind Abbildung 48 A in Kapitel 9.2 dargestellt.

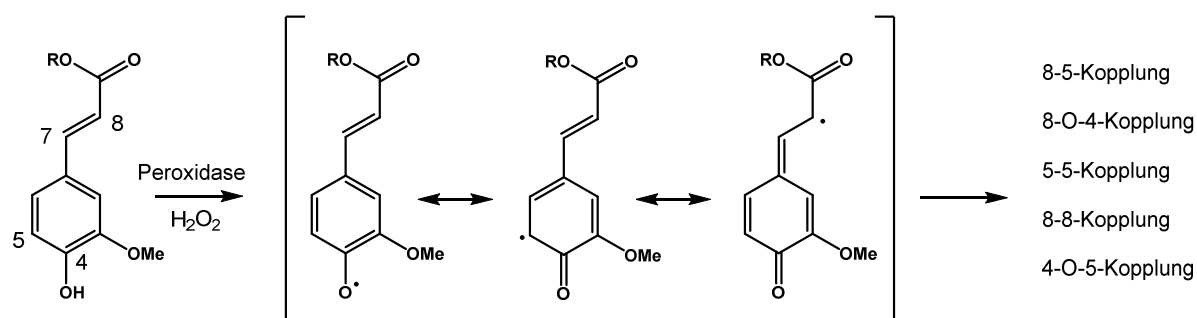


Abbildung 7: Phenoxyradikalbildung von Ferulasäure und deren Resonanzstabilisierung. Durch Kopplung von zwei Phenoxyradikalen können dabei unterschiedliche Bindungen entstehen (Bunzel 2010). Die dabei gebildeten Di-, Tri- und Tetraferulasäuren sind in Abbildung 48 in Kapitel 9.2 dargestellt.

Neben DFS wurde auch das natürliche Vorkommen verschiedener Tri- und Tetraferulasäuren (TriFS, TetraFS) nachgewiesen, wodurch das Ausmaß der Ausbildung von Cross-Links verstärkt wird. Darunter zu finden sind 5-5/8-O-4-TriFS, 8-O-4/8-O-4-TriFS, 8-8-c/8-O-4-TriFS, 8-O-4/8-5-nc-TriFS, 8-8-THF/5-5-TriFS und 8-5-nc/5-5-TriFS sowie 8-O-4/5-5/8-O-4-TetraFS und 8-O-4/5-5/8-5-nc-TetraFS (Strukturen siehe Abbildung 48 B und C, Kapitel 9.2) (Bunzel et al. 2006; Bunzel et al. 2003; Bunzel et al. 2005a; Funk et al. 2005). Der Nachweis von höheren Oligomeren der Ferulasäure lässt vermuten, dass theoretisch auch die Ausbildung von Cross-Links zwischen drei oder vier Polysacchariden möglich ist. Molekulare Modellierungen lassen allerdings vermuten, dass insbesondere 5-5-gekoppelte DFS auch intramolekular entstehen können (Hatfield und Ralph 1999). Die Ausbildung von intramolekularen Dimeren ist zudem auch schon aus sterischen Gründen wahrscheinlich, da die Verknüpfung von drei oder vier Polysacchariden durch ausschließlich intermolekulare Kopplungen sterisch eher unwahrscheinlich, wenn auch möglich, ist. Dadurch könnte das Ausmaß von intermolekularen Cross-Links auch in Anwesenheit von Tri- und Tetrameren geringer ausfal-

len als theoretisch möglich. Die Frage, inwiefern die Verknüpfung von mehreren Polysacchariden durch Ferulasäureoligomere stattfindet, ist noch nicht abschließend geklärt. Unumstritten ist jedoch, dass die Ausbildung von TriFS und TetraFS zusammen mit DFS maßgeblich zu einer Vernetzung der Zellwandkomponenten beiträgt.

Ferulasäure spielt zudem eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung von Zellwand Cross-Links zwischen Polysacchariden und Lignin (Ralph 2010). Ferulasäure kann dabei sowohl über Etherbindungen als auch über Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen an Ligninmonomere gebunden sein. Für die Ausbildung von Cross-Links kommen mechanistisch gesehen zwei unterschiedliche Reaktionen in Frage: Zum einen können Cross-Links über die nukleophile Addition der phenolischen Hydroxygruppe der Ferulasäure an ein während der Lignifizierung entstandenes Chinonmethid ausgebildet werden, wodurch α -Ether entstehen (Ralph et al. 2004a). Zum anderen kann die Ferulasäure auch über radikalische Kopplungsreaktionen an Ligninmonomere koppeln (Ralph et al. 2004a). Modell-Studien zeigten, dass die Beteiligung an radikalischen Kopplungsreaktionen ausgehend von der phenolischen Hydroxygruppe der Ferulasäure an die β -Position eines Monolignols, aber auch ausgehend von der 8-Position der Ferulasäure möglich ist (Grabber et al. 2002; Ralph et al. 1992). Die Beteiligung der Ferulasäure an radikalischen Kopplungsreaktionen mit Ligninmonomeren *in vivo* konnte durch die Identifizierung von Ferulasäure-Monolignol-Dimeren bestätigt werden (Bunzel et al. 2004; Jacquet et al. 1995; Ralph et al. 1995). Hierbei konnten vor allem β -Ether und 8- β -Kopplungen nachgewiesen werden, was bestätigt, dass Ferulasäure aktiv an Lignin gekoppelt werden kann. Zusätzlich ist theoretisch auch die radikalische Kopplung von DFS an Lignin möglich (Grabber et al. 2000; Quideau und Ralph 1997).

1.5 Zellwandbestandteile als Ballaststoffe

Pflanzliche Lebensmittel stellen eine wichtige Aufnahmequelle für Ballaststoffe dar, da die Hauptbestandteile der pflanzlichen Zelle, wie Polysaccharide und Lignin, zum Ballaststoffkomplex gezählt werden. In der Literatur existieren verschiedene Ballaststoffdefinitionen. Laut der Definition der American Association of Cereal Chemists International (AACCI) von 2001 handelt es sich bei Ballaststoffen um essbare Pflanzenteile oder analoge Kohlenhydrate, die im Dünndarm des Menschen weder verdaut noch adsorbiert und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden. Hierzu zählen, Polysaccharide, Oligosaccharide, Lignin und andere assoziierte Pflanzensubstanzen wie Wachse oder Cutin. Des Weiteren fördern Ballaststoffe, laut dieser Definition, bestimmte positive physiologische Eigenschaften wie die Regulierung des Cholesterin- und/oder des Blutglucosespiegels und besitzen abführende Eigenschaften (AACCI 2001). Die Ballaststoffdefinition des Codex Alimentarius von 2010 definiert Ballaststoffe als Kohlenhydratpolymere mit drei oder mehr Monomereinheiten, die im menschlichen Dünndarm enzymatisch nicht hydrolysiert werden. Zusätzlich erlaubt sie

nationalen Behörden, Kohlenhydratpolymere mit drei bis neun Monomereinheiten als Ballaststoffe zu klassifizieren. Neben essbaren, natürlich vorkommenden Kohlenhydratpolymeren (inklusive Lignin und weiteren mit Polysacchariden assoziierten Substanzen) werden auch durch physikalische, enzymatische oder chemische Behandlung gewonnene sowie synthetisch hergestellte Kohlenhydratpolymere mit nachweislich positiven physiologischen Wirkungen in die Definition mit eingeschlossen (Codex Alimentarius 2010).

Ballaststoffe werden mit einer Reihe von ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften, wie z.B. Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen sowie Senkung des Blutglucosespiegels und des Krebsrisikos, assoziiert (Slavin 2013). Diese Eigenschaften sind allerdings stark abhängig von Ballaststoffgehalt und -art sowie von der Struktur der betrachteten Komponenten und deren Zusammenspiel untereinander. Lösliche Ballaststoffe (LBS) besitzen ein gutes Wasserbindungs- und Quellvermögen, wodurch sie zu einem schnelleren Sättigungsgefühl beitragen können (Plaami 1997). Zudem sinkt durch die erhöhte Viskosität des Nahrungsbreis die Zugänglichkeit von bestimmten Verdauungsenzymen zu ihren Substraten und Nährstoffe können weniger effektiv aufgenommen werden. Dies kann sich auf den Blutglucosespiegel auswirken, da Glucose langsamer und über einen längeren Zeitraum aufgenommen wird (Asp et al. 1993). In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen wird vor allem die Regulierung des Blutcholesterinspiegels durch viskose LBS diskutiert (McDougall et al. 1996; Plaami 1997). Cholesterin wird u.a. zur Synthese von Gallensäuren verwendet. Gallensäuren stellen Emulgatoren dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Fettverdauung. Gallensäuren werden in das Duodenum abgegeben und nach Erfüllung ihrer physiologischen Funktion im Ileum normalerweise sehr effektiv rückresorbiert. Durch die erhöhte Viskosität des Nahrungsbreis wird die Rückresorption jedoch teilweise gehemmt, sodass vermehrt Gallensäuren aus Cholesterin synthetisiert werden, wodurch der Serumcholesterinspiegel sinkt (Superko et al. 1988; Turner et al. 1990). Ein weiterer Mechanismus, der in diesem Zusammenhang diskutiert wird ist, dass die durch mikrobielle Fermentation im Dickdarm entstehenden kurzkettigen Fettsäuren eine Cholesterin-reduzierende Wirkung haben, da sie die Cholesterinsynthese *in vitro* hemmen können (Wright et al. 1990). Dieser Mechanismus wird jedoch mittlerweile aufgrund der wenig vorhandenen *in vivo* Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen stark hinterfragt (Gunnness und Gidley 2010; Theuwissen und Mensink 2008).

Unlösliche Ballaststoffe (UBS) werden dagegen in Bezug auf die Senkung des Krebsrisikos diskutiert (Harris und Ferguson 1993; Harris und Ferguson 1999). Ballaststoffe werden im Dünndarm nicht verdaut und gelangen so intakt in den Dickdarm. Dort erfolgt deren Fermentation durch die bakterielle Mikrobiota, wodurch u.a. kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat entstehen. Diese senken den pH-Wert im Kolon, hemmen so das Wachstum pathogener Bakterien und fördern gleichzeitig das Wachstum von Mikroorganis-

men, die als positiv zu bewertende Vertreter der Darmmikrobiota gelten (Slavin 2013). Vor allem die Bildung von Butyrat soll Dickdarmkrebs-protektiv wirken, da es in Zellkulturstudien die Proliferation von Kolonkarzinomzellen hemmt und deren Apoptose fördert (Hague et al. 1993; Heerdt et al. 1994). Das Ausmaß der Fermentation und die Art der entstehenden Fermentationsprodukte sind von der Art und Struktur der Ballaststoffe abhängig. So werden z.B. LBS häufig stärker und schneller fermentiert als UBS (Plaami 1997). Der oft vorhandene hohe Anteil an Cellulose in den UBS reduziert das Fermentationsausmaß, da Cellulose zum einen nicht vollständig, wenn überhaupt, fermentiert wird und zum anderen die Fermentation der anderen Polysaccharide, die mit der Cellulose in einem engen Netzwerk vorliegen, erschwert (Leschine 1995; Slavin et al. 1981). Des Weiteren kann auch Lignin die Geschwindigkeit bzw. das Ausmaß der Ballaststofffermentation reduzieren (Funk et al. 2007a). Cross-Links zwischen Zellwandpolymeren wird ebenfalls ein Einfluss auf die Reduzierung der Fermentationsgeschwindigkeit von Ballaststoffen zugeschrieben, wobei der genaue Effekt, insbesondere *in vivo*, nicht eindeutig anhand der Literaturdaten bewertet werden kann (Funk et al. 2007b; Grabber et al. 1998; Grabber et al. 2009). Die Fermentation von Polysacchariden erfolgt in der Regel im proximalen Bereich des Kolons. Die reduzierte Geschwindigkeit der Ballaststofffermentation kann zu einer Verlagerung der Fermentation in den distalen Bereich des Kolons führen. Im distalen Kolonabschnitt findet normalerweise verstärkt die Proteinfermentation statt, wodurch unerwünschte, teilweise toxische Verbindungen wie Ammoniak oder Thiole entstehen (Blaut 2002). Diese werden in Zusammenhang mit der Entstehung von Dickdarmkrebs gebracht, der häufig im distalen Kolonabschnitt auftritt. *In vitro* Studien zeigten, dass eine verstärkte Fermentation von Oligo- und Polysacchariden zu einem Rückgang der Proteinfermentation führte (Vince und Burrige 1980; Vince et al. 1990). Die verlangsamte Ballaststofffermentation könnte daher zu einer Unterdrückung der Proteinfermentation im distalen Kolon führen, was als Dickdarmkrebs-protektiv diskutiert wird. Ein weiterer diskutierter, protektiver Mechanismus in Bezug auf ein vermindertes Krebsrisiko ist die Adsorption von kanzerogenen Substanzen durch UBS, insbesondere durch Lignin (Ferguson und Harris 1996; Harris und Ferguson 1993; Harris und Ferguson 1999). Eine bekannte Gruppe von potentiell kanzerogenen Verbindungen stellen die heterocyclischen aromatischen Amine (HAAs) dar, die besonders in stark erhitztem Fleisch und Fisch zu finden sind. HAAs sind aufgrund ihres mutagenen und kanzerogenen Potentials von gesundheitlicher Bedeutung. Voraussetzung für diese Wirkungen ist die metabolische Aktivierung der HAAs, die vorwiegend nach Absorption aus dem Dünndarm in der Leber verläuft. Die primäre Aminogruppe wird während des Phase I Metabolismus zum N-Hydroxylamin umgesetzt. Während des Phase II Metabolismus kommt es zur Konjugation an der eingeführten Hydroxygruppe, insbesondere zu Veresterungen durch Acetyltransferasen oder Sulfatasen. Durch heterolytische Spaltung dieser instabilen Ester entstehen hochreaktive Nitreniumionen, die in der Lage sind

DNA-Addukte zu bilden (Turesky und Le Marchand 2011). Das Ausmaß der Adsorption der HAAs im Dünndarm kann durch die Nahrungsmatrix beeinflusst werden. Dabei steht vor allem die Adsorption der HAAs an Ballaststoffe im Fokus, wofür insbesondere die Adsorption an Lignin verantwortlich gemacht wird (Ferguson und Harris 1996; Funk et al. 2007a; Funk et al. 2006; Harris et al. 1996). In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl der Ligningehalt als auch die Ligninstruktur maßgebliche Faktoren für das Ausmaß der Adsorption sind. Des Weiteren ist auch die Hydrophobizität der HAAs für deren Adsorption an lignifizierte Ballaststoffe von Bedeutung. Dabei wurde festgestellt, dass mit steigender Hydrophobizität der HAAs und mit steigenden Ligningehalten die Adsorption der HAAs begünstigt wurde (Funk et al. 2007a; Funk et al. 2006). In Bezug auf den Einfluss der Ligninzusammensetzung wurde gezeigt, dass hydrophobere HAAs besser an G-reiche Lignine und weniger hydrophobe HAAs besser an S-reiche Lignine adsorbiert werden (Funk et al. 2006). Ein Effekt von arabinoxylangebundener Ferulasäure oder Ferulasäure Cross-Links auf die Adsorption von HAAs konnte dagegen nicht festgestellt werden (Funk et al. 2006).

Insgesamt muss bei der Bewertung von gesundheitsfördernden Eigenschaften durch Ballaststoffe allerdings immer beachtet werden, dass Ballaststoffe nicht als Einzelkomponenten vorliegen, sondern immer im Komplex mit der gesamten Lebensmittelmatrix. Zwar werden unterschiedliche Mechanismen für einzelne Ballaststoffbestandteile diskutiert, der resultierende Effekt *in vivo* ist jedoch viel komplexer, da sich die einzelnen Ballaststoffkomponenten untereinander beeinflussen können und auch immer Interaktionen mit anderen Lebensmittelmatrixkomponenten stattfinden.

1.6 Einfluss der pflanzlichen Zellwand auf die Textur pflanzlicher Lebensmittel

Die Textur stellt einen wichtigen Qualitätsparameter von pflanzlichen Lebensmitteln dar und wird maßgeblich von der Zusammensetzung der Zellwand bestimmt (Van Buren 1979). Zellwände von pflanzlichen Lebensmitteln sind kontinuierlichen Veränderungsprozessen sowohl während des Wachstum bzw. der Reifung am Baum/im Boden als auch während der Reifung nach der Ernte unterlegen. Dabei sind das Ausmaß und die Art der Änderungen stark abhängig von Faktoren wie Pflanzenart und Umwelt- oder Lagerbedingungen.

Reife- und lagerbedingte Veränderungen der Zellwände von Obst sind vergleichsweise umfangreich beschrieben (Brummell 2006; Prasanna et al. 2007). Die Reifung von Obst ist von einer Reihe von Prozessen begleitet, die das Obst weicher und matschiger werden lassen. Dies geht vor allem auf den Abbau von Pektinen der Primärwand und Mittellamelle zurück, der durch Enzyme wie *endo*-Polygalacturonasen, Methylesterasen, β -Galactosidasen und α -Arabinofuranosidasen katalysiert wird (Deytieux-Belleau et al. 2008; Tateishi 2008). Vor al-

lem der enzymatische Abbau von Galactanen- und/oder Arabinanen der Pektine ist ein Merkmal der Fruchtreifung (Gross und Sams 1984; Tateishi 2008). Des Weiteren spielen aber vermutlich auch der Abbau von Homogalacturonanen und die Spaltung der teilweise vorliegenden Methylester eine Rolle in der Texturveränderung (Brummell 2006). Diese strukturellen Änderungen führen zu einem teilweisen Abbau der Pektinstrukturen, wodurch es zum Ablösen der Zellen untereinander kommt, was, zusammen mit weiteren Faktoren wie z.B. einem sinkenden Turgordruck, zu einem Weichwerden der Früchte führt.

Des Weiteren wird bei der Reifung häufig auch ein Abbau von Xyloglucanen beobachtet, der verstärkt in der frühen Reifungsphase abläuft (Wakabayashi 2000). Wie bereits beschrieben spielen Xyloglucane eine wichtige Rolle beim Aufbau der Zellwandmatrix und tragen daher zur Architektur und Stabilität der Zellwand bei. Durch den Abbau von Xyloglucanen wird das Cellulose-Xyloglucan-Netzwerk gelockert. Außerdem kann es, auch teilweise ausgelöst durch den steigenden Anteil an löslichen Pektinen, zu einer Aufquellung der Zellwände kommen (Brummell 2006).

Im Gegensatz zu Obst wird Gemüse während bzw. nach der Reifung oft mit den Attributen fest, faserig und auch holzig beschrieben. Dies wird vor allem auf die Einlagerung von Lignin in die Sekundärzellwand, die nach Beendigung des Zellwachstums auf die Primärzellwand aufgelagert wird, zurückgeführt. Nach der Ernte kann es zudem zusätzlich zu einer verstärkten Lignineinlagerung als Antwort auf Verwundungsprozesse kommen (Waldron et al. 2003). Lignin beeinflusst daher maßgeblich die Textur von pflanzlichen Lebensmitteln, insbesondere von Gemüse. Allerdings ist auch in einigen Früchten, wie z.B. in Steinzellen von Birnen, die ebenfalls aus verdickten Sekundärzellwänden bestehen, Lignin in größeren Anteilen zu finden. Dadurch können die Früchte mit fortschreitender Reifung ein Art „sandige“ Textur aufweisen (Yan et al. 2014). Eine erhöhte Festigkeit lässt sich aber nicht immer zwangsläufig nur auf einen steigenden Ligningehalt zurückführen. Für Spargel konnte z.B. gezeigt werden, dass die Textur des mittleren Spargelabschnitts während der Lagerung nicht verfestigt wird, obwohl sich in diesem Abschnitt der höchste Ligningehalt im Vergleich zu den anderen Abschnitten befand (Rodriguez et al. 1999a). Einen zusätzlichen Einfluss auf die Textur könnte somit neben dem Ligningehalt auch die Ligninstruktur ausüben.

Ein weiterer Faktor, der sowohl während des Wachstums bzw. der Reifung als auch nach der Ernte bei der Lagerung eine Rolle in der Ausbildung der Textur von pflanzlichen Lebensmitteln spielt, sind Zellwand Cross-Links. Dabei wird vor allem der Einfluss von Cross-Links auf die Festigkeit diskutiert. Für Spargel wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Zellwand Cross-Links und einer Verfestigung der Textur besteht (Jaramillo et al. 2007; Rodriguez-Arcos et al. 2002; Rodriguez-Arcos et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). Dass Cross-Links über Ferulasäureoligomere eine Rolle in der Texturausbildung spielen, zeigt sich

auch darin, dass sie die thermische Stabilität der Textur beeinflussen können, d.h. dass sie das thermisch bedingte Erweichen verlangsamen können (Ng et al. 1998; Waldron et al. 1997).

Die verschiedenen Bestandteile der Zellwand können somit in unterschiedlichem Ausmaß die Textur eines pflanzlichen Lebensmittels bestimmen. Ausschlaggebend ist dabei nicht nur das Vorkommen einzelner Komponenten, sondern auch das Wechselwirken aller Bestandteile untereinander.

2 Fragestellung

Die pflanzliche Zellwand stellt ein komplexes, dynamisches System dar. Sie ist aus strukturell unterschiedlichen Polymeren zusammengesetzt, deren Anteile und Strukturen sich während der Lagerung bzw. Reifung verändern können. Das Verständnis der lager- und reifebedingten Veränderungen setzt eine detaillierte Charakterisierung der Zellwandpolymere voraus. Da pflanzliche Lebensmittel einen wichtigen Teil in der menschlichen Ernährung darstellen, ist die Kenntnis der Zusammensetzung der zum Ballaststoffkomplex gehörenden Zellwandpolymere von besonderer Bedeutung. Ballaststoffe setzen sich vorwiegend aus den Hauptbestandteilen der pflanzlichen Zellwand zusammen und können daher erheblich in ihren Gehalten und Strukturen der einzelnen Nichtproteinpolymere der Zellwand variieren. Die Unterschiede gehen nicht nur auf unterschiedliche Pflanzenspezies zurück, sondern können auch durch das Alter der Pflanze oder Umweltfaktoren beeinflusst werden. Ballaststoffen werden eine Reihe von ernährungsphysiologisch positiven Eigenschaften zugeschrieben, die abhängig von der Zusammensetzung der Ballaststoffkomponenten sowie deren Interaktionen sind. So hat die Polysaccharidzusammensetzung u.a. Einfluss auf das Ausmaß der Fermentation der Ballaststoffe im Dickdarm sowie auf die Art der dabei entstehenden Produkte. Auch der Ligningehalt kann die Fermentationsrate stark beeinflussen. Lignifizierte Ballaststoffe werden zudem mit einer verminderten Tumorinzidenz durch die Adsorption von potentiellen Kanzerogenen wie z.B. heterocyclischen aromatischen Aminen in Verbindung gebracht. Das Ausmaß der Adsorption durch lignifizierte Ballaststoffe ist stark abhängig von dem Ligningehalt, aber auch von der Zusammensetzung des Ligninpolymers. Die Interaktionen einzelner Ballaststoffkomponenten durch z.B. Ausbildung von Cross-Links zwischen den Polymeren der Zellwand können ebenfalls Einfluss auf potentielle ernährungsphysiologische Eigenschaften haben. In vielen Studien, die den Zusammenhang zwischen der Ballaststoffaufnahme und den ernährungsphysiologischen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus beschreiben, werden Ballaststoffe vereinfacht dargestellt. Die komplexen Strukturen der Komponenten werden dabei oft stark vernachlässigt. Um die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen besser beurteilen zu können, ist eine detaillierte Charakterisierung aller Ballaststoffkomponenten notwendig. Für Gemüse gibt es in der Literatur nur wenige Daten zur Charakterisierung von Ballaststoffkomponenten. Zudem beschäftigen sich vorhandene Publikationen oft vorwiegend mit der Charakterisierung einzelner Zellwandbestandteile, wodurch das komplexe Zusammenspiel aller Ballaststoffkomponenten vernachlässigt wird.

Pflanzliche Zellwände spielen zudem eine wichtige Rolle für die Qualität von Obst und Gemüse, da sie deren Textur maßgeblich beeinflussen. Ausschlaggebend sind hierfür sowohl

einzelne Zellwandkomponenten als auch deren Vernetzungen untereinander. Durch vor- und nacherntephysiologische Prozesse kann es einhergehend mit Veränderungen der Zellwandkomponenten zu einer Veränderung der Textur kommen. Dies ist bei Früchten im Allgemeinen durch das Weichwerden während der Reifung charakterisiert. Die dabei ablaufenden Prozesse der Zellwandumstrukturierung sind vergleichsweise gut beschrieben. Im Gegensatz dazu wird die Textur von Gemüse im Verlauf der Reifung bzw. Lagerung oft als härter, faseriger und holziger beschrieben. Daten zu Veränderungen der Zellwandkomponenten, mit denen die festgestellten Texturveränderungen chemisch beschrieben werden können, sind jedoch kaum vorhanden.

Insgesamt spielt die Charakterisierung der Zellwandkomponenten sowohl aus ernährungsphysiologischer Sicht als auch aus Sicht der sensorischen Qualität pflanzlicher Lebensmittel eine wichtige Rolle. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der Charakterisierung der Zellwandkomponenten unterschiedlicher Gemüsesorten (Spargel, Brokkoli, Kohlrabi, Radieschen und Karotten). Die Charakterisierung sollte insbesondere die Bestimmung und die detaillierte Strukturbeschreibung der einzelnen Zellwandpolysaccharide sowie die quantitative und qualitative Strukturanalyse von Ligninen umfassen. Da die existierenden Methoden zur Charakterisierung von Ligninen nur schwer bzw. nicht auf gering lignifizierte Gewebe anwendbar sind, sollten in diesem Bereich methodische Verbesserungen eingeführt werden. Darüber hinaus lag ein Augenmerk auf potentiellen phenolischen Cross-Links zwischen Zellwandpolysacchariden untereinander sowie zwischen Polysacchariden und Ligninen. Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit, die während der Reifung und Lagerung dieser Gemüsesorten stattfindenden Veränderungen zu beschreiben. Zur Beschreibung der Zellwandpolymere und deren lager- und reifebedingten Veränderungen sollten Spargel und Brokkoli bei 20°C und 1°C für unterschiedliche Zeiträume gelagert werden. Radieschen, Kohlrabi und Karotten sollten zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet werden. Die Lager- und Anbauversuche wurden in Kooperation mit dem Max Rubner-Institut, Karlsruhe, Abteilung für Sicherheit und Qualität von Obst und Gemüse durchgeführt. Neben der chemischen Analyse der Zellwandkomponenten sollte auch in den Grundzügen eine sensorische Beschreibung der Proben erfolgen. Da viele Methoden der Polymeranalyse mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen behaftet sind, sollten für eine möglichst umfassende Strukturcharakterisierung der Komponenten unterschiedliche spektroskopische und chromatographische Methoden angewendet werden. Da für die Quantifizierung von Ligninen dieselben Einschränkungen gelten wie für die Strukturcharakterisierung von Zellwandpolymeren, sollten auch hier unterschiedliche Methoden Anwendung finden, um neben qualitativen auch die quantitativen Veränderungen in der Zellwand möglichst umfangreich abzubilden.

3 Material und Methoden

3.1 Ausgangsmaterialien

Als Probenmaterialien standen Spargel, Brokkoli, Radieschen, Kohlrabi und Karotten zur Verfügung. Spargel und Brokkoli wurden für die Lagerungsversuche direkt nach der Ernte bei 1°C und 20°C für unterschiedliche Zeiträume am Max Rubner-Institut (Karlsruhe) gelagert. Radieschen, Kohlrabi und Karotten wurden im Gewächshaus am Max Rubner-Institut (Karlsruhe) angebaut. Die erste Ernte erfolgte in etwa zum Zeitpunkt der optimalen Reife. Die weiteren Ernten erfolgten nach unterschiedlichen Reifungszeiträumen. Nach jeder Probennahme wurden die Proben anhand verschiedener Attribute bezüglich Konsistenz und Geschmack sensorisch beurteilt. Hierbei stand ein Panel von mindestens fünf Prüfern zu Verfügung. Die Bewertung erfolgte auf einer Skala von 1 (nicht vorhanden) bis 10 (stark vorhanden). Für die chemischen Analysen wurden die Proben teilweise geschält (abhängig von der Probe), zerkleinert, gefriergetrocknet und gemahlen (<0,5 mm). Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte aus der Differenzwägung vor und nach der Gefriertrocknung.

3.1.1 Spargel (*Asparagus officinalis* L., Sorte Backlim)

Die erste Probennahme erfolgte direkt nach dem Erwerb (Huber-Hof, Iffezheim) im Sommer 2013 (0 Tage). Anschließend wurden die Proben für 7, 14, 21 und 28 Tage bei 1°C (60-80% relative Luftfeuchtigkeit) bzw. für 3 und 7 Tage bei 20°C (ca. 80% relative Luftfeuchtigkeit) gelagert. Für die sensorische Bewertung wurde der Spargel geschält, die untersten 0,5 mm entfernt, der Rest in 2 cm Stücke geschnitten und die Spitze verworfen. Anschließend wurden die Spargelstücke 6 min gekocht und nach 5 min Abkühlen verkostet. Für die chemischen Analysen wurden ebenfalls geschälte Spargelstangen verwendet.

3.1.2 Brokkoli (*Brassica oleracea* var. *italica*, Sorte Ironman)

Die erste Probennahme des Brokkolis fand ebenfalls direkt nach dem Erwerb (Queckbrunnenerhof, Schifferstadt) im Sommer 2014 (0 Tage) statt. Anschließend erfolgte die Lagerung für 7, 14 und 28 Tage bei 1°C bzw. 7 und 9 Tage bei 20°C. Die sensorische Bewertung erfolgte vom Brokkolistrunk, der vor der Verkostung in 2 cm Stücke geschnitten, für 4 min gekocht und anschließend 4 min abgekühlt wurde. Da vor allem die Röschen der Proben nach der Lagerung bei 20°C für 9 Tage verschimmelt waren, wurden diese Proben nicht sensorisch bewertet. Für die chemischen Analysen wurde ebenfalls der Brokkolistrunk verarbeitet.

3.1.3 Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*, Sorte Delikatess Weißer)

Kohlrabi wurde im Sommer 2014 im Gewächshaus ausgesät. Die erste Probennahme erfolgte 14 Wochen nach Aussaat, anschließend wurden jeweils nach 3, 6, 9 und 15 Wochen die weiteren Proben geerntet. Die Ernte erfolgte von zuvor für die jeweiligen Ernten im Gewächshaus festgelegten Reihen. Für die sensorische Bewertung und die chemischen Analysen wurden die Kohlrabiprüfproben dünn geschält und im rohen Zustand verwendet.

3.1.4 Radieschen (*Raphanus sativus* var. *sativus*, Sorte Saxa 3)

Die Aussaat der Radieschen erfolgte Anfang 2015. Die erste Probennahme erfolgte 8 Wochen nach der Aussaat. Die weiteren Proben wurden 3, 6, 9,5 und 11,5 Wochen nach der ersten Ernte geerntet. Für die Sensorik und die chemischen Analysen wurden die Radieschen im rohen Zustand verwendet. Die letzte Ernte war aufgrund sehr starker Verholzung nicht mehr sensorisch zu testen.

3.1.5 Karotten (*Daucus carota*, Sorte Nantasie 2)

Die Aussaat der Karotten erfolgte im Frühjahr 2014. 26 Wochen nach der Aussaat wurden die ersten Proben geerntet. Die weiteren Probennahmen erfolgten 3 und 9 Wochen nach der ersten Ernte. Für die Sensorik und die chemischen Analysen wurden die Karotten ungeschält und im rohen Zustand verwendet.

3.2 Ballaststoffbestimmung und -isolierung

Bei der Ballaststoffbestimmung wird grundsätzlich zwischen enzymatisch-chemischen und enzymatisch-gravimetrischen Methoden unterschieden (Asp 1987). Zu den enzymatisch-chemischen Methoden zählen dabei die Englyst- und die Uppsala-Methode. Bei beiden Methoden erfolgt zunächst ein enzymatischer Stärkeabbau mittels Amylase und Amyloglucosidase. Anschließend erfolgt, nach Ausfällung der löslichen Ballaststoffe mit Ethanol, die chemische Analyse des Rückstandes zur Bestimmung des Ballaststoffgehaltes. Die Uppsala-Methode schließt dabei sowohl die chromatographische Bestimmung der neutralen Monosaccharide nach saurer Hydrolyse der Polysaccharide, als auch die photometrische Uronsäurebestimmung und die gravimetrische Ligninbestimmung (Klason-Lignin) mit ein (Theander et al. 1995). Bei der Englyst-Methode werden stattdessen nur Nicht-Stärke-Polysaccharide bestimmt (Englyst et al. 1994). Da die Definition von Ballaststoffen jedoch neben den Nicht-Stärke-Polysacchariden auch weitere unverdaubare Bestandteile wie Lignin und zellwandassoziierte Substanzen sowie auch synthetisch hergestellte und modifizierte Kohlenhydrate mit einem positiven ernährungsphysiologischen Effekt einschließt, wird insbesondere mit letzterer Methode der Ballaststoffgehalt unterschätzt. Die chemischen Methoden

zur Ballaststoffbestimmung sind daher insgesamt besser zur Charakterisierung von Ballaststofffraktionen geeignet als für die Bestimmung des Ballaststoffgehaltes.

Für die enzymatisch-gravimetrischen Methoden, die heutzutage meistens Anwendung für die analytische Ballaststoffbestimmung finden, gibt es eine Reihe von offiziellen Methoden der Association of Analytical Chemists (AOAC). Modifikationen der Standardmethoden waren notwendig, da sich die Ballaststoffdefinition im Laufe der Jahre immer wieder geändert hat und daher die Methoden auf die zu erfassenden Ballaststoffkomponenten angepasst werden mussten. So wurde die ursprüngliche AOAC Methode 985.29 u.a. auf die Mitbestimmung von Fructanen, resistenter Stärker und Maltodextrinen erweitert (McCleary et al. 2013). Das Prinzip aller Methoden beruht auf einem enzymatischen Stärkeabbau mittels α -Amylase und Amyloglucosidase sowie einer Proteinhydrolyse mittels Protease. Die meisten Methoden verwenden dabei eine thermostabile α -Amylase, die jedoch auch resistente Stärke hydrolysiert. Der Rückstand kann anschließend als UBS ausgewogen werden. Die LBS werden mittels 80%-igem Ethanol ausgefällt und ebenfalls ausgewogen. Die aktuelle AOAC Methode 2009.01 beinhaltet zudem die Bestimmung der niedermolekularen löslichen Ballaststoffe (NMLBS). Hierbei handelt es sich um nicht-verdaubare Oligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad von ≥ 3 , die ebenfalls als Ballaststoffkomponenten gelten, jedoch oft nicht durch Ethanol ausgefällt werden (McCleary et al. 2010). Die Bestimmung erfolgt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer Kationen-Austauscherphase (Sugar-Pak) und gekoppeltem Brechungsindexdetektor (RI). Dies stellt eine vergleichsweise unspezifische Methode dar, da die genaue Herkunft und Art der NMLBS nicht bestimmt werden können. So kann z.B. ein unvollständiger Stärkeverdau, verbunden mit der Bildung von Maltooligosacchariden, zu einer Überschätzung dieser Fraktion führen. Diese Methode verwendet zudem eine Pankreas α -Amylase, um die physiologischen Bedingungen im menschlichen Dünndarm zu imitieren. Ein Vorteil der Verwendung dieser Amylase ist es, dass diese die Bestimmung von resistenter Stärke erlaubt (McCleary et al. 2013). Weitere Anpassungen dieser Methode haben realere Inkubationszeiten mit α -Amylase und Amyloglucosidase, um die Transitzeit im menschlichen Dünndarm besser zu imitieren, zum Gegenstand (McCleary et al. 2015). Die analytische Bestimmung der Ballaststoffgehalte der hier untersuchten Proben basiert auf der Methode nach McCleary et al. (2010), allerdings ohne Bestimmung der NMLBS (mit Ausnahme der Spargelproben). Die Arbeitsvorschrift dazu ist in Kapitel 8.2 zu finden. Da die enzymatische Proteinhydrolyse oft nicht vollständig verläuft und da insbesondere bei der LBS-Bestimmung Puffersalze mitgefällt werden, ist es notwendig im Anschluss die Ballaststoffgehalte um die Restprotein- und Restaschegehalte zu korrigieren (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.3 und 8.4).

Die präparative Gewinnung von Ballaststoffen für die chemische Charakterisierung basiert auf dem Prinzip der AOAC Methode 985.29 unter Verwendung einer thermostabilen α -Amylase. Außerdem wurde eine Trennung in LBS und UBS vorgenommen. Die Arbeitsvorschrift zur Isolierung der Ballaststoffe ist in Kapitel 8.1 zu finden.

3.3 Bestimmung des Restprotein- und Restaschegehaltes

Trotz Verwendung einer Protease im Zuge der Ballaststoffisolierung können Restproteine, z.B. aufgrund schlechter Zugänglichkeit, in den Ballaststoffen vorhanden sein. Da Proteine nicht zum Ballaststoffkomplex gehören, müssen die Ballaststoffgehalte um den Restprotein-gehalt korrigiert werden. Zudem wurden auch die Klason-Ligningehalte korrigiert, da auch in den Klason-Ligninpräparaten Restproteine vorhanden sein können (Bunzel et al. 2011). Die Bestimmung des Proteingehaltes kann allgemein nach Säureaufschluss nach Kjeldahl und anschließender Bestimmung des Stickstoffgehaltes erfolgen. Für die Bestimmung des Stickstoffgehaltes gibt es unterschiedliche Methoden wie titrimetrische und photometrische Methoden sowie die Bestimmung mittels Ammonium-selektiver Elektrode. Die titrimetrische Stickstoffbestimmung benötigt in der Regel höhere Mengen an Stickstoff, wodurch diese Methode für die Bestimmung des Restproteins in den hier untersuchten Proben nicht geeignet ist, da zum einen die Probenmengen begrenzt und zum anderen die Restproteingehalte zu gering sind. Alternativ zur Kjeldahl Methode kann auch die Methode nach Bradford zur Proteinquantifizierung verwendet werden, die auf der Bildung eines Farbkomplexes zwischen Proteinen und Coomassie Brilliantblau beruht (Bradford 1976). Das Ausmaß der Farbkomplexbildung ist allerdings abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des vorliegenden Proteins, wodurch die Verwendung eines allgemeinen Standardproteins zur Kalibrierung, meist Rinderserumalbumin, oft zu einer fehlerhaften Bestimmung des Proteingehaltes führt (Bradford 1976). Des Weiteren ist die Methode nur für lösliche Proteine anzuwenden und störanfällig gegenüber Substanzen wie z.B. Phenolen oder Tanninen, was die Verwendung bei Anwesenheit der komplexen Pflanzenmatrix ausschließt (Khanizadeh et al. 1995).

Für die Restproteinbestimmung der hier analysierten Proben wurde die photometrische Stickstoffbestimmung nach Willis et al. (1996) verwendet. Dabei bildet der nach Kjeldahl Aufschluss vorliegende Stickstoff mit einem Natriumsalicylat-haltigen Farbreagenz einen grünen Farbstoffkomplex, dessen Absorption bei 685 nm gemessen wird (Willis et al. 1996). Die genaue Arbeitsvorschrift befindet sich in Kapitel 8.4. Durch Multiplikation mit dem allgemein gültigen Faktor 6,25 wird anschließend der Proteingehalt berechnet. Die Verwendung dieses Faktors kann jedoch zur Unter- oder Überbestimmung des Proteingehaltes führen, da er idealerweise, je nach Aminosäurezusammensetzung der vorhandenen Proteine, individuell angepasst werden müsste (Khanizadeh et al. 1995).

Neben dem Restproteingehalt wurde zusätzlich der Aschegehalt der Ballaststoffe und des Klason-Lignins bestimmt. Insbesondere für LBS ist die Aschekorrektur notwendig, da, wie bereits erwähnt, bei deren Ausfällung in Ethanol auch Puffersalze ausfallen können. Zur Bestimmung des Aschegehaltes wurden die Proben bei 520°C für 5 h verascht (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.3).

3.4 Analytik der Zellwandpolysaccharide

3.4.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Für die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung von Polysacchariden sind in der Literatur unterschiedliche Methoden beschrieben, die sich in den Hydrolysebedingungen und den verwendeten Analysemethoden unterscheiden.

Für die Spaltung der Polysaccharide wird in der Regel eine saure Hydrolyse angewandt. Häufig ist dabei sowohl die H₂SO₄-Hydrolyse bei 100°C nach Saeman et al. (1945) oder die Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure (TFA) bei 121°C nach Albersheim et al. (1967) zu finden. Eine Variante der TFA-Hydrolyse stellt die Methanolyse nach De Ruiter et al. (1992) dar. Bei der Methanolyse werden zunächst Methylglykoside durch Behandlung der Polysaccharide mit methanolischer HCl gebildet, anschließend werden die glykosidischen Bindungen sowie die Methylester mittels TFA gespalten (De Ruiter et al. 1992). Bei der Auswahl der säurehydrolytischen Bedingungen muss beachtet werden, dass die Spaltung der unterschiedlichen glykosidischen Bindungen in den Polysacchariden unterschiedlich schnell und in unterschiedlichem Ausmaß erfolgen kann. So sind z.B. α-glykosidische Bindungen säurelabiler als β-glykosidische Bindungen. Außerdem werden Furanosen leichter als Pyranosen freigesetzt. Des Weiteren kommt es bei der H₂SO₄-Hydrolyse zu einer unvollständigen Freisetzung der Uronsäuren, sodass diese meist unterbestimmt werden (Willfor et al. 2009). Der Vorteil der H₂SO₄-Hydrolyse ist jedoch, dass kristalline Cellulose gut erfasst werden kann, wenn die Hydrolyse zweistufig durchgeführt wird (12 M H₂SO₄ für 2,5 h bei Raumtemperatur gefolgt von 1,6 M H₂SO₄ für 3 h bei 100°C). Bei der Methanolyse wird kristalline Cellulose dagegen kaum hydrolysiert, wohingegen Uronsäuren gut erfasst werden (Willfor et al. 2009). Es empfiehlt sich daher, je nach Probenmaterial, beide Methoden in Kombination anzuwenden.

Die freigesetzten Monosaccharide können anschließend mittels Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit einem Massenspektrometer (MS) oder Flammenionisationsdetektor (FID) analysiert werden (Albersheim et al. 1967; Churms 1990). Die Analyse mittels GC erfordert eine Derivatisierung der Monosaccharide. Gängige Derivatisierungsmöglichkeiten stellen die Bildung von Alditolacetaten oder Trimethylsilylether (häufig in Kombination mit einer Oximierung) dar (Churms 1990). Die Verwendung der Hochleistungsanionenaustauschchromato-

graphie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) nach De Ruiter et al. (1992) ermöglicht dagegen die direkte Analyse der Monosaccharide ohne vorherige Derivatisierung. Das Trennprinzip beruht auf Anionenaustausch an einem pellicularen Latex-Austauscherharz im basischen Milieu, da die Monosaccharide im stark Alkalischen als Polyanionen vorliegen. Die Detektion erfolgt elektrochemisch durch Oxidation der Monosaccharide an einer Gold-elektrode (Willfor et al. 2009).

Für die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der hier verwendeten Probenmaterialien wurden die UBS sowohl nach zweistufiger H_2SO_4 -Hydrolyse als auch nach Methanolyse und anschließender HPAEC-PAD Analyse untersucht (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.5). Die HPAEC-PAD Analysen ermöglichen die Identifizierung der Monosaccharide und die Bestimmung ihrer molaren Verhältnisse. Bei der Ergebnisinterpretation ist daher zu beachten, dass keine gesicherten Aussagen über absolute Zu- oder Abnahmen in den Probenmaterialien getroffen werden können, sondern lediglich die Anteile bewertet werden können. Es ist zwar möglich Absolutmengen der einzelnen Monosaccharide und somit auch den Gesamtkohlenhydratgehalt zu berechnen, allerdings kann es durch die Säurehydrolyse zu teilweisen Verlusten, verursacht durch unvollständige Hydrolyse oder durch säurebedingten Abbau der freigesetzten Monosaccharide, kommen, sodass diese Werte lediglich eine grobe Näherung darstellen.

3.4.2 Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharide

Die Methylierungsanalyse ist eine häufig angewandte Methode zur Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Monosaccharide in den Polysacchariden. Allgemein beruht das Prinzip der Methylierungsanalyse auf der Identifizierung partiell methylierter Alditolacetate (PMAAs), wodurch Rückschlüsse auf die Bindungspositionen der Monomere im Polymer gezogen werden können (Pettolino et al. 2012). Hierzu werden zunächst die freien Hydroxygruppen der Polysaccharide methyliert. Anschließend erfolgt eine saure Hydrolyse der Polysaccharide. Durch Natriumborodeuterid erfolgt die Ringöffnung und Reduktion der Monosaccharide und damit einhergehend die Markierung der anomeren C1-Position, wodurch die Information der Aldehydposition erhalten bleibt. Informationen über die Konfiguration am anomeren Zentrum gehen allerdings durch die Reduktion verloren. Abschließend erfolgt die Acetylierung der im Zuge der Hydrolyse und Reduktion freigesetzten bzw. erzeugten Hydroxygruppen, d.h. von Hydroxygruppen, die an einer Bindung beteiligt waren (Pettolino et al. 2012).

Ein weiterer Nachteil neben dem Informationsverlust über die anomere Konfiguration ist, dass Informationen über die Bindungspartner nicht erhalten bleiben. Des Weiteren werden häufig Untermethylierungen beobachtet. Durch die nicht vollständige Methylierung der an-

fänglich freien Hydroxygruppen werden diese im Acetylierungsschritt acetyliert und somit fälschlicherweise als im Polymer gebunden vorliegende Hydroxygruppen markiert. Um diese Untermethylierung zu umgehen, empfiehlt es sich die Methylierungsreaktion zweifach durchzuführen. Einen weiteren Nachteil stellt der zusätzlich notwendige Schritt zur Identifizierung von Uronsäuren dar. Um diese als PMAAs zu erfassen, müssen sie vor der Methylierung aktiviert und reduziert werden (Pettolino et al. 2012).

In der Literatur gibt es zahlreiche Varianten der Methylierungsanalyse, die sich bezüglich der Parameter wie eingesetzter Base, Methylierungsreagenz, Lösungsmittel oder Hydrolysebedingungen unterscheiden. Für die Methylierung der freien Hydroxygruppen müssen diese zunächst im aprotischen und stark basischen Milieu deprotoniert werden. Zwei bekannte Methoden, die sich hinsichtlich dieser Reaktion unterscheiden, sind die Methode nach Hakomori (1964) und die Methode nach Ciucanu und Kerek (1984). Die Methode nach Hakomori (1964) verwendet Methylsulfinyl-Carbanionen, die durch die Reaktion von DMSO und Natriumhydrid entstehen, als basisches Reagenz. Ciucanu und Kerek (1984) verwenden dagegen festes NaOH als basisches Agens, um die freien Hydroxygruppen der Polysaccharide zu deprotonieren. Die Methode nach Ciucanu und Kerek (1984) ist vorzuziehen, da Methylsulfinyl-Carbanionen in der Gegenwart von Sauerstoff explosiv sind. Außerdem wird die Entstehung von Nebenprodukten im Vergleich zu der Methode nach Hakomori (1964) reduziert (Ciucanu und Kerek 1984; Pettolino et al. 2012). Die Methylierung der freien, deprotonierten Hydroxygruppen erfolgt bei beiden Methoden mittels Methyljodid. Für die darauffolgende Hydrolyse der glykosidischen Bindungen wird häufig TFA oder H_2SO_4 verwendet, wobei TFA den Vorteil hat, dass sie flüchtig ist und somit besser aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann (Pettolino et al. 2012).

Ergänzend zur Methylierungsanalyse ist der Einsatz der 2D-NMR Analyse möglich, um Polysaccharidstrukturen näher zu charakterisieren. Vorteile der NMR-Methoden sind, dass strukturelle Informationen, wie Konfiguration am anomeren Zentrum oder auch die genauen Bindungspartner der Monosaccharide, erhalten bleiben. Allerdings ist hierfür die Isolierung von Oligosaccharidstrukturen in höheren Mengen notwendig, was sich teilweise als sehr aufwendig gestaltet. Die NMR-Analytik ist daher eher für spezifische Fragestellungen geeignet. Es gibt allerdings auch Ansätze in der Literatur, die die Polysaccharidcharakterisierung ohne großen Aufwand für die Probenvorbereitung ermöglichen. Bei diesen Methoden kann die komplette Zellwand direkt analysiert werden, wodurch eine vorherige aufwendige Isolierung von Strukturelementen entfällt (Kim und Ralph 2014; Mansfield et al. 2012). Es kann jedoch aufgrund der komplexen Pflanzenmatrix zu Überlappungen der Signale kommen, wodurch eine korrekte Identifizierung erschwert wird. Zudem befindet sich diese Methodik noch in der Entwicklung, insbesondere im Hinblick auf die Zuordnung der Signale. Außerdem ist es frag-

lich, ob bestimmte Bindungsarten, die in geringen Anteilen vorliegen, mittels 2D-NMR Analyse des komplexen Zellwandmaterials überhaupt erkannt werden. Da sie aus den genannten Gründen keine vergleichbaren Ergebnisse zur Methylierungsanalyse liefert, ist die 2D-NMR Analyse nicht als Alternative zur Methylierungsanalyse zu sehen, sondern vielmehr als Methode zur detaillierteren Strukturaufklärung von Polysacchariden bzw. für spezifische Fragestellungen.

In dieser Arbeit wurden die Bindungsverhältnisse der Monosaccharide in den Polysacchariden mittels Methylierungsanalyse ermittelt. Die Methylierung erfolgte nach der Methode von Ciucanu und Kerek (1984). Außerdem wurde die Methylierung doppelt durchgeführt, um Untermethylierungen zu vermeiden bzw. zu reduzieren. Die nach anschließender Hydrolyse (2 M TFA, 90 min bei 121°C), Reduktion und Acetylierung entstandenen PMAAs wurden anschließend mittels GC-MS identifiziert und mittels GC-FID semiquantitativ bestimmt. Bei der Ergebnisinterpretation ist zu beachten, dass ein PMAA mehrere Bindungstypen repräsentieren kann. So bilden z.B. 1,5-verknüpfte Arabinofuranosen und 1,4-verknüpfte Arabino-pyranosen, die jedoch in der Regel weniger häufig vorkommen, dieselben PMAAs. Zur semiquantitativen Bestimmung der einzelnen PMAAs wurden die molaren Responsefaktoren nach Sweet et al. (1975) verwendet. Wie auch bei der Monosaccharidanalyse ist zu beachten, dass die molaren Anteile der verschiedenen PMAAs erhalten werden, sodass ebenfalls kein gesicherter Rückschluss auf absolute Mengen, und damit verbunden, auf einen direkten Auf- oder Abbau der Polysaccharide geschlossen werden kann. Auch kann keine direkte Aussage darüber getroffen werden, welche Bindungspartner die einzelnen Monosaccharide aufweisen. Die verwendete Arbeitsvorschrift zur Durchführung der Methylierungsanalyse ist in Kapitel 8.6 zu finden.

Um detailliertere Informationen bezüglich Verzweigungsgrad und -art von Arabinanen und Galactanen zu erhalten, wurde zusätzlich für Brokkoli- und Radieschenproben ein Arabinan- und Galactan-Screening durchgeführt. Hierbei werden die linearen Abschnitte der neutralen Pektinseitenketten durch *endo*-Arabinanasen bzw. *endo*-Galactanasen gespalten, wodurch lineare und/oder verzweigte Oligosaccharide freigesetzt werden, die anschließend mittels HPAEC-PAD semiquantitativ bestimmt werden können (Wefers et al. 2015b). Vorteil dieser Methode ist, dass charakteristische Strukturmerkmale, wie z.B. Informationen über Bindungspartner, nachweisbar sind. Allerdings ist hier zu beachten, dass die enzymatische Hydrolyse oft nicht vollständig stattfindet, da bestimmte Strukturelemente innerhalb des Ballaststoffkomplexes bzw. der Pektine nicht für die Enzyme zugänglich sind. Es empfiehlt sich, die Proben vor der Enzymzugabe zu autoklavieren, da sich dadurch die enzymatische Zugänglichkeit durch Auflockerung des Polysaccharidnetzwerkes verbessern kann. Die entsprechenden Arbeitsvorschriften sind in Kapitel 8.7 zu finden.

3.5 Ligninanalytik

3.5.1 Bestimmung des Ligningehaltes

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden zur Ligninquantifizierung beschrieben, von denen die meisten ursprünglich für die Ligninbestimmung in Hölzern entwickelt und durch Weiterentwicklung an krautige Pflanzen angepasst wurden. Pflanzliche Lebensmittel unterscheiden sich in zwei Hauptaspekten von Holzproben. So enthalten sie zum einen geringere Ligningehalte, was eine Quantifizierung im Allgemeinen erschwert. Zum anderen enthalten sie einen hohen Anteil an Matrixkomponenten wie strukturell vielfältige Polysaccharide, Proteine, Wachse, Suberin und Cutin, die bei der Bestimmung des Ligningehaltes stören können. Daher ist eine Anpassung der Probenaufarbeitung notwendig. Des Weiteren sollten die Vor- und Nachteile jeder Methode bei der Ergebnisinterpretation beachtet werden. Obwohl eine Vielzahl an Methoden vorhanden ist, kann keine der Methoden den Ligningehalt exakt bestimmen, da alle Methoden unterschiedliche Einschränkungen besitzen. Generell können zwei methodische Prinzipien unterschieden werden: Ein Teil der Methoden beruht dabei auf der direkten Ligninbestimmung nach Entfernung aller Nicht-Ligninbestandteile, der andere Teil bestimmt den Ligningehalt indirekt durch Oxidation des Lignins oder auch durch Lösen des Lignins gefolgt von dessen spektroskopischer Bestimmung (Hatfield und Fukushima 2005).

Zu der ersten Kategorie zählen die Säure-Detergens-Lignin (ADL)- und die Klason-Ligninmethoden (Theander und Westerlund 1986; Van Soest 1963). Beide Methoden beruhen auf einer Säurehydrolyse der Zellwandpolysaccharide sowie weiterer Matrixkomponenten, wodurch Lignin anschließend gravimetrisch bestimmt werden kann. Für die Bestimmung des ADL werden die Proben zusätzlich zuvor mit einem sauren Detergens behandelt, um Matrixkomponenten wie Proteine und ein Teil der Polysaccharide zu entfernen (Van Soest 1963). Die anschließende Hydrolyse der glykosidischen Bindungen der noch vorhandenen Polysaccharide erfolgt meist mittels 12 M H_2SO_4 . Bei der Klason-Ligninmethode erfolgt direkt die Hydrolyse mittels H_2SO_4 zur Entfernung anderer Zellwandbestandteile. Ein Nachteil beider Methoden ist, dass ein Teil des Lignins sowohl im verwendeten sauren Detergens als auch in H_2SO_4 löslich sein kann, wodurch es zu einer Unterbestimmung des Ligningehaltes kommen kann. Die Unterbestimmung des Ligningehaltes durch säurelösliches Lignin ist in der Regel bei der Klason-Ligninmethode geringer (Hatfield et al. 1994; Lowry et al. 1994). Um dieses Problem zu umgehen, kann das säurelösliche Lignin nach der Klason-Ligninbestimmung photometrisch bestimmt werden. Diese Bestimmung ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da der verwendete Extinktionskoeffizient je nach Ligninstruktur variieren kann. Außerdem ist die Auswahl einer geeigneten Messwellenlänge problematisch, da neben Lignin vor allem auch Furfurale vorhanden sind. Diese entstehen während der Säure-

hydrolyse aus Kohlenhydraten und absorbieren ebenfalls bei den zur Ligninbestimmung verwendeten Wellenlängen. Die potentielle Überbestimmung des Ligningehaltes durch die Mitbestimmung anderer teilweise säureunlöslicher Zellwandbestandteile wie Wachse, Suberin oder (Struktur-) Proteine ist jedoch kritischer einzuschätzen als eine Unterbestimmung aufgrund einer (geringen) Säurelöslichkeit von Ligninbestandteilen (Bunzel et al. 2011; Hatfield et al. 1994). Die Überbestimmung von Lignin bei Anwendung der Klason-Ligninmethode stellt besonders bei pflanzlichen Lebensmitteln ein Problem dar. Daher ist es notwendig die Probenaufarbeitung anzupassen, um störende Matrixbestandteile zumindest teilweise zu entfernen. Da die Klason-Ligninmethode ursprünglich für Hölzer entwickelt wurde, stellt für gering lignifizierte Proben auch die entsprechend hohe Probeneinwaage zur Gewährleistung quantitativer Ligninauswaagen, einen weiteren Nachteil dar. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Methode gut auf geringe Ligninmengen angepasst werden kann, sodass die Klason-Ligninbestimmung auch für gering lignifizierte Proben mit ausreichender Präzision eingesetzt werden kann (Ibanez und Bauer 2014). Ein Vorteil der Klason-Ligninmethode ist die Möglichkeit, neutrale Zucker oder Uronsäuren aus dem Hydrolysat zu bestimmen, wodurch eine zusätzliche Aufarbeitung für die Monosaccharidanalyse erspart bleibt.

Zu der zweiten Kategorie der Methoden zur Ligninquantifizierung gehört die Bestimmung des Ligningehaltes mittels Oxidation des Ligninpolymers durch Kaliumpermanganat (Van Soest und Wine 1968). Allerdings ist diese Methode, insbesondere für gering lignifizierte Materialien mit einem hohen Matrixanteil ungeeignet, da die Oxidationsreaktion recht unspezifisch ist. So können neben Lignin weitere Substanzen wie niedermolekulare phenolische Verbindungen, Proteine oder Farbpigmente oxidiert werden, was zu einer Überbestimmung des Ligningehaltes führt (Hatfield und Fukushima 2005). Des Weiteren zählen zu dieser Kategorie Methoden, bei denen Lignine zunächst in Lösung überführt werden. Das Ligninpolymer wird dabei mit Reagenzien wie Mercaptoessigsäure oder Acetylbromid derivatisiert und gelöst. Durch die Verwendung von Mercaptoessigsäure reagieren die freien Hydroxygruppen des Ligninpolymers zu Thioethern. Das derart modifizierte Lignin besitzt endständige Säuregruppen, wodurch das Polymer im Alkalischen löslich ist. Durch Ausfällen des Lignins im Sauren kann der Gehalt des Mercaptoessigsäure-Lignins ausgewogen werden (Hatfield und Fukushima 2005). Diese Methode hat den Nachteil, dass definierte Standardsubstanzen benötigt werden, um die Massenänderung durch die Derivatisierung zu korrigieren. Um dieses Problem zu umgehen, verwenden modifizierte Methoden die Messung der Absorption des derivatisierten Lignins bei einer Wellenlänge von 280 nm (Lange et al. 1995). Die Messwellenlänge ist jedoch recht unspezifisch und kann, insbesondere bei gering lignifizierten Proben, zu einer Verfälschung des Ligningehaltes durch Matrixkomponenten führen.

Eine in der Literatur sehr häufig angewandte Methode stellt die Bestimmung des acetylbro-midlöslichen Lignins (ABSL) dar. Zur Bestimmung des ABSL wird Lignin mit Acetylbromid in Essigsäure derivatisiert. Die Löslichkeit des Lignins in Essigsäure wird dabei durch Bromie-rung in α -Position und die Acetylierung der restlichen freien Hydroxygruppen erreicht. Zur Bestimmung des Ligningehaltes wird anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und daraus der Gehalt unter Verwendung spezieller Absorptionskoeffi-zienten bestimmt. Auch diese Methode wurde für die Ligninbestimmung in Hölzern entwi-ckelt, sie wurde jedoch im Laufe der Zeit hinsichtlich der Anwendung auf krautige Pflanzen weiterentwickelt (Hatfield et al. 1999; Iiyama und Wallis 1990). Dennoch sind bei Anwendung auf gering lignifizierte Proben einige Aspekte in Bezug auf die Durchführung und Ergebnisin-terpretation zu beachten. Ein Aspekt ist die Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Diese Wellenlänge ist, wie zuvor bereits angesprochen, recht unspezifisch, da bestimmte Verbindungen aus dem hohen Anteil an Matrixkomponenten in pflanzlichen Lebensmitteln ebenso bei dieser Wellenlänge absorbieren und dadurch das Ergebnis fälschlicherweise er-höhen. So sind insbesondere Xylane durch die Behandlung mit Acetylbromid anfällig für den Abbau zu Furfuralen, die bei 280 nm ebenfalls UV-Licht absorbieren. Das Ausmaß der Fur-furalentstehung ist von der Temperatur und der Anwesenheit von Perchlorsäure abhängig. (Hatfield et al. 1999). Die Zugabe von Perchlorsäure wurde zur Verbesserung der Löslichkeit der Lignine aus krautigen Pflanzen eingeführt (Iiyama und Wallis 1990), sollte jedoch auf Grund des damit verbundenen verstärkten Xylanabbaus in polysaccharidreichen Proben vermieden werden. Ebenso minimiert die Anpassung der Reaktionstemperatur auf 50°C den Abbau der Polysaccharide (Hatfield et al. 1999). Einen weiteren Störfaktor stellen auch poly-saccharidgebundene phenolische Bestandteile wie Ferulasäure und *para*-Cumarsäure dar. Auch diese Substanzen absorbieren bei 280 nm und können zu einer Überbestimmung des Ligningehaltes führen. Ligningebundene phenolische Bestandteile, die nicht zu den klassi-schen Monolignolen gehören und ebenfalls bei der Messung bestimmt werden, sollten dage-gegen als Ligninbestandteile betrachtet werden und sind daher nicht als Störfaktoren zu bewer-ten. Gerade für Proben aus dem Lebensmittelbereich kann es problematisch sein, dass das Absorptionsmaximum für eine Ligninquantifizierung durch einen geringen Ligningehalt nicht ausreichend ausgeprägt ist. Es empfiehlt sich daher, ein gesamtes Absorptionsspektrum aufzunehmen, um ein Absorptionsmaximum bei 280 nm zu bestätigen. Außerdem kann sich das Maximum je nach Zusammensetzung des Lignins verschieben. So liegt das Absorpti-onsmaximum für besonders S-reiche Lignine bei 270 nm (Hatfield und Fukushima 2005).

Einen weiteren Nachteil stellt die mögliche Fehlbestimmung des Ligningehaltes durch den für die Quantifizierung verwendeten Absorptionskoeffizienten dar. Da dieser je nach Struktur des Ligninpolymers variieren kann, wird theoretisch ein definiertes und der Probe angepass-tes Standardlignin benötigt. Fukushima und Hatfield (2001) schlagen die Isolierung von Lig-

nin aus unterschiedlichen Probenmaterialien vor, um Standardlignine für die ABSL-Bestimmung zu erhalten. Die hohe Variabilität der Ligninpolymere, die von der Pflanzenart aber auch von den Anbaubedingungen und dem Alter der Pflanze abhängt, gestaltet dies jedoch kaum realisierbar. Als näherungsweise gültiger Absorptionskoeffizient kann für pflanzliche Lebensmittel der von Iiyama und Wallis (1990) vorgeschlagene Koeffizient für krautige Pflanzen verwendet werden, wobei beachtet werden sollte, dass dieser nicht exakt auf die einzelnen Proben abgestimmt ist.

In dieser Arbeit wurden die zwei am häufigsten angewandten Methoden für die Ligninbestimmung ausgewählt, um trotz beschriebener Einschränkungen den Ligningehalt einschätzen zu können. Dafür wurde der Ligningehalt als ABSL und als Klason-Lignin bestimmt. Um störende Matrixsubstanzen bei der Klason-Ligninbestimmung zu minimieren, wurden die UBS mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität in einer Soxhletapparatur extrahiert, wodurch Substanzen wie Fette und Wachse weitgehend entfernt werden. Die UBS wurden anschließend mit 12 M H_2SO_4 bei Raumtemperatur aufgequollen. Die Hydrolyse erfolgte bei 100°C nach Verdünnen der H_2SO_4 auf eine Konzentration von 1,6 M (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.8). Der Rückstand wurde anschließend gravimetrisch ausgewogen. Da zusätzlich Proteine und Asche im Rückstand vorhanden sein können, wurde dieser um den Restprotein- und Restaschegehalt korrigiert (Arbeitsvorschriften siehe Kapitel 8.3 und 8.4).

Für die Bestimmung des ABSL-Gehaltes wurden die UBS zunächst mit einem polysaccharidabbauenden Enzymgemisch (Driselase) inkubiert. Dies hat zum einen den Vorteil, dass der Ligningehalt angereicht wird. Zum anderen werden polysaccharidgebundene phenolische Bestandteile entfernt, die ansonsten die Messung stören würden. Aufgrund der geringeren Kohlenhydratanteile der so behandelten Proben wird ebenfalls die Bildung von Furfuralen bei der anschließenden Behandlung mit Acetylbromid und Essigsäure reduziert. Um die Bildung von Furfuralen weiter zu minimieren, wurden die Proben wie von Hatfield et al. (1999) vorgeschlagen bei einer Temperatur von 50°C mit Acetylbromid in Essigsäure behandelt (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.9). Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Außerdem wurde ein Absorptionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm aufgenommen, um ein ausreichend ausgeprägtes Absorptionsmaximum zu bestätigen. Zur Auswertung wurde der von Iiyama und Wallis (1990) vorgeschlagene Absorptionskoeffizient von 20 ml/(cm*mg) verwendet.

3.5.2 Charakterisierung von Ligninstrukturen

3.5.2.1 Bestimmung der Monomerzusammensetzung

Auch die Strukturcharakterisierung von Ligninpolymeren gestaltet sich sehr komplex. Ein Problem, insbesondere bei der Bestimmung der Monomerzusammensetzung, stellt die chemische Stabilität des Ligninpolymers dar. So sind die im Polymer vorhandenen Bindungstypen in der Regel sehr stabil gegenüber chemischer Spaltung. Eine Ausnahme stellt die am häufigsten vorkommende β -O-4-Bindung dar. Diese kann chemisch selektiv gespalten werden, sodass die darüber gebundenen Monomere freigesetzt und analysiert werden können. Die darauf basierenden Methoden unterliegen jedoch der Einschränkung, dass nur die Monomere bestimmt werden, die vollständig über β -O-4-Bindungen in das Ligninpolymer eingebaut wurden. Da die β -O-4-Bindungen in den meisten Ligninen in Anteilen von weit über 50% vorkommen, eignen sich diese Methoden dennoch gut für die Charakterisierung der Monomerzusammensetzung von Ligninen. Zwei Methoden, die auf dem beschriebenen Prinzip beruhen, sind die Thioacidolyse und die derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode (Lapierre et al. 1985; Lu und Ralph 1997b).

Bei der Thioacidolyse wird das Lignin zunächst in einem Dioxan-Ethanthiol-Gemisch gelöst. Durch den ebenfalls vorhandenen Katalysator Bortrifluoriddiethyletherat kommt es zur Substitution der α -Hydroxygruppe durch Ethanthiol und anschließend zur Spaltung der β -O-4-Bindungen (Lapierre et al. 1985). Im weiteren Reaktionsverlauf erfolgt die Substitution der β - und γ -Hydroxygruppen. Die so entstandenen Trithioethylmonomere können anschließend mittels GC-MS analysiert werden (Lapierre et al. 1985). Neben der Analyse von Monomeren kann die Thioacidolyse auch zur Identifizierung von Dimeren verwendet werden, wodurch Rückschlüsse auf andere Bindungstypen als β -O-4-Bindungen gezogen werden können, da diese bei der Reaktion erhalten bleiben (Rencoret et al. 2011; Rencoret et al. 2013). Nachteil dieser Methode ist die Verwendung des übel riechenden Ethanthiols.

Die DFRC-Methode wurde erstmals von Lu und Ralph (1997a) beschrieben. Auch sie beruht auf der selektiven Spaltung der β -O-4-Bindungen zur Freisetzung der Monomere. Im Gegensatz zur Thioacidolyse läuft sie dabei in drei Schritten ab. Im ersten Schritt kommt es durch die Zugabe von Acetylbromid und Essigsäure zur Spaltung von nicht-cyclischen α -Arylethern, zur Bromierung der α -Position und zur Acetylierung der freien Hydroxygruppen. Im zweiten Schritt wird die β -O-4-Bindung reduktiv durch die Zugabe von Zink gespalten (Lu und Ralph 1997b; Lu und Ralph 1998). Die so freigesetzten, teilweise acetylierten Monomere liegen vorwiegend in *trans*-Konfiguration vor (Lu und Ralph 1998). Im letzten Schritt werden diese unter Verwendung von Essigsäureanhydrid und Pyridin vollständig acetyliert und kön-

nen anschließend als Diacetate mittels GC-FID oder GC-MS identifiziert und quantifiziert werden. Der Ablauf der Reaktion ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

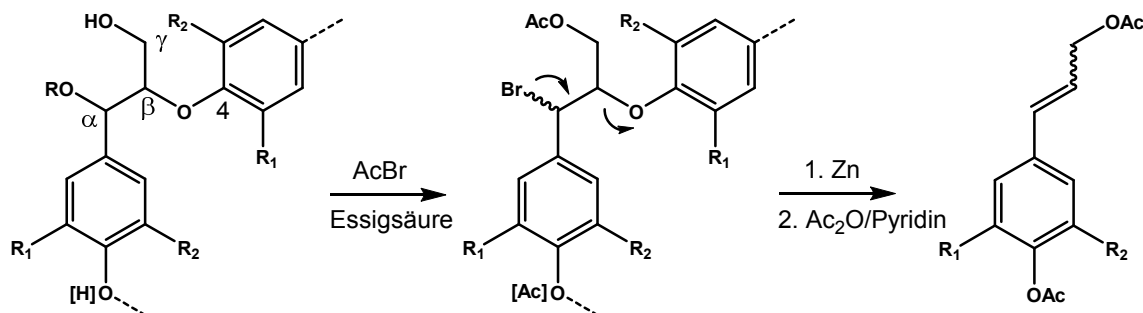


Abbildung 8: Mechanismus der derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode. Monomere, die durch β -O-4-Bindungen verknüpft sind, können selektiv freigesetzt werden. Die freigesetzten Monomere liegen überwiegend in der *trans*-Konfiguration vor. $R=H$ oder Aryl; $R_{1,2}=H$, Hydroxyphenyl; $R_1=H/R_2=OMe$, Guaiacyl; $R_{1,2}=OMe$, Syringyl.

Der Reaktionsablauf in drei Schritten gewährt der DFRC-Methode eine gewisse Flexibilität hinsichtlich spezifischer Fragestellungen. So kann durch eine geeignete Modifizierung der Methode der Anteil natürlich acetylierter Monomere bestimmt werden. Diese Unterscheidung kann mit der ursprünglichen DFRC-Methode nicht getroffen werden, da hierbei im Verlauf der Derivatisierung Acetylgruppen eingeführt werden. Durch den Austausch der verwendeten Reagenzien mit den entsprechenden propionylierten Verbindungen werden freie Hydroxygruppen durch Veresterung mit Propionsäure markiert (Lu und Ralph 2002; Ralph und Lu 1998). Durch eine weitere Variante der DFRC-Methode kann auch zwischen freien phenolischen Hydroxygruppen und phenolischen Hydroxygruppen, die in α - bzw. β -Ethern eingebaut sind, unterschieden werden (Holtman et al. 2003; Ikeda et al. 2002). Hierbei werden freie phenolische Hydroxygruppen zuerst methyliert. Im zweiten Schritt erfolgen durch die Zugabe von Acetylbromid und Essigsäure die Spaltung der α -Ether und gleichzeitig die Acetylierung der dort frei werdenden phenolischen Hydroxygruppen. Nach der reduktiven Spaltung der β -O-4-Bindungen können die dabei freiwerdenden phenolischen Hydroxygruppen durch Bildung der Propionsäureester markiert werden.

Auch die DFRC-Methode kann zur Bestimmung von Dimeren verwendet werden, um Informationen über weitere im Ligninpolymer vorhandene Bindungstypen zu erhalten (Peng et al. 1998). Des Weiteren ist es so auch möglich, mit phenolischen Säuren veresterte Ligninmonomere zu bestimmen, um somit Rückschlüsse zu ziehen, welche Monolignole verestert vorliegen (Lu und Ralph 1999). Dies ist möglich, da Esterbindungen durch die DFRC-Methode nicht gespalten werden. Diese Anwendung ist von besonderem Interesse bei Proben, die einen hohen Anteil ligningebundener phenolischer Nicht-Monolignolbestandteile besitzen. Die Anwendung der DFRC-Methode kann daher zum einen als Nachweis der Bindung dieser

Verbindungen an Lignin und zum anderen auch zur Identifizierung des veresterten Monolignols dienen.

Die DFRC-Methode ist somit insgesamt flexibel auf unterschiedliche Probenmaterialien einsetzbar. Durch 2D-NMR Analysen, bei denen alle im (gelösten) Polymer vorliegenden Monomere erfasst werden, konnte bestätigt werden, dass die Charakterisierung der Monomere durch die DFRC-Methode gut geeignet ist (Bunzel und Ralph 2006). Allerdings ist die Anwendung auf gering lignifizierte Materialien aufgrund des hohen Matrixanteils dieser Proben problematisch. Durch Coelution von Matrixkomponenten mit DFRC-Produkten während der GC-Analyse wird die Identifizierung und Quantifizierung, insbesondere bei der Verwendung eines FIDs, gestört. Bei Verwendung eines MS zur Detektion führt die hohe Matrixbelastung zu einer schnellen Kontamination des MS-Detektors. Daher ist es notwendig, die Probenaufarbeitung der DFRC-Methode zu modifizieren, um die Matrixbelastung zu minimieren. Des Weiteren wäre insbesondere für Proben mit geringem Ligningehalt eine MS-basierte Analytik im selected ion monitoring (SIM)-Modus von Vorteil. Hierdurch erhöht sich sowohl die Empfindlichkeit als auch Selektivität der Analysenmethode. Ein Aspekt, der in diesem Zusammenhang zusätzlich zu optimieren ist, stellt die Verwendung geeigneter interner Standardsubstanzen dar. In der Literatur werden dafür Tetracosan oder 4,4-Ethylidenbisphenol verwendet (Bunzel et al. 2005b; Lu und Ralph 1997a). Beide Substanzen sind strukturell unterschiedlich zu den analysierten diacetylierten Monolignolen und erfüllen daher nicht die Bedingungen geeigneter interner Standardsubstanzen. Optimal geeignet sind dagegen die strukturell identischen, sechsfach deuterierten DFRC-Produkte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine GC-SIM-MS Methode entwickelt und validiert, wobei die sechsfach deuterierten Monolignolacetate als interne Standardsubstanzen zur Quantifizierung verwendet wurden (Schäfer et al. 2015). Außerdem wurde zur Minimierung der Matrixbelastung die Probenaufarbeitung an gering lignifizierte Proben angepasst (Schäfer et al. 2015). Diese modifizierte Methode wurde anschließend verwendet, um die Monolignolzusammensetzung von Ligninen aus Gemüseproben zu charakterisieren (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.10.2). Im Folgenden soll auf die Methodenentwicklung näher eingegangen werden.

3.5.2.2 Entwicklung einer GC-SIM-MS Methode zur Bestimmung von DFRC-Produkten aus gering lignifizierten Proben

Synthese geeigneter Standardsubstanzen

Für die Entwicklung und Validierung der GC-SIM-MS Methode mussten die sechsfach deuterierten DFRC-Produkte *para*-Cumarylalkoholdiacetat (H₆DiAc-*d*₆), Coniferylalkoholdiacetat (G₆DiAc-*d*₆) und Sinapylalkoholdiacetat (S₆DiAc-*d*₆) hergestellt werden. Die Deuteriummarkierung erfolgte hierbei an den Acetylgruppen. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Al-

kohole synthetisiert, die anschließend mit deuterierten Reagenzien diacetyliert wurden. Die Reaktionsabfolgen sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Die Synthese von Coniferyl- und Sinapylalkohol erfolgte über die Reduktion der entsprechenden Aldehyde unter Verwendung eines Borhydridaustauscherharzes (Kim und Ralph 2005). Die Verwendung des Austauscherharzes hat den Vorteil, dass die Entstehung von Nebenprodukten, insbesondere die Absättigung der Doppelbindung, im Vergleich zur Reduktion mit freiem Natriumborhydrid vermieden wird. Da *para*-Cumaraldehyd nicht käuflich zu erwerben war, wurde *para*-Cumarylalkohol in zwei Stufen aus der entsprechenden Säure synthetisiert (Quideau und Ralph 1992). Dazu wurde zunächst der Ethylester hergestellt, der anschließend unter Verwendung von Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) zum Alkohol reduziert wurde. Anschließend erfolgte die Diacetylierung der synthetisierten Alkohole unter Verwendung von Essigsäureanhydrid- d_6 und Pyridin. Für die Methodenentwicklung wurden zudem die entsprechenden nicht-deuterierten Standardsubstanzen hergestellt. Die Arbeitsvorschriften der Synthesen sind in Kapitel 8.10.1 zu finden.

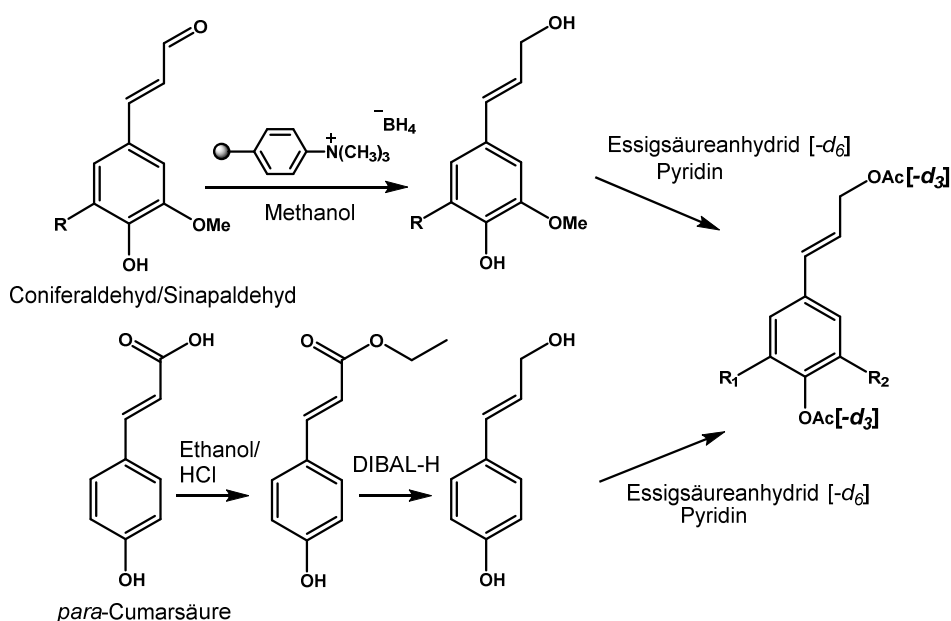


Abbildung 9: Syntheschema der Ligninmonomere *para*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol und deren Diacetate. Durch die Verwendung von Essigsäureanhydrid- d_6 entstehen die entsprechenden sechsfach deuterierten Diacetate. $R=H$, Coniferaldehyd; $R=OMe$, Sinapaldehyd; $R_{1,2}=H$, *para*-Cumarylalkoholdiacetat ($-d_6$); $R_1=H/R_2=OMe$, Coniferylalkoholdiacetat ($-d_6$); $R_{1,2}=OMe$, Sinapylalkoholdiacetat ($-d_6$); DIBAL-H, Diisobutylaluminiumhydrid.

Entwicklung und Validierung der GC-SIM-MS Methode

Voraussetzung für die Verwendung der sechsfach deuterierten DFRC-Produkte ist, dass diese ein GC-MS Fragment aufweisen, das sich von den Fragmenten der nicht deuterierten DFRC-Produkte unterscheidet und somit zur Quantifizierung verwendet werden kann. Die Fragmentmuster der einzelnen Verbindungen sind in Kapitel 9.1, Tabelle 31 zu finden. Die

für die SIM-MS Analyse ausgewählten Fragmentationen sind in Kapitel 8.10.2, Tabelle 25 dargestellt. Sowohl für GD₆Ac (-d₆) als auch für SD₆Ac (-d₆) konnte jeweils der Basispeak ausgewählt werden. Für HD₆Ac (-d₆) war dies nicht möglich, da die entsprechende nicht-deuterierte Verbindung ebenfalls dieses Fragmentation aufwies. Die zur Quantifizierung ausgewählten Fragmente resultieren alle aus einer Ketenabspaltung, die in Abbildung 10 für GD₆Ac beispielhaft dargestellt ist. Da ein Proton der phenolischen Acetatgruppe am Molekül verbleibt, kann der Massenunterschied von vier atomaren Masseneinheiten zwischen den deuterierten und den entsprechenden nicht-deuterierten Verbindungen erklärt werden.

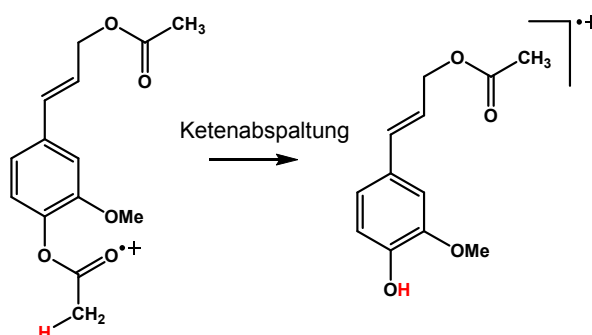


Abbildung 10: Charakteristische Ketenabspaltung am Beispiel von Coniferylalkoholdiacetat. Die Fragmentierung von *para*-Cumarylalkoholdiacetat und Sinapylalkoholdiacetat verläuft analog.

Während der Methodvalidierung ergab sich das Problem, dass die Fragmentierung der einzelnen Verbindungen schlecht reproduzierbar war (Standardabweichungen >20%). Unter Verwendung der entsprechenden deuterierten Substanzen kann dieses Problem jedoch weitgehend behoben werden (Standardabweichung 0,1-2,0%). Diese Tatsache verdeutlicht noch einmal die Bedeutung geeigneter Standardsubstanzen für die Quantifizierung der DFRC-Produkte. Für die Kalibrierungen wurden daher zu allen Kalibrierlösungen die internen Standardsubstanzen in einer Konzentration von 30 µM gegeben. Die Validierungsparameter der so erstellten Kalibrierung sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Erstellung der Kalibrierkurve ergab eine polynomiale Anpassung zweiter Ordnung. Da bei dem niedrigsten und dem höchsten Kalibrierpunkt keine Varianzenhomogenität gegeben war, wurde die Kalibriergerade zusätzlich gewichtet (Gewichtungsfaktor $1/(\text{Standardabweichung})^2$). Des Weiteren wurde die Methode auf Robustheit getestet, indem Kalibriergeraden an unterschiedlichen Tagen und auch aus jeweils frisch hergestellten Lösungen erstellt wurden. Da sich dabei nur geringe Abweichungen ergaben, ist die Aufstellung einer neuen Kalibrierung mit jeder Probenanalyse nicht zwingend notwendig. Dennoch sollte die Gültigkeit zeitlich zurückliegender Kalibrierungen anhand von drei Kalibrierkonzentrationen vor der Probenanalyse kontrolliert werden.

Table 1: Zusammenfassung der Validierungsparameter der Kalibrierung von *para*-Cumarylalkoholdiacetat (HDiAc), *Coniferyl*alkoholdiacetat (GDiAc) und *Sinapyl*alkoholdiacetat (SDiAc). Zur Bestimmung der Kalibriergeraden wurden die entsprechenden sechsfach deuterierten Diacetate (jeweils 30 μM) als interne Standardsubstanzen verwendet. Die Nachweisgrenze (NG) stellt aufgrund der instabilen Fragmentierung lediglich eine Näherung dar. Die Wiederfindungsraten wurden aus den Peakflächen der internen Standardsubstanzen, die während der Probenaufarbeitung zugegeben wurden, abgeschätzt. BG, Bestimmungsgrenze.

	Kalibrierkurve	Korrelationskoeffizient	NG [μM]	BG [μM]	Wiederfindung (%)
HDiAc	$y=0,00654+0,04094x+8,59968*10^{-5}x^2$	1,0000	0,007	5	99-142
GDiAc	$y=0,00225+0,03314x+1,2895*10^{-4}x^2$	1,0000	0,001	5	68-185
SDiAc	$y=-0,00984+0,03872x+1,553252*10^{-4}x^2$	0,9997	0,05	5	77-179

Als weitere Validierungsparameter wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen bestimmt. Aufgrund der beschriebenen Variabilität in der Fragmentierung konnten allerdings keine exakt definierten Werte anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses von 3:1 (Bestimmungsgrenze) bzw. 9:1 (Nachweisgrenze) bestimmt werden. Als Bestimmungsgrenzen wurden daher die Konzentrationen der jeweils niedrigsten Kalibrierpunkte festgelegt. Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden Lösungen mit abnehmenden Konzentrationen der Standardsubstanzen in Dreifachbestimmung injiziert, bis ein Signal-Rausch-Verhältnis von etwa 5:1-10:1 vorlag. Die Nachweisgrenzen sind somit als grobe Näherungen zu betrachten. Dasselbe Problem ergab sich auch bei der Bestimmung der Wiederfindungsraten. Diese wurden anhand der Peakflächen der während der Probenaufarbeitung zugesetzten internen Standardsubstanzen abgeschätzt. Auch hierbei handelt es sich lediglich um Näherungen, da das Ausmaß der Fragmentierung erheblich variieren kann, wodurch die teilweise hohen Wiederfindungsraten von über 100% erklärt werden können. Dennoch kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass der Hauptteil der freigesetzten Monomere, auch nach der modifizierten Probenaufarbeitung (s.u.), erfasst wird. Ebenfalls zu erwähnen ist, dass die Bestimmung von Monomerverhältnissen aussagekräftiger für die Lignincharakterisierung ist als die Quantifizierung absoluter Monomerkonzentrationen. Dies ist auf das allgemeine Prinzip der DFRC-Methode zurückzuführen, da hierbei lediglich die Monomere bestimmt werden können, die über β -O-4-Bindungen in das Polymer eingebaut wurden.

Modifizierung der Probenaufarbeitung

Um den Einfluss der Probenmatrix auf die DFRC-Methode möglichst gering zu halten, empfiehlt es sich vor der eigentlichen DFRC-Methode die UBS zusätzlich mit einem polysaccha-

ridabbauenden Enzymgemisch (Driselase) zu inkubieren. Hierbei wird ein Großteil der Polysaccharide bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung des Ligningehaltes entfernt.

Die ursprüngliche DFRC-Methode beinhaltet nach dem Acetylierungsschritt die Aufnahme des gesamten Rückstandes in Dichlormethan. Da während der Synthese der Standardsubstanzen festgestellt wurde, dass sich die DFRC-Produkte gut in Methanol lösen, wurde der Rückstand in Methanol anstelle von Dichlormethan aufgenommen. Nach Zugabe von Methanol verbleibt ein unlöslicher Rückstand, wodurch ein großer Teil der Matrixsubstanzen entfernt werden kann. Zusätzlich wurde ein Aufreinigungsschritt mittels Festphasenextraktion (SPE) entwickelt. Die dabei verwendete Phase ist speziell für die Wechselwirkung mit aromatischen Komponenten geeignet. Versuche zur Löslichkeit der Standardsubstanzen ergaben, dass diese vollständig in Methanol/H₂O (40:60, v/v) löslich sind. Die SPE-Bedingungen wurden ermittelt, indem eine Lösung aller Standardsubstanzen in diesem Lösungsmittel auf die Säule appliziert wurde, die stationäre Phase gewaschen wurde und anschließend die Standardsubstanzen mit Lösungsmittelgemischen mit ansteigendem Methanolanteil eluiert wurden. Die Eluate wurden getrennt gesammelt und mittels GC-SIM-MS analysiert. Die beschriebenen Optimierungsschritte (Kohlenhydratabbau, Verwendung von Methanol anstelle von Dichlormethan, Verwendung der SPE) führten insgesamt zu einer deutlich reduzierten Verschmutzung des GC-MS Systems.

Anwendung der Methode

Die entwickelte Methode wurde anschließend anhand vier unterschiedlicher Probenmaterialien getestet. Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, sind die mit der hier entwickelten Methode bestimmten G/S-Verhältnisse mit den in der Literatur beschriebenen G/S-Verhältnissen vergleichbar. Dies zeigt, dass die entwickelte GC-SIM-MS Methode zusammen mit der modifizierten Probenaufarbeitung gut zur Bestimmung der Ligninmonomere in gering lignifizierten Proben geeignet ist.

Tabelle 2: Monomierzusammensetzung von Ligninen aus Birne, Radieschen, Karotte und Spargel. Die berechneten Monomerverhältnisse resultieren aus der GC-selected ion monitoring (SIM)-MS-Analyse der derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Produkte mit modifizierter Probenaufarbeitung. H, Hydroxyphenyl; G, Guaiacyl; S, Syringyl.

	H:G:S [mol%]	G/S-Verhältnis	G/S-Verhältnis (Bunzel et al. 2005b)
Birne	0,18 : 53,28 : 46,54	1,15 (± 0,03)	0,6 (± 0,04)
Radieschen	1,29 : 44,75 : 53,96	0,80 (± 0,14)	1,5 (± 0,18)
Karotte	2,32 : 94,97 : 2,71	35,24 (± 2,45)	38,8 (± 6,11)
Spargel	0,85 : 67,04 : 32,11	2,10 (± 0,17)	3,3 (± 0,28)

Ein Vorteil der GC-SIM-MS Methode ist zudem, dass durch die erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zu der auf einer GC-FID Analytik beruhenden Originalmethode auch die Detektion von geringeren Monolignolkonzentrationen möglich ist. Dies zeigt sich am Beispiel von Radieschen, in denen zuvor H-Einheiten nicht quantitativ bestimmt werden konnten (Bunzel et al. 2005b). Neben der erhöhten Empfindlichkeit zeichnet sich die Methode zusätzlich durch eine verbesserte Selektivität aus. In Abbildung 11 ist ein Vergleich der ursprünglichen GC-FID Analyse und der hier entwickelten GC-SIM-MS Analyse dargestellt. Die Identifizierung der Monomere im GC-FID Chromatogramm ist deutlich erschwert, da neben den geringen Konzentrationen der diacetylierten Monolignole ein erheblicher Anteil an Matrixkomponenten vorhanden ist. Die hier entwickelte GC-SIM-MS Methode ist daher besser zur Bestimmung der Ligninmonomierzusammensetzung von pflanzlichen Lebensmitteln geeignet als die Originalmethode.

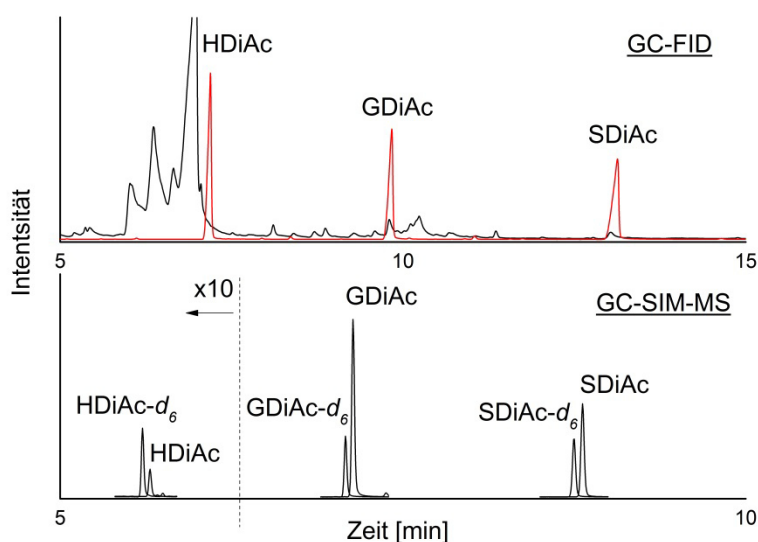


Abbildung 11: Vergleich der GC-Flammenionisationsdetektor (FID) und GC-selected ion monitoring (SIM)-MS Chromatogramme der derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Produkte aus Spargelligninen. Für die Analytik mittels GC-SIM-MS wurde die modifizierte Probenaufarbeitung für gering lignifizierte Proben angewandt. Die Analytik mittels GC-FID erfolgte ohne Anwendung der modifizierten Probenaufarbeitung. HDiAc, para-Cumarylalkoholdiacetat; GDiAc, Coniferylalkoholdiacetat; SDiAc, Sinapylalkoholdiacetat; d_6 , sechsfach deuteriert.

3.5.2.3 Strukturcharakterisierung von Ligninen mittels 2D-NMR Analyse

Neben den Methoden, die auf dem (teilweisen) Abbau des Ligninpolymers beruhen, stellt die 2D-NMR eine gute Ergänzung zur weitergehenden Strukturcharakterisierung dar (Ralph und Landucci 2010). Bei dieser Analysenmethode können die polymeren Lignine ohne vorherigen chemischen Abbau analysiert werden. Mittels heteronuclear single quantum coherence (HSQC)-Experimente können neben der Bestimmung der Ligninmonomere zusätzlich auch die im Polymer vorhandenen Bindungstypen charakterisiert werden (Bunzel

und Ralph 2006; Kim et al. 2008; Rencoret et al. 2013). Weiterführende heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)-Experimente lassen zusätzlich die Zuordnung der Monolignole zu einzelnen Bindungstypen zu, da hierbei Korrelationen zwischen Kohlenstoffen und Protonen über zwei oder drei Bindungen gemessen werden können (Bunzel und Ralph 2006). Außerdem können diese Experimente Informationen über die Veresterung von Monolignolen liefern (Lu et al. 2015; Ralph et al. 1994).

Zur Vorbereitung der Messung von 2D-NMR Spektren sind unterschiedliche Probenaufarbeitungen möglich. So können Lignine zum einen direkt in dem vorliegenden Zellwandmaterial charakterisiert werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, Lignine aus den Probenmaterialien zu isolieren. Die größte Herausforderung stellt dabei eine möglichst vollständige Isolierung von reinen Ligninen dar, ohne die Struktur der Lignine zu verändern.

Die geringste Probenaufarbeitung ist für die Aufnahme von Spektren der gesamten Zellwand notwendig (Mansfield et al. 2012). Hierbei wird das Zellwandmaterial nach Vermahlung in einer Kugelmühle in einer Mischung aus DMSO- d_6 /Pyridin- d_5 (4:1) im Ultraschallbad „aufgequollen“, wodurch sich eine viskose, gelartige Lösung/Suspension ausbildet, die anschließend direkt mittels NMR gemessen werden kann (Kim und Ralph 2010). Dabei ist eine Vermahlung von $<5 \mu\text{m}$ ausschlaggebend für eine optimale Gelbildung (Kim und Ralph 2010). Diese Methode zeichnet sich somit durch eine sehr einfache und schnelle Probenaufarbeitung aus. Außerdem werden Veränderungen in der nativen Ligninstruktur durch chemische Behandlungen vermieden. Allerdings muss beachtet werden, dass auch mechanische Belastungen zu strukturellen Veränderungen der Ligninpolymere führen können. So können z.B. Oxidations- und Depolymerisationsreaktionen, insbesondere von β -Aryl-Ethern, durch das Mahlen auftreten. Diese Reaktionen spielen jedoch bei der Zellwand-NMR wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle, da sie lediglich in geringem Ausmaß und nach deutlich extensiveren Mahlbedingungen als bei der Zellwand-NMR angewandt nachgewiesen wurden (Guerra et al. 2006; Hu et al. 2006; Ikeda et al. 2002). Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass die gelartigen Proben aufgrund der vergleichsweise kurzen Relaxationszeiten nicht für HMBC-Experimente zur detaillierteren Strukturaufklärung geeignet sind (Kim und Ralph 2010). Dieses Problem kann durch die vorherige Acetylierung der Lignine und anderer Zellwandkomponenten umgangen werden, wodurch diese in Aceton gelöst werden können und dadurch die Viskosität deutlich verringert wird (Mansfield et al. 2012). Allerdings gehen hierbei Informationen zum nativ vorliegenden Acetylierungsgrad verloren. Dennoch stellt die Zellwand-NMR ein geeignetes Screeningverfahren für hoch lignifizierte pflanzliche Gewebe dar, um Grundinformationen über die vorliegende Ligninstrukturen zu erhalten. Bei gering lignifizierten Proben mit hohem Matrixanteil ist die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren direkt aus dem Zellwandmaterial oft problematisch, da es verstärkt zu Überlappungen der Analyt-

signale mit Matrixsignalen kommen kann. Dadurch wird eine Identifizierung der Ligninsignale, insbesondere im Verschiebungsbereich der Bindungstypen, erschwert bzw. unmöglich. Eine Möglichkeit den Matrixanteil zu reduzieren stellt die vorherige Behandlung des Probenmaterials mit einem polysaccharidabbauenden Enzymgemisches (Driselase) dar. Anschließend kann der Rückstand wie beschrieben zur 2D-NMR Analyse verwendet werden. Durch den Abbau der Polysaccharidmatrix können somit Störsignale deutlich minimiert werden.

Eine weitere Möglichkeit zur verbesserten Lignincharakterisierung von gering lignifizierten Materialien stellt die Isolierung der Lignine aus diesen Proben dar. Auch hierfür gibt es unterschiedliche Ansätze. Die Ligninisolierung nach Björkman (1954) umfasst die Vermahlung der Proben in einer Kugelmühle und die anschließende Extraktion der Lignine mit Hilfe von 96%- und 50%-igem Dioxan. Die so erhaltenen Lignine galten lange Zeit als repräsentativ für native Ligninstrukturen. Die geringe Ligninausbeute bei dieser Methode lässt jedoch Zweifel aufkommen, ob dies für die Gesamtheit der in den pflanzlichen Materialien enthaltenen Lignine tatsächlich zutrifft. Außerdem kann auch, wie beschrieben, das Mahlen in der Kugelmühle zu strukturellen Änderungen der Ligninpolymere führen. Die Mahlbedingungen beeinflussen dabei maßgeblich die Ligninausbeute, aber auch das Ausmaß der strukturellen Veränderungen (Björkman 1954; Fujimoto et al. 2005). Zwar wird durch eine intensivere Vermahlung mit höherem Energieeintrag eine höhere Ausbeute erreicht, allerdings verändert sich dabei auch zunehmend die native Ligninstruktur durch Oxidationsreaktionen und/oder Spaltung von Bindungen (Guerra et al. 2006; Ikeda et al. 2002). Eine Erhöhung der Ligninausbeute ohne verstärkte mechanische Belastung kann durch eine enzymatische Behandlung der Proben vor der Ligninextraktion erreicht werden (Holtman et al. 2004). Durch den Einsatz von polysaccharidabbauenden Enzymen kann die Ausbeute der sich anschließenden Extraktion in 96%-igem wässrigem Dioxan deutlich erhöht werden, ohne ausgeprägte Strukturveränderungen an den Ligninen zu erzeugen (Holtman et al. 2004; Hu et al. 2006). Wu und Argyropoulos (2003) schlagen eine Ligninisolierung mittels Dioxan:0,01 M HCl (85:15, v/v) vor, wobei vorhandene Lignin-Polysaccharid-Bindungen säurehydrolytisch gespalten werden. Dadurch wird sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit des isolierten Lignins im Vergleich zu den vorherigen Methoden weiter verbessert, jedoch werden säurelabile Ligninstrukturen, z.B. Spirodienonstrukturen, teilweise zerstört bzw. in andere Struktureinheiten (β -1-Bindungen) überführt (Wu und Argyropoulos 2003; Zhang und Gellerstedt 2001).

Die in dieser Arbeit analysierten Proben weisen relativ geringe Ligningehalte in einer komplexen Matrix auf. Daher wurde die Ligninisolierung nach Wu und Argyropoulos (2003) gewählt, um möglichst reine Lignine für die Strukturcharakterisierung mittels 2D-NMR zu erhalten (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.11). Die UBS der Proben wurden zunächst in der Kugelmühle fein zermahlen, wobei sich die Mahlzeiten an den von Kim und Ralph (2010) be-

schriebenen Zeiten orientierten. Eine ausreichende Zerkleinerung und Lockerung der Strukturen ist für die Zugänglichkeit der anschließend eingesetzten Enzyme zum Abbau der Polysaccharidmatrix wichtig (Guerra et al. 2006). Das hierfür verwendete Enzymgemisch Driselase weist dabei keine Esteraseaktivität auf, sodass möglicherweise vorhandene Esterbindungen zwischen phenolischen Nicht-Monolignolkomponenten und Ligninmonomeren erhalten bleiben. Anschließend erfolgte die Ligninisolierung mittels Dioxan:0,01 M HCl (85:15, v/v), wodurch noch vorhandene Lignin-Polysaccharid-Bindungen gespalten wurden. Für eine weitere Erhöhung der Ligninreinheit wurden die isolierten Lignine in angesäuertem Wasser (pH 2) ausgefällt. Um die Löslichkeit in Aceton- d_6 zu gewährleisten, wurden die Lignine vor der Messung mittels Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand vorhandener Literaturdaten (Bunzel und Ralph 2006; Ralph et al. 2009). In Abbildung 12 ist beispielhaft die Identifizierung der Monomereinheiten H, G und S dargestellt. Die Identifizierung erfolgte anhand der jeweiligen aromatischen C-H-Korrelationen.

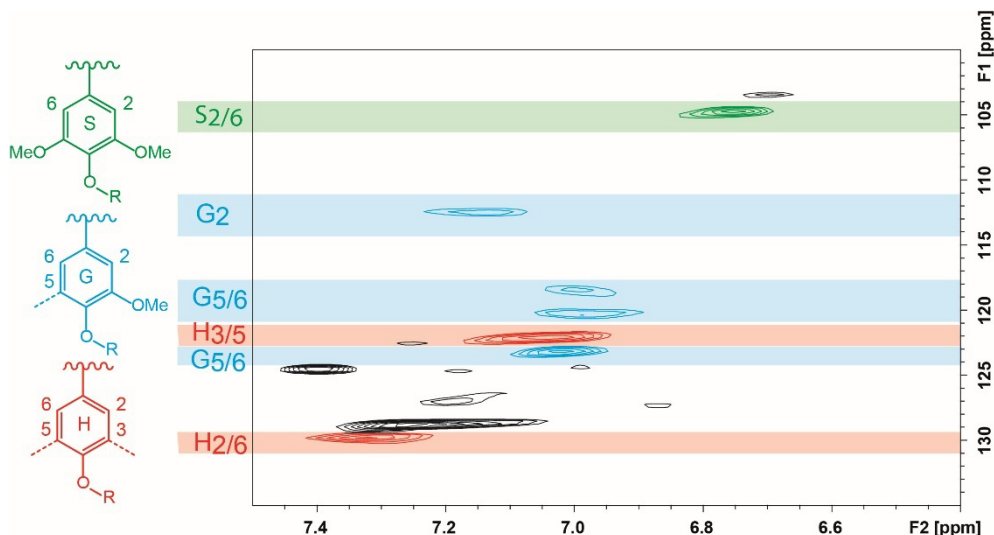


Abbildung 12: Ausschnitt eines HSQC-Spektrums (aromatischer Bereich) zur Identifizierung der *para*-Hydroxyphenyl (H)-, Guaiacyl (G)- und Syringyleinheiten (S). Die exakte Zuordnung der C5-H5 bzw. C6-H6 Korrelationen der G-Einheiten ist nicht möglich, da deren chemischen Verschiebungen von dem Bindungstyp abhängig sind, den diese Einheiten ausbilden.

Die Identifizierung der Bindungstypen erfolgte über die jeweiligen α -, β - und γ -C-H-Korrelationen. Da die γ -C-H-Korrelationen der Dibenzodioxocinstruktur, der Spirodienonstruktur und der klassischen β -1-Bindung von dem breiten Signal der γ -C-H Korrelation der β -O-4-Bindung überlagert wurden, wurden zur Identifizierung dieser Struktureinheiten lediglich die α - und β -C-H-Korrelationen herangezogen. Die Zuordnung der Signale zu den Bindungstypen ist für die einzelnen Proben in den jeweiligen Kapiteln dargestellt. Die NMR-Daten zur Zuordnung von Monomeren und Bindungstypen in den HSQC-Spektren der acetylierten Lignine in Aceton- d_6 sind in Kapitel 9.1, Tabelle 38 zusammengefasst.

Die semiquantitative Bestimmung der Monomierzusammensetzung sowie der Bindungstypenprofile kann allgemein über Volumenintegration charakteristischer Signale in den HSQC-Spektren erfolgen. Für die Bestimmung der G-Anteile wurden die C2-H2-Korrelation und für die Bestimmung der H- und S-Anteile die C2/6-H2/6-Korrelationen herangezogen. Für die Berechnung der Anteile muss das Integral der G-Einheiten verdoppelt werden, da die Signale der H- und S-Einheiten aus jeweils zwei Protonen resultieren. Bei der Bestimmung der Monomeranteile muss zudem beachtet werden, dass H-Einheiten häufig Endgruppen darstellen, wodurch diese eine langsamere Relaxationszeit als das gesamte Polymer aufweisen, was zu einer Überbestimmung dieser Einheiten führen kann (Mansfield et al. 2012). Dieser Aspekt muss auch bei der Bestimmung von phenolischen Nicht-Monolignolkomponenten wie z.B. Cumaraten oder Benzoaten, die in der Regel ebenso Endgruppen darstellen, beachtet werden. Für die Bestimmung des Bindungstypenprofils können die Signale, die aus den α -C-H-Korrelationen resultieren, ebenfalls über Volumenintegration bestimmt werden. Für einige Bindungstypen sind in der Literatur Korrekturfaktoren beschrieben (Ralph et al. 2006), die hier ebenfalls mit einberechnet wurden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass diese Faktoren je nach Spektrometer und verwendeten Messbedingungen variieren können. Bei der Bestimmung der Bindungstypen, für die keine Korrekturfaktoren vorhanden sind wird ein Faktor von 1 angenommen.

3.6 Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile

Niedermolekulare, phenolische Bestandteile wie Ferulasäure oder *para*-Cumarsäure können kovalent über Ester- bzw. Etherbindungen an Zellwandbestandteile, wie Polysaccharide bzw. Lignin, gebunden vorliegen. Vor der Quantifizierung der phenolischen Bestandteile müssen diese durch eine Hydrolyse freigesetzt werden. Die Hydrolyse kann dabei im Säuren, im Alkalischen oder enzymatisch erfolgen, wobei die Methoden je nach Anwendungsziel unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen (Barberousse et al. 2008; Mathew und Abraham 2004). Die saure Hydrolyse mittels H_2SO_4 oder HCl ist in der Lage Ester- und Etherbindungen zu spalten. Sie hat jedoch den Nachteil, dass unter zu milden Bedingungen Esterbindungen erhalten bleiben, wohingegen bei zu hohen Säurekonzentrationen die phenolischen Bestandteile teilweise zerstört werden (Barberousse et al. 2008). Bei der enzymatischen Hydrolyse, die unter deutlich mildereren Bedingungen abläuft, kommen meist Esterasen, oft auch in Kombination mit Xylanasen und Pectinasen, zum Einsatz (Andreasen et al. 1999; Kroon et al. 1999). Nachteil der enzymatischen Hydrolyse ist die oft unvollständige Erfassung der zellwandgebundenen phenolischen Bestandteile, da die Zugänglichkeit der Esterbindungen durch komplexe Zellwandstrukturen beschränkt sein kann. Die am häufigsten in der Literatur angewandte Methode zur Spaltung von Esterbindungen ist die alkalische Ver-

seifung mittels NaOH, wobei vor allem Laugenkonzentration und Hydrolysezeit sehr variabel sein können (Barberousse et al. 2008; Dobberstein und Bunzel 2010). Die alkalische Hydrolyse findet unter Inertgasatmosphäre und Lichtausschluss statt, um Oxidations- und Isomerisierungsreaktionen zu vermeiden. Durch sequentielle Hydrolysen ist es zudem möglich zwischen Ester- und Etherbindungen zu unterscheiden. Mildere alkalische Hydrolysebedingungen spalten dabei bevorzugt Esterbindungen, während anschließend stärker alkalische Druckaufschlüsse oder auch saure Bedingungen in der Lage sind die vorhandenen Etherbindungen zu spalten (Iiyama et al. 1990; Pan et al. 1998; Rodriguez et al. 2005).

Auch für die Trennung und Detektion niedermolekularer, phenolischer Bestandteile werden in der Literatur unterschiedliche Methoden beschrieben. Häufig eingesetzt wird die Kombination aus HPLC-Trennung und UV-Detektion mit Hilfe eines Diodenarraydetektors (DAD) (Dobberstein und Bunzel 2010; Kroon et al. 1999; Waldron et al. 1996). Dabei erfolgt die Identifizierung der Analyten anhand von Retentionszeiten und charakteristischer UV-Spektren. Durch Coelution mit Matrixkomponenten kann die Identifizierung und insbesondere die Quantifizierung jedoch erheblich erschwert werden. Die alternative Analytik mittels HPLC-MS erhöht die Selektivität und die Empfindlichkeit deutlich (Gruz et al. 2015; Jilek und Bunzel 2013; Vismeh et al. 2013). Eine weitere Analysenmöglichkeit stellt die GC-MS Methodik dar, wodurch ebenfalls die Selektivität und Empfindlichkeit im Vergleich zur HPLC-DAD Methodik erhöht werden. Die Identifizierung der Analyten erfolgt hierbei anhand charakteristischer Fragmentierungsmuster. Allerdings ist für die GC-MS ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt, meist eine Silylierung, notwendig (Bunzel et al. 2001). Ein weiterer Nachteil dieser Analysenmethode ist, dass höhere Oligomere, z.B. Tri- und Tetramere der Ferulasäure, aufgrund nicht ausreichender Flüchtigkeit nicht analysiert werden können.

Für die Bestimmung estergebundener phenolischer Monomere sowie von Ferulasäureoligomeren wurde in dieser Arbeit die Methode nach Dobberstein und Bunzel (2010) gewählt (Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 8.12). Diese Methode ist zur schnellen Quantifizierung zellwandgebundener phenolischer Monomere, DFS und TriFS geeignet. Zur Quantifizierung mit Hilfe interner Standardsubstanzen können die von Dobberstein und Bunzel (2010) ermittelten Korrekturfaktoren verwendet werden. Somit ist keine Kalibrierung mittels teilweise aufwendig zu isolierenden oder zu synthetisierenden Standardsubstanzen notwendig. Außerdem können dadurch, im Gegensatz zu anderen in der Literatur beschriebenen HPLC-DAD Methoden, neben phenolischen Monomeren und Ferulasäuredimeren auch Ferulasäuretrimere erfasst werden. Zwar wurden auch in der HPLC-MS Methode nach Jilek und Bunzel (2013) Korrekturfaktoren ermittelt, diese sind jedoch nicht ohne weiteres übertragbar, da sie von dem verwendeten MS-Gerät abhängig sind. Nach alkalischer Verseifung der UBS mit 2 M NaOH erfolgte, nach Ansäuern des Hydrolysats, die Extraktion der phenolischen Verbindungen mit

Diethylether und anschließend die Analyse der Verbindungen mittels HPLC-DAD. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte bei 280 nm, da 8-8-THF-DFS im Gegensatz zu den anderen Hydroxyzimtsäurederivaten kein UV-Maximum bei 325 nm aufweist. Die Identifizierung erfolgte mittels isolierter Standardsubstanzen sowie anhand charakteristischer UV-Spektren. Da 8-8-THF-DFS nicht als Standardsubstanz zur Verfügung stand, wurde diese lediglich über ihr UV-Spektrum identifiziert. Zur Quantifizierung der phenolischen Monomere wurde vor der Extraktion Kaffeesäure als interner Standard hinzugegeben. Ferulasäuredi- und -trimere wurden über den internen Standard 5-5-(Mono-) Methyl-DFS quantifiziert. Wie bereits erwähnt, wurden die von Dobberstein und Bunzel (2010) ermittelten Korrekturfaktoren zur Quantifizierung verwendet. Da für die Trimere 8-O-4/8-O-4-TriFS und 8-5-nc/8-O-4-TriFS keine Korrekturfaktoren publiziert waren, wurden Responsefaktoren der isolierten TriFS-Standardsubstanzen gegen 5-5-(Mono-) Methyl-DFS als interne Standardsubstanz bestimmt. Anders als bei der Bestimmung der Korrekturfaktoren gleichen die Responsefaktoren eventuell vorhandene Verluste der Verbindungen im Zuge der Probenvorbereitung oder aufgrund von Matrixinteraktionen nicht aus, weshalb die Bestimmung der TriFS als semi-quantitativ betrachtet werden muss.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung von Zellwandveränderungen während der Lagerung

4.1.1 Zellwandcharakterisierung von Spargel

4.1.1.1 Sensorische Beurteilung des Probenmaterials

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben wurden die Spargelstangen geschält und gekocht verkostet. Die sensorische Beurteilung erfolgte anhand verschiedener Attribute hinsichtlich des Geschmacks (typisch, süß, bitter) und der Konsistenz (zart, holzig, faserig, zäh, fest, wässrig). Die Ergebnisse der sensorischen Prüfung sind in Abbildung 13 für das frische Probenmaterial im Vergleich zu den Probenmaterialien der Lagerzeitendpunkte (20°C, 7 Tage bzw. 1°C, 28 Tage) dargestellt.

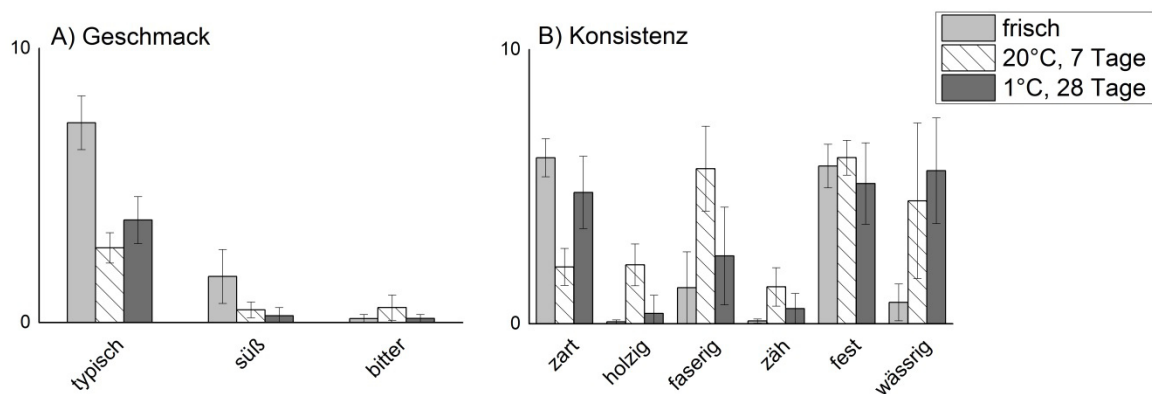


Abbildung 13: Ergebnisse der sensorischen Beurteilung der gekochten und geschälten Spargelstangen hinsichtlich Geschmack (A) und Konsistenz (B). Die Ergebnisse sind für die frischen Proben im Vergleich zu den Proben der Lagerzeitendpunkte (20°C, 7 Tage bzw. 1°C, 28 Tage) gezeigt. Die Verkostung erfolgte für jeden Zeitpunkt doppelt von mindestens fünf Prüfern.

Die frische Probe wurde sowohl mit typisch im Geschmack als auch leicht süß beschrieben. Das Geschmacksmerkmal bitter spielte kaum eine Rolle. Trotz der sehr hohen Standardabweichungen, die aus der geringen Anzahl von fünf Testpersonen resultieren, können geringe Geschmacksveränderungen während der Lagerung erkannt werden. So entwickelte der Spargel einen weniger typischen und weniger süßen Geschmack im Verlauf der Lagerung. Die Textur des frischen Spargels wurde als zart, fest und als wenig faserig und wässrig und kaum zäh und holzig beschrieben. Auch hier können trotz der teilweise hohen Standardabweichungen, gewisse Tendenzen einer Texturveränderung beobachtet werden. So wurden

die Spargelstangen während der Lagerung deutlich weniger zart, dafür aber holziger, faseriger, wässriger und zäher. Die Festigkeit blieb während der Lagerung erhalten.

Die beschriebenen sensorischen Veränderungen waren deutlich von der Lagertemperatur aber auch von der Lagerdauer abhängig. So veränderten sich die sensorischen Merkmale während der Lagerung bei 20°C stärker als bei der Lagerung bei 1°C. Selbst nach 28 Tagen Lagerzeit bei 1°C erreichten die Bewertungsmerkmale nicht das Ausmaß der Merkmalsausprägungen der Proben, die für 7 Tage bei 20°C gelagert wurden.

4.1.1.2 Bestimmung des Ballaststoffgehaltes

Die Bestimmung des Ballaststoffgehaltes erfolgte getrennt nach UBS, LBS und NMLBS (McCleary et al. 2010). Die einzelnen Gehalte aller Proben bezogen auf das Spargelmehl sind in Abbildung 14 dargestellt. Aufgrund des begrenzt vorliegenden Probenmaterials wurde für die Bestimmung der UBS und LBS jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt, die Bestimmung der NMLBS erfolgte in Einfachbestimmung.

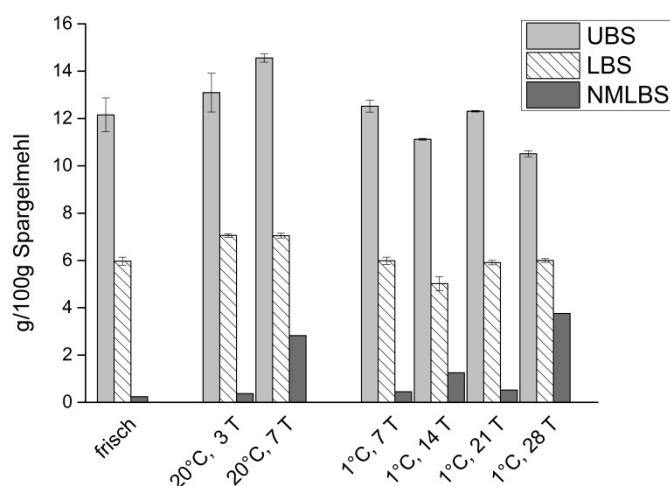


Abbildung 14: Gehalte der unlöslichen (UBS), löslichen (LBS) und niedermolekularen löslichen (NMLBS) Ballaststoffe des getrockneten Spargelmehls. Dargestellt sind die Ergebnisse der frisch geernteten Proben im Vergleich zu den Proben, die bei 20°C und 1°C für unterschiedliche Zeiträume gelagert wurden. Die Ergebnisse der UBS und LBS resultieren aus einer Doppelbestimmung, die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. Die Bestimmung der NMLBS erfolgte in einer Einfachbestimmung. T, Tage.

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass der Anteil der UBS für alle Zeitpunkte etwa doppelt so groß wie der Anteil der LBS war. Der Gehalt an LBS blieb während der Lagerung bei 1°C konstant, wohingegen ein leichter Anstieg bei der Lagerung bei 20°C zu erkennen war. Der UBS-Gehalt stieg während der Lagerung für 7 Tage bei 20°C im Vergleich zum UBS-Gehalt des frisch geernteten Spargels an. Im Gegensatz dazu blieb der UBS-Gehalt während der Lagerung bei 1°C in etwa konstant. Der Gehalt an NMLBS war bei allen Proben geringer als der Gehalt an LBS. Im Verlauf der Lagerung kam es jedoch zu einem Anstieg

des NMLBS-Gehaltes. Bei dieser Fraktion handelt es sich um Oligosaccharide bzw. bestimmte Polysaccharide, die nicht mit der Fraktion der LBS in 80%-igem Ethanol ausgefällt werden. Ein Rückschluss auf die Herkunft dieser Fraktion kann nicht gezogen werden, da die Analyse unspezifisch mittels HPLC-RI erfolgte. Insgesamt lassen die Veränderungen des Ballaststoffgehaltes während der Lagerung bei 20°C vermuten, dass es unter diesen Lagerbedingungen zu einer Änderung der Zellwandzusammensetzung kommt.

In Tabelle 3 sind die Wassergehalte, die mittels Gefriertrocknung ermittelt wurden, und die damit berechneten Gesamtballaststoffgehalte bezogen auf das Frischgewicht der frisch geernteten und der unterschiedlich gelagerten Spargelproben zusammengefasst. Erstaunlicherweise kam es während der Lagerung kaum zu einem Wasserverlust, wobei zu berücksichtigen ist, dass der Wassergehalt lediglich aus einer Einfachbestimmung resultiert. Der Gesamtballaststoffgehalt von frisch geerntetem Spargel lag bei etwa 1%. Während der Lagerung stieg der Gesamtballaststoffgehalt in Abhängigkeit von der Lagertemperatur und der Lagerdauer auf 1,4% (20°C, 7 Tage) bzw. 1,3% (1°C, 28 Tage) an. Die Daten sind jedoch aufgrund der Einfachbestimmung der NMLBS-Gehalte sowie der Wassergehalte vorsichtig zu interpretieren.

Tabelle 3: Gesamtballaststoffgehalte (BS) der frisch geernteten und der gelagerten Spargelproben bezogen auf das Frischgewicht ($n=2$). Der dafür notwendige Wassergehalt wurde aus dem Gewichtsverlust während der Gefriertrocknung der Proben berechnet ($n=1$).

		Wassergehalt [%]	BS [g/100 g Frischgewicht]
frisch		94,0	1,1 ± 0,03
20°C	3 Tage	94,2	1,2 ± 0,04
	7 Tage	94,5	1,4 ± 0,02
1°C	7 Tage	94,2	1,1 ± 0,02
	14 Tage	93,7	1,1 ± 0,02
	21 Tage	94,3	1,1 ± 0,003
	28 Tage	93,8	1,3 ± 0,003

4.1.1.3 Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe

Die Polysaccharidcharakterisierung der präparativ gewonnenen UBS aus Spargel erfolgte sowohl mittels H_2SO_4 -Hydrolyse als auch mittels Methanolyse. Mit Hilfe der Methylierungsanalyse können die identifizierten Monosaccharide einzelnen Polysacchariden vorläufig zugeordnet werden. Die molaren Anteile der freigesetzten Monosaccharide sind für die H_2SO_4 -Hydrolyse und die Methanolyse in Abbildung 15 für die frisch geernteten und die gelagerten Spargelproben dargestellt. Beide Analysen zeigten, dass Glucose, Xylose, Galactose und Galacturonsäure die Hauptmonosaccharide in den Ausgangsmaterialien darstellen. Des Wei-

teren konnten Arabinose, Mannose, und Rhamnose identifiziert werden. Da die Uronsäuren mittels H_2SO_4 -Hydrolyse unterbestimmt werden, wurden diese hierbei nicht mit in die Auswertung einbezogen. Die Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Zur besseren Übersicht sind dabei lediglich die Ergebnisse für frisch geernteten Spargel im Vergleich zu den Spargelproben der Lagerzeitendpunkte (20°C , 7 Tage bzw. 1°C , 28 Tage) dargestellt. Die Ergebnisse der restlichen Zeitpunkte sind in Kapitel 9.1, Tabelle 32 zu finden.

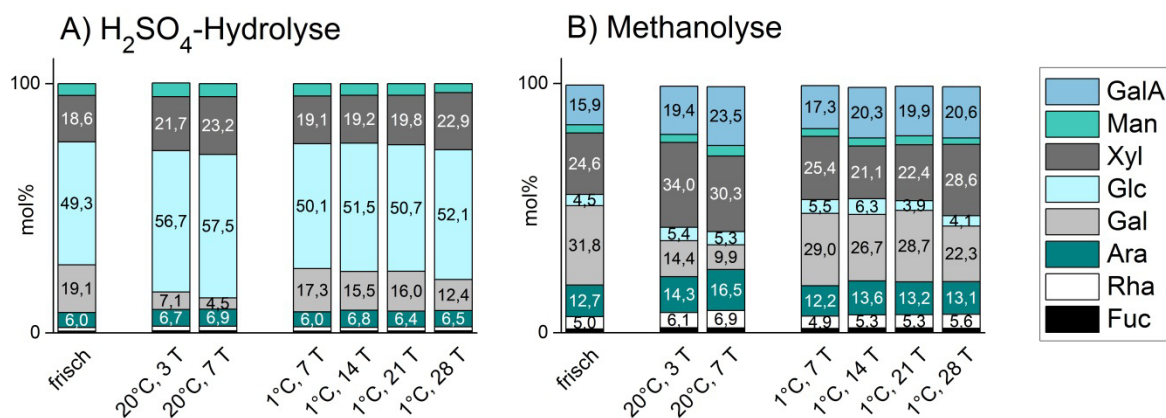


Abbildung 15: Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide aus den unlöslichen Ballaststoffen von den frisch geernteten und den bei 20°C und 1°C gelagerten Spargelproben. Dargestellt sind die Ergebnisse der H_2SO_4 -Hydrolyse (A) und der Methanolyse (B). Da es bei der H_2SO_4 -Hydrolyse zu einer Unterbestimmung der Uronsäuren kommt, sind diese nicht mit einberechnet. Die Methanolyse ergab zudem Spuren ($<0,8$ mol%) an Glucuronsäure, die hier ebenfalls nicht berücksichtigt sind. Die Anteile in mol% resultieren aus einer Dreifachbestimmung (Ausnahme: H_2SO_4 -Hydrolyse, Fucose, Spargel 20°C , 3 Tage Lagerung: Doppelbestimmung). GalA, Galacturonsäure; Man, Mannose; Xyl, Xylose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; T, Tage.

Die UBS aus frisch geerntetem Spargel enthielten erwartungsgemäß einen großen Anteil an Glucose von 49,3 mol% (H_2SO_4 -Hydrolyse), die überwiegend 1,4-verknüpft vorlag. Sowohl Cellulose als auch Xyloglucane sind aus einer Kette von β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Glucopyranosen aufgebaut. Zur besseren Zuordnung der Herkunft der Glucose können die Ergebnisse der Methanolyse herangezogen werden. Der Anteil an Glucose, der mittels Methanolyse bestimmt wurde, lag bei 4,5 mol%. Da kristalline Cellulose durch die Methanolyse kaum hydrolysiert wird, ist dieser Anteil hauptsächlich den Xyloglucanen zuzuordnen. Somit resultiert der größte Teil an 1,4-verknüpfter Glucopyranose vermutlich aus Cellulose. Das Vorliegen von Xyloglucanen wurde zusätzlich durch die Identifizierung der PMAAs, die aus terminaler Xylopyranose und insbesondere aus 1,4,6-verknüpfter Xylopyranose entstehen, bestätigt. Die Hauptthemicellulosen der UBS aus Spargel stellen jedoch Xylane dar. Xylane besitzen allgemein ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Xylopyranosen, die in unterschiedlichem Ausmaß hauptsächlich an den Positionen O-2 und/oder O-3 substituiert sein können. Der

Xyloseanteil aus der Methanolyse lag mit 24,6 mol% deutlich höher als der Glucoseanteil, der den Xyloglucanen zuzuordnen ist. Die Methylierungsanalyse zeigte, dass die Xylose überwiegend 1,4-verknüpft vorliegt. Allerdings coeluierten bei der verwendeten GC-MS-Methode die Peaks der PMAAs, die aus 1,2,4- und 1,3,4-verknüpften Xylopyranosen resultieren, fast vollständig mit dem stark dominierenden Peak des PMAAs der 1,4-verknüpften Glucopyranose. Daher sind Aussagen über den Substitutionsgrad der Xylane und die Position der Substituenten schwer zu treffen. Allerdings besaß der Peak des PMAAs der 1,4-verknüpften Glucopyranose eine kleine Schulter, die das Fragmentierungsmuster des PMAAs der 1,2,4-verknüpften Xylopyranose aufwies. Daher kann eine geringe Substitution der Xylane in Position *O*-2 angenommen werden. Aussagen über eine Substitution in Position *O*-3 der Xylose können jedoch nicht getroffen werden. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang meistens eine geringe Substitution der Xylane in Position *O*-2 beschrieben (Rodriguez et al. 1999b; Waldron und Selvendran 1992; Waldron und Selvendran 1990a; Waldron und Selvendran 1990b), wohingegen Daten zu dem Vorkommen von 1,3,4-verknüpfter Xylopyranose kaum zu finden sind (Waldron und Selvendran 1990a). Anhand der hier angewandten Methoden kann zudem nicht eindeutig gesagt werden, mit welchen Monosacchariden die Substitution des Xylanrückgrats erfolgt. Mögliche, aus der Substitution resultierende Polysaccharide wären Arabinoxylane und/oder (4-*O*-Methyl-) Glucuronoxylane, die bereits in nicht-commeliniden Monokotyledonen, zu denen auch der Spargel gehört, nachgewiesen wurden (Das Gupta und Mukherjee 1967). Weitere Hemicellulosen in UBS aus Spargel stellen lineare Mannane dar, was durch einen Anteil von 4,7 mol% (H_2SO_4 -Hydrolyse) ausschließlich 1,4-verknüpfter Mannose gezeigt wurde.

Die Pektinfraktion der UBS aus Spargel besteht vorwiegend aus Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen. Das mittels Methanolyse bestimmte Galacturonsäure- zu Rhamnoseverhältnis lag bei etwa 3. Da Homogalacturonane aus Ketten α -(1 \rightarrow 4)-verknüpfter Galacturonsäureeinheiten bestehen und Typ I Rhamnogalacturonane ein Rückgrat aus alternierenden Rhamnose- und Galacturonsäureeinheiten besitzen, kann auf das Vorkommen ähnlicher Anteile an Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen geschlossen werden. Die Galactose- und Arabinoseanteile aus der Monosaccharidanalyse sind hauptsächlich den Pektinseitenketten Arabinan und (Arabino-) Galactan zuzuordnen. Dabei scheinen Galactane zu überwiegen, da Galactose in deutlich höheren Anteilen als Arabinose nachgewiesen wurde. Geringe Anteile an 1,6-verknüpften Galactopyranosen (<0,5 mol%) lassen zusätzlich auf das Vorkommen von niedrigen Gehalten an Typ II Arabinogalactanen schließen. Allerdings wurden weitere charakteristische Strukturelemente von Typ II Arabinogalactanen, wie 1,3-verknüpfte und/oder 1,3,6-verknüpfte Galactopyranosen, nicht identifiziert. In der Literatur ist das Vorkommen der genannten PMAAs beschrieben, sodass das

Vorhandensein geringer Mengen an Typ II Arabinogalactanen nicht auszuschließen ist (Rodriguez et al. 1999b; Waldron und Selvendran 1992).

Tabelle 4: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von unlöslichen Ballaststoffen aus frisch geerntetem Spargel im Vergleich zu Spargel, der bei 20°C für 7 Tage und bei 1°C für 28 Tage gelagert wurde. Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppelbestimmung, die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. Die Ergebnisse der restlichen Zeitpunkte sind in Kapitel 9.1, Tabelle 32 zusammengefasst. PMAA, partiell methyliertes Alditolacetat; t, terminal; p, Pyranose; f, Furanose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose.

PMAA [mol%]	frisch	20°C, 7 Tage	1°C, 28 Tage
t-Glcp	0,52 ± 0,14	0,44 ± 0,04	0,59 ± 0,13
1,4-Glcp	54,78 ± 0,45	59,34 ± 0,87	55,04 ± 0,35
1,4,6-Glcp	5,46 ± 0,04	5,59 ± 0,09	5,55 ± 0,05
t-Xylp	5,98 ± 0,01	5,98 ± 0,06	6,56 ± 0,09
1,4-Xylp	17,19 ± 0,67	17,22 ± 0,84	17,83 ± 0,24
1,2,4-Xylp^a			
t-Galp	1,77 ± 0,04	0,94 ± 0,03	1,59 ± 0,06
1,4-Galp	3,92 ± 0,19	0,77 ± 0,07	2,50 ± 0,11
1,6-Galp	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,50 ± 0,001
t-Araf	2,54 ± 0,06	2,51 ± 0,03	2,56 ± 0,03
1,2-Araf	1,03 ± 0,03	1,74 ± 0,002	1,16 ± 0,05
1,5-Araf	3,00 ± 0,10	1,74 ± 0,02	2,58 ± 0,04
1,3,5-Araf^a			
1,2-Rhap	0,46 ± 0,08	0,70 ± 0,18	0,56 ± 0,05
1,2,4-Rhap	0,34 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,26 ± 0,04
1,4-Manp	2,69 ± 0,05	2,55 ± 0,14	2,74 ± 0,12

^a Identifizierung mittels GC-MS. Aufgrund (fast) vollständiger Coelution mit einem unbekanntem Peak war jedoch keine Integration im GC-FID Chromatogramm möglich.

Die vorhandenen Arabinane liegen teilweise verzweigt vor, da neben 1,5-verknüpften Arabinofuranosen zusätzlich 1,3,5-verknüpfte Arabinofuranosen identifiziert wurden. Das charakteristische Fragmentierungsmuster der 1,3,5-verknüpften Arabinofuranose konnte mittels GC-MS eindeutig identifiziert werden. Allerdings war eine Integration des entsprechenden Peaks im GC-FID Chromatogramm nicht möglich, da es hierbei zu einer fast vollständigen Coelution mit einem unbekanntem, dominanten Peak kam. Wie hoch der Substitutionsgrad des 1,5-verknüpften Arabinoserückgrats ist, konnte daher nicht ermittelt werden. Hinweise für eine Substitution des Arabinanrückgrats in Position O-2 wurden nicht gefunden. Der An-

teil an 1,5-verknüpfter Arabinofuranose kann zudem leicht überschätzt worden sein, da 1,4-verknüpfte Arabinopyranose dasselbe PMMA ergibt. Im Allgemeinen überwiegt jedoch der Anteil an 1,5-verknüpfter Arabinofuranose deutlich. Unter Berücksichtigung des relativ geringen Rhamnoseanteils von 1,4 mol% (H_2SO_4 -Hydrolyse) und der Tatsache, dass die Rhamnose nur in sehr geringem Ausmaß 1,2,4-verknüpft vorlag, kann unter Berücksichtigung der hohen Anteile an Galactose und Arabinose auf lange (Arabino-) Galactan- und Arabinanseitenketten geschlossen werden.

Nacherntephysiologische Zellwandpolysaccharidveränderungen während der Lagerung bei 20°C wurden von einer Abnahme des Galactananteils dominiert, abzulesen an einer Abnahme des Galactoseanteils von 19,1 mol% (frisch) auf 7,1 mol% (20°C, 3 Tage) bzw. auf 4,5 mol% (20°C, 7 Tage) (H_2SO_4 -Hydrolyse). Ebenso war bei der Methylierungsanalyse eine Abnahme des Anteils der 1,4-verknüpften Galactopyranose von 3,92 mol% (frisch) auf 2,50 mol% (20°C, 3 Tage) bzw. auf 0,77 mol% (20°C, 7 Tage) zu beobachten. Änderungen hinsichtlich der Arabinanseitenketten sind dagegen nicht eindeutig zu bewerten. Während die Ergebnisse der H_2SO_4 -Hydrolyse einen konstant bleibenden Arabinoseanteil zeigten, wurde mittels Methanolyse ein Anstieg des Arabinoseanteils von 12,7 mol% (frisch) auf 16,5 mol% (20°C, 7 Tage) ermittelt. Im Gegensatz dazu stand die mittels Methylierungsanalyse bestimmte Abnahme des Anteils an 1,5-verknüpfter Arabinofuranose. In der Literatur ist teilweise eine leichte Abnahme des Arabinananteils während der Lagerung von Spargel beschrieben (Waldron und Selvendran 1992; Waldron und Selvendran 1990b), dennoch überwiegt auch in den anderen Studien die Abnahme des Galactananteils (Rodriguez et al. 1999a; Rodriguez et al. 1999b; Waldron und Selvendran 1992; Waldron und Selvendran 1990b). Einhergehend mit den beobachteten Veränderungen der neutralen Pektinseitenketten konnte auch eine Zunahme des Galacturonsäureanteils während der Lagerung bei 20°C beobachtet werden (Methanolyse). Da mittels Monosaccharidanalyse lediglich relative Anteile bestimmt werden, kann jedoch nicht gesagt werden, ob der Anstieg des Galacturonsäureanteils aufgrund einer Neusynthese von galacturonsäurehaltigen Polysacchariden oder aufgrund des Abbaus anderer Polysaccharide zustande kommt.

Des Weiteren war eine Zunahme des Anteils der mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzten Xylose von 18,6 mol% (frisch) auf 21,7 mol% (20°C, 3 Tage) bzw. auf 23,2 mol% (20°C, 7 Tage) zu beobachten. Allerdings änderte sich weder der Anteil an terminaler Xylopyranose noch der Anteil an 1,4-verknüpfter Xylopyranose. Xylosen sind β -(1→4)-verknüpft in Xylanen zu finden. Zudem liegen sie terminal in Xyloglucanen und Xylogalacturonanen vor. In Xylogalacturonanen ist die Xylose an Position O-3 der Galacturonsäure gebunden und kann zusätzlich an Position O-2 eine weitere Xylose tragen (Caffall und Mohnen 2009). Mit Hilfe der Ergebnisse der Methylierungsanalyse können somit keine Aussagen getroffen werden,

woraus die Zunahme des Xyloseanteils resultiert. Ein Anstieg des Xyloglucananteils gilt jedoch als unwahrscheinlich, da zum einen keine Änderung des Anteils der 1,4,6-verknüpften Glucopyranosen und zum anderen auch keine Änderung des mittels Methanolyse freigesetzten Glucoseanteils beobachtet werden konnte. Ob der Xylananteil und/oder der Xylogalacturonananteil während der Lagerung zunimmt kann nicht abschließend bewertet werden. In der Literatur ist in diesem Zusammenhang häufig eine Zunahme des Xyloseanteils einhergehend mit einem Anstieg des Anteils an 1,4-verknüpfter Xylopyranose beschrieben (Waldron und Selvendran 1992; Waldron und Selvendran 1990b). Zusätzlich zum Xyloseanteil nahm auch der Anteil an mittels H_2SO_4 freigesetzter Glucose von 49,3 mol% (frisch) auf 56,7 mol% (20°C, 3 Tage) bzw. auf 57,5 mol% (20°C, 7 Tage) zu. Ebenso erhöhte sich der Anteil an 1,4-verknüpfter Glucopyranose im Verlauf der Lagerung bei 20°C. Aufgrund der oben beschriebenen Gründe resultiert der erhöhte Anteil an 1,4-verknüpfter Glucopyranose während der Lagerung vermutlich aus einem höheren Celluloseanteil und nicht aus einem erhöhten Anteil an Xyloglucanen.

Im Gegensatz zu der Lagerung bei 20°C sind Änderungen der Polysaccharidprofile der UBS aus Spargel, der bei 1°C gelagert wurde, erst nach 28 Tagen Lagerung zu beobachten. Zusätzlich ist auch das Ausmaß der Änderungen weniger stark ausgeprägt. Dennoch ist zu erkennen, dass auch während der Lagerung bei 1°C der Anteil an 1,4-gebundener Galactopyranose abnahm. Ebenso nahm der durch H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzte Anteil an Xylose und Glucose leicht zu. Ein zunehmender Anteil an 1,4-gebundener Glucopyranose konnte allerdings nicht beobachtet werden. Des Weiteren konnte auch während der Lagerung bei 1°C ein geringfügiger Anstieg des Galacturonsäureanteils beobachtet werden.

In der Literatur sind bereits einige Daten zu Polysaccharidstrukturen aus Spargelzellwänden und deren Änderungen während der Lagerung vorhanden (Redondo-Cuenca et al. 1997; Rodriguez et al. 1999a; Rodriguez et al. 1999b; Villanueva-Suarez et al. 1999; Waldron und Selvendran 1992; Waldron und Selvendran 1990a; Waldron und Selvendran 1990b). Die hier ermittelte Polysaccharidzusammensetzung des frisch geernteten Spargels sowie die lagerbedingten Veränderungen stimmen zum größten Teil mit den Literaturdaten überein. Allerdings konnte eine in der Literatur beschriebene Zunahme an 1,4-verknüpften Xylopyranosen (Waldron und Selvendran 1992; Waldron und Selvendran 1990b) nicht festgestellt werden.

4.1.1.4 Bestimmung des Ligningehaltes

Die Bestimmung der Ligningehalte der UBS aus Spargel erfolgt sowohl als Klason-Lignin als auch als ABSL. Wie in Abbildung 16 zu sehen, ergaben sich dabei unterschiedliche Gehalte, wobei der Klason-Ligningehalt immer etwa um das Dreifache höher als der ABSL-Gehalt lag. Die unterschiedlichen Ergebnisse verdeutlichen die Schwierigkeit den Ligningehalt mittels

der bestehenden Methoden exakt zu ermitteln. Die unterschiedlichen Gehalte ergeben sich aus den unterschiedlichen Prinzipien der Methoden, wodurch es zu einer Unter- bzw. Überbestimmung kommen kann (siehe Kapitel 3.5.1). Bei Spargel besteht zusätzlich die Besonderheit, dass die UBS einen hohen Anteil an niedermolekularen, zellwandassoziierten phenolischen Komponenten besitzen (Jaramillo et al. 2007; Rodriguez-Arcos et al. 2002; Rodriguez-Arcos et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). Zwar wurden polysaccharidgebundene phenolische Bestandteile durch die Verwendung eines polysaccharidabbauenden Enzymgemisches (Driselase) weitgehend entfernt, jedoch bleiben Etherbindungen zu Lignin oder auch mit Monolignolen veresterte phenolische Gruppen erhalten. Diese haben einen maßgeblichen Einfluss auf den ABSL-Gehalt. Allerdings gelten die mit Monolignolen veresterten phenolischen Gruppen als Ligninbestandteile, da die Veresterung der Monolignole mit hoher Wahrscheinlichkeit vor dem Einbau der Monolignole in das Polymer stattfindet (Lu et al. 2015; Ralph et al. 1994). Daher stellt sich die Frage, ob diese tatsächlich zu einer Überbestimmung des ABSL-Gehaltes oder vielmehr zum tatsächlichen Ligningehalt beitragen.

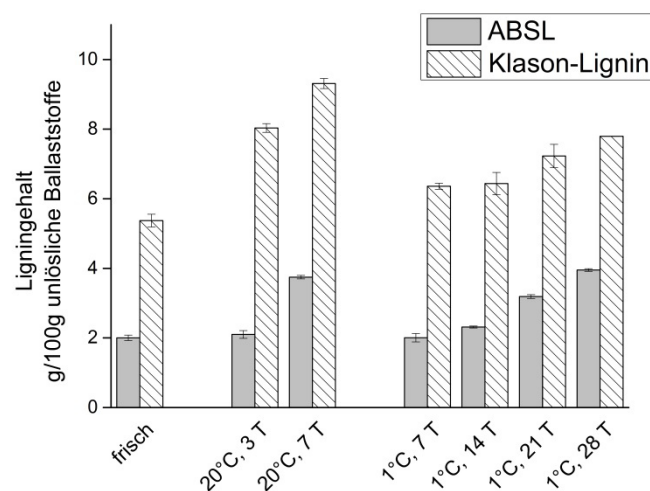


Abbildung 16: Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe aus frisch geerntetem Spargel im Vergleich zu den Ligningehalten der unlöslichen Ballaststoffe, die aus bei 20°C und 1°C gelagertem Spargel isoliert wurden. Die Bestimmung erfolgte als Klason-Lignin und als acetylbromidlösliches Lignin (ABSL). Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppelbestimmung, Abweichungen sind als Range/2 angegeben. T, Tage.

Anhand Abbildung 16 ist zu erkennen, dass sowohl der Klason-Ligningehalt als auch der ABSL-Gehalt während der Lagerung in Abhängigkeit von Lagerdauer und -temperatur zunahm. Beide Gehalte verdoppelten sich etwa während der Lagerung für 7 Tage bei 20°C. Im Gegensatz dazu kam es während der Lagerung bei 1°C erst nach 28 Tagen Lagerdauer zu einer Verdopplung des ABSL-Gehaltes. Der Klason-Ligningehalt stieg nach dieser Lagerdauer auf das 1,5-fache. Eine Zunahme des Ligningehaltes wird im Laufe der Reifung natürlicherweise erwartet, da hierbei das sekundäre Dickenwachstum der zunimmt, wodurch vermehrt Lignin in die Zellwand eingelagert wird. Waldron und Selvendran (1990b) zeigten,

dass insbesondere in der unteren Hälfte der Spargelstangen das sekundäre Dickenwachstum überwiegt, während in den Regionen von der Mitte bis zur Spitze des Spargels vermehrt Zellteilungen und Zellerweiterungen stattfinden. Eine erhöhte Lignineinlagerung in die Pflanzenzellwände während der Lagerung kann jedoch auch durch Verwundungsprozesse am unteren Ende der Spargelstangen bei der Ernte ausgelöst worden sein.

4.1.1.5 Charakterisierung von Ligninstrukturen

Die Bestimmung der Monolignolzusammensetzung der Lignine aus den UBS von Spargel erfolgte mittels DFRC-Methode und anschließender GC-SIM-MS Analyse. Zusätzlich wurde sie mittels 2D-NMR Analyse von isolierten Ligninen semiquantitativ bestimmt. Dies hat den Vorteil, dass die Gesamtheit an Ligninmonomeren erfasst wird. Im Gegensatz dazu werden bei der DFRC-Methode lediglich die Monomere bestimmt, die vollständig über β -O-4-Bindungen in das Polymer eingebaut wurden. In Tabelle 5 ist eine Übersicht über die Monomierzusammensetzung der Lignine aus den unterschiedlich gelagerten Spargelproben im Vergleich zur Zusammensetzung der Lignine aus den frisch geernteten Spargelproben gegeben. Dabei werden die Ergebnisse aus der DFRC-Methode mit den Ergebnissen der 2D-NMR Analyse verglichen.

Tabelle 5: Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung der Ligninpolymere aus den unlöslichen Ballaststoffen von frisch geerntetem und bei 20°C und 1°C gelagertem Spargel mittels derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode und 2D-NMR. Die Ergebnisse der DFRC-Methode sind in mol% dargestellt und resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Das mittels 2D-NMR ermittelte Guaiacyl (G)/Syringylverhältnis (S) resultiert aus der Einfachbestimmung der isolierten Lignine. H, Hydroxyphenyl; ng, nachgewiesen.

		H:G:S (DFRC) [mol%]	G/S (DFRC)	G/S (NMR)
frisch		ng : 76,7 : 23,3	3,9 ± 0,7	2,7
20°C	3 Tage	0,8 : 61,6 : 37,6	2,4 ± 1,2	1,5
	7 Tage	0,9 : 57,7 : 41,4	1,7 ± 0,6	1,2
1°C	7 Tage	ng : 83,1 : 16,9	4,4 ± 0,7	4,2
	14 Tage	ng : 78,8 : 21,2	4,3 ± 0,6	3,4
	21 Tage	ng : 76,8 : 23,2	4,1 ± 1,1	3,5
	28 Tage	ng : 72,8 : 27,2	2,8 ± 0,2	2,0

H-Einheiten spielen als Monolignole von Spargelligninen nur eine untergeordnete Rolle. Mittels GC-SIM-MS konnten zwar Spuren nachgewiesen werden, allerdings lagen die Gehalte in den meisten Fällen unter der Bestimmungsgrenze. Eine Ausnahme bildeten die Proben der Lagerung bei 20°C, bei denen H-Einheiten in geringen Mengen (<1 mol%) quantifiziert werden konnten. Dies war unerwartet, da *para*-Cumarylalkohol in der Regel vermehrt zu Be-

ginn der Lignifizierung in das Polymer eingebaut wird und im weiteren Verlauf keine große Rolle im Aufbau des Ligninpolymers spielt (Donaldson 2001). Da die H-Einheiten nur eine untergeordnete Rolle spielen, kann zur weiteren Charakterisierung der Lignine hinsichtlich ihrer Monomierzusammensetzung das Verhältnis von G- zu S-Einheiten herangezogen werden. Lignine aus den frisch geernteten Spargelproben waren dabei aus Coniferyl- und Sinapylalkohol im Verhältnis von etwa 4:1 aufgebaut. Ähnliche G/S-Verhältnisse im Ligninpolymer von Spargel wurden bereits zuvor gezeigt (Bunzel et al. 2005b; Schäfer et al. 2015). Der Vergleich der Spargelproben der Lagerzeitendpunkte (20°C, 7 Tage bzw. 1°C, 28 Tage) mit der frischen Probe ergab eine Abnahme der G/S-Verhältnisse im Verlauf der Lagerung, wobei diese sowohl abhängig von der Lagertemperatur als auch der Lagerdauer war. Nach 7 Tagen Lagerung bei 20°C lag das G/S-Verhältnis bei $1,7 \pm 0,6$, wohingegen nach 28 Tagen Lagerung bei 1°C ein G/S-Verhältnis von $2,8 \pm 0,2$ vorlag (DFRC-Methode). Eine Abnahme der G/S-Verhältnisse bedeutet, dass während der Lagerung von Spargel vermehrt Sinapylalkohol in das Ligninpolymer eingebaut wird. Die Änderung der Ligninzusammensetzung bestätigt somit auch den erhöhten Ligningehalt, da Lignin in der Regel nicht abgebaut sondern lediglich aufgebaut wird. Die mittels 2D-NMR ermittelten G/S-Verhältnisse stimmen gut mit den mittels DFRC-Methode erhaltenen G/S-Verhältnissen überein. Auch hierbei bestätigte sich ein bevorzugter Einbau an Sinapylalkohol in das Ligninpolymer während der Lagerung. Die gute Übereinstimmung zeigt zudem, dass die DFRC-Methode trotz der Beschränkung, dass sie nur vollständig β -O-4-gebundene Monolignole erfasst, in diesem Fall gut geeignet zur Charakterisierung der Monolignolzusammensetzung ist.

Neben der Bestimmung der Monolignolanteile kann die 2D-NMR Analyse auch genutzt werden, um die Bindungstypen innerhalb der Ligninpolymere zu bestimmen. In Abbildung 17 ist beispielhaft ein Ausschnitt eines HSQC-Spektrums gezeigt, mit Hilfe dessen die unterschiedlichen Bindungstypen identifiziert wurden. Wie in Kapitel 3.5.2.3 beschrieben können durch Volumenintegration der α -C-H-Signale die Anteile der verschiedenen Bindungstypen unter Verwendung von in der Literatur beschriebenen Korrekturfaktoren ermittelt werden (Ralph et al. 2006). Die semiquantitative Bestimmung der Anteile der Bindungstypen in den Ligninpolymeren aller Spargelproben ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

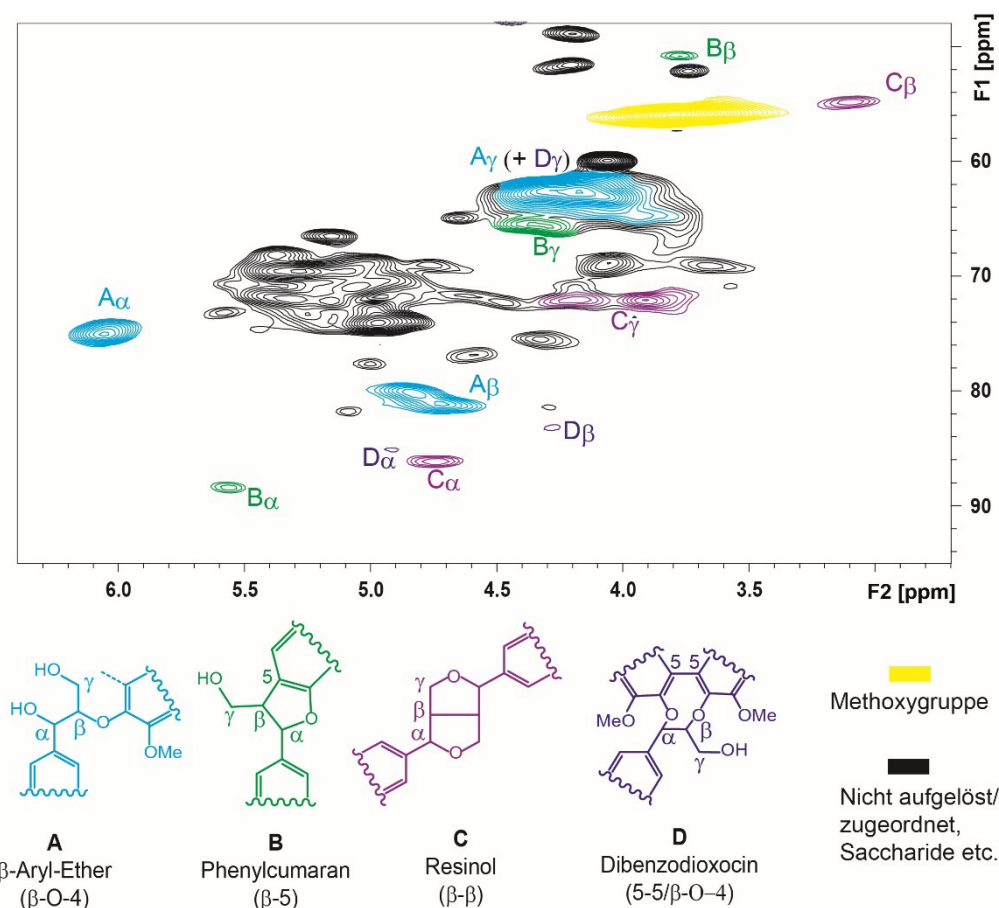


Abbildung 17: Ausschnitt des HSQC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen der frisch geernteten Spargelproben isoliert wurden. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . Die identifizierten Bindungstypen sind entsprechend farblich markiert. Aufgrund des breiten Signals der γ -C-H-Korrelation der β -O-4-Bindung war die γ -C-H-Korrelation der Dibenzodioxocineinheit nicht ausreichend aufgelöst. Die berechneten Anteile der Bindungstypen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Bei allen analysierten Ligninen stellten β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindungen) mit Anteilen zwischen 72,6% und 86,1% erwartungsgemäß den Hauptbindungstyp dar. In den Ligninpolymeren, die aus den frisch geernteten Spargelproben isoliert wurden, waren Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) am zweithäufigsten zu finden, gefolgt von Phenylcumaranstrukturen (β -5-Bindungen) und Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen). Während der Lagerung kam es zu einer Änderung des Bindungstypenprofils, die abhängig von der Lagertemperatur und -zeit war. Auffällig war besonders die Abnahme des Anteils der Resinolstrukturen von 17,6% (frisch) auf 7,3% (20°C, 7 Tage) bzw. 10,8% (1°C, 28 Tage). Gleichzeitig nahm der Anteil an β -O-4-Bindungen von 73,8% (frisch) auf 86,1% (20°C, 7 Tage) bzw. 81,5% (1°C, 28 Tage) zu. Das Bindungstypenprofil der Lignine der bei 1°C für 21 Tage gelagerten Spargelproben wich insgesamt von dem im Verlauf der Lagerung erkennbaren Trend ab. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass die isolierte Ligninmenge mit etwa 10 mg vergleichsweise gering war, wodurch die Messung und die Volumenintegration der Signale erschwert wurden.

Tabelle 6: Bindungstypen und deren Anteile in den analysierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen der frisch geernteten und der bei 20°C und 1°C gelagerten Spargelproben isoliert wurden. Die Berechnung der Anteile erfolgte nach Volumenintegration der jeweiligen α -C-H Signale und unter Verwendung von in der Literatur vorhandenen Korrekturfaktoren. A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4). $n=1$.

		%A	%B	%C	%D
frisch		73,8	6,4	17,6	2,2
20°C	3 Tage	76,9	5,9	13,6	3,6
	7 Tage	86,1	5,8	7,3	0,8
1°C	7 Tage	72,6	7,5	16,0	3,9
	14 Tage	79,6	7,5	10,4	2,4
	21 Tage	83,4	5,8	5,9	4,9
	28 Tage	81,5	6,6	10,8	1,2

Der abnehmende Anteil an Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) kann möglicherweise auf den Mechanismus der Lignifizierung zurückgeführt werden. Die β - β -Bindung entsteht in der Regel bevorzugt durch die Dimerisierung zweier Monolignole, was normalerweise zu Beginn der Lignifizierung eintritt. In späteren Phasen findet dies oft nur in geringem Ausmaß statt, da beim Wachstum des Polymers bevorzugt Monomere bzw. Oligomere an das Ligninpolymer koppeln (Ralph et al. 2004b). Ein geringerer Anteil dieser Bindungen zu späteren Lagerungszeitpunkten spricht somit dafür, dass die Lignifizierung hauptsächlich durch die Koppelung neuer Monomere an bestehende Polymere stattfindet und nicht durch die Bildung neuer, vergleichsweise niedermolekularer Ligninpolymere.

4.1.1.6 Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile und Zellwand Cross-Links

Die Texturveränderung von Spargel während der Lagerung wird neben dem erhöhten Ligningehalt auch mit einem starken Anstieg von Hydroxycimtsäuren, insbesondere von Ferulasäure und *para*-Cumarsäure, sowie mit einem Anstieg von DFS assoziiert (Jaramillo et al. 2007; Rodriguez-Arcos et al. 2002; Rodriguez-Arcos et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). In den genannten Studien wurden 8-8-c-DFS, 8-8-nc-DFS, 8-O-4-DFS, 8-5-c-DFS, 8-5-nc-DFS und in geringem Ausmaß auch 5-5-DFS identifiziert und quantifiziert, wobei die quantitative Analytik dieser Verbindungen teilweise Fragen aufwirft.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten konnte auch in dieser Arbeit sowohl ein Anstieg der phenolischen Monomere als auch der DFS und TriFS beobachtet werden (Abbildung 18). Das Ausmaß des Anstiegs war abhängig von der Lagertemperatur und der Lagerdauer. So nahm der Gesamtgehalt der phenolischen Monomere von $21,99 \pm 5,47$ mg/100 g UBS

(frisch) auf einen Gehalt von $406,34 \pm 43,60$ mg/100 g UBS (20°C , 7 Tage) bzw. von $153,56 \pm 23,62$ mg/100 g UBS (1°C , 28 Tage) zu. Der Gehalt an DFS stieg von $5,80 \pm 0,53$ mg/100 g UBS (frisch) auf $144,14 \pm 3,38$ mg/100 g UBS (20°C , 7 Tage) bzw. auf $76,81 \pm 2,80$ mg/100 g UBS (1°C , 28 Tage) an. TriFS konnten in den UBS von frisch geerntetem Spargel in nur sehr geringen Mengen von $0,31 \pm 0,05$ mg/100 g UBS quantifiziert werden. Der Gehalt nahm jedoch auch hierbei deutlich während der Lagerung auf $24,47 \pm 1,23$ mg/100 g UBS (20°C , 7 Tage) bzw. auf $9,73 \pm 0,90$ mg/100 g UBS (1°C , 28 Tage) zu.

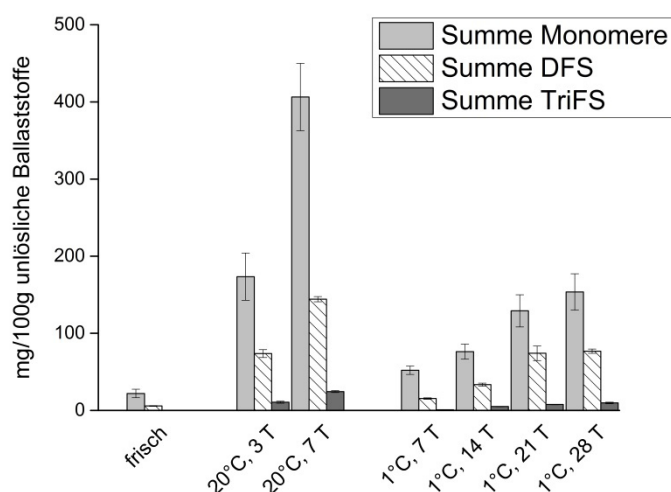


Abbildung 18: Gesamtgehalte der phenolischen Monomere, Diferulasäuren (DFS) und Triferulasäuren (TriFS) nach alkalischer Verseifung der unlöslichen Ballaststoffe und anschließender Analyse mittels HPLC-DAD. Die Ergebnisse sind für die Spargelproben aller Lagerzeitpunkte im Vergleich zu den frisch geernteten Spargelproben dargestellt und resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Gruppen ist Tabelle 33 bis Tabelle 35 in Kapitel 9.1 zu entnehmen.

Den Hauptbestandteil der phenolischen Monomere in den UBS aus frisch geerntetem Spargel stellte die *trans-para*-Cumarsäure mit $9,27 \pm 1,91$ mg/100 g UBS dar, gefolgt von *trans*-Ferulasäure mit $4,24 \pm 0,75$ mg/100 g UBS. Des Weiteren konnten *cis-para*-Cumarsäure, *cis*-Ferulasäure, Vanillin, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzaldehyd quantifiziert werden. Das Vorkommen dieser Monomere in Spargel wurde bereits mehrfach gezeigt (Rodriguez-Arcos et al. 2002; Rodriguez-Arcos et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). Entgegen der Literatur waren zusätzlich auch Syringasäure und Syringaldehyd in Spuren detektierbar. Eine Quantifizierung war jedoch aufgrund der teilweisen Coelution mit einem unbekanntem Peak nicht möglich. Während der Lagerung der Spargelstangen kam es zu einem drastischen Anstieg an *trans-para*-Cumarsäure (30-fach nach 7 Tagen Lagerung bei 20°C und 10-fach nach 28 Tagen Lagerung bei 1°C) und an *trans*-Ferulasäure (18-fach nach 7 Tagen Lagerung bei 20°C und 13-fach nach 28 Tagen Lagerung bei 1°C). Die Gehalte der anderen phenolischen Monomere stiegen ebenfalls an, jedoch deutlich geringer. Eine detail-

lierte Übersicht über die Zusammensetzung der phenolischen Monomere aller Proben ist in Kapitel 9.1, Tabelle 33 zu finden.

Die DFS-Fraktion setzte sich aus 8-5-c/nc-DFS (56%), 8-8-c/nc-DFS (31%), 8-O-4-DFS (11%) und 5-5-DFS (2%) zusammen. Die einzelnen DFS-Gehalte der frisch geernteten und den gelagerten Proben sind tabellarisch in Kapitel 9.1 Tabelle 34 zusammengefasst. Das Vorkommen genannter DFS in Spargel wird ebenfalls in der Literatur beschrieben (Dobberstein und Bunzel 2010; Jaramillo et al. 2007; Rodriguez-Arcos et al. 2002; Rodriguez-Arcos et al. 2004; Rodriguez et al. 2005). Unter den 8-5-gekoppelten DFS gilt lediglich die cyclische Form als nativ, 8-5-nc-DFS und 8-5-dc-DFS entstehen dagegen vermutlich während der Verseifung der Proben (Bunzel 2010). Dies wurde dadurch bestätigt, dass die 8-5-dc-DFS nur teilweise in den hier bearbeiteten Proben identifiziert werden konnte. Da diese mit einem unbekanntem Peak coeluierte, konnte sie allerdings nicht quantifiziert werden. Im Unterschied zur Literatur konnte zusätzlich zu den genannten DFS die 8-8-THF-DFS aufgrund ihres UV-Spektrums identifiziert werden. Allerdings stand keine Standardlösung zur Verfügung, um die Identität des Peaks zu überprüfen, daher wurde diese DFS semiquantitativ bestimmt und nicht mit in die Gesamtsumme einbezogen.

Während der Lagerung kam es in Abhängigkeit der Lagerbedingungen zu einem Anstieg der Gehalte aller identifizierter DFS. Die höchsten Gehalte wurden dabei nach Lagerung für 7 Tage bei 20°C erreicht. Zwar stiegen die Gehalte auch bei der Lagerung bei 1°C, dennoch lagen die DFS-Gehalte nach 28 Tagen Lagerung immer noch deutlich unter den DFS-Gehalten (etwa 50%), die durch die Lagerung bei 20°C erreicht wurden. Interessanterweise änderten sich jedoch die relativen Anteile der einzelnen Isomere zueinander nicht. Da das Ausmaß der Bildung der verschiedenen Regioisomere u.a. von dem pH-Wert des Mediums abhängt, scheinen sich diese Bedingungen im Verlauf der Lagerung nicht zu verändern.

Die Identifizierung einzelner TriFS erwies sich, insbesondere in den UBS aus frisch geerntetem Spargel, aufgrund hoher Matrixanteile im Chromatogramm als schwierig. Dennoch konnte 8-5-nc/8-O-4-TriFS detektiert werden. In den Proben, die bei 20°C für 3 Tage gelagert wurden, war zusätzlich die Identifizierung und Quantifizierung von 5-5/8-O-4-TriFS und 8-O-4/8-O-4-TriFS möglich. Bei den Proben, die bei 1°C gelagert wurden, war die Detektion dieser TriFS ab einer Lagerdauer von 14 Tagen möglich. Die ermittelten Gehalte der einzelnen TriFS in den frisch geernteten und den gelagerten Spargelproben sind in Kapitel 9.1, Tabelle 35 zu finden. Im Gegensatz zu den phenolischen Monomeren und DFS gibt es kaum Literaturdaten zu dem Vorkommen von TriFS in Spargel. Dobberstein und Bunzel (2010) zeigten das Vorkommen von 5-5/8-O-4-TriFS, 8-8-c/8-O-4-TriFS und 8-O-4/8-O-4-TriFS in UBS aus Spargel, allerdings lagen die Gehalte unter der Bestimmungsgrenze, sodass keine Quantifizierung möglich war. Das Vorkommen von 8-8-c/8-O-4-TriFS in Spargel konnte in den hier

verwendeten Proben nicht bestätigt werden, dafür gelang zusätzlich der Nachweis der 8-5-nc/8-O-4-TriFS. Außerdem war es möglich, Gehalte der TriFS zu quantifizieren. Die Ergebnisse sind jedoch als semiquantitativ zu betrachten sind, da lediglich für 5-5/8-O-4-TriFS ein Korrekturfaktor aus der Literatur zur Verfügung stand (Dobberstein und Bunzel 2010). Für die weiteren TriFS wurden Responsefaktoren anhand entsprechender Standardlösungen zur semiquantitativen Bestimmung dieser TriFS ermittelt.

Die Gehalte aller TriFS stiegen während der Lagerung der Spargelproben in Abhängigkeit der Lagertemperatur und der Lagerdauer an. Wie auch bei den DFS waren die höchsten Gehalte nach 7 Tagen Lagerung bei 20°C zu finden. Zudem lagen die Gehalte zum Endpunkt der Lagerung bei 1°C (28 Tage Lagerung) ebenfalls um etwa 50% niedriger als die Gehalte, die zum Endpunkt der Lagerung bei 20°C (7 Tage Lagerung) analysiert wurden. Interessanterweise scheint es auch hier keine speziellen Bedingungen zu geben, die die spezifische Bildung einzelner TriFS bevorzugen würden, sodass trotz steigender Gehalte, die relativen Anteile konstant blieben.

Zusammenfassend betrachtet war der Anstieg der niedermolekularen, zellwandgebundenen phenolischen Bestandteile dominiert durch den drastischen Anstieg des Gehaltes der *para*-Cumarsäure, gefolgt von einem starken Anstieg an monomerer Ferulasäure. Generell liegt Ferulasäure vorwiegend polysaccharidgebunden vor, wobei die Bindung bei monokotylen Pflanzen bevorzugt an Arabinoxylane erfolgt (Bunzel 2010). Durch die Ausbildung von Di-, Tri- und Tetrameren ist sie an der Vernetzung von Polysacchariden untereinander oder von Polysacchariden mit Lignin beteiligt. Dagegen ist *para*-Cumarsäure vor allem in Gräsern bevorzugt an Lignin gebunden, wobei die Bindung an Arabinoxylane ebenfalls gezeigt werden konnte (Allerdings et al. 2006; Ishii und Hiroi 1990; Ralph 2010). Die These, dass *para*-Cumarsäure auch in Spargel an Lignin gebunden vorliegt, konnte mittels 2D-NMR Analysen der isolierten und acetylierten Lignine unterstützt werden. Wie in Abbildung 19 zu sehen, erfolgte die Identifizierung der *para*-Cumarsäure anhand der C2/6-H2/6-Korrelationen ($\delta^1\text{H}/\delta^{13}\text{C}$ [ppm]: 7,72/129,99). Die für die Identifizierung der ligningebundenen *para*-Cumarsäure benötigten chemischen Verschiebungen wurden näherungsweise anhand eines acetylierten *para*-Cumarsäureethylesters ermittelt. Durch Volumenintegration dieses Signals kann der Anteil an *para*-Cumarsäure im Verhältnis zu den Hauptmonomereinheiten G und S bestimmt werden. Der dadurch bestimmte Anteil der *para*-Cumarsäure stieg während der Lagerung in Abhängigkeit der Lagertemperatur und der Lagerdauer an. Bei der Volumenintegration ist allerdings zu beachten, dass die Signale der *para*-Cumarsäure oft überschätzt werden. Dies kann damit erklärt werden, dass *para*-Cumarsäure häufig als Endgruppe vorliegt und daher eine längere Relaxationszeit als das restliche Polymer aufweist. Da zudem die Gehalte der *para*-Cumarsäure nach alkalischer Verseifung im Verlauf der Lagerung an-

stiegen, kann auf eine zumindest teilweise Bindung der *para*-Cumarsäure an Lignin über eine Esterbindung geschlossen werden.

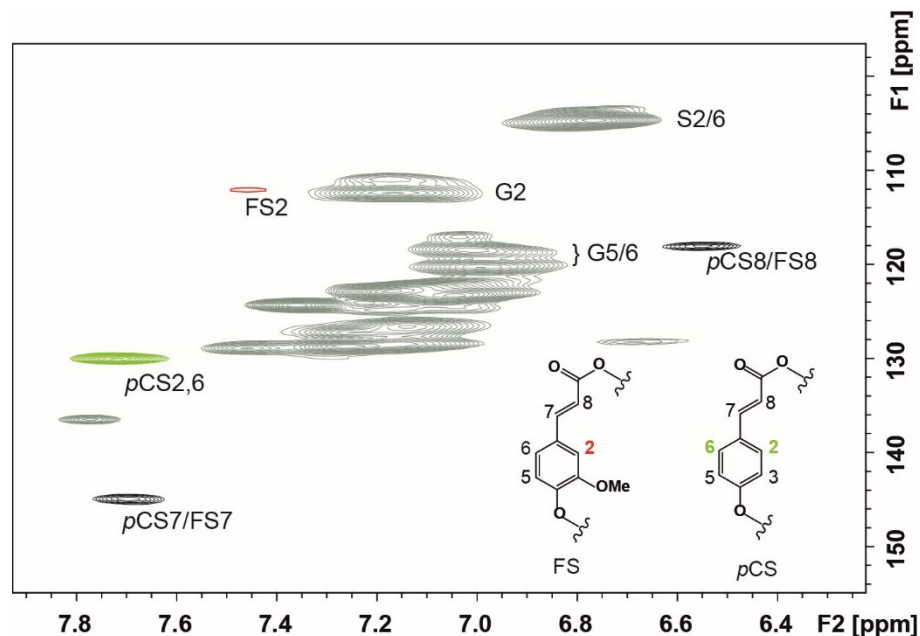


Abbildung 19: Aromatischer Bereich des HSQC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen von Spargel isoliert wurden, der für 7 Tage bei 20°C gelagert wurde. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . Für die Identifizierung der *para*-Cumarsäure (pCS) und Ferulasäure (FS) wurden die chemischen Verschiebungen der entsprechenden acetylierten Ethylester verwendet. Im Spektrum sind zusätzlich die Signale markiert, anhand derer die Identifizierung der Guaiacyl (G)- und Syringyleinheiten (S) erfolgte.

Häufig wird ausschließlich eine Bindung der *para*-Cumarsäure an die γ -ständige Hydroxygruppe des Ligninpolymers beschrieben, was für eine Veresterung der Monolignole vor dem Einbau in das Polymer spricht (Crestini und Argyropoulos 1997; Ralph et al. 1994). Außerdem wird bevorzugt Sinapylalkohol mit *para*-Cumarsäure verestert (Grabber et al. 1996; Lu und Ralph 1999). Für Spargel konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es während der Lagerung neben einem Anstieg des Gehaltes der *para*-Cumarsäure auch zu einem vermehrten Einbau von Sinapylalkohol in das Ligninpolymer kommt. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch hier bevorzugt Sinapylalkohol mit *para*-Cumarsäure verestert wird. Ein weiterführendes HMBC-Experiment lieferte allerdings keinen eindeutigen Hinweis auf die Bindungsposition der *para*-Cumarsäure im Ligninpolymer. Zusätzlich wurde versucht mit *para*-Cumarsäure veresterte Monolignole mittels DFRC-Methode und anschließender GC-MS Analyse nach Lu und Ralph (1999) zu detektieren. Jedoch konnten auch hierbei keine Cumarate nachgewiesen werden, was vermutlich mit dem vergleichsweise geringen Ligningehalt der Proben erklärt werden kann. Anhand von Modellsubstanzen konnte gezeigt werden, dass β -Aryl-Ether, die in γ -Position verestert vorliegen, lediglich zu 60-65% im Vergleich zu nicht veresterten β -Aryl-Ethern gespalten

werden, was die Empfindlichkeit dieses Nachweises zusätzlich reduziert (Lu und Ralph 1999).

In Abbildung 19 ist zudem ein schwaches Signal bei einer chemischen Verschiebung von $\delta^1\text{H}$ 7,45 ppm und $\delta^{13}\text{C}$ 112,06 ppm zu erkennen. Dieses Signal, welches auf ligningebundene Ferulasäure hinweist, war nicht im HSQC-Spektrum der acetylierten Lignine, die aus den UBS von frisch geerntetem und bei 1°C für 7 und 14 Tage gelagertem Spargel gewonnen wurden, vorhanden. Allerdings können die hohen Gehalte an Ferulasäure, die nach alkalischer Verseifung quantifiziert wurden, nicht ausschließlich durch dieses schwache Signal erklärt werden. Wie beschrieben ist Ferulasäure häufig estergebunden an Polysaccharide zu finden. Erste Versuche zur Aufklärung von möglichen Interaktionen von Ferulasäure und (Arabino-) Xylanen waren jedoch nicht erfolgreich, sodass die Bindung von Ferulasäure an Zellwandpolymere aus Spargel weiterer Untersuchungen bedarf.

4.1.2 Zellwandcharakterisierung von Brokkolistrunk

4.1.2.1 Sensorische Beurteilung des Probenmaterials

Für die sensorische Beurteilung der Brokkoliprobe wurde jeweils der Strunk am Ansatz der Röschen entfernt und gekocht. Die sensorische Bewertung erfolgte anhand verschiedener Attribute hinsichtlich Geschmack (kohlartig, harmonisch, süß, nussig, bitter, adstringierend, fremd) und Konsistenz (weich, zäh, holzig). Die Bewertung wurde je nach Probe von vier bis sechs Prüfern durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an Testpersonen ergaben sich hierbei teilweise sehr hohe Standardabweichungen. In Abbildung 20 sind zur besseren Übersicht die Ergebnisse der sensorischen Beurteilung für die frische Probe im Vergleich zu den Proben, die bei 20°C für 7 Tage bzw. bei 1°C für 28 Tage gelagert wurden, dargestellt. Die Proben, die für 9 Tage bei 20°C gelagert wurden, waren aufgrund starken Schimmelbefalls der Röschen nicht mehr zu verköstigen.

Der Geschmack der frischen Probe wurde mit kohlartig, harmonisch und süß beschrieben. Die Attribute nussig, bitter, adstringierend und fremd spielten kaum eine Rolle. Im Vergleich zu den sensorischen Daten der gelagerten Proben sind kaum Veränderungen zu erkennen. Lediglich eine Abnahme des leicht süßlichen Geschmacks kann vermutet werden. Die Konsistenz der frisch geernteten Proben wurde mit weich und kaum zäh und kaum holzig beschrieben. Trotz Berücksichtigung der hohen Standardabweichungen kann eine Tendenz einer Texturveränderung während der Lagerung beobachtet werden. Der Brokkolistrunk wurde im Verlauf der Lagerung bei 20°C und 1°C weniger weich und gleichzeitig zäher und holziger. Das Ausmaß der Texturveränderungen war nach 28 Tagen Lagerzeit bei 1°C ähnlich stark ausgeprägt wie nach 7 Tagen Lagerzeit bei 1°C.

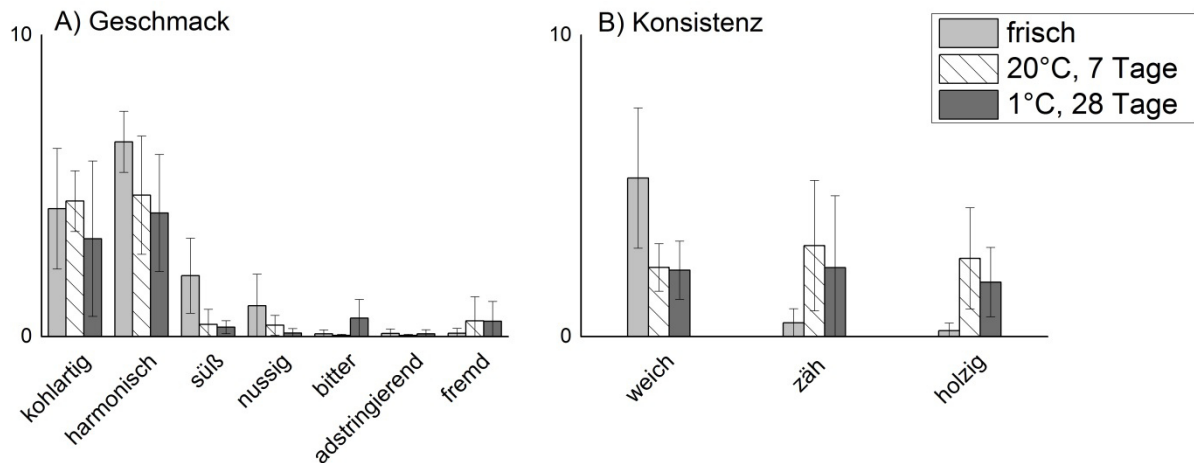


Abbildung 20: Ergebnisse der sensorischen Beurteilung von gekochtem Brokkolistrunk hinsichtlich unterschiedlicher Geschmacks- (A) und Konsistenzattribute (B). Die Ergebnisse sind für die frisch geernteten Proben im Vergleich zu den bei 20°C für 7 Tage und bei 1°C für 28 Tage gelagerten Proben gezeigt. Die Verkostung erfolgte für jeden Zeitpunkt von vier bis sechs Prüfern.

4.1.2.2 Bestimmung des Ballaststoffgehaltes

Der Ballaststoffgehalt des Brokkolistrunks wurde getrennt nach UBS und LBS bestimmt. In Abbildung 21 sind die Gehalte beider Fraktionen für frisch geernteten Brokkolistrunk im Vergleich zu bei 20°C und 1°C gelagerten Brokkolistrunk gezeigt. Da ausreichend Material vorhanden war, resultieren die angegebenen Ergebnisse aus einer Dreifachbestimmung. Generell war auffällig, dass der Gehalt der UBS für alle Zeitpunkte um mindestens das Zehnfache höher als der Gehalt an LBS war.

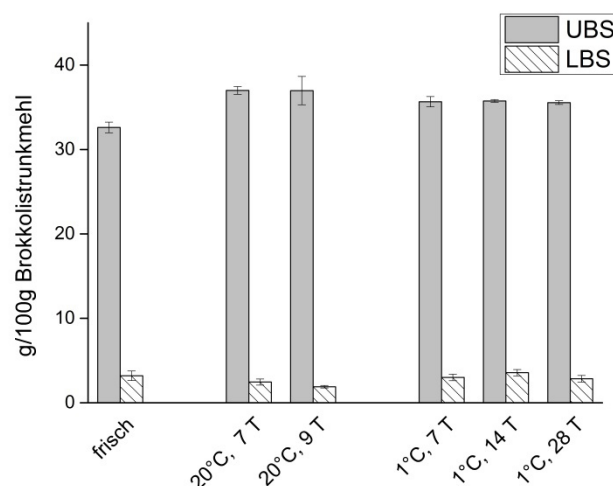


Abbildung 21: Unlösliche (UBS) und lösliche (LBS) Ballaststoffgehalte des getrockneten Brokkolistrunkmehls. Dargestellt sind die Ergebnisse der frisch geernteten Brokkoliprobe im Vergleich zu den bei 20°C und 1°C für verschiedene Zeiträume gelagerten Proben. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung. T, Tage.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen, kommt es zu einem leichten Anstieg des Gehaltes an UBS sowohl während der Lagerung bei 20°C als auch bei 1°C für jeweils 7 Tage. Die Gehalte der LBS blieben dagegen im Verlauf der Lagerung weitgehend konstant. Der Wassergehalt der Proben lag bei etwa 90%, wobei eine leichte Abnahme des Wassergehaltes im Verlauf der Lagerung bei 1°C zu erkennen war (Tabelle 7). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Wassergehalt aus einer Einfachbestimmung resultierte, sodass Aussagen zu einer signifikanten Abnahme nicht getroffen werden können. Daten zu Ballaststoffgehalten von Brokkolistrunk sind in der Literatur nicht vorhanden. Für eine Einordnung der hier analysierten Gehalte kann der Ballaststoffgehalt von Blumenkohl herangezogen werden, der ebenfalls zur Familie der Brassicaceen gehört. Hierfür wurde von Khanum et al. (2000) ein Gesamtballaststoffgehalt von 4,2% ermittelt.

Tabelle 7: Gesamtballaststoffgehalte (BS) der frisch geernteten und bei 20°C und 1°C gelagerten Brokkoliprobe bezogen auf das Frischgewicht ($n=3$). Der dafür notwendige Wassergehalt wurde aus dem Gewichtsverlust während der Gefriertrocknung der Proben berechnet ($n=1$).

		Wassergehalt [%]	BS [g/100 g Frischgewicht]
frisch		90,8	3,3 ± 0,1
20°C	7 Tage	89,9	4,0 ± 0,1
	9 Tage	90,2	3,8 ± 0,2
1°C	7 Tage	90,5	3,7 ± 0,04
	14 Tage	89,6	4,1 ± 0,04
	28 Tage	87,7	4,7 ± 0,1

4.1.2.3 Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe

Die Charakterisierung der in den UBS aus Brokkolistrunk vorliegenden Polysaccharidstrukturen erfolgte durch Monosaccharidbestimmung nach H₂SO₄-Hydrolyse bzw. Methanolyse sowie mit Hilfe der Methylierungsanalyse. Des Weiteren wurden Arabinan- und Galactanstrukturen der Polysaccharide aus den UBS mittels einer enzymatisch-chromatographischen Screeningmethode näher charakterisiert. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der H₂SO₄-Hydrolyse und der Methanolyse für alle Lagerzeitpunkte im Vergleich zu frisch geerntetem Brokkoli dargestellt. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalyse zur besseren Übersicht lediglich für die frisch geernteten Proben im Vergleich zu den Proben der Lagerzeitpunkte (Lagerung bei 20°C für 9 Tage bzw. bei 1°C für 28 Tage) zusammengefasst. Die Ergebnisse der restlichen Proben befinden sich in Kapitel 9.1, Tabelle 36.

Die Polysaccharide der UBS aus frisch geerntetem Brokkolistrunk bestanden hauptsächlich aus den Neutralzuckern Glucose, gefolgt von Arabinose und Xylose sowie vergleichbaren Anteilen an Galactose und Mannose. Außerdem waren geringe Mengen an Rhamnose vor-

handen. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Methanolyse wird deutlich, dass auch die Galacturonsäure ein bedeutendes Monomer der Polysaccharide aus den UBS von Brokkoli ist. Diese Monosaccharidzusammensetzung ist vergleichbar mit in der Literatur vorhandenen Daten (Bestard et al. 2001; Femenia et al. 2000; Houben et al. 2011; Mueller et al. 2003). Lediglich der Anteil der Galactose war bei den hier analysierten Proben etwas geringer als in der Literatur beschrieben. Die Glucose lag hauptsächlich 1,4-verknüpft vor und ist vermutlich überwiegend der Cellulose zuzuordnen. Der nach Methanolyse bestimmte geringe Glucoseanteil von 2,5 mol% bestätigte dies, da der hierbei ermittelte Glucoseanteil nicht aus kristalliner Cellulose, sondern hauptsächlich aus Xyloglucanen resultiert. Das Vorkommen von Xyloglucanen wurde durch die Identifizierung der PMMAAs der 1,4,6-verknüpften Glucopyranose sowie der terminalen Xylopyranose bestätigt. Der Nachweis von 1,4-verknüpften Xylopyranosen zeigt außerdem das Vorhandensein linearer Xylane an. Aufgrund beschriebener Coelution der PMAAs, die aus 1,2,4- und 1,3,4-verknüpften Xylopyranosen entstehen, mit dem dominanten Peak des PMAAs der 1,4-verknüpften Glucopyranose kann ein geringer, hier nicht zuweisender Substitutionsgrad der Xylane nicht vollständig ausgeschlossen werden. Literaturdaten bezüglich der Polysaccharidstrukturen in den UBS aus Brokkolistrunk sind nicht vorhanden. Femenia et al. (1999) analysierten den verwandten Blumenkohl, der eine zu Brokkoli ähnliche Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide aufweist, auf dessen Polysaccharidstrukturen. Mittels Methylierungsanalyse identifizierten sie u.a. geringe Anteile an 1,2,4- und 1,3,4-verknüpften Xylopyranosen. Durch welche Monosaccharide eine Substitution der Xylanhauptkette erfolgt, wurde dabei nicht gezeigt. Daher ist auch im Fall von Brokkoli eine geringe Substitution der Xylane nicht unwahrscheinlich. Weitere Hemicellulosen der UBS der hier analysierten Proben stellen zudem Mannane dar, die in geringem Ausmaß in Position *O*-6 verzweigt vorliegen, da neben 1,4-verknüpfter Mannopyranosen geringe Anteile an 1,4,6-verknüpfter Mannopyranose identifiziert wurden.

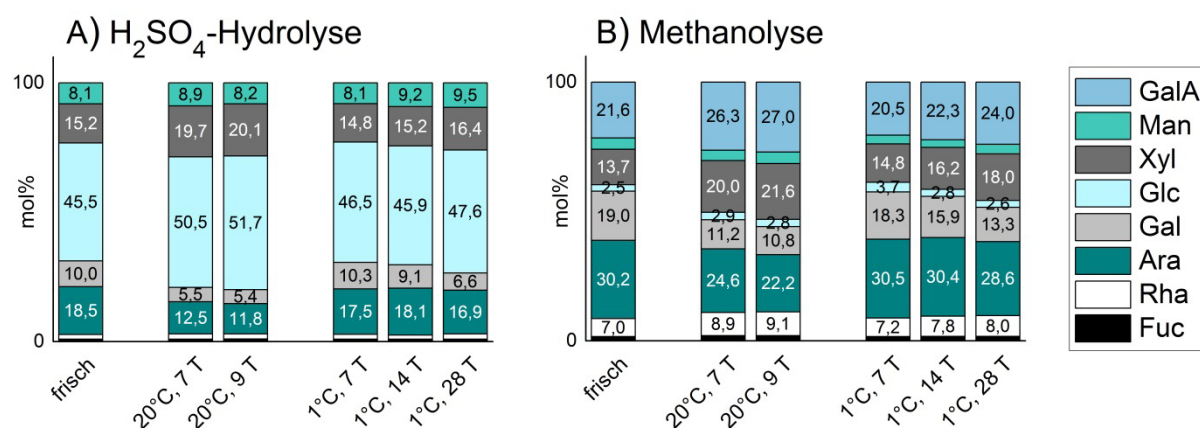


Abbildung 22: Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide aus den unlöslichen Ballaststoffen von frisch geerntetem und gelagertem Brokkolistrunk. Dargestellt sind die Ergebnisse nach H₂SO₄-Hydrolyse (A) und nach Methanolyse (B) für alle Lagerzeitpunkte. Da es bei der H₂SO₄-Hydrolyse zu einer Unterbestimmung der Uronsäuren kommt, sind diese hierbei nicht mit einberechnet. Die Methanolyse ergab zudem Spuren (<0,7 mol%) an Glucuronsäure, die ebenfalls nicht bei der Berechnung der Anteile berücksichtigt wurde. Die Anteile in mol% resultieren aus einer Dreifachbestimmung (Ausnahme: Methanolyse, Mannose Brokkoli frisch und 7 Tage Lagerung bei 1°C: Doppelbestimmung). GalA, Galacturonsäure; Man, Mannose; Xyl, Xylose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; T, Tage.

Die Pektinfraktion der UBS aus frisch geerntetem Brokkolistrunk setzt sich aus etwa gleichen Anteilen (bezogen auf die Hauptkette) an Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen zusammen. Dies geht aus dem Galacturonsäure- zu Rhamnoseverhältnis von etwa 3:1 hervor (Methanolyse). Das Vorhandensein von Typ I Rhamnogalacturonanen wurde durch die Identifizierung des PMAAs, das aus 1,2-verknüpfter Rhamnopyranose resultiert, bestätigt. Arabinose und Galactose haben ihren Ursprung vermutlich vorwiegend in Arabinanen und (Arabino-) Galactanen. Diese Pektinseitenketten sind an Position O-4 der Rhamnose des Rhamnogalacturonans gebunden. Die 1,2,4-verknüpfte Rhamnopyranose konnte in nur sehr geringen Anteilen nachgewiesen werden. Der geringe Substitutionsgrad des Rhamnogalacturonans I zeigt, zusammen mit den hohen Anteilen an Arabinose und Galactose, dass wahrscheinlich sehr lange neutrale Pektinseitenketten vorliegen. Da außerdem der durch H₂SO₄-Hydrolyse bestimmte Arabinoseanteil mit 18,5 mol% den Galactoseanteil von 10,0 mol% überwog, stellen Arabinane die dominierenden neutralen Pektinseitenketten dar. Die Methylierungsanalyse zeigte, dass Arabinose überwiegend 1,5-verknüpft und furanosidisch vorliegt. Auch hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass 1,4-verknüpfte Arabinopyranose in dem gleichen PMAA resultiert wie 1,5-verknüpfte Arabinofuranose. Des Weiteren wurden 1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-verknüpfte Arabinofuranosen identifiziert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass das PMAA der 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranose sowohl aus einer vollständig substituiert vorliegenden Arabinose als auch aus einer Untermethylierung resultieren kann. Der Anteil an 1,3,5-verknüpfter Arabinofuranose kann leicht überbestimmt worden

sein, da der entsprechende Peak im GC-FID Chromatogramm nicht vollständig von dem verhältnismäßig kleineren Peak einer unbekanntes Substanz getrennt vorlag. Auch unter Berücksichtigung dieser Einschränkung kann anhand des deutlich höheren Anteils an 1,3,5-verknüpfter Arabinofuranose im Vergleich zu dem Anteil an 1,2,5-verknüpfter Arabinofuranose die Position O-3 als bevorzugte Verzweigungsposition vermutet werden. Da vergleichbare Anteile verzweigter und nicht verzweigter 1,5-gebundener Arabinofuranose vorliegen, kann auf einen hohen Substitutionsgrad des Arabinanrückgrats geschlossen werden. Der hohe Anteil an terminaler Arabinofuranose (9,82 mol%) lässt zudem die Vermutung zu, dass die Substitution des Arabinanrückgrats bevorzugt durch einzelne Arabinosen erfolgt.

Tabelle 8: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von unlöslichen Ballaststoffen aus frisch geerntetem Brokkolistrunk im Vergleich zu Brokkolistrunk, der bei 20°C für 9 Tage und bei 1°C für 28 Tage gelagert wurde. Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppelbestimmung, die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. Die Ergebnisse der restlichen Zeitpunkte sind in Kapitel 9.1, Tabelle 36 dargestellt. PMAA, partiell methyliertes Alditolacetat; t, terminal; p, Pyranose; f, Furanose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose.

PMAA [mol%]	frisch	20°C, 9 Tage	1°C, 28 Tage
t-Glcp	1,03 ± 0,15	0,84 ± 0,12	0,74 ± 0,14
1,4-Glcp	38,60 ± 0,45	49,11 ± 2,25	38,24 ± 4,88
1,4,6-Glcp	4,14 ± 0,27	4,87 ± 0,03	4,19 ± 0,41
t-Xylp	5,14 ± 0,54	5,34 ± 0,24	5,76 ± 0,40
1,4-Xylp	10,88 ± 1,01	14,82 ± 0,74	16,31 ± 3,05
t-Galp	2,67 ± 0,51	1,90 ± 0,07	2,02 ± 0,23
1,4-Galp	3,13 ± 0,15	1,24 ± 0,11	1,52 ± 0,56
t-Araf	9,82 ± 2,11	5,11 ± 0,01	8,11 ± 0,05
t-Arap	0,66 ± 0,28	0,48 ± 0,03	0,72 ± 0,05
1,5-Araf	9,30 ± 2,04	6,04 ± 1,06	8,67 ± 0,55
1,3,5-Araf^a	4,15 ± 1,31	2,07 ± 0,003	4,34 ± 1,06
1,2,5-Araf	1,80 ± 0,11	1,63 ± 0,73	1,82 ± 0,06
1,2,3,5-Araf	2,96 ± 1,12	3,00 ± 0,54	3,72 ± 0,40
1,2-Rhap	1,42 ± 0,22	0,84 ± 0,39	1,22 ± 0,10
1,2,4-Rhap	0,72 ± 0,15	0,54 ± 0,02	0,39 ± 0,10
1,4-Manp	2,55 ± 0,51	1,41 ± 0,84	1,60 ± 0,24
1,4,6-Manp	1,04 ± 0,28	0,76 ± 0,03	0,62 ± 0,05

^a Überbestimmung aufgrund unvollständiger Peaktrennung im GC-FID Chromatogramm möglich.

Das enzymatisch-chromatographische Arabinan-Screening kann zusätzliche, oft detailliertere Strukturinformationen liefern als die Methylierungsanalyse. Durch den Einsatz von *endo-*

Arabinanase werden die linearen α -(1→5)-verknüpften L-Arabinofuranosen innerhalb des Arabinanrückgrats gespalten, wodurch oligomere Einheiten freigesetzt werden. Die Ergebnisse des Screenings sind als semiquantitativ zu betrachten, da die Freisetzung der oligomeren Strukturelemente in der Regel nicht vollständig erfolgt. In Abbildung 23 (A) sind die Anteile der mittels *endo*-Arabinanase freigesetzten Arabinooligosaccharide für die frisch geerntete Brokkoliprobe und die gelagerten Brokkoliprobe dargestellt. Die Strukturen der freigesetzten Arabinooligosaccharide sind in Kapitel 9.1, Tabelle 39 abgebildet. Neben diesen Struktureinheiten wurde ein sehr hoher Anteil an monomerer Arabinose freigesetzt, der jedoch bei der Berechnung der Verteilung keine Berücksichtigung fand.

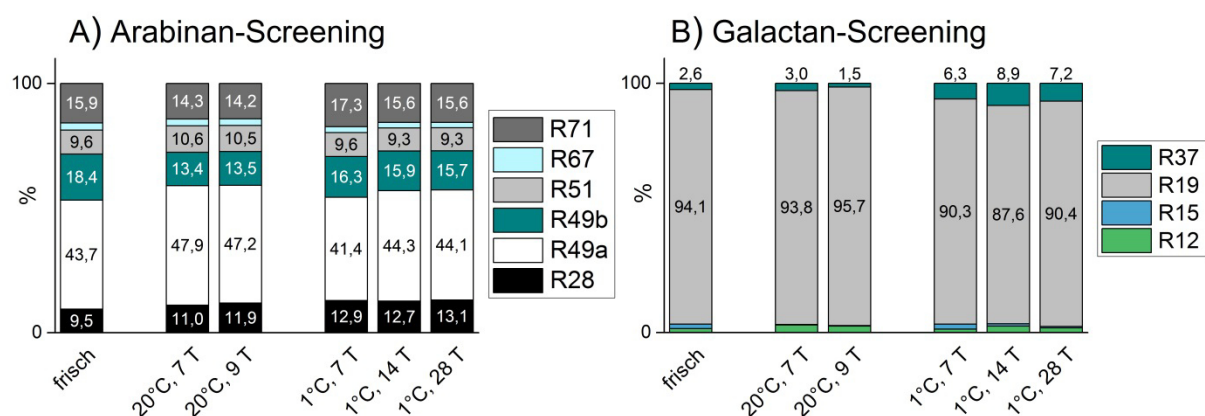


Abbildung 23: Verhältnisse [%] der freigesetzten Arabino- (A) bzw. Galactooligosaccharide (B) nach Inkubation der unlöslichen Ballaststoffe aus Brokkoli mit *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase und anschließender Analyse mittels HPAEC-PAD. Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppel- (Galactan-Screening) bzw. Dreifachbestimmung (Arabinan-Screening). Die zugehörigen Strukturen sind in Kapitel 9.1, Tabelle 39 bzw. Tabelle 40 dargestellt.

Interessanterweise bildeten die verzweigten Strukturelemente (R49a, R49b, R71, R51 und R67) den Hauptanteil der freigesetzten Arabinooligosaccharide. R28 stellt das Dimer zweier α -(1→5)-verknüpfter Arabinofuranosen dar und steht daher für die linearen Abschnitte des Arabinanrückgrats. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass auch ein Teil der bestimmten Monomere aus den linearen Abschnitten freigesetzt wurde und daher nicht ausschließlich der Anteil an R28 die linearen Bereiche der Arabinane repräsentiert. Außerdem kann auch je nach Zugänglichkeit der Strukturelemente bzw. Polysaccharide für die Enzyme die Freisetzung von Oligosacchariden aus linearen Abschnitten gehemmt sein. Den größten Anteil der freigesetzten Arabinooligosaccharide bildete das Tetramer 49a, das eine Substitution mit Arabinose in Position O-3 des Arabinanrückgrats repräsentiert. Eine Verknüpfung in Position O-2 konnte durch die Identifizierung des Tetramers 49b nachgewiesen werden. Auch die Oligomere R71 und R67 stellen Strukturelemente mit Verzweigungen in Position O-3 des Arabinanrückgrats dar. Darüber hinaus repräsentieren diese Oligosaccharide stark verzweigte Abschnitte des Arabinanrückgrats. Das Vorhandensein vollsubstituierter Arabinoseeinhei-

ten wurde durch die Identifizierung des Pentamers R51 nachgewiesen, da hier die mittlere Arabinose des Arabinanhauptstrangs sowohl in Position O-2 als auch in Position O-3 mit weiteren Arabinosen substituiert ist. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse des Arabinan-Screenings die aus den Ergebnissen der Methylierungsanalyse aufgestellten Vermutungen. So sind die Arabinane des Brokkolistrunks stark verzweigt. Da vermehrt Strukturelemente mit Verknüpfungen in Position O-3 des Arabinanrückgrats nachgewiesen wurden, scheint diese Position bevorzugt substituiert zu sein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Methylierungsanalyse, da auch dort die 1,3,5-verknüpfte Arabinofuranose über die 1,2,5-verknüpfte Arabinofuranose dominierte, wobei eine mögliche Überbestimmung der 1,3,5-verknüpften Arabinofuranosen bei der Ergebnisinterpretation beachtet werden muss. Des Weiteren wurde bestätigt, dass das PMAA der 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranose zumindest teilweise auf eine vollsubstituierte Arabinose zurückgeführt werden kann.

Die Methylierungsanalyse zeigte, dass die Galactose sowohl terminal als auch 1,4-verknüpft vorlag, sodass die derart verknüpften Galactoseeinheiten den Galactanen zugeordnet werden können. Der Peak des PMAAs der 1,4-verknüpften Galactopyranose eluierte teilweise mit einer unbekannt Substanz, wodurch die Identifizierung und insbesondere die Quantifizierung dieses in geringen Anteilen vorkommenden PMAAs erschwert wurden. Daher wurde auch hier eine enzymatisch-chromatographische Screeningmethode angewandt, um detailliertere Strukturinformationen über die Galactane in Brokkolistrunk zu erhalten. Hierbei wird das lineare β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Galactanrückgrat mittels *endo*-Galactanase hydrolysiert. Wie auch beim Arabinan-Screening ist zu beachten, dass die Ergebnisse als semiquantitativ zu betrachten sind. Die Verteilung der freigesetzten Oligosaccharide ist in Abbildung 23 (B) für alle Proben dargestellt. Die Strukturen der Galactooligosaccharide sind in Kapitel 9.1, Tabelle 40 zu finden. Auch hier wurde die ebenfalls freigesetzte monomere Galactose nicht mit in die Verteilung der Hydrolyseprodukte aufgenommen. Den Hauptanteil der freigesetzten oligomeren Struktureinheiten bildete mit $\geq 90\%$ das aus zwei β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen zusammengesetzte Dimer R19. Ein weiteres lineares Dimer stellte die Struktureinheit R15 dar, das aus der enzymatischen Hydrolyse von β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen, die in Position O-4 eine terminale Arabinopyranose gebunden haben, entsteht. Das Dimer R12 besteht aus einer Arabinopyranose, an die über eine β -(1 \rightarrow 4)-Bindung eine Galactopyranose gebunden ist. Daher handelt es sich um eine interne, im Galactanrückgrat gebundene Arabinopyranose. Das Vorkommen geringer Anteile an terminalen Arabinopyranosen wurde auch bei der Methylierungsanalyse beobachtet. Allerdings kann die Zugehörigkeit zu Galactanstrukturen anhand der Methylierungsanalyse nicht erkannt werden. Das Tetramer R37 besteht aus drei β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen, an dessen nicht-reduzierendem Ende eine weitere Galactopyranose in Position O-6 gebunden ist. Die Identifizierung dieses Oligosaccharids ist ein Hinweis darauf, dass die Galactane aus Brokko-

litrunk schwach verzweigt vorliegen können. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die 1,6-gebundene Galactoseeinheit terminal vorliegt, d.h. das Kettenende des Galactans markiert.

Während der Lagerung der Proben kam es zu einer Änderung der Polysaccharidprofile der UBS. Dabei ist die Änderung deutlich stärker nach der Lagerung bei 20°C als nach der Lagerung bei 1°C ausgeprägt (Abbildung 22). Generell war während der Lagerung bei 20°C zu beobachten, dass nach 7 Tagen Lagerung das Ausmaß der Änderungen in Bezug auf die frisch geernteten Proben am stärksten war. Die Lagerung für weitere zwei Tage führte zu keinen ausgeprägten zusätzlichen Veränderungen. Die Lagerung bei 20°C führte zu einem Anstieg des durch H₂SO₄-Hydrolyse freigesetzten Glucoseanteils von 45,5 mol% (frisch) auf 50,5 mol% (20°C, 7 Tage) bzw. auf 51,7 mol% (20°C, 9 Tage). Ebenso erhöhte sich der mittels Methylierungsanalyse bestimmte Anteil an 1,4-gebundener Glucopyranose. Dies kann auf einen erhöhten Celluloseanteil zurückgeführt werden, da sowohl der nach Methanolyse bestimmte Glucosegehalt konstant bei etwa 3 mol% lag als auch der Anteil an 1,4,6-gebundener Glucopyranose sich während der Lagerung nicht veränderte. Der Anteil an Xyloglucanen blieb daher während der Lagerung bei 20°C unverändert. Ebenso waren keine Änderungen bezüglich des Mannananteils zu erkennen.

Zusätzlich zum Anstieg des Glucoseanteils, nahm auch der Anteil an nach H₂SO₄-Hydrolyse freigesetzter Xylose von 15,2 mol% (frisch) auf 19,7 mol% (20°C, 7 Tage) bzw. auf 20,1 mol% (20°C, 9 Tage) zu. Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil an 1,4-gebundener Xylopyranose, wodurch auf einen zunehmenden Xylananteil während der Lagerung geschlossen werden kann.

Die quantitativ am stärksten ausgeprägten Veränderungen während der Lagerung bei 20°C ergaben sich für die Arabinane und Galactane. Sowohl der nach H₂SO₄-Hydrolyse bestimmte Galactoseanteil als auch der Anteil an 1,4-gebundener Galactopyranose nahmen nach 9 Tagen Lagerung bei 20°C um fast 50% ab. Neben einer Abnahme des Galactananteils war auch eine Abnahme des Arabinananteils zu beobachten, da sowohl der mittels H₂SO₄-Hydrolyse bestimmte Anteil an Arabinose von 18,5 mol% (frisch) auf 12,5 mol% (20°C, 7 Tage) bzw. 11,8 mol% (20°C, 9 Tage) als auch die Anteile an 1,5-gebundener und terminaler Arabinofuranosen abnahmen. Das Arabinan-Screening deutete auf eine leichte Zunahme des Anteils des Tetramers R49a, das eine Arabinofuranose in Position O-3 des Arabinoserückgrats trägt, hin. Dies geht einher mit der Abnahme des Anteils des Tetramers R49b, welches eine O-2-Verknüpfung des Arabinanrückgrats repräsentiert. Dies steht im Gegensatz zu dem Ergebnis aus der Methylierungsanalyse, bei der eine Abnahme des Verhältnisses der 1,3,5-verknüpften Arabinofuranose zu der 1,2,5-verknüpften Arabinofuranose ermittelt wur-

de. Die Gründe für die abweichenden Ergebnisse zwischen Methylierungsanalyse und Arabinan-Screening können nicht abschließend geklärt werden.

Wie bereits erwähnt ist bei den Ergebnissen generell zu beachten, dass lediglich relative Anteile bestimmt werden, und daher kein Rückschluss auf einen direkten Auf- bzw. Abbau der Strukturelemente bzw. der Polysaccharide gezogen werden kann. Bei einem Abbau von Arabinanen sind Arabinofuranosidasen beteiligt, die terminale Arabinofuranosen am nicht-reduzierenden Ende der Arabinankette abspalten (Tateishi 2008). Es liegt daher nahe, dass zunächst die Verzweigungen abgebaut werden, wodurch der Anteil an linearen Abschnitten zunimmt. So zeigten Pena und Carpita (2004) mit Hilfe der Methylierungsanalyse, dass es während der Reifung von Äpfeln zu einer Abnahme der Verhältnisse zwischen verzweigten und linearen Strukturen kam. Ein Abbau von Arabinanstrukturen während der Lagerung von Brokkoli kann daher ebenso potentiell erkannt werden. Die Verhältnisse der Summe der PMAAs der 1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranosen zu dem PMAA der 1,5-verknüpften Arabinofuranose ergaben sowohl für die frisch geernteten Proben als auch für die Proben der jeweiligen Lagerzeitendpunkte (Lagerung bei 20°C für 9 Tage bzw. bei 1°C für 28 Tage) jeweils einen Wert von etwa 1. Die Berechnung dieser Verhältnisse anhand der Ergebnisse aus dem Arabinan-Screening lies ebenfalls keinen Trend erkennen. Dies zeigt, dass ein Abbau der Arabinane unwahrscheinlich ist. Die geringeren Anteile dieser Polysaccharide resultieren vermutlich aus der Neusynthese anderer Polysaccharide. Zusätzlich zum abnehmenden Anteil der neutralen Pektinseitenketten nahm der Anteil der Galacturonsäure zu. Hier kann allerdings nicht bewertet werden, ob diese Zunahme aus dem Aufbau galacturonsäurehaltiger Polysaccharide resultiert. Ob und welche Polysaccharide während der Lagerung neu synthetisiert werden, kann aus den vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Um diese Fragestellung zu beantworten, wären weitere Studien zur Expression von Enzymen der Polysaccharidsynthese hilfreich.

Im Gegensatz zu der Lagerung bei 20°C beeinflusste die Lagerung bei 1°C kaum die Polysaccharidzusammensetzung der UBS. Erst nach 28 Tagen Lagerung konnten leichte Veränderungen der Polysaccharidprofile erkannt werden. Die stattfindenden Veränderungen waren in der Tendenz, jedoch nicht in der Ausprägung, vergleichbar mit denen, die bei der 20°C Lagerung beschrieben wurden. Eine Ausnahme stellten jedoch die Ergebnisse des Galactan-Screenings dar. Erstaunlicherweise nahm im Gegensatz zur Lagerung bei 20°C der Anteil des Strukturelements R37 während der Lagerung bei 1°C zu. Gleichzeitig sank der Anteil des Strukturelements R19. Diese Änderungen waren bereits nach einer Lagerdauer von 7 Tagen ausgeprägt. Die mittels Galactan-Screening relativ ermittelten Anteile können jedoch nicht zu Beurteilung eines absoluten Ab- bzw. Aufbaus von Galactanstrukturen verwendet werden. Woraus diese leicht veränderten Anteile resultieren, kann daher an dieser Stelle

nicht gesagt werden. Denkbar wäre, dass die enzymatische Hydrolyse nicht vergleichbar ablief, wodurch sich das Spektrum an bestimmten Oligosacchariden unterscheiden kann.

Die hier beschriebenen Änderungen in der Polysaccharidzusammensetzung während der Lagerung von Brokkoli wurden ebenfalls bei der Entwicklung und Reifung von Blumenkohl beobachtet (Femenia et al. 1999). Auch hier konnte eine Zunahme des Xylan- und Celluloseanteils sowie eine Abnahme von Arabinan- und Galactananteilen beobachtet werden.

4.1.2.4 Bestimmung des Ligningehaltes

Die Ligningehalte der UBS aus Brokkolistrunk wurden als ABSL und als Klason-Lignin bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 für die UBS der frisch geernteten Proben im Vergleich zu den UBS der bei 20°C und 1°C gelagerten Proben dargestellt. Alle Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung.

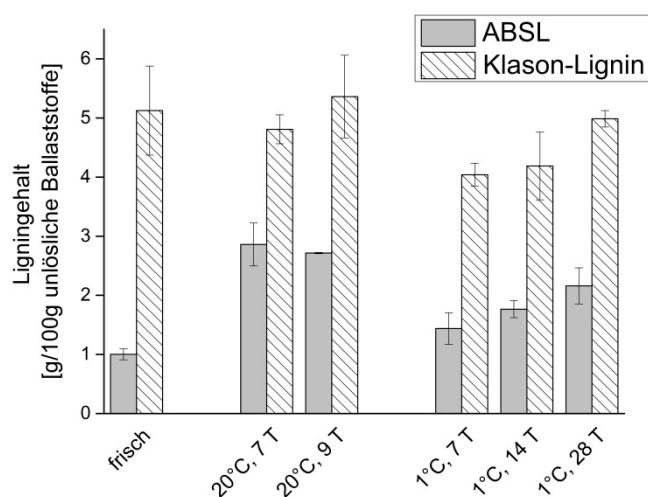


Abbildung 24: Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe aus frisch geerntetem Brokkolistrunk im Vergleich zu den Ligningehalten der unlöslichen Ballaststoffe, die aus bei 20°C und 1°C gelagertem Brokkolistrunk isoliert wurden. Die Bestimmung erfolgte als Klason-Lignin und als acetyl bromidlösliches Lignin (ABSL), jeweils in einer Dreifachbestimmung.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Ligningehalte je nach verwendeter Methode unterschiedlich waren. Eine Aussage zu den absolut vorliegenden Ligningehalten ist auch hier nicht möglich. Die Klason-Ligningehalte lagen zu jedem Zeitpunkt höher als die ABSL-Gehalte. Anders als z.B. bei der Lagerung von Spargel waren hier je nach Methode unterschiedliche Änderungen während der Lagerung festzustellen. Der ABSL-Gehalt stieg während der Lagerung für 7 Tage bei 20°C um etwa das Dreifache an. Eine längere Lagerzeit führte zu keinem weiteren Anstieg des ABSL-Gehaltes. Die Vergleichbarkeit der Proben, die bei 20°C für 7 Tage gelagert wurden und der Proben, die 9 Tage lang gelagert wurden, war bereits bei der Analyse der Polysaccharidprofile zu beobachten. Auch während der Lagerung bei 1°C kam es zu einem von der Lagerdauer abhängigen Anstieg des ABSL-Gehaltes, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei der Lagerung bei 20°C. So verdoppelte sich der

ABSL-Gehalt während der Lagerung bei 1°C erst nach 28 Tagen. Im Gegensatz zum ABSL-Gehalt änderte sich der Klason-Ligningehalt während der Lagerung kaum. Dies ist vermutlich auf die methodischen Unterschiede der Ligninbestimmung zurückzuführen. Das Klason-Lignin wird nach weitgehender Entfernung der Zellwandmatrix durch Säurehydrolyse gravimetrisch ausgewogen. Trotz vorheriger Lösungsmittelextraktion des Probenmaterials sowie der Protein- und Aschekorrektur des Klason-Lignins kann es dennoch durch weitere säureunlösliche Substanzen wie z.B. Wachse oder Cutin zu einer Überbestimmung des Ligningehaltes kommen (Bunzel et al. 2011). Außerdem kann auch die Proteinkorrektur fehlerhaft sein, da zur Berechnung des Proteingehaltes ein allgemeiner Faktor verwendet wurde, der jedoch je nach Aminosäurezusammensetzung der Proteine angepasst werden müsste. Des Weiteren ist es nicht unbedingt gegeben, dass nur proteingebundener Stickstoff, sondern auch polymere Maillardreaktionsprodukte, die im Verlauf der thermischen Säurehydrolyse entstehen, bei der Proteinkorrektur erfasst werden. Dies würde zu einer Überkorrektur des Klason-Ligningehaltes führen. Auch der potentiell vorhandene Anteil an säurelöslichem Lignin kann die Ergebnisse beeinflussen. Dieser wird bei der Bestimmung des Klason-Ligningehaltes abgetrennt, wohingegen er bei der Bestimmung des ABSL-Gehaltes erfasst wird. Dabei sind insbesondere die zu Beginn der Lignifizierung durch Dimerisierung zweier Monolignole gebildeten Ligninoligomere als säurelöslich zu betrachten. In späteren Phasen der Lignifizierung spielt die Dimerisierung in der Regel nur eine untergeordnete Rolle. Im Fall von Brokkolilignin kann diese Reaktion jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da der Anteil der durch Dimerisierung gebildeten Resinolstrukturen, anders als z.B. beim Spargel (siehe Kapitel 4.1.1.5), im Verlauf der Lagerung konstant blieb (siehe Kapitel 4.1.2.5). Worauf die unterschiedlichen Ergebnisse beider Methoden zur Bestimmung des Ligningehaltes zurückzuführen sind, kann nicht abschließend geklärt werden.

4.1.2.5 Charakterisierung von Ligninstrukturen

Zur Bestimmung der Monolignolzusammensetzung der Lignine aus Brokkoli wurde sowohl die DFRC-Methode als auch die 2D-NMR Analyse angewandt. Beide Methoden zeigten, dass die Lignine aus Brokkoli generell sehr G-dominant sind. Die DFRC-Methode ergab, dass der Anteil an G-Einheiten, unabhängig von dem Lagerzeitpunkt, etwa 90 mol% betrug (Tabelle 9). Daneben waren auch H- und S-Einheiten mit Hilfe der DFRC-Methode quantifizierbar. Das Auffinden und die Integration der den H-Einheiten zugeordneten Signale im HSQC-Spektrum erwiesen sich als schwierig, da diese mit anderen, unbekanntem Signalen teilweise überlappten. Daher wurden mittels NMR lediglich die G- und S-Einheiten semi-quantitativ bestimmt. Die mittels NMR erhaltene Monomerverteilung ist ebenfalls in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Charakterisierung der Monomierzusammensetzung der Ligninpolymere aus den unlöslichen Ballaststoffen von frisch geerntetem und gelagertem Brokkolistrunk mittels derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode und 2D-NMR. Die Ergebnisse der DFRC-Methode sind in mol% dargestellt und resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Das mittels 2D-NMR ermittelte Guaiacyl (G)-/Syringylverhältnis (S) resultiert aus der Einfachbestimmung der isolierten Lignine. H, Hydroxyphenyl.

		H:G:S (DFRC) [mol%]	G:S (NMR)
frisch		5,9 : 90,2 : 3,9	97,9 : 2,2
20°C	7 Tage	5,7 : 85,3 : 8,9	91,3 : 8,7
	9 Tage	6,0 : 85,7 : 8,4	92,3 : 7,7
1°C	7 Tage	6,8 : 89,6 : 3,6	97,9 : 2,1
	14 Tage	6,4 : 90,7 : 3,0	95,8 : 4,2
	28 Tage	5,6 : 91,4 : 3,0	96,2 : 3,8

Neben einem sehr hohen Anteil an G-Einheiten war das Lignin aus frisch geerntetem Brokkolistrunk aus etwa gleichen Anteilen an H- und S-Einheiten zusammengesetzt (DFRC-Methode). Während der Lagerung bei 20°C änderte sich der Anteil an H-Einheiten nicht. Die stärkste Änderung ergab sich hinsichtlich der S-Einheiten, deren Anteil sich nach der Lagerung für 7 Tage bei 20°C verdoppelte. Die Lagerung für weitere zwei Tage (9 Tage Lagerung) hatte keinen weiteren Einfluss auf die Monomierzusammensetzung der Ligninpolymere. Im Gegensatz dazu konnte während der Lagerung bei 1°C mittels DFRC-Methode kein zunehmender Anteil an S-Einheiten beobachtet werden. Auch der Anteil an H-Einheiten blieb konstant. Der vermehrte Einbau von Sinapylalkohol in das Ligninpolymer während der Lagerung bei 20°C wurde durch die 2D-NMR Analyse bestätigt. Die 2D-NMR Analysen der Lignine aus den Proben, die bei 1°C gelagert wurden, zeigten im Gegensatz zur DFRC-Methode einen leichten Trend hinsichtlich eines ansteigenden S-Anteils nach 14 bzw. 28 Tagen Lagerung. Dennoch kann hierbei nicht von eindeutig erhöhten Anteilen an S-Einheiten gesprochen werden, insbesondere da die NMR Analysen nur in Einfachbestimmung durchgeführt werden konnten. Daher scheint sich lediglich die Lagerung bei 20°C auf eine veränderte Monomierzusammensetzung der Lignine auszuwirken. Die Veränderung der Monomierzusammensetzung während der Lagerung bei 20°C korreliert gut mit dem beobachteten Anstieg des ABSL-Gehaltes. Daher kann von einem verstärkten Einbau an Sinapylalkohol in das Ligninpolymer während der Lagerung von Brokkoli bei 20°C ausgegangen werden. Der ABSL-Gehalt stieg auch während der Lagerung bei 1°C an. Allerdings war das Ausmaß deutlich weniger stark ausgeprägt, sodass Veränderungen in der Monomierzusammensetzung ebenfalls nur gering auszufallen scheinen.

Die Bindungstypen innerhalb der Ligninpolymere wurden mittels HSQC-Experimenten identifiziert. In Abbildung 25 ist ein Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum der acetylierten Ligninpo-

lymere, die aus den UBS von frisch geerntetem Brokkolistrunk isoliert wurden, dargestellt. Die vorhandenen Bindungstypen in den Ligninpolymeren aller Brokkoliprobe und deren Anteile sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Da wie zuvor erläutert nicht für alle Bindungstypen Korrekturfaktoren beschrieben sind, erfolgte die Berechnung der Anteile der Bindungstypen sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung der Bindungstypen, für die keine experimentellen Korrekturfaktoren vorliegen und für die diese vereinfacht als 1 angenommen wurden.

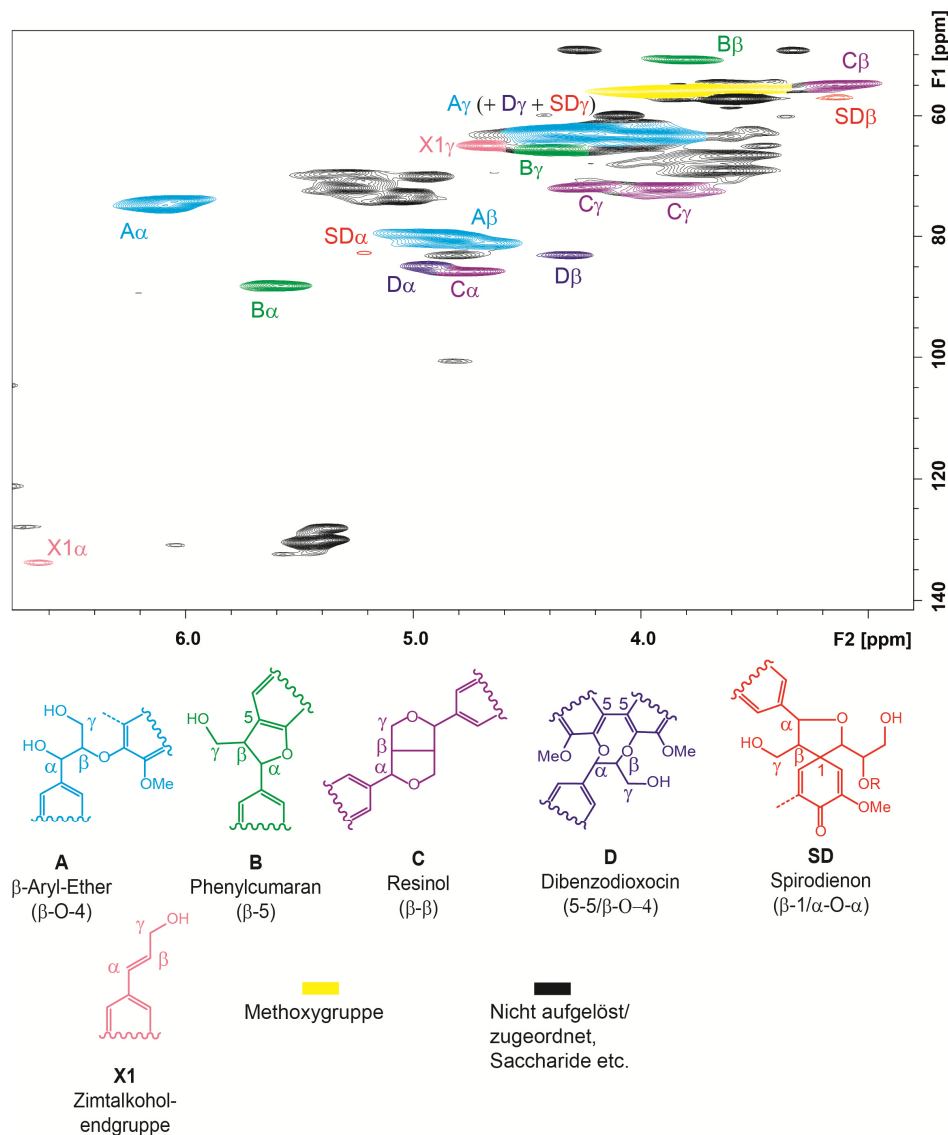


Abbildung 25: Ausschnitt des HSQC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen von frisch geerntetem Brokkolistrunk isoliert wurden. Die identifizierten Bindungstypen sind farblich gekennzeichnet. Das Signal der β -C-H-Korrelation der Zimtalkoholendgruppen ist in der gewählten Darstellungsebene nicht zu sehen. Aufgrund des breiten Signals der γ -C-H-Korrelation der β -O-4-Bindung waren die γ -C-H-Korrelationen der Spirodienon- und der Dibenzodioxocineinheiten nicht aufgelöst. Die semiquantitative Verteilung dieser Bindungstypen ist in Tabelle 10 für alle Proben zusammengefasst.

In allen analysierten Ligninen stellten β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindungen) mit einem Anteil von 63,6-67,2% den Hauptbindungstyp dar. Daneben waren etwa gleiche Anteile an Phe-

nylcumaran (β -5-Bindungen)- und Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) von 13-16%, gefolgt von Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen) mit etwa 5-7% zu finden. Zimtalkoholendgruppen und Spirodienonstrukturen (β -1/ α -O- α -Bindungen) waren ebenfalls vorhanden, scheinen jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sowohl während der Lagerung bei 20°C als auch bei der Lagerung bei 1°C änderte sich das Bindungstypenprofil der Lignine kaum. So war eine leichte Zunahme des Anteils der β -O-4-Bindung nach der Lagerung für 7 Tage bei 20°C zu beobachten. Zudem nahm gleichzeitig der Anteil an Dibenzodioxocinstrukturen ab. Dies resultiert vermutlich aus dem vermehrten Einbau von Sinapylalkohol, da hierbei die Position C5 durch eine Methoxygruppe belegt ist und daher nicht zur Ausbildung einer Bindung zur Verfügung steht. Der erhöhte Anteil an β -O-4-Bindungen resultiert vermutlich aus dem bevorzugten Einbau von Sinapylalkohol in das Ligninpolymer über diesen Bindungstyp. All diesen Aussagen liegt jedoch auch wiederum die Limitierung zugrunde, dass diese Analysen nur als Einfachbestimmungen durchgeführt werden konnten.

Tabelle 10: Bindungstypen und deren Anteile in Ligninen, die aus frisch geerntetem Brokkoli und gelagerten Brokkoliprobe isoliert wurden. Bei den in Klammern dargestellten Werte ist zu berücksichtigen, dass hierbei Korrekturfaktoren von 1 für Zimtalkoholendgruppen (X1) und Spirodienonstrukturen (SD, β -1/ α -O- α) angenommen wurden, da keine Korrekturfaktoren in der Literatur vorhanden sind. A, β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindung); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4). $n=1$.

		%A	%B	%C	%D	%X1	%SD
frisch		64,2	14,3	13,9	7,5		
		(61,7)	(13,8)	(13,4)	(7,2)	(3,0)	(0,9)
20°C	7 Tage	67,2	12,7	14,2	5,9		
		(64,7)	(12,2)	(13,7)	(5,7)	(2,5)	(1,2)
	9 Tage	67,1	13,1	14,2	5,5		
		(64,6)	(12,7)	(13,7)	(5,3)	(2,7)	(1,0)
1°C	7 Tage	63,6	13,5	16,0	7,0		
		(61,2)	(13,0)	(15,4)	(6,7)	(2,6)	(1,1)
	14 Tage	64,9	13,5	15,0	6,6		
		(62,4)	(13,0)	(14,4)	(6,3)	(2,7)	(1,2)
	28 Tage	64,5	13,4	14,8	7,2		
		(62,3)	(13,0)	(14,3)	(6,9)	(2,4)	(1,0)

Zusätzlich zu den HSQC-Spektren wurden HMBC-Spektren der Lignine aus den UBS von frisch geerntetem Brokkolistrunk und aus den Proben der Lagerzeitendpunkte (20°C, 9 Tage bzw. 1°C, 28 Tage) aufgenommen. Anhand dieser Spektren können die Monomereinheiten einzelnen Bindungstypen zugeordnet werden. In Abbildung 26 sind Ausschnitte der HMBC-Spektren der genannten Proben dargestellt.

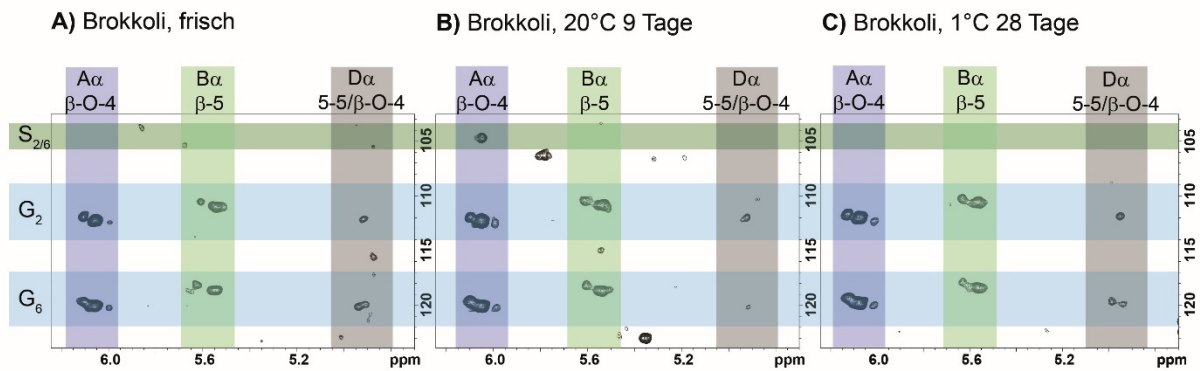


Abbildung 26: Ausschnitte aus HMBC-Spektren von acetylierten Ligninen, die aus den frisch geernteten und den gelagerten Brokkoliprobe (20°C, 9 Tage bzw. 1°C, 28 Tage) isoliert wurden. Die farblich hinterlegten Banden zeigen die Korrelationen über drei Bindungen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps und den 2/6-Kohlenstoffen der Guaiacyl (G)- bzw. der Syringyleinheiten (S). Nicht gezeigt sind die ebenfalls vorhandenen Korrelationen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps mit den β - und γ -Kohlenstoffatomen. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4).

Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass G-Einheiten sowohl in der Ausbildung von β -Aryl-Ethern (β -O-4-Bindungen) als auch von Phenylcumaran (β -5-Bindungen)- und Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen) beteiligt sind. In den Spektren der Lignine aus den UBS der frischen und der bei 1°C für 28 Tage gelagerten Proben sind die S-Einheiten keinem Bindungstyp zuzuordnen, was auf den geringen Anteil der S-Einheiten von 3-4% in Verbindung mit der geringen Empfindlichkeit des HMBC-Experiments zu erklären ist. In dem Spektrum der Lignine, die aus den UBS der bei 20°C für 9 Tage gelagerten Proben isoliert wurden, ist dagegen eine Korrelation zwischen den 2/6-Kohlenstoffen der S-Einheiten und dem α -Proton der β -O-4-Bindung zu erkennen. Dies untermauert die Annahme, dass der während der Lignifizierung vermehrt eingebaute Sinapylalkohol bevorzugt über β -O-4-Bindungen in das Ligninpolymer integriert wird. Informationen darüber, welche Monolignole die Resinolstrukturen ausbilden, konnten anhand der aufgenommenen Spektren nicht erhalten werden, obwohl deren Anteil bei >10% liegt. Resinolstrukturen werden normalerweise bevorzugt von Sinapylalkohol ausgebildet (Ralph et al. 2004b). Das Fehlen eines entsprechenden Korrelationssignals in den HMBC-Spektren der Lignine aus frisch geerntetem und aus bei 1°C für 28 Tage gelagertem Brokkolistrunk könnte daher ebenfalls mit dem generell geringen Anteil an S-Einheiten erklärt werden. Mittels DFRC-Methode und 2D-NMR Analysen (HSQC-Experimente) konnte allerdings gezeigt werden, dass der Anteil an S-Einheiten im Verlauf der Lagerung bei 20°C deutlich zunahm. Allerdings waren im Spektrum der Lignine, die aus bei 20°C für 9 Tage gelagertem Brokkolistrunk isoliert wurden, ebenfalls keine Korrelationssignale zu erkennen, die darauf hinweisen würden, welche Monolignole über β - β -Bindungen gekoppelt vorliegen. Daher können keine detaillierten Aussagen über die in den Ligninen nachgewiesenen Resinolstrukturen getroffen werden.

4.2 Charakterisierung von Zellwandveränderungen während der Reifung

4.2.1 Zellwandcharakterisierung von Kohlrabi

4.2.1.1 Sensorische Beurteilung des Probenmaterials

Der Kohlrabi wurde dünn geschält und anhand typischer Geschmacks- (typisch, vollmundig, nussig, süß, scharf, kohlähnlich) und Konsistenzattribute (saftig, zart, knackig, zäh, holzig) von fünf bis sieben Prüfern direkt nach der Ernte sensorisch beurteilt (Abbildung 27).

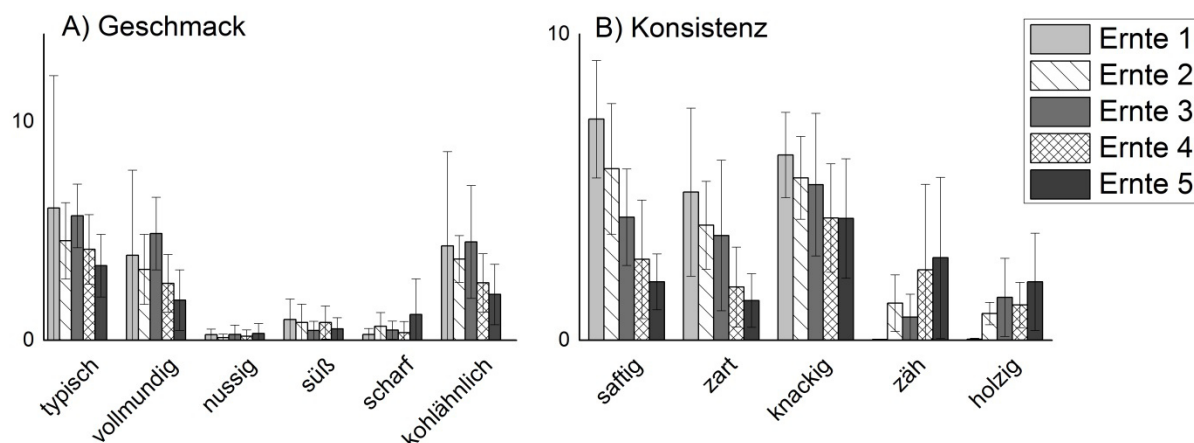


Abbildung 27: Ergebnisse der sensorischen Beurteilung der dünn geschälten Kohlrabiprüben hinsichtlich Geschmack (A) und Konsistenz (B). Die Ergebnisse sind für alle Ernten (1-5) gezeigt. Die Verkostung erfolgte für jeden Zeitpunkt von mindestens fünf Prüfern.

Hinsichtlich des Geschmacks konnten im Verlauf der Reifung keine Änderungen festgestellt werden. Die Attribute nussig, süß und scharf spielten generell keine große Rolle im Geschmack der Kohlrabiprüben. Bei der Konsistenz der Prüben konnte, trotz der teilweise sehr hohen Standardabweichungen, ein leichter Trend hinsichtlich einer Veränderung beobachtet werden. So war Ernte 1 saftiger, zarter, knackiger und weniger zäh und holzig als die Kohlrabiprüben der Ernte 5. Während der Verkostung fiel auf, dass die Stücke teilweise sehr uneinheitlich waren, ein Faktor, der, neben der geringen Anzahl an Prüfern, zu den hohen Standardabweichungen beitragen kann. Zudem war auffällig, dass häufig vor allem der äußere Rand eine faserige Textur aufwies.

4.2.1.2 Bestimmung des Ballaststoffgehaltes

Die Bestimmung des Ballaststoffgehaltes erfolgte getrennt als UBS und LBS. In Abbildung 28 sind die Ballaststoffgehalte der Ernten 1-5 (Ernte zum optimalen Erntezeitpunkt sowie 15 Wochen später) dargestellt, die jeweils aus einer Dreifachbestimmung resultieren. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Gehalte an LBS bei allen Ernten weniger als 10% der UBS betragen. Die Kohlrabiprüben der Ernte 1 besaßen einen LBS-Gehalt von $1,6 \pm 0,1$ g/100 g Kohlrabimehl, der sich im weiteren Verlauf der Reifung nicht veränderte. Der Gehalt der UBS

der Ernte 1 betrug $22,2 \pm 1,3$ g/100 g Kohlrabimehl. Während der Reifung blieb der Gehalt der UBS zunächst konstant. Im Gegensatz zu dem Gehalt der LBS stieg er jedoch zwischen Ernte 3 und 4 um etwa 20% an. Die Reifung für weitere 6 Wochen (Ernte 5) beeinflusste den Gehalt der UBS nicht mehr.

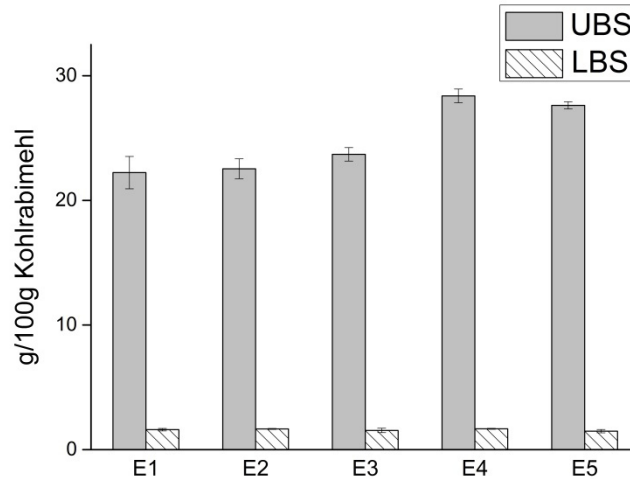


Abbildung 28: Unlösliche (UBS) und lösliche (LBS) Ballaststoffgehalte des getrockneten Kohlrabimehls. Dargestellt sind die Ergebnisse der Ernten 1-5. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung.

Die sensorische Beurteilung der Proben ergab einen abnehmenden Trend hinsichtlich der Saftigkeit. Dennoch blieb der Wassergehalt der verschiedenen Ernten weitgehend konstant (Tabelle 11). Allerdings muss beachtet werden, dass der Wassergehalt lediglich aus einer Einfach- (Ernte 1) bzw. Doppelbestimmung (Ernten 2-5) resultierte. Unter Berücksichtigung des Wassergehaltes ergab sich ein Gesamtballaststoffgehalt der Ernte 1 von $1,6 \pm 0,1$ g/100 g Frischgewicht, der ab Ernte 4 deutlich auf $2,3 \pm 0,04$ g/100 g Frischgewicht anstieg (Tabelle 11). Der hier ermittelte Gesamtballaststoffgehalt ist vergleichbar mit dem von Kontraszti et al. (1999) ermittelten Gehalt von 1,9%.

Tabelle 11: Gesamtballaststoffgehalte (BS) der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kohlrabiprobe bezogen auf das Frischgewicht ($n=3$). Der dafür notwendige Wassergehalt wurde aus dem Gewichtsverlust während der Gefriertrocknung der Proben berechnet (Ernte 1: $n=1$; Ernten 2-5: $n=2$).

	Wassergehalt [%]	BS [g/100 g Frischgewicht]
Ernte 1	93,5	$1,6 \pm 0,1$
Ernte 2	$92,7 \pm 0,8$	$1,8 \pm 0,1$
Ernte 3	$93,0 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,04$
Ernte 4	$92,3 \pm 1,4$	$2,3 \pm 0,04$
Ernte 5	$91,7 \pm 1,0$	$2,4 \pm 0,03$

4.2.1.3 Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe

Die Analyse der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der UBS erfolgte sowohl nach H_2SO_4 -Hydrolyse als auch nach Methanolyse. Die so ermittelten Monosaccharidzusammensetzungen sind in Abbildung 29 für die Kohlrabiprobe der Ernten 1-5 gezeigt. Zur weiteren Charakterisierung der Polysaccharide wurde die Methylierungsanalyse durchgeführt. Die hierbei identifizierten Bindungspositionen der Monosaccharide sind für die Kohlrabiprobe der Ernte 1 in Tabelle 12 zusammengefasst. Da kaum Veränderungen zu beobachten waren, sind die Ergebnisse der Methylierungsanalyse für die Ernten 2-5 in Kapitel 9.1, Tabelle 37 aufgeführt.

Die mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzten neutralen Monosaccharide waren hauptsächlich Glucose, gefolgt von etwa ähnlichen Anteilen an Arabinose und Xylose und ebenfalls vergleichbaren jedoch geringeren Anteilen an Galactose und Mannose. Des Weiteren waren geringe Mengen an Rhamnose und Fucose detektierbar. Nach Methanolyse konnte zudem das Vorkommen von Galacturonsäure und in Spuren auch von Glucuronsäure (ca. 0,7 mol%) bestätigt werden. Hinsichtlich der Polysaccharidzusammensetzung der UBS aus Kohlrabi sind in der Literatur kaum Daten vorhanden (Kontraszti et al. 1999). Die hier ermittelte Monosaccharidzusammensetzung ist allerdings sehr ähnlich zu der zuvor bestimmten Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide aus den UBS von Brokkolistrunk (siehe Kapitel 4.1.2.3) und der aus der Literatur bekannten Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide aus Blumenkohl (Femenia et al. 1999). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass alle der genannten Proben der Familie der Brassicaceen, Gattung Kohl (*Brassica*), angehören.

Die in einem Anteil von >50 mol% vorkommende Glucose lag hauptsächlich 1,4-verknüpft vor und kann vermutlich zum größten Teil der Cellulose zugeordnet werden. Ein kleiner Teil der Glucose resultiert jedoch auch aus den Xyloglucanen, die ebenfalls aus einem Rückgrat von β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Glucopyranosen bestehen. Dies ist aufgrund des geringen Gehaltes an Glucose (4,2 mol%) zu vermuten, der nach Methanolyse bestimmt wurde. Die Existenz von Xyloglucanen wurde durch den Nachweis des PMAAs der 1,4,6-verknüpften Glucopyranose bestätigt. Weitere vorkommende Hemicellulosen stellen zudem Xylane und zu geringeren Anteilen Mannane dar. Die Xylose lag im Polymer hauptsächlich als terminale und 1,4-verknüpfte Xylopyranose vor. Zusätzlich zeigte eine kleine Schulter des dominierenden Peaks des PMAAs der 1,4-gebundenen Glucopyranose das charakteristische Fragmentierungsmuster des PMAAs, das aus der 1,2,4-verknüpften Xylopyranose resultiert. Eine Integration dieses Peaks war im GC-FID Chromatogramm jedoch nicht möglich. Dennoch kann ein geringer Substitutionsgrad der Xylane in Position O-2 vermutet werden. Eine zusätzliche Substitution in Position O-3 des Xyloserückgrats kann nicht vollständig ausgeschlossen wer-

den, da das entsprechende PMAA mit dem Peak des PMAAs der 1,4-verknüpften Glucopyranose in der hier verwendeten GC-Methode vollständig coeluiert. Durch welche Monosaccharide die Substitution des Xylanrückgrats erfolgt, kann anhand der Methylierungsanalyse nicht gesagt werden. Möglich wäre eine Substitution mit Arabinose, wodurch es zur Ausbildung von Arabinoxylanen kommt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Substitution mit (4-O-Methyl-) Glucuronsäure. Die Mannane der UBS aus Kohlrabi sind in geringem Ausmaß an Position O-6 des Mannoserückgrats verzweigt, da neben dem PMAA, das aus 1,4-verknüpfter Mannopyranose resultiert, auch das PMAA der 1,4,6-verknüpften Mannopyranose identifiziert wurde.

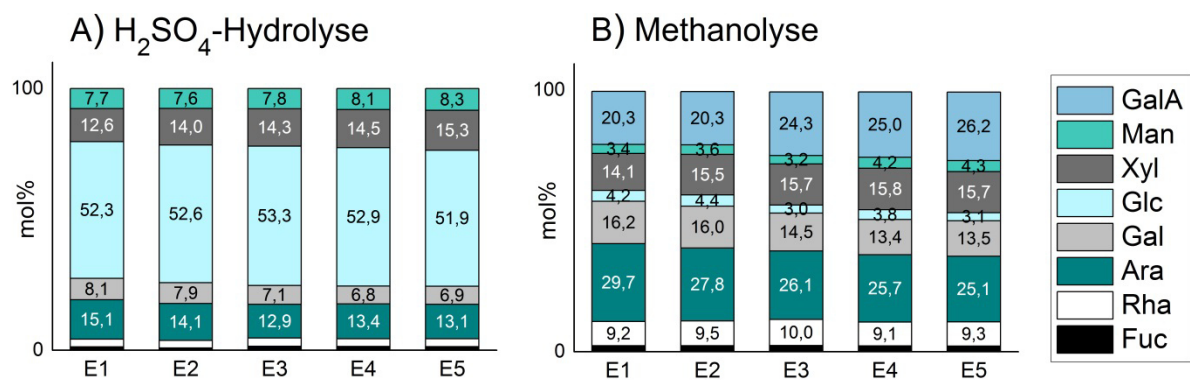


Abbildung 29: Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der unlöslichen Ballaststoffe aus Kohlrabi nach H₂SO₄-Hydrolyse (A) und Methanolyse (B). Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Da Urnsäuren nach H₂SO₄-Hydrolyse unterbestimmt werden, sind sie nicht mit einberechnet. Nach der Methanolyse war zusätzlich Glucuronsäure in Spuren (< 1 mol%) detektierbar, die zur besseren Übersichtlichkeit ebenfalls nicht dargestellt ist. GalA, Galacturonsäure; Man, Mannose; Xyl, Xylose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; E, Ernte.

Die Pektine der UBS aus Kohlrabi bestehen aus einem höheren Anteil an Typ I Rhamnogalacturonanen als an Homogalacturonanen, was aus dem nach Methanolyse bestimmten Verhältnis von Galacturonsäure zu Rhamnose von etwa 2:1 geschlossen werden kann. Der ähnliche Anteil des PMAAs, das aus der 1,2,4-verknüpften Rhamnopyranose resultiert, im Vergleich zu dem Anteil des PMAAs der 1,2-verknüpften Rhamnose lässt zudem den Schluss zu, dass ein vergleichsweise hoher Anteil an neutralen Pektinseitenketten vorhanden ist. Die freigesetzten Monosaccharide Arabinose und Galactose sind hauptsächlich den Arabinanen und (Arabino-) Galactanen zuzuordnen, da die Arabinose hauptsächlich 1,5-verknüpft (wenn von furanosidisch vorliegender Arabinose ausgegangen wird) bzw. die Galactose hauptsächlich 1,4-verknüpft vorlag. Da der Anteil der mittels H₂SO₄-Hydrolyse freigesetzten Arabinose etwa um die Hälfte geringer als der Galactoseanteil war, stellen Galactane vermutlich die dominierenden Pektinseitenketten dar. Spuren des PMAAs der 1,6-verknüpften Galactopyranose deuten zudem auf Typ II Arabinogalactane hin, wobei weitere Charakteristika von Typ II Arabinogalactanen, wie 1,3- und 1,3,6-verknüpfte Galactopyrano-

sen, nicht identifiziert wurden. Die vorliegenden Arabinane sind zusätzlich in Position O-2 und/oder O-3 des Arabinoserückgrats verzweigt, da die PMAAs der 1,3,5-, 1,2,5- und 1,2,3,5-Arabinofuranosen identifiziert werden konnten. Auch hier ist jedoch zu beachten, dass das PMAA der 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranose zumindest teilweise aus einer Unter-methylierung resultieren kann. Daher kann der durch Methylierungsanalyse bestimmte Anteil an disubstituierter Arabinose überschätzt worden sein.

Tabelle 12: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von unlöslichen Ballaststoffen aus Kohlrabi der Ernte 1. Da kaum Änderungen zwischen den Ernten festgestellt wurden, sind die Ergebnisse der restlichen Ernten zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Sie sind in Kapitel 9.1, Tabelle 37 zusammengefasst. Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppelbestimmung, die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. PMAA, partiell methyliertes Alditolacetat; t, terminal; p, Pyranose; f, Furanose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose.

PMAA [mol%]	Ernte 1	PMAA [mol%]	Ernte 1
t-Glcp	0,92 ± 0,07	t-Galp	2,22 ± 0,11
1,4-Glcp	52,24 ± 0,41	1,4-Galp	1,90 ± 0,15
1,4,6-Glcp	4,01 ± 0,06	1,6-Galp	0,09 ± 0,01
t-Xylp	4,56 ± 0,02	t-Araf	8,31 ± 0,10
1,4-Xylp	7,81 ± 0,38	t-Arap	0,56 ± 0,07
1,2,4-Xylp^a		1,2-Araf	0,13 ± 0,03
		1,5-Araf	7,43 ± 0,11
t-Manp	0,12 ± 0,03	1,3,5-Araf^b	2,11 ± 0,11
1,4-Manp	1,88 ± 0,08	1,2,5-Araf	1,19 ± 0,02
1,4,6-Manp	0,67 ± 0,02	1,2,3,5-Araf	2,18 ± 0,03
1,2-Rhap	1,05 ± 0,11		
1,2,4-Rhap	0,60 ± 0,15		

^a Identifizierung mittels GC-MS. Aufgrund vollständiger Coelution mit einem unbekanntem Peak war jedoch keine Integration im GC-FID Chromatogramm möglich.

^b Überbestimmung aufgrund unvollständiger Peaktrennung möglich.

Beim Vergleich der Ernten untereinander fällt auf, dass es während der Reifung nur zu geringen Änderungen hinsichtlich des Polysaccharidprofils kam. Am stärksten ausgeprägt war der Anstieg des durch Methanolyse bestimmten Galacturonsäureanteils von 20,3 mol% (Ernte 1) auf 26,2 mol% (Ernte 5). Gleichzeitig war eine Abnahme des Arabinoseanteils von 29,7 mol% (Ernte 1) auf 25,1 mol% (Ernte 5) und des Galactoseanteils von 16,2 mol% (Ernte 1) auf 13,5 mol% (Ernte 5) zu beobachten. Des Weiteren war sowohl nach H₂SO₄-Hydrolyse als auch nach Methanolyse eine leichte Zunahme des Xyloseanteils zu beobachten. Anhand der Ergebnisse der Methylierungsanalyse konnten keine tiefgreifenden Veränderungen in den Polysaccharidstrukturen während der Reifung festgestellt werden (Kapitel

9.1, Tabelle 37). Nach Zuordnung der Monosaccharide zu einzelnen Polysacchariden kann von einer geringen Abnahme des Arabinan- und Galactananteils sowie von einer leichten Zunahme des Homogalacturonan- und Xylananteils ausgegangen werden. Zum Erntezeitpunkt 5 lagen, bezogen auf die Hauptketten, in etwa vergleichbare Anteile an Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen vor. Auch hier gilt, dass anhand dieser Daten nicht darauf geschlossen werden kann, ob und welche Polysaccharide neu synthetisiert werden, da lediglich die relativen Anteile bestimmt wurden. Da das Verhältnis von linearen zu verzweigten Arabinanstrukturelementen über den gesamten Erntezeitraum konstant blieb, gilt zumindest ein Abbau von Arabinanstrukturen als unwahrscheinlich. Die Abnahme des Arabinoseanteils ist daher vermutlich eher auf die Neusynthese anderer Polysaccharide zurückzuführen. Für die Galactane kann keine entsprechende Aussage getroffen werden.

4.2.1.4 Bestimmung des Ligningehaltes

Der Ligningehalt der UBS aus Kohlrabi wurde als ABSL und als Klason-Lignin bestimmt. Die Ergebnisse der hierbei ermittelten Ligningehalte sind für die Kohlrabiprobe aller Ernten in Abbildung 30 dargestellt. Die Ergebnisse resultieren jeweils aus einer Dreifachbestimmung.

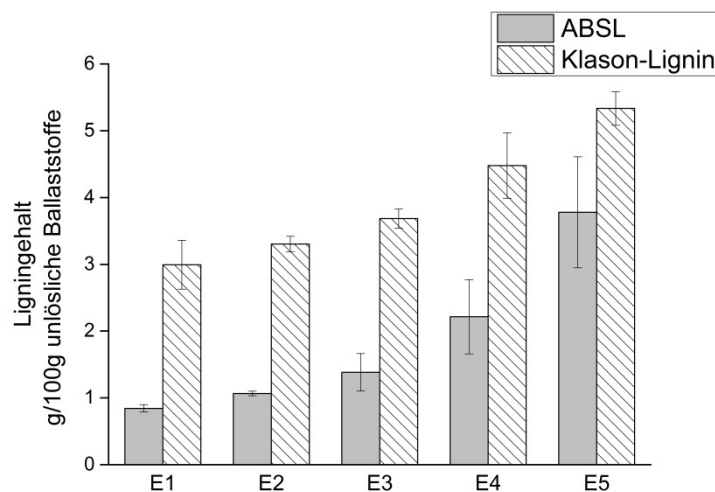


Abbildung 30: Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kohlrabiprobe. Die Ligningehalte wurden als Klason-Lignin und als acetylbromidlösliches Lignin (ABSL) bestimmt. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung. E, Ernte.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass der Klason-Ligningehalt generell höher als der ABSL-Gehalt war. So betrug der Klason-Ligningehalt der UBS aus den Kohlrabiprobe der Ernte 1 etwa das Dreifache des ABSL-Gehaltes. Während der Reifung war mit beiden Methoden eine Zunahme des Ligningehaltes zu beobachten, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Der ABSL-Gehalt stieg innerhalb 15 Wochen Reifung (Ernte 1 bis Ernte 5) um etwa das Vierfache an, der Klason-Ligningehalt verdoppelte sich dagegen lediglich. Die unterschiedlichen Gehalte und auch das unterschiedliche Ausmaß der Änderung können vermutlich auf die

unterschiedlichen Prinzipien beider Methoden zur Ligninbestimmung zurückzuführen sein. So kann der Klason-Ligningehalt überbestimmt worden sein, da weitere säureunlösliche Bestandteile wie z.B. Wachse oder Cutin mitbestimmt werden können (Bunzel et al. 2011). Eine Überbestimmung des Klason-Ligningehaltes durch Wachse oder Cutin scheint jedoch unwahrscheinlich, da die Kohlrabiprobe vor der Ballaststoffisolierung dünn geschält wurden. Daneben könnte der Klason-Ligningehalt im Laufe der Reifung der Kohlrabiprobe auch unterbestimmt worden sein, da die während der Lignifizierung möglicherweise zunächst neu gebildeten Ligninoligomere teilweise säurelöslich sein können und daher nicht miterfasst werden. Beim ABSL-Gehalt werden Ligninoligomere dagegen mitbestimmt, wodurch sich das unterschiedliche Ausmaß des Anstiegs der Ligningehalte erklären lassen könnte. Worauf die Unterschiede letztendlich zurückzuführen sind, kann nicht abschließend bewertet werden. Auch wenn der absolute Ligningehalt mit beiden Methoden nicht exakt bestimmt werden konnte, wurde dennoch deutlich, dass es zwischen Ernte 1 und Ernte 5 zu einer vermehrten Lignineinlagerung kommt.

4.2.1.5 Charakterisierung von Ligninstrukturen

Die Charakterisierung der Lignine hinsichtlich der Monomierzusammensetzung erfolgte mittels DFRC-Methode und 2D-NMR Analyse. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse beider Methoden vergleichend dargestellt. Mittels DFRC-Methode und anschließender GC-SIM-MS Analyse konnten neben den dominierenden G- und S-Einheiten auch geringe Anteile an H-Einheiten quantifiziert werden. Eine eindeutige Identifizierung der H-Einheiten im HSQC-Spektrum der isolierten, acetylierten Lignine war aufgrund unbekannter Signale mit ähnlicher chemischer Verschiebung nicht möglich. Der Anteil an H-Einheiten, der mittels DFRC-Methode bestimmt wurde, betrug im Ligninpolymer der Kohlrabiprobe der Ernte 1 etwa 3 mol%. Da H-Einheiten somit nur eine untergeordnete Rolle spielen, kann das G/S-Verhältnis zur Charakterisierung der Ligninzusammensetzung herangezogen werden. Das für Ernte 1 berechnete G/S-Verhältnis lag bei $5,8 \pm 0,2$ (DFRC-Methode). In der Literatur ist ein kleineres G/S-Verhältnis von 2,4 beschrieben (Bunzel et al. 2005b). Der Unterschied ist vermutlich auf die unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (in Bezug auf Anbaubedingungen und Reifezustand) zurückzuführen. Im Verlauf der Reifung nahm der Anteil der H-Einheiten leicht zu, was erstaunlich ist, da diese bei der fortgeschrittenen Lignifizierung in der Regel nur eine untergeordnete Rolle beim Aufbau des Ligninpolymers spielen (Donaldson 2001). Gleichzeitig nahm der Anteil an G-Einheiten von 82,6 mol% (Ernte 1) auf 57,9 mol% (Ernte 5) ab. Am stärksten ausgeprägt war jedoch die Zunahme des Anteils der S-Einheiten. Dieser stieg während des Reifezeitraums von 15 Wochen etwa um das Dreifache an. Dies spiegelte sich auch in den entsprechenden G/S-Verhältnissen wider, die deutlich im Verlauf der Reifung abnahmen. Die mittels 2D-NMR ermittelten G/S-Verhältnisse lagen leicht über den mit-

tels DFRC-Methode berechneten G/S-Verhältnissen, insbesondere bei Ernte 1. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass mittels 2D-NMR die gesamten Monomere erfasst werden, während die DFRC-Methode lediglich die Monomere erfassen kann, die vollständig über β -O-4-Bindungen in das Polymer eingebunden sind. Wie später beschrieben (siehe Kapitel 4.2.1.5), ist die β -O-4-Bindung auch in den Ligninen aus den UBS von Kohlrabi vorherrschend, jedoch nicht ganz so dominant wie in anderen pflanzlichen Proben (z.B. Spargel). Dennoch bestätigen auch die Ergebnisse der 2D-NMR Analyse den vermehrten Einbau von Sinapylalkohol in das Ligninpolymer während der Reifung, da die so ermittelten G/S-Verhältnisse ebenfalls von Ernte 1 bis Ernte 5 abnahmen. Trotz zahlenmäßiger Abweichungen lieferten beide Methoden somit vergleichbare Ergebnisse, wodurch auch für dieses Probenmaterial die Anwendbarkeit der DFRC-Methode bestätigt wurde. Die Veränderung der Monomerzusammensetzung der Ligninpolymere korreliert zudem sehr gut mit dem ansteigenden Ligningehalt.

Tabelle 13: Charakterisierung der Monomerzusammensetzung der Ligninpolymere aus den unlöslichen Ballaststoffen der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kohlrabiprobe mittels derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode und 2D-NMR. Die Ergebnisse der DFRC-Methode sind in mol% dargestellt und resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Das mittels 2D-NMR ermittelte Guaiacyl (G)-/Syringylverhältnis (S) resultiert aus der Einfachbestimmung der isolierten Lignine. H, Hydroxyphenyl.

	H:G:S (DFRC) [mol%]	G/S (DFRC)	G/S (NMR)
Ernte 1	3,1 : 82,6 : 14,3	5,8 ± 0,2	9,3
Ernte 2	3,1 : 72,3 : 24,7	2,9 ± 0,1	5,2
Ernte 3	4,6 : 67,9 : 27,5	2,5 ± 0,2	4,6
Ernte 4	5,3 : 64,0 : 30,7	2,1 ± 0,01	3,4
Ernte 5	4,4 : 57,9 : 37,8	1,5 ± 0,1	2,4

Mittels 2D-NMR konnten zusätzlich die Bindungstypen der Monomere in den Ligninpolymeren, die aus den UBS der unterschiedlichen Kohlrabiprobe isoliert wurden, charakterisiert werden. In Abbildung 31 ist beispielhaft ein Ausschnitt eines HSQC-Spektrums der aus der Ernte 1 isolierten und anschließend acetylierten Lignine gezeigt. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Anteile der identifizierten Bindungstypen für alle Ernten.

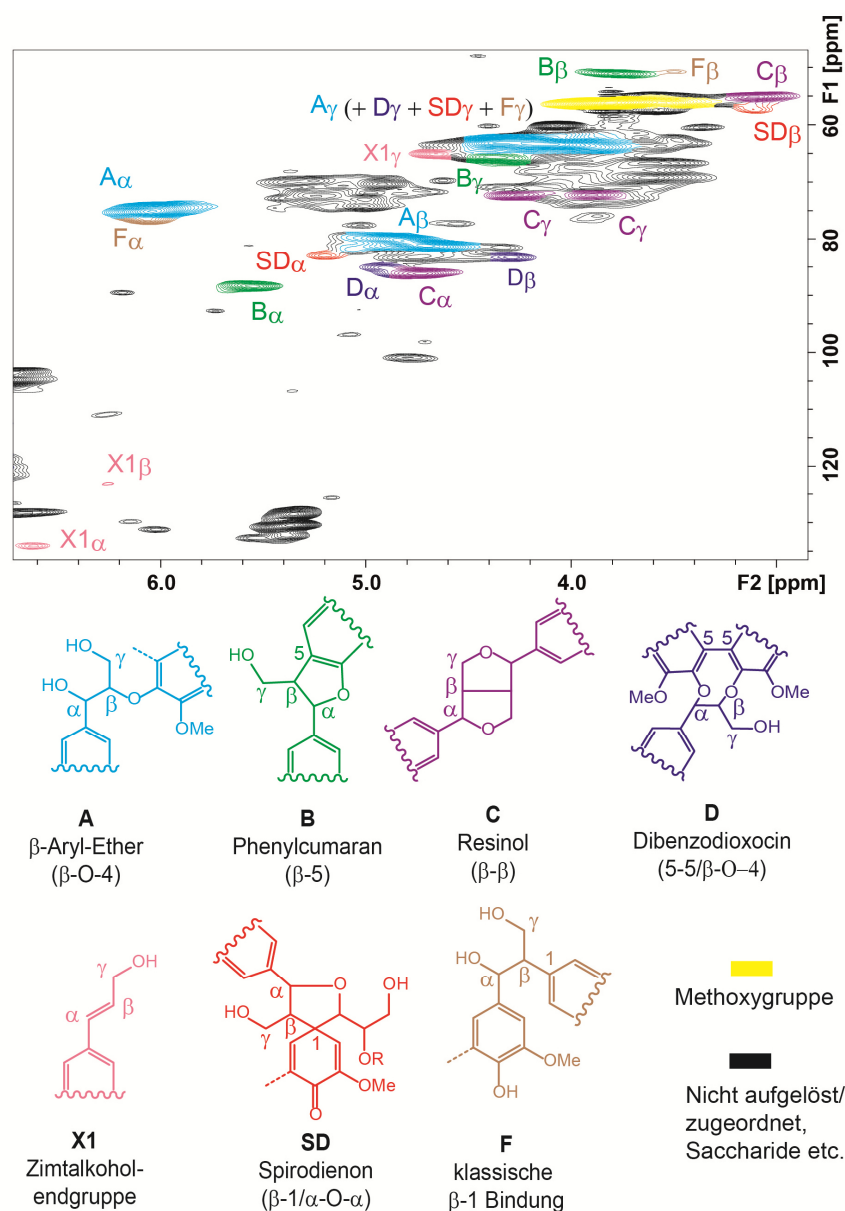


Abbildung 31: Ausschnitt des HSQC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen der Kohlrabiprüfen der Ernte 5 isoliert wurden. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . Die identifizierten Bindungstypen sind entsprechend farblich markiert. Aufgrund des breiten Signals der γ -C-H-Korrelation der β -O-4-Bindung waren die γ -C-H-Korrelationen der Dibenzodioxocineinheit, der Spirodienoneinheit und der klassischen β -1-Bindung nicht ausreichend aufgelöst. Die berechneten Anteile der Bindungstypen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

In den Ligninpolymeren, die aus den Kohlrabiprüfen der Ernte 1 isoliert wurden, dominierten β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindungen) mit 63,3%, gefolgt von Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) mit 17,6%, Phenylcumaranstrukturen (β -5-Bindungen) mit 12,7% und Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen) mit 6,3%. Während der Reifung veränderte sich das Bindungstypenprofil nur in geringem Ausmaß. So nahm der Anteil der β -Aryl-Ether und der Resinolstrukturen leicht zu, während sich der bei Ernte 1 bereits geringe Anteil der Dibenzodioxocinstrukturen halbierte. Wie bei den anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben

sind diese Aussagen mit Vorsicht zu bewerten, da die berechneten Daten aus einer Einfachbestimmung stammen. Wie bereits beschrieben, nahmen sowohl die Ligningehalte als auch die Anteile an S-Einheiten während der Reifung zu. Eine leichte Zunahme des β -O-4-Bindungsanteils spricht für einen Einbau von Sinapylalkohol in das Polymer über diesen Bindungstyp. Der ebenfalls leicht erhöhte Anteil an Resinolstrukturen, welche hauptsächlich durch Dimerisierung zweier Monolignole, insbesondere von Sinapylalkohol (Ralph et al. 2004b), entstehen, lässt neben dem Wachstum bereits bestehender Ligninpolymere auf die zusätzliche Neubildung von Ligninen schließen. Dies könnte zudem die zuvor beschriebene Zunahme der H-Anteile im Ligninpolymer während der Reifung von Kohlrabi erklären, da *para*-Cumarylalkohol bevorzugt in der frühen Phase der Ligninbildung als Monolignol dient. Die Neubildung von Ligninen könnte, wie bereits angesprochen, die Bestimmung des Klason-Ligningehaltes beeinflussen. Die neu gebildeten vermutlich vielfach oligomeren Ligninmoleküle sind säurelöslicher als hochmolekulare Ligninpolymere und könnten dadurch nach der Säurehydrolyse nicht gravimetrisch erfasst werden. Dies kann somit zu den unterschiedlichen Gehalten beitragen, die mit den Methoden der ABSL- und der Klason-Ligninbestimmung analysiert wurden. Der abnehmende Anteil der Dibenzodioxocinstrukturen lässt sich mit dem erhöhten Anteil an S-Einheiten erklären, da im Sinapylalkohol die Position C5 durch eine Methoxygruppe blockiert ist und daher die Ausbildung von 5-5-Bindungen verhindert wird. Neben den genannten Bindungstypen wurden zudem Zimtalkoholendgruppen, Spirodienonstrukturen und klassische β -1-Strukturen identifiziert, deren Anteile bei der Berechnung der Bindungstypenverteilung unter Annahme eines Korrekturfaktors von 1 abgeschätzt wurden.

Zimtalkoholendgruppen und Spirodienonstrukturen (β -1/ α -O- α) waren mit einem Anteil von 1,0-1,9% bzw. 0,6-1,4% nur wenig vertreten. Die klassische β -1-Bindung war dagegen in höheren Anteilen von 4,8-9,0% vertreten. Das zur Integration verwendete Signal überlappte jedoch teilweise mit dem α -C-H-Signal der dominierenden β -O-4-Bindung (Abbildung 31), wodurch es zu einer Überbestimmung des Anteils der klassischen β -1-Bindung kommen kann. Das native Vorkommen der klassischen β -1-Bindungen, insbesondere in Anteilen bis zu 10%, wird als unwahrscheinlich angesehen. Vielmehr wird diskutiert, dass diese vor allem während der Ligninisolierung unter sauren Bedingungen aus den nativ vorliegenden Spirodienonstrukturen entstehen (Ralph und Landucci 2010; Zhang und Gellerstedt 2001). Daher kann der Anteil der Spirodienonstruktur und der klassischen β -1-Bindung zusammen betrachtet werden, sodass insgesamt ein zunehmender Anteil an β -1-Strukturen von 6,2% (Ernte 1) auf 9,6% (Ernte 5) resultiert. Die Bildung von β -1-Strukturen erfolgt allgemein durch die β -1-Kopplung eines Monolignols mit einem bereits bestehenden β -Aryl-Ether, wobei sowohl G- als auch S-Einheiten involviert sein können (Zhang et al. 2006). Die Zunahme des Anteils dieser Struktureinheit lässt daher vermuten, dass Sinapylalkohol zusätzlich zum Ein-

bau über β -O-4-Bindungen bzw. β - β -Bindungen auch über β -1-Bindungen in das bestehende Ligninpolymer eingebaut wird.

Table 14: Bindungstypen und deren Anteile in Ligninen, die aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kohlrabiprogenen isoliert wurden. Bei den in Klammern dargestellten Werten ist zu berücksichtigen, dass hierbei Korrekturfaktoren von 1 für Zimtalkoholendgruppen (X1), Spirodienonstrukturen (SD, β -1/ α -O- α) und klassische β -1-Strukturen (F) angenommen wurden, da keine Korrekturfaktoren in der Literatur vorhanden sind. A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4). n=1.

	%A	%B	%C	%D	%X1	%SD	%F
Ernte 1	63,3	12,7	17,6	6,3			
	(58,7)	(11,8)	(16,3)	(5,9)	(1,0)	(1,4)	(4,8)
Ernte 2	64,8	11,3	18,6	5,3			
	(58,5)	(10,2)	(16,8)	(4,8)	(1,7)	(1,1)	(7,0)
Ernte 3	66,6	11,3	18,4	3,7			
	(59,8)	(10,1)	(16,5)	(3,3)	(1,6)	(1,4)	(7,3)
Ernte 4	66,9	10,4	18,1	4,6			
	(60,8)	(9,4)	(16,4)	(4,2)	(1,7)	(1,4)	(6,1)
Ernte 5	66,9	10,0	20,1	3,0			
	(59,3)	(8,9)	(17,8)	(2,6)	(1,9)	(0,6)	(9,0)

Die Aufnahme von HMBC-Spektren diente der weiteren Charakterisierung der Bindungen in den Ligninpolymeren, insbesondere der Bestimmung, welche Monomereinheiten über die jeweiligen Bindungstypen verknüpft sind. Um mögliche Unterschiede zwischen den Ligninen aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Kohlrabiprogenen zu analysieren, sind in Abbildung 32 Ausschnitte der HMBC-Spektren von Ligninen, die aus Kohlrabiprogenen der Ernten 2-4 isoliert wurden, dargestellt. Das HMBC-Spektrum der Lignine, die aus den UBS von Kohlrabi der Ernte 1 isoliert wurden, ähnelte dem HMBC-Spektrum der Lignine aus den UBS von Kohlrabi der Ernte 2. Eine Ausnahme stellte das die Korrelation des α -Protons der Phenylcumaranstruktur (β -5-Bindung) mit den 2/6-Kohlenstoffen der G-Einheiten repräsentierende Signal dar, welches nur sehr schwach vorhanden war. Dies lag vermutlich an dem niedrigeren Ligningehalt der Ernte 1 im Vergleich zu den anderen Proben und dem damit verbundenen geringeren Monomergehalt. Der Abbildung 32 (A) ist zu entnehmen, dass die G-Einheiten sowohl bei der Ausbildung von β -Aryl-Ethern, als auch von Phenylcumaran- und Dibenzodioxocinstrukturen beteiligt sind. Im Gegensatz dazu sind die S-Einheiten hauptsächlich über β -O-4-Bindungen in das Ligninpolymer eingebunden. Welche Monolignole bei der Bildung von Resinolstrukturen eine Rolle spielen und ob dies, wie in der Literatur beschrieben, vor allem der Sinapylalkohol ist, kann nicht gesagt werden. In Abbildung 32 (B) ist zusätzlich ein schwaches Signal zu sehen, das aus der Kopplung des α -Protons der Phenylcumaranstruktur mit den 2/6-Kohlenstoffen der S-Einheiten resultiert. Das HMBC-

Spektrum der Lignine der zum vierten Zeitpunkt geernteten Kohlrabiprobe zeigt zusätzlich eine Korrelation des α -Protons der Resinoleinheit mit den 2/6-Kohlenstoffen der S-Einheiten. Das HMBC-Spektrum der Lignine, die aus Kohlrabi der Ernte 5 isoliert wurden, war wiederum vergleichbar mit dem Spektrum des Lignins aus Kohlrabi der Ernte 4. Allerdings war hier die Korrelation des α -Protons der Dibenzodioxocinstruktur lediglich mit dem 2-Kohlenstoff der G-Einheiten zu sehen. Die zusätzlichen Signale in den HMBC-Spektren der Ernten 4 und 5 deuten insgesamt darauf hin, dass der während der Lignifizierung verstärkt eingebaute Sinapylalkohol sowohl über β -5- als auch über β - β -Bindungen integriert wird. Letzteres ließ sich bereits aus den HSQC-Experimenten vermuten, da hierbei ein erhöhter Anteil an β - β -Bindungen im Verlauf der Erntezeitpunkte zu beobachten war. Daher bekräftigten die HMBC-Experimente die Annahme, dass bereits existierende Ligninpolymere nicht nur durch den Einbau neuer Monolignole unter Ausbildung unterschiedlicher Bindungstypen vergrößert wird, sondern es wahrscheinlich auch zur Neubildung von Ligninoligomeren kommt.

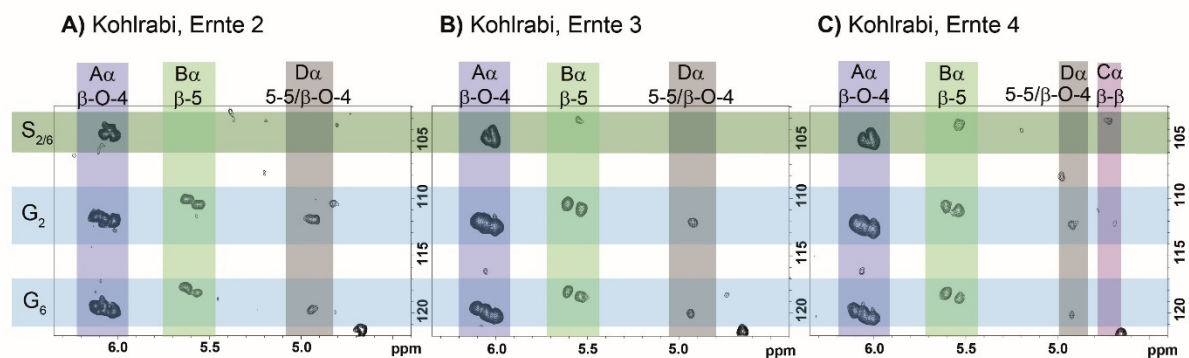


Abbildung 32: Ausschnitte der HMBC-Spektren von acetylierten Ligninen, die aus den Kohlrabiprobe der Ernten 2 (A), 3 (B) und 4 (C) isoliert wurden. Die farblich hinterlegten Banden zeigen die Korrelationen über drei Bindungen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps und den 2/6-Kohlenstoffen der Guaiacyl (G)- bzw. der Syringyleinheiten (S). Nicht gezeigt sind die ebenfalls vorhandenen Korrelationen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps mit den β - und γ -Kohlenstoffen. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4).

Welche Monomere bei der Ausbildung von Spirodienonstrukturen eine Rolle spielen, kann anhand der aufgenommenen HMBC-Spektren nicht gesagt werden. Vermutlich ist der Anteil dieser Struktureinheit zu gering, um bei den verwendeten Messbedingungen ein Korrelationssignal zu erhalten. Die Zuordnung der Monomereinheiten zu den klassischen β -1-Strukturen, die wahrscheinlich aus den nativ vorliegenden Spirodienonstrukturen entstehen, war ebenfalls nicht möglich, da die chemische Verschiebung des α -Protons der klassischen β -1-Bindung identisch mit der chemischen Verschiebung des α -Protons der β -O-4-Bindung ist.

4.2.2 Zellwandcharakterisierung von Radieschen

4.2.2.1 Sensorische Beurteilung des Probenmaterials

Die Verkostung der Radieschen erfolgte im rohen Zustand. Die Ergebnisse der sensorischen Bewertung hinsichtlich verschiedener Geschmacks- (scharf, geschmacklos, süß, mild) und Konsistenzattribute (saftig, zart, knackig, zäh, holzig), die jeweils von sechs bis sieben Prüfern durchgeführt wurde, sind in Abbildung 33 für die Ernten 1-4 zusammengefasst. Da die Radieschen der Ernte 5 stark verholzt waren, konnten diese nicht mehr verkostet werden. Geschmacklich war zwischen den Ernten kaum ein Unterschied festzustellen. Das Attribut süß spielte allgemein keine große Rolle bei der Beschreibung des Geschmacks. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichungen ließ sich lediglich eine Tendenz hinsichtlich einer Zunahme der Geschmackslosigkeit erkennen.

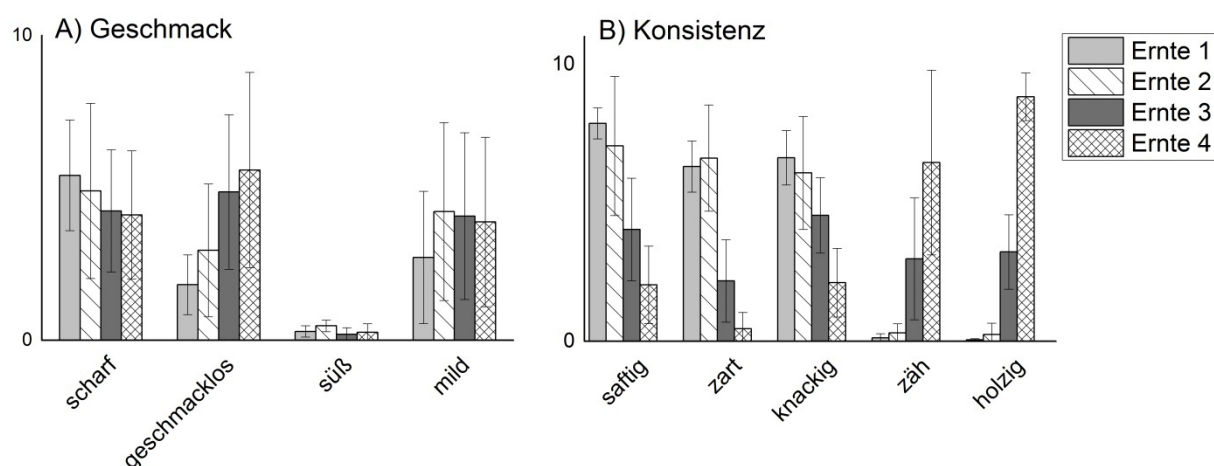


Abbildung 33: Ergebnisse der sensorischen Beurteilung der Radieschenproben hinsichtlich Geschmack (A) und Konsistenz (B). Die Ergebnisse sind für die Ernten 1-4 gezeigt. Die Radieschen der Ernte 5 waren aufgrund zu starker Holzigkeit nicht mehr zu verkosten. Die Verkostung erfolgte je nach Erntezeitpunkt von sechs bis sieben Prüfern.

Im Gegensatz dazu sind die Konsistenzveränderungen deutlicher ausgeprägt. Die Radieschen der Ernte 1 waren sehr saftig, zart und knackig. Eigenschaften wie Zähigkeit und Holzigkeit waren kaum vorhanden. Dies änderte sich deutlich im Verlauf der Reifung. Beim Vergleich der Radieschen der Ernte 1 mit den Radieschen der Ernte 4 fällt insbesondere die deutlich ausgeprägte Zunahme der Zähigkeit und Holzigkeit auf. Daneben waren diese Radieschen weniger saftig, zart und knackig. Diese, selbst unter Berücksichtigung der teilweise hohen Standardabweichungen, ausgeprägten Texturveränderungen lassen eine drastische Veränderung der Zellwandzusammensetzung vermuten.

4.2.2.2 Bestimmung des Ballaststoffgehaltes

Die Bestimmung der Ballaststoffgehalte der verschiedenen Ernten erfolgte getrennt nach UBS- und LBS-Gehalten. Aufgrund des stark limitierten Probenmaterials der Ernten 1 und 2

erfolgten die Analysen jeweils in Doppelbestimmung. Die Ergebnisse der Ballaststoffgehalte bezogen auf die Trockenmasse sind in Abbildung 34 dargestellt. Der Gehalt der UBS der Radieschen der Ernte 1 lag bei $23,1 \pm 0,1$ g/100 g Radieschenmehl und überwog deutlich den Gehalt der LBS mit $2,1 \pm 0,1$ g/100 g Radieschenmehl. Die Ballaststoffgehalte der Radieschen, die drei Wochen später geerntet wurden (Ernte 2), zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den Ballaststoffgehalten der Radieschen der Ernte 1. Im Verlauf der weiteren Reifung war jedoch eine deutliche Zunahme des UBS-Gehaltes zu beobachten. So stieg der UBS-Gehalt nach sechs Wochen Reifung (Ernte 3) um das 1,5-fache. Während der Reifung für weitere 3,5 bzw. 5,5 Wochen (Ernte 4 bzw. 5) stieg der UBS-Gehalt weiter auf mehr als das Doppelte im Vergleich zum UBS-Gehalt der Ernte 1 an.

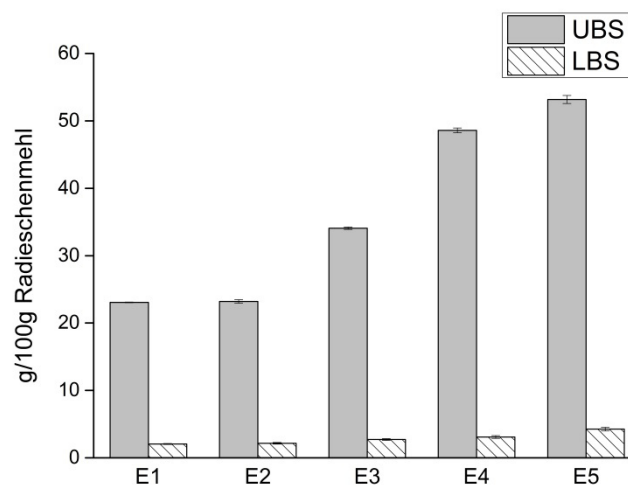


Abbildung 34: Unlösliche (UBS) und lösliche (LBS) Ballaststoffgehalte des getrockneten Radieschenmehls. Dargestellt sind die Ergebnisse der Ernten 1-5. Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppelbestimmung, Abweichungen sind als Range/2 angegeben.

Die Gehalte der LBS verdoppelten sich ebenfalls zwischen Ernte 1 und Ernte 5. Der drastische Anstieg der UBS korreliert gut mit den sensorisch festgestellten Texturveränderungen, da beides auf drastische Veränderungen der Zellwandzusammensetzung hindeutet.

Obwohl die Saftigkeit der Radieschen von Ernte 1 zu Ernte 4 abnahm, änderte sich der mittels Gefriertrocknung bestimmte Wassergehalt kaum (Tabelle 15). Unter Berücksichtigung des Wassergehaltes sind in Tabelle 15 die Gesamtballaststoffgehalte der unterschiedlichen Ernten zusammengefasst. Der Gesamtballaststoffgehalt der Radieschen der Ernte 1 betrug $1,2 \pm 0,001$ g/100 g Frischgewicht. Dies entspricht in etwa den in der Literatur zu findenden Gehalten von 1,3% (Kontraszti et al. 1999) bzw. 2% (Khanum et al. 2000). Der Gesamtballaststoffgehalt stieg anschließend während der Reifung für 15 Wochen (Ernte 5) um etwa das Dreifache an, wobei der größte Sprung zwischen Ernte 3 und 4 zu beobachten war.

Table 15: Gesamtballaststoffgehalte (BS) der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Radieschen bezogen auf das Frischgewicht ($n=2$). Der für die Berechnung notwendige Wassergehalt resultiert aus dem Gewichtsverlust während der Gefriertrocknung der Proben ($n=3$).

	Wassergehalt [%]	BS [g/100 g Frischgewicht]
Ernte 1	95,3 ± 0,6	1,2 ± 0,001
Ernte 2	95,2 ± 0,3	1,2 ± 0,01
Ernte 3	95,4 ± 0,1	1,7 ± 0,01
Ernte 4	94,4 ± 0,2	2,9 ± 0,03
Ernte 5	94,0 ± 0,8	3,6 ± 0,02

4.2.2.3 Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe

Die Charakterisierung der Polysaccharide der UBS aus Radieschen erfolgte durch die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung nach H_2SO_4 -Hydrolyse und Methanolyse. Über welche Bindungsarten die Monosaccharide in die Polysaccharide eingebunden sind, wurde wiederum mit Hilfe der Methylierungsanalyse bestimmt. Des Weiteren wurden die Arabinan- und Galactanstrukturen mittels des enzymatisch-chromatographischen Arabinan- und Galactan-Screenings näher betrachtet.

Die Monosaccharidzusammensetzungen der Polysaccharide aus den UBS von Radieschen der Ernten 1-5, die nach H_2SO_4 -Hydrolyse und Methanolyse bestimmt wurden, sind in Abbildung 35 dargestellt. Die entsprechenden Ergebnisse der Methylierungsanalyse sind für alle Ernten in Tabelle 16 zusammengefasst. In der Literatur sind nur wenige Daten zur Polysaccharidzusammensetzung von Radieschen zu finden. So ist lediglich die Monosaccharidzusammensetzung des eng verwandten Rettichs beschrieben, die mit der hier ermittelten Zusammensetzung vergleichbar ist (Kontraszti et al. 1999; Villanueva-Suarez et al. 2003). Hauptmonosaccharid der Polysaccharide aus den UBS der Radieschen der Ernte 1 stellte die Glucose mit einem Anteil von 60,9 mol% dar. Die Methylierungsanalyse zeigte, dass diese hauptsächlich 1,4-verknüpft vorliegt. Da der mittels Methanolyse bestimmte Glucoseanteil lediglich bei 8,7 mol% lag, resultiert der Hauptanteil der nach H_2SO_4 -Hydrolyse bestimmten Glucose vermutlich aus Cellulose. Der Nachweis des durch Methanolyse bestimmten Anteils an Glucose, aber insbesondere die Identifizierung des PMAAs, das aus 1,4,6-verknüpfter Glucopyranose resultiert, lassen auf das Vorhandensein von Xyloglucanen schließen. Neben Xyloglucanen konnten auch Xylane nachgewiesen werden, da die freigesetzte Xylose überwiegend als 1,4-verknüpft vorliegend bestimmt wurde. Die Xylane scheinen überwiegend linear zu sein. Eine geringe Verzweigung in Position O-2 und/oder O-3 kann jedoch aufgrund der in den vorherigen Kapiteln bereits erläuterten chromatographischen Schwierigkeiten bei der GC-MS bzw. GC-FID Analyse nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur sind keine

Daten bezüglich der Xylanstrukturen von Radieschen oder eng verwandten pflanzlichen Lebensmitteln vorhanden. Der geringe Anteil an 1,4-verknüpfter Mannose weist zudem auf das Vorkommen von Mannanen hin. Die Identifizierung des PMAAs der 1,4,6-verknüpften Mannopyranose zeigt, dass die vorliegenden Mannane verzweigt sind. Durch welches Monosaccharid die Substitution erfolgt, kann mit Hilfe der Methylierungsanalyse nicht bestimmt werden. In der Regel sind jedoch häufig Galactomannane, die in Position O-6 des Mannanrückgrats eine Galactose tragen, zu finden (Melton et al. 2009). Ein kleiner Teil der 1,4-verknüpften Glucopyranose könnte zudem im Mannanrückgrat integriert vorliegen, sodass auch das Vorhandensein von Galactoglucomannanen möglich ist (Melton et al. 2009).

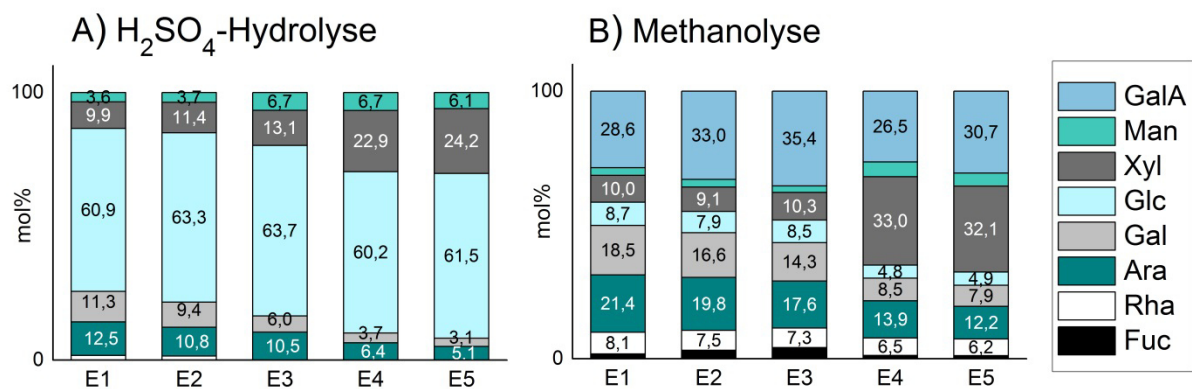


Abbildung 35: Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der unlöslichen Ballaststoffe aus Radieschen der Ernten 1-5 nach H₂SO₄-Hydrolyse (A) und Methanolyse (B). Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Da Uronsäuren durch die H₂SO₄-Hydrolyse unterbestimmt werden, sind sie nicht mit einberechnet. Rhamnose konnte nach H₂SO₄-Hydrolyse in den Radieschen der Ernten 3-5 zwar identifiziert werden, die Konzentrationen lagen jedoch unter der Kalibriergeraden, sodass eine Berechnung der Anteile nicht möglich war. GalA, Galacturonsäure; Man, Mannose; Xyl, Xylose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Fuc, Fucose; E, Ernte.

Die Pektinfraktion der UBS der zum ersten Zeitpunkt geernteten Radieschen besteht aus Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen, wobei, bezogen auf die Hauptketten, Homogalacturonane überwiegen. Dies geht zum einen aus dem nach Methanolyse bestimmten Verhältnis von Galacturonsäure zu Rhamnose von etwa 4:1 und zum anderen aus dem sehr geringen Anteil von 0,56 mol% an 1,2-verknüpfter Rhamnopyranose hervor. Da das PMAA, das aus 1,2,4-verknüpfter Rhamnopyranose resultiert, in ähnlichen Anteilen vorhanden ist, kann auf eine hohe Substitution der Typ I Rhamnogalacturonane mit vermutlich Arabinanen und (Arabino-) Galactanen geschlossen werden. Der Hauptanteil an Arabinose und Galactose lässt sich diesen Pektinseitenketten zuordnen, da Arabinose hauptsächlich 1,5-verknüpft (wiederum bei Annahme, dass Arabinose überwiegend furanosidisch vorliegt) und Galactose hauptsächlich 1,4-verknüpft vorlag. Arabinose und Galactose wurden zu ähnlichen Anteilen säurehydrolytisch freigesetzt, daher sind Arabinane und Galactane zu etwa gleichen Anteilen vertreten. Dies lässt sich nicht durch die Verhältnisse der 1,5-verknüpften

Arabinofuranosen zu den 1,4-verknüpften Galactopyranosen bestätigen. Allerdings wurde in dieser Arbeit und bei vielen anderen Anwendungen der Methylierungsanalyse auf pflanzliche Proben in unserer Arbeitsgruppe demonstriert, dass Galactane bei dieser Methode vermutlich unterbestimmt werden. Die vorliegenden Arabinane sind zusätzlich in Position O-2 und/oder O-3 verzweigt, was durch die Identifizierung der PMAAs der 1,2,5-, 1,3,5- und der 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranosen nachgewiesen wurde. Wie bereits beschrieben, kann das PMAA der 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranose auch teilweise oder vollständig als Folge einer Untermethylierung entstehen.

Tabelle 16: Ergebnisse der Methylierungsanalyse von unlöslichen Ballaststoffen aus Radieschen der Ernten 1-5. Die Ergebnisse resultieren aus einer Doppelbestimmung, die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. PMAA, partiell methyliertes Alditolacetat; t, terminal; p, Pyranose; f, Furanose; Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose.

PMAA [mol%]	Ernte 1	Ernte 2	Ernte 3	Ernte 4	Ernte 5
t-Glcp	1,36 ± 0,01	1,14 ± 0,05	1,92 ± 0,005	2,12 ± 0,01	2,25 ± 0,13
1,4-Glcp	59,74 ± 1,38	62,04 ± 1,67	57,41 ± 3,92	58,36 ± 1,88	55,58 ± 2,49
1,4,6-Glcp	4,47 ± 0,06	4,76 ± 0,49	4,87 ± 0,26	3,75 ± 0,20	2,89 ± 0,06
t-Xylp	3,73 ± 0,03	4,21 ± 0,23	4,03 ± 0,04	4,91 ± 0,61	4,38 ± 0,08
1,4-Xylp	4,68 ± 0,56	5,05 ± 0,09	8,54 ± 0,51	14,39 ± 0,03	19,72 ± 2,16
t-Galp	3,20 ± 0,01	3,00 ± 0,02	2,35 ± 0,06	1,81 ± 0,19	1,51 ± 0,09
1,4-Galp^a	2,05 ± 0,006	1,94 ± 0,11			
t-Araf	5,78 ± 0,34	5,13 ± 0,13	4,99 ± 0,04	3,81 ± 0,27	3,35 ± 0,17
1,2-Arap	0,58 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,73 ± 0,12	0,59 ± 0,26	0,94 ± 0,07
1,5-Araf	6,60 ± 0,23	4,41 ± 0,20	6,83 ± 2,75	3,02 ± 0,57	2,87 ± 0,51
1,3,5-Araf^b	1,98 ± 0,03	2,00 ± 0,70	2,72 ± 0,18	2,38 ± 0,02	1,87 ± 0,09
1,2,5-Araf	0,87 ± 0,07	0,61 ± 0,12	0,49 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,20 ± 0,01
1,2,3,5-Araf	0,93 ± 0,07	1,01 ± 0,12	0,88 ± 0,23	0,66 ± 0,11	0,44 ± 0,02
1,2-Rhap	0,56 ± 0,20	0,54 ± 0,08	1,08 ± 0,82	1,64 ± 0,69	1,88 ± 0,01
1,2,4-Rhap	0,66 ± 0,05	0,64 ± 0,12	0,49 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,19 ± 0,02
1,4-Manp	2,19 ± 0,02	2,40 ± 0,17	1,98 ± 0,10	1,58 ± 0,03	1,61 ± 0,08
1,4,6-Manp	0,63 ± 0,11	0,60 ± 0,08	0,69 ± 0,05	0,41 ± 0,03	0,30 ± 0,001

^a Die Identifizierung des PMAAs im GC-MS Chromatogramm war ab Ernte 3 nicht mehr möglich.

^b Überbestimmung aufgrund unvollständiger Peaktrennung im GC-FID Chromatogramm möglich.

Eine detailliertere Betrachtung der Arabinanstrukturen ermöglicht das Arabinan-Screening. In Abbildung 36 sind die Anteile der aus den Polysacchariden der UBS freigesetzten Arabinooligosaccharide dargestellt. Die zugehörigen Strukturen sind in Kapitel 9.1, Tabelle 39 zu

finden. Ebenfalls freigesetzte, monomere Arabinosen wurden bei der Berechnung der Verteilung aufgrund der limitierten Aussagekraft für die Arabinanstrukturen nicht mit einbezogen. Es fällt auf, dass das aus zwei α -(1→5)-verknüpften Arabinofuranosen bestehende Dimer R28 mit 79% den Hauptanteil bildete. Diese Struktureinheit repräsentiert die linearen Abschnitte der Arabinane. R38 stellt ein lineares Trimer dar und resultiert aus einem unvollständigen enzymatischen Abbau, da es mittels der eingesetzten *endo*-Arabinanase weiter zu Arabinose und dem Dimer R28 abgebaut werden kann. Daher kann dessen Anteil ebenfalls zu den linearen Abschnitten gezählt werden. Die restlichen Anteile verteilten sich auf verschieden verzweigte Arabinooligosaccharide. Bei den Struktureinheiten R49a und R49b handelt es sich um Ketten aus drei α -(1→5)-verknüpften Arabinofuranoseeinheiten, wobei die mittlere Arabinose in Position O-3 (R49a) bzw. O-2 (R49b) mit einer weiteren Arabinofuranose substituiert ist. Ein ähnliches Oligomer stellt R51 dar, dessen mittlere Arabinose der Arabinosekette in Position O-2 und O-3 je eine Arabinofuranose trägt. Auch die höheren Oligomere R68a und R71 stellen in Position O-2 und O-3 (R68a) bzw. in Position O-3 (R71) substituierte Arabinanstrukturen dar. Das Arabinan-Screening bestätigte daher die Ergebnisse aus der Methylierungsanalyse. Auch diese zeigte, dass der Hauptteil der Arabinofuranosen 1,5-verknüpft vorlag. Daneben wurden ebenfalls Verzweigungen in Position O-2 oder O-3 des Arabinanrückgrats nachgewiesen. Zudem bestätigte das Arabinan-Screening, dass das PMAA der vollsubstituierten Arabinofuranose (PMAA der 1,2,3,5-verknüpfte Arabinofuranose) tatsächlich auf das Vorhandensein einer vollsubstituierten Arabinose und nicht ausschließlich auf eine Untermethylierung zurückzuführen ist.

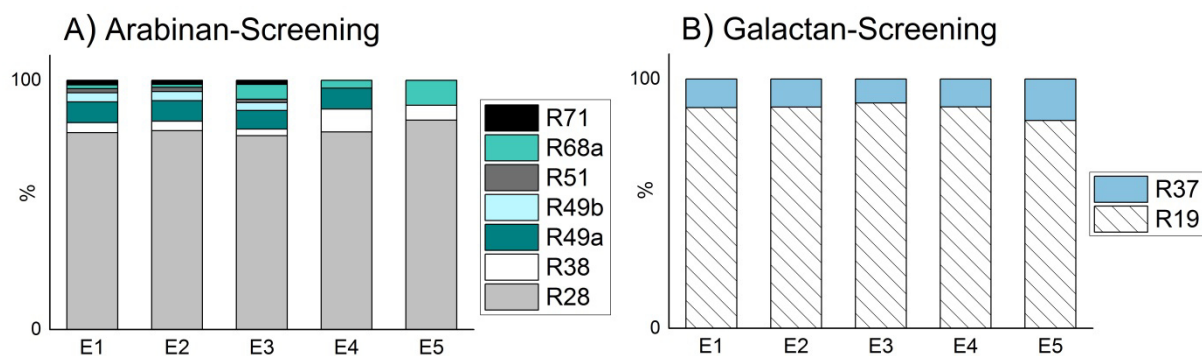


Abbildung 36: Verhältnisse [%] der Arabino- (A) und Galactooligosaccharide (B) nach Inkubation der unlöslichen Ballaststoffe aus Radieschen (Ernten 1-5) mit *endo*-Arabinanase bzw. *endo*-Galactanase und anschließender Analyse der freigesetzten Oligosaccharide mittels HPAEC-PAD. Bei den Ernten 4 und 5 waren die Arabinooligosaccharide R49a (nur Ernte 5), R49b, R51 und R71 lediglich qualitativ nachweisbar. Zudem war auch nach Inkubation mittels *endo*-Galactanase das Galactooligosaccharid R15 bei allen Ernten in nicht quantifizierbaren Mengen vorhanden. Die genannten Oligosaccharide sind daher nicht mit eingerechnet. Die Strukturen der Oligosaccharide sind Kapitel 9.1, Tabelle 39 bzw. Tabelle 40 zu entnehmen.

Neben den Arabinanen stellen auch Galactane wichtige Strukturelemente der Pektinfraktion aus den Radieschen dar, was durch die hauptsächlich 1,4-verknüpften Galactopyranosen gezeigt wurde. Allerdings konnte zu den späteren Erntezeitpunkten (ab Ernte 3) keine 1,4-verknüpfte Galactopyranose mehr mittels Methylierungsanalyse nachgewiesen werden. Zur Bestätigung von Galactanstrukturen in den UBS aus Radieschen wurde daher das Galactan-Screening herangezogen. In Abbildung 36 sind die Anteile der dabei freigesetzten Galactooligosaccharide dargestellt. Auch hier wurden freigesetzte, monomere Galactosen nicht in die Verteilung einberechnet. Die Enzyminkubation der UBS der Ernte 1 führte zur Freisetzung von zwei quantifizierbaren Struktureinheiten. Den Hauptanteil mit 88,5% stellte das aus zwei β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen zusammengesetzte Dimer R19 dar. Daneben konnte das Tetramer R37 bestimmt werden, das aus drei β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen besteht, an dessen nicht-reduzierenden Ende eine weitere Galactopyranose in Position O-6 gebunden ist. Zusätzlich waren Spuren des Dimers R15 vorhanden, das aus der enzymatischen Hydrolyse von β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Galactopyranosen, die in Position O-4 eine terminale Arabinopyranose gebunden haben, entsteht.

Während der Reifung der Radieschen kam es zu einer deutlichen Änderung des zum Erntezeitpunkt 1 vorliegenden Polysaccharidprofils. So nahm der mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzte Anteil an Xylose von 9,9 mol% (Ernte 1) auf 24,2 mol% (Ernte 5) zu. Gleichzeitig erhöhte sich auch der Anteil der 1,4-gebundenen Xylose, sodass auf einen erhöhten Anteil an Xylanen geschlossen werden kann. Die Änderungen waren zwischen der Ernte 3 und 4 besonders stark ausgeprägt. Je nach Hydrolysevariante verdoppelte bzw. verdreifachte sich dabei der freigesetzte Anteil an Xylose. Auch der Anteil des PMAAs der 1,4-verknüpften Xylose verdoppelte sich etwa in diesem Zeitraum. Die Reifung für weitere zwei Wochen (Ernte 5) bewirkte dagegen kaum eine zusätzliche Änderung. Zusätzlich zur Zunahme des Xyloseanteils nahm auch der Anteil an polymergebundener Mannose um etwa das Doppelte zu. Allerdings konnte keine Zunahme des Anteils an 1,4-gebundener Mannose beobachtet werden. Je nach Hydrolysemethode war die am stärksten ausgeprägte Anteilszunahme zwischen Ernte 2 und 3 (H_2SO_4 -Hydrolyse) oder zwischen Ernte 3 und 4 (Methanolyse) festzustellen. Ein Problem bei der Quantifizierung der Mannose stellte die unvollständige Trennung der Mannose- und Xylose-Peaks dar. Zwar kann zur Quantifizierung der Mannose ein geändertes Gradientenprogramm verwendet werden, jedoch wurde auch hierbei keine vollständige Trennung erreicht. Daher kann es, insbesondere bei höheren Xylosekonzentrationen (besonders bei den Ernten 4 und 5), zu einer Überbestimmung der Mannoseanteile kommen. Ob bzw. wie stark sich der Mannananteil während der Reifung von Radieschen ändert, kann somit nicht eindeutig bewertet werden.

Der Anteil an mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzter Glucose sowie auch der Anteil an 1,4-verknüpfter Glucopyranose blieben weitgehend konstant, woraus geschlossen werden kann, dass sich der Anteil an Cellulose kaum veränderte. Im Gegensatz dazu nahm der mittels Methanolyse freigesetzte Anteil an Glucose von Ernte 3 auf Ernte 4 sprunghaft ab. Da der hierbei analysierte Glucoseanteil vorwiegend den Xyloglucanen zuzuordnen ist, lässt diese Abnahme auf einen geringeren Xyloglucananteil schließen. Allerdings war nur eine geringe Abnahme des Anteils der 1,4,6-gebundenen Glucopyranose zu beobachten.

Im Gegensatz zum Xylose- und Mannoseanteil nahm der Anteil an mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzter Arabinose von 12,5 mol% (Ernte 1) auf 5,1 mol% (Ernte 5) ab. Damit einhergehend sanken die Anteile der terminalen sowie der 1,5-, 1,2,5- und 1,3,5-verknüpften Arabinofuranosen, sodass insgesamt von einem abnehmenden Arabinananteil ausgegangen werden kann. Auffällig war, dass sich auch hier die stärkste Änderung zwischen Ernte 3 und Ernte 4 ergab. Die Reifung für weitere zwei Wochen (Ernte 5) hatte anschließend kaum Einfluss auf den Arabinananteil. Auch das Arabinan-Screening zeigte leichte Änderungen ab Ernte 4 hinsichtlich der freigesetzten Arabinooligosaccharide. So waren das Heptamer R71, das Pentamer R51 und das Tetramer R49b in den Hydrolysaten der Radieschen der Ernten 4 und 5 nur noch in Spuren nachweisbar. Zusätzlich konnte auch das Strukturelement R49a im Hydrolysat der Radieschen der letzten Ernte lediglich in Spuren identifiziert werden. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil des Heptamers R68a leicht zu. Dieses Oligomer besitzt in direkter Nachbarschaft zu einer in Position O-2 und O-3 substituierten Arabinose eine weitere in Position O-3 substituierte Arabinose. Die Struktureinheiten R71, R51 und R49b besitzen dagegen jeweils in Nachbarschaft zu einer substituierten Arabinose eine frei vorliegende Arabinose. Eine Erklärung für den leicht erhöhten Anteil an R68a könnte somit eine erschwerte Zugänglichkeit dieses Strukturelements für die am Arabinanabbau beteiligten Enzyme sein. Zusätzlich erhöhte sich ab Ernte 4 auch der Anteil des Trimers R38, das die linearen Abschnitte der Arabinane repräsentiert. Insgesamt resultiert somit für Radieschen der Ernten 4 und 5 ein erhöhter Anteil an linearen Abschnitten im Verhältnis zu den Anteilen der substituierten Strukturelemente. Da die *endo*-Arabinanase terminale Arabinofuranosen vom nicht-reduzierenden Ende der Polysaccharide abspaltet (Tateishi 2008), liegt es nahe, dass bei einem enzymatischen Abbau von Arabinanstrukturen bevorzugt zunächst Verzweigungen abgebaut werden. Die Zunahme der Verhältnisse der linearen zu verzweigten Strukturelementen spricht daher für einen tatsächlichen Abbau der Arabinane innerhalb der letzten beiden Erntezeitpunkte. Diese Vermutung konnte allerdings mit Hilfe der Ergebnisse der Methylierungsanalyse nicht bestätigt werden. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, bezogen auf die Ernten 4 und 5, könnte die Identifizierung des Oligosaccharids R38 sein. Dieses Trimer resultiert aus einem teilweise unvollständigen Abbau der Arabinane durch die eingesetzte *endo*-Arabinanase, da es durch dieses weiter

zum Dimer R28 und Arabinose hydrolysiert werden kann. Da sich der Anteil an R38 ab Ernte 4 erhöhte, könnte dies für eine nicht optimal ablaufende enzymatische Hydrolyse sprechen, wodurch die erhaltenen Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind.

Insgesamt ist es fraglich, ob ein enzymatischer Abbau der Arabinanstrukturen während der Reifung den starken Rückgang des nach H_2SO_4 -Hydrolyse bestimmten Arabinoseanteils erklärt. Ein Teil dieser Abnahme könnte zusätzlich auch damit erklärt werden, dass andere Polysaccharide im Gegensatz zu den Arabinanen neu synthetisiert bzw. in einem stärkeren Ausmaß neu synthetisiert werden als Arabinane. Dies ist auch deswegen wahrscheinlich, da zwischen den Ernten 1-3 zwar eine Abnahme des 1,5-verknüpften Arabinoseanteils beobachtet wurde, allerdings anhand der Ergebnisse der Methylierungsanalyse kein Hinweis auf einen Abbau der Arabinane zwischen diesen Erntezeitpunkten erhalten wurde, da sich der Anteil der 1,5-verknüpften Arabinofuranosen im Verhältnis zu den zusätzlich substituierten Arabinoseeinheiten kaum veränderte. Ob ab dem Erntezeitpunkt 3 ein zusätzlicher enzymatischer Abbau der Arabinane stattfindet, kann aufgrund der widersprüchlichen Daten aus der Methylierungsanalyse und des Arabinan-Screenings nicht eindeutig bewertet werden.

Zwischen den Ernten 1 und 5 war auch eine Abnahme des Anteils der mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzten Galactose von 11,3 mol% (Ernte 1) auf 3,1 mol% (Ernte 5) zusammen mit der Abnahme des Anteils an terminaler und 1,4-gebundener Galactopyranosen zu beobachten. Hier ist zu beachten, dass ab dem Erntezeitpunkt 3 im Gegensatz zu den vorherigen Erntezeitpunkten die Identifizierung 1,4-gebundener Galactopyranosen mittels Methylierungsanalyse nicht möglich war. Die Existenz von Galactanen zu diesen Erntezeitpunkten konnte jedoch mit Hilfe des Galactan-Screenings nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Galactancharakterisierung lassen keine Rückschlüsse auf einen möglichen Abbau dieser Strukturen zu. Wie erläutert ist die Abnahme der Arabinoseanteile in den UBS aus Radieschen über die Reifung vermutlich zumindest teilweise auf einen geringer vorliegenden Anteil an Pektinen im Vergleich zu anderen (stärker) neu synthetisierten Polysacchariden zurückzuführen. Da Galactane ebenfalls Pektinseitenketten darstellen, liegt es nahe, dass die Abnahme des Galactoseanteils ebenfalls darauf zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den Arabinose- und Galactoseanteilen nahmen die Galacturonsäureanteile in den UBS aus Radieschen im Verlauf der ersten drei Erntezeitpunkte von 28,6 mol% (Ernte 1) auf 35,4 mol% (Ernte 3) zu. Anschließend sank der Galacturonsäureanteil allerdings wieder sprunghaft auf 26,5 mol% (Ernte 4) ab. Die Reifung für weitere zwei Wochen (Ernte 5) führte wieder zu einem Anstieg des Galacturonsäureanteils auf 30,7 mol%. Mittels der Monosaccharidanalyse werden lediglich relative Anteile bestimmt. Daher bedingt ein Anstieg eines Anteils gleichzeitig auch immer eine entsprechende Abnahme der restlichen Anteile. Der sprunghafte Rückgang des Galacturonsäureanteils nach dem Erntezeitpunkt 3 könnte daher auf den drasti-

schen Anstieg des Xyloseanteils zurückzuführen sein. Die beschriebene Zunahme der Galacturonsäureanteile von Ernte 1 bis Ernte 3 steht im Gegensatz zu der zuvor angestellten Vermutung, dass die Abnahme der Arabinan- und Galactananteile in diesem Zeitraum nicht durch einen enzymatischen Abbau dieser Polysaccharidstrukturen resultiert, sondern durch einen geringeren Anteil an Pektinen aufgrund verstärkter Neusynthesen anderer Polysaccharide zu erklären ist. Ob die Zunahme der Galacturonsäureanteile bei gleichzeitiger Abnahme der Anteile der neutralen Pektinseitenketten auf eine verstärkte Neusynthese von Homogalacturonanen hindeuten oder die Anteile der Galacturonsäure aufgrund dem Abbau anderer Polysaccharide zunehmen, kann nicht gesagt werden.

Insgesamt betrachtet sind deutliche Änderungen in der Zusammensetzung der Zellwandpolysaccharide über die Reifung der Radieschen zu erkennen. Ob diese zumindest teilweise auch darin begründet sind, dass spezielle Polysaccharide oder Polysaccharideinheiten enzymatisch abgebaut werden oder nur darin, dass die Neusynthese der verschiedenen Zellwandpolysaccharide im Verlauf der Reifung unterschiedlich ausgeprägt verläuft, lässt sich anhand der hier durchgeführten Analysen nicht abschließend bewerten.

4.2.2.4 Bestimmung des Ligningehaltes

Der Ligningehalt der verschiedenen Radieschenproben wurde als Klason-Lignin und als ABSL bestimmt. Die Ergebnisse, die anhand der beiden Methoden ermittelt wurden, sind in Abbildung 37 für alle Erntezeitpunkte bezogen auf die UBS dargestellt. Auch hier lieferten die Methoden unterschiedliche absolute Ligningehalte, wobei die Klason-Ligningehalte zu jedem Erntezeitpunkt höher als die ABSL-Gehalte lagen.

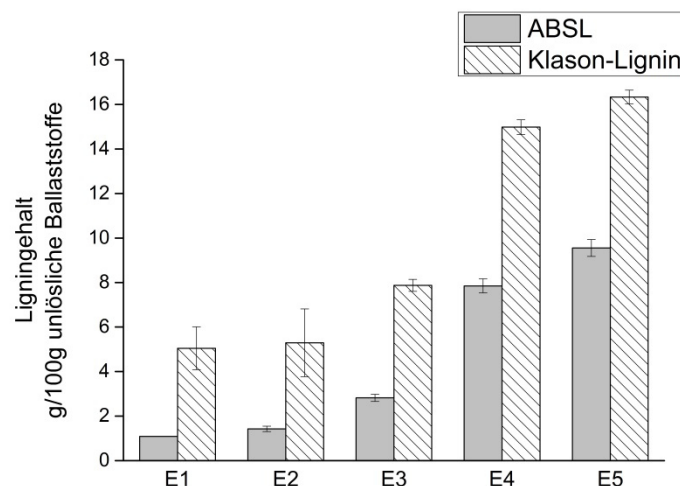


Abbildung 37: Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Radieschenproben. Die Ligninbestimmung erfolgte als Klason-Lignin und als acetylbromidlösliches Lignin (ABSL). Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung.

Der ABSL-Gehalt der UBS der Ernte 1 lag bei $1,09 \pm 0,01$ g/100 g UBS, wohingegen der Klason-Ligningehalt um das Fünffache höher bei $5,05 \pm 1,0$ g/100 g UBS lag. Im Vergleich zu Ernte 1 änderte sich der Ligningehalt innerhalb einer weiteren Reifezeit von 3 Wochen nicht (Ernte 2). Die Reifung für weitere drei Wochen (Ernte 3) führte zu einem mit beiden Methoden bestimmten geringen Anstieg des Ligningehaltes. Wie auch schon bei der Bestimmung der Ballaststoffgehalte und bei der Polysaccharidcharakterisierung beobachtet, war die Zunahme des Ligningehaltes im Zeitraum zwischen Ernte 3 und 4 am stärksten ausgeprägt. Dabei verdoppelte sich der Klason-Ligningehalt, wohingegen der ABSL-Gehalt sich verdreifachte. Während der Reifung für weitere zwei Wochen (Ernte 5) stieg der Ligningehalt dagegen nur noch geringfügig. Das unterschiedliche Ausmaß des Anstiegs des Klason-Ligningehaltes und des ABSL-Gehaltes zwischen den Ernten 3 und 4 sowie die unterschiedlichen Absolutgehalte verdeutlichen einmal mehr die unterschiedlichen Prinzipien der Methoden, die für diese Unterschiede verantwortlich sind (siehe Kapitel 3.5.1). Dennoch zeigten beide Methoden einen starken Anstieg des Ligningehaltes in den UBS während der Reifung der Radieschen an.

4.2.2.5 Charakterisierung von Ligninstrukturen

Die Charakterisierung der Monomerzusammensetzung der Ligninpolymere erfolgte mittels DFRC-Methode und 2D-NMR Analyse der isolierten und anschließend acetylierten Lignine. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse beider Methoden vergleichend dargestellt. Auffällig war, dass die Ligninpolymere, die aus den UBS der Ernte 1 isoliert wurden, einen vergleichsweise hohen Anteil an H-Einheiten von 14,0% (DFRC-Methode) bzw. 18,4% (2D-NMR) aufwiesen. Damit war *para*-Cumarylalkohol genauso häufig als Monomer vertreten wie Sinapylalkohol (S-Anteile von 17,0% (DFRC-Methode) bzw. 21,2% (2D-NMR)). Die G-Einheiten waren insgesamt am häufigsten vertreten, sodass sich ein G/S-Verhältnis von etwa 4 (DFRC-Methode) bzw. 3 (2D-NMR) ergab. Der mittels 2D-NMR bestimmte Anteil an H-Einheiten lag leicht höher als der mittels DFRC-Methode bestimmte Anteil. Bei der Bestimmung der H-Einheiten mittels 2D-NMR muss beachtet werden, dass diese häufig als Endgruppen im Polymer vorliegen und daher eine längere Relaxationszeit als der Rest des Polymers aufweisen. Somit kann es hierbei zu einer Überbestimmung dieser Einheiten kommen. Obwohl mittels 2D-NMR zwar höhere H-Anteile als mit der DFRC-Methode bestimmt wurden, weisen die Ergebnisse beider Methoden auf einen ungewöhnlich hohen H-Anteil in den Ligninen dieser Proben hin.

Während der Reifung der Radieschen kam es zu einem Rückgang des H-Anteils, was mit Hilfe beider Methoden bestätigt werden konnte. Dies spiegelt den allgemein beschriebenen Verlauf der Lignifizierung wider, da *para*-Cumarylalkohol in der Regel zu Beginn der Lignifizierung in das Polymer eingebaut wird, wohingegen dieses Monolignol beim weiteren Aufbau

des Ligninpolymers nur eine untergeordnete Rolle spielt (Donaldson 2001). Eine Identifizierung der H-Einheiten in den HSQC-Spektren der Lignine aus den UBS der Radieschen der Ernten 4 und 5 war aufgrund unbekannter, dominanter Signale nicht möglich. Des Weiteren nahm der Anteil der S-Einheiten in den Ligninen im Verlauf der Erntezeitpunkte stark zu, was für einen vermehrten Einbau an Sinapylalkohol in das Polymer spricht. Die Zunahme des S-Anteils war so stark ausgeprägt, dass Lignine aus Radieschen der Erntezeitpunkte 4 und 5 ein etwa ausgeglichenes Verhältnis an G- und S-Einheiten aufwiesen. Somit fand während der Reifung eine grundlegende Änderung der Monomierzusammensetzung der Ligninpolymere statt. Dies korreliert gut mit dem stark ansteigenden Ligningehalt. Allerdings kann bei der Änderung der Monolignolzusammensetzung der Lignine keine sprunghafte Veränderung zwischen den Erntezeitpunkten 3 und 4 erkannt werden.

Table 17: Charakterisierung der Monomierzusammensetzung der Ligninpolymere aus den unlöslichen Ballaststoffen der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Radieschenproben mittels derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode und 2D-NMR. Die Ergebnisse der DFRC-Methode sind in mol% dargestellt und resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Die mittels 2D-NMR ermittelten Ergebnisse resultieren aus einer Einfachbestimmung der isolierten Lignine. H, Hydroxyphenyl; G, Guaiacyl; S, Syringyl.

	H:G:S (DFRC) [mol%]	G/S (DFRC)	H:G:S (NMR)	G/S (NMR)
Ernte 1	14,0 : 69,0 : 17,0	4,1 ± 0,3	20,7 : 58,0 : 21,2	2,7
Ernte 2	10,6 : 76,8 : 12,6	6,1 ± 0,4	10,8 : 66,8 : 22,4	3,0
Ernte 3	4,7 : 60,5 : 34,7	1,8 ± 0,1	2,1 : 68,7 : 29,3	2,4
Ernte 4	3,0 : 52,5 : 44,5	1,2 ± 0,1	- : 62,1 : 37,9	1,6
Ernte 5	2,3 : 51,6 : 46,1	1,1 ± 0,2	- : 55,3 : 44,7	1,2

Die mittels DFRC-Methode bestimmten Monolignolanteile des Ligninpolymers der Ernte 2 wichen von dem beschriebenen Trend ab. So wurden im Vergleich zu den NMR-Ergebnissen die G-Einheiten überbestimmt bzw. die S-Einheiten unterbestimmt. Eine Unterbestimmung von Monomereinheiten mittels DFRC-Methode kann stattfinden, da, wie beschrieben, nur vollständig β -O-4-gebundene Monolignole erfasst werden. Im Gegensatz dazu bestimmt die 2D-NMR Analyse alle in den isolierten Ligninen vorliegenden Monolignole. Allerdings muss bei der Ergebnisinterpretation beachtet werden, dass die 2D-NMR Analyse der isolierten Lignine in Einfachbestimmung erfolgte. Eine Unterbestimmung der S-Einheiten durch die DFRC-Methode ist unwahrscheinlich, da die restlichen Ergebnisse, insbesondere die der Ernte 1, mit beiden Methoden gut übereinstimmen. Worauf die festgestellte Abweichung zurückzuführen ist, kann somit nicht eindeutig bewertet werden.

Um die Anteile der vorliegenden Bindungstypen zu bestimmen, wurden die HSQC-Spektren der isolierten, acetylierten Lignine herangezogen. In Abbildung 38 ist dafür beispielhaft ein

Ausschnitt des HSQC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den UBS der Radieschen der Ernte 5 isoliert wurden, gezeigt. Die Verteilung der Bindungstypen in den Ligninpolymeren der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Radieschen ist in Tabelle 18 zusammengefasst.

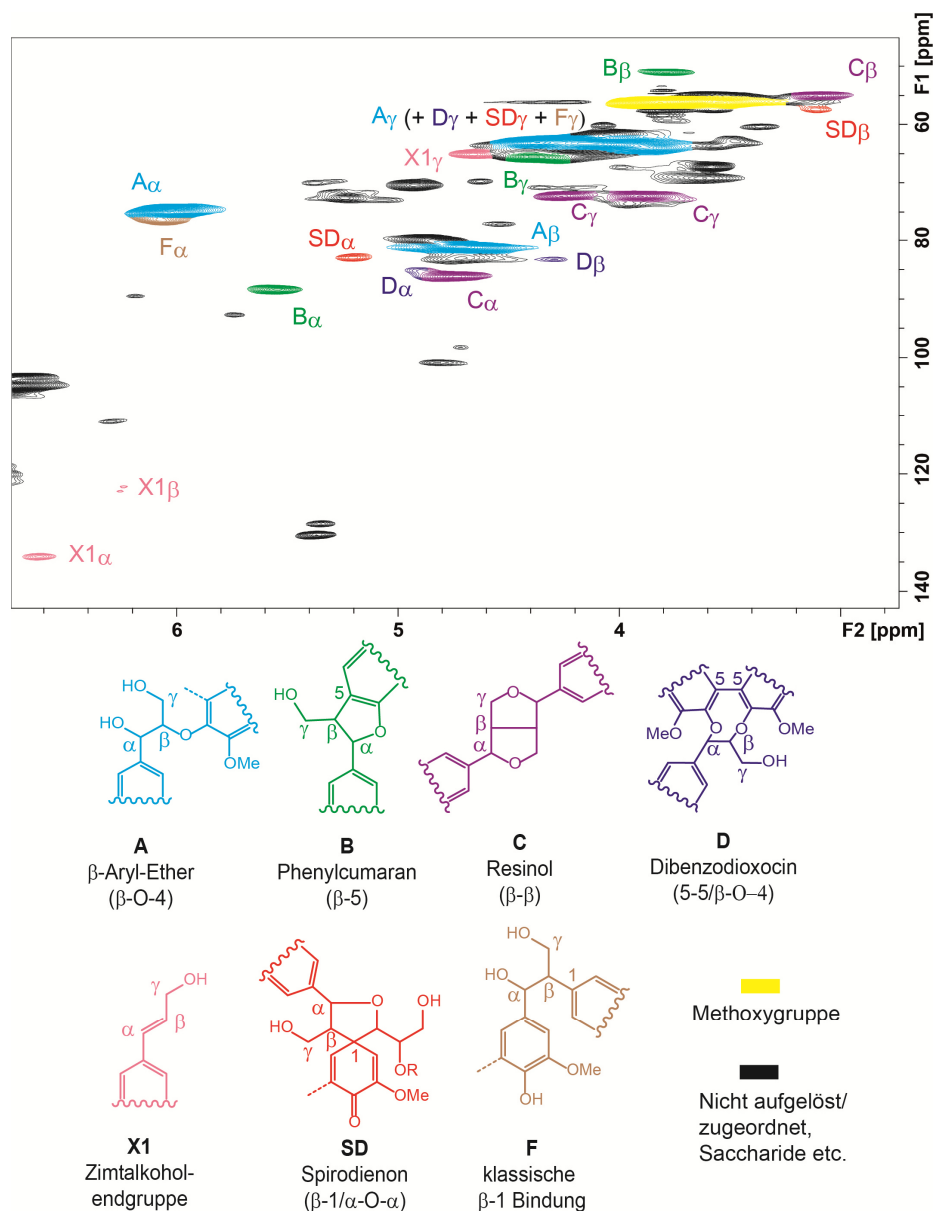


Abbildung 38: Ausschnitt des HSQC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen der Radieschenproben der Ernte 5 isoliert wurden. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . Die identifizierten Bindungstypen sind entsprechend farblich markiert. Das Signal der β -C-H-Korrelation der klassischen β -1-Bindung konnte zwar identifiziert werden, ist jedoch in der hier gewählten Ebene des Spektrums nicht zu sehen. Zudem sind die γ -C-H-Korrelationen der Dibenzodioxocin- und der Spirodienoneinheiten sowie die der klassischen β -1-Bindungen aufgrund des breiten Signals der γ -C-H-Korrelation der β -O-4-Bindung nicht ausreichend aufgelöst. Die berechneten Anteile sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

In den Ligninpolymeren aus den UBS der Ernte 1 besaßen erwartungsgemäß β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindungen) mit 62,9% den höchsten Anteil, gefolgt von Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) mit 21,1%, Phenylcumaranstrukturen (β -5-Bindungen) mit 8,8% und Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen) mit einem Anteil von 7,2%. Die Anteile dieser Bindungstypen änderten sich im Verlauf der Reifung nur wenig. So nahm der Dibenzodioxocinanteil ab, was auf den erhöhten Anteil an S-Einheiten in den Ligninen zu späteren Reifezeitpunkten zurückzuführen ist. Gleichzeitig nahm der Anteil der β -O-4-Bindungen zu. Werden Zimtalkoholendgruppen, Spirodienonstrukturen (β -1/ α -O- α -Bindungen) und die klassischen β -1-Strukturen mit in die Verteilung einbezogen, kann zusätzlich eine leichte Zunahme des Anteils der Zimtalkoholendgruppen beobachtet werden. Werden die beiden auf β -1-Kopplung beruhenden Bindungstypen zusammen betrachtet, so kann auch hier eine leichte Zunahme β -1-gekoppelter Struktureinheiten beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die fortschreitende Lignifizierung unter vermehrter Ausbildung dieser Bindungstypen verläuft. Allerdings muss beachtet werden, dass die Signale der α -C-H-Korrelationen der klassischen β -1-Bindungen teilweise mit dem dominierenden Signal der α -C-H-Korrelationen der β -O-4-Bindungen überlappte, wodurch der Anteil der klassischen β -1-Bindung überschätzt werden kann.

Tabelle 18: Bindungstypen und deren Anteile in Ligninen, die aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Radieschenproben isoliert wurden. Bei den in Klammern dargestellten Werten ist zu berücksichtigen, dass hierbei Korrekturfaktoren von 1 für Zimtalkoholendgruppen (X1), Spirodienonstrukturen (SD, β -1/ α -O- α) und klassische β -1-Strukturen (F) angenommen wurden, da keine Korrekturfaktoren in der Literatur vorhanden waren. Aus den Radieschen der Ernten 1 und 2 wurden vergleichsweise geringe Mengen an Ligninen isoliert (15 bzw. 16 mg). Dadurch waren die Identifizierung und die Integration der Signale erschwert. A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4). n=1.

	%A	%B	%C	%D	%X1	%SD	%F
Ernte 1	62,9 (56,7)	8,8 (7,9)	21,1 (19,0)	7,2 (6,5)	(1,4)	(2,6)	(6,0)
Ernte 2	69,4 (64,0)	7,8 (7,2)	15,8 (14,6)	6,9 (6,4)	(1,2)	(4,0)	(2,5)
Ernte 3	67,0 (59,6)	8,6 (7,6)	19,8 (17,6)	4,6 (4,1)	(3,1)	(2,0)	(6,0)
Ernte 4	71,4 (61,3)	7,8 (6,7)	18,5 (15,8)	2,4 (2,1)	(3,4)	(2,9)	(7,8)
Ernte 5	70,9 (58,8)	7,8 (6,5)	19,2 (15,9)	2,1 (1,7)	(3,6)	(4,4)	(9,0)

Um zu bestimmen, welche Monolignole in den verschiedenen Bindungstypen vorliegen, wurden HMBC-Spektren der isolierten und anschließend acetylierten Lignine aufgenommen. Dabei waren insbesondere die Lignine der Radieschen aus den ersten beiden Ernten interessant, da diese ungewöhnlich hohe Anteile an H-Einheiten aufwiesen. Leider konnten jedoch lediglich die Korrelationen der α -Protonen der β -O-4-Bindung und der 2/6-Kohlenstoffe der G- und S-Einheiten identifiziert werden. Dies ist vermutlich auf die geringen Mengen an Ligninen (15 bzw. 16 mg) zurückzuführen, die aus beiden Proben isoliert werden konnten. Im Allgemeinen ist noch wenig über die Art der Beteiligung von *para*-Cumarylalkohol bei der Bildung des Ligninpolymers bekannt, da dieser in den meisten dikotylen Pflanzen nur in geringen Anteilen vorhanden ist. Studien mit Alfalfa-Pflanzen, bei denen die Aktivität der Cumarat-3-Hydroxylase herunterreguliert wurde, zeigten, dass *para*-Cumarylalkohol radikalische Kopplungsreaktionen analog zu Coniferyl- und Sinapylalkohol eingehen kann (Ralph et al. 2012; Ralph et al. 2006). Unter Beteiligung der Cumarat-3-Hydroxylase erfolgt die Hydroxylierung der Position 3 am Aromaten, wodurch diesem Enzym eine wichtige Rolle bei der Synthese von Coniferyl- und Sinapylalkohol zukommt. Die Cumarat-3-Hydroxylase-defizienten Pflanzen wiesen dementsprechend einen Anteil an H-Einheiten von bis zu 65% auf (Ralph et al. 2006). Anhand von 2D-NMR Analysen konnte gezeigt werden, dass *para*-Cumarylalkohol, neben der Ausbildung von β -Aryl-Ethern, bevorzugt an der Ausbildung von Phenylcumaran-, Dibenzodioxocin- und Resinolstrukturen beteiligt war (Ralph et al. 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die gentechnisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wild-Typ keine β -1-Strukturen ausbildeten (Ralph et al. 2006). Daher ist es durchaus möglich, dass die H-Einheiten auch im Lignin von Radieschen in verschiedenen Bindungstypen vorliegen, ein Nachweis konnte allerdings nicht erbracht werden.

Im Gegensatz zu den UBS aus den Radieschen der Ernten 1 und 2 konnten aus den UBS der Radieschen der Ernten 3-5 ausreichende Ligninmengen isoliert werden, sodass aussagekräftige HMBC-Spektren erhalten wurden. In Abbildung 39 sind Ausschnitte dieser Spektren gezeigt. Die Beteiligung der Monomere an der Ausbildung eines Bindungstyps konnte anhand charakteristischer Korrelationen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps und der 2/6-Kohlenstoffe der G- und/oder S-Einheiten nachgewiesen werden. Im HMBC-Spektrum des Lignins aus Ernte 3 ist deutlich zu sehen, dass sowohl Coniferyl- als auch Sinapylalkohol über β -Aryl-Ether in das Polymer eingebunden sind. Coniferylalkohol war zudem an der Ausbildung von Phenylcumaran- und Dibenzodioxocinstrukturen beteiligt. Resinolstrukturen wurden dagegen bevorzugt durch Sinapylalkohol gebildet. Ungewöhnlich waren die Signale, die auf eine Korrelation des α -Protons der Resinolstrukturen mit dem 2-Kohlenstoff der G-Einheiten hindeuteten. Jedoch waren keine entsprechenden Korrelationen für den 6-Kohlenstoff der G-Einheiten vorhanden, wodurch die Ausbildung von Resinolstrukturen durch Coniferylalkohol als unwahrscheinlich angesehen wird. Eine Bestätigung des

Signale in den anderen HMBC-Spektren konnte zudem nicht erfolgen. Das HMBC-Spektrum der acetylierten Lignine, die aus den UBS der Radieschen der Ernte 4 isoliert wurden, zeigte zwei Unterschiede im Vergleich zu dem der Ernte 3. So war zum einen deutlich zu erkennen, dass hierbei auch Sinapylalkohol Phenylcumaranstrukturen ausbildet. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass Spirodienonstrukturen durch Sinapylalkohol entstehen. Das vorherige Fehlen dieser Signale lässt vermuten, dass der während der Reifung neu integrierte Sinapylalkohol u.a. bevorzugt über diese Bindungen eingebaut wird. Der vermehrte Einbau von Sinapylalkohol in Spirodienonstrukturen geht einher mit einem höheren Anteil an Spirodienonstrukturen im Vergleich zu den vorherigen Ernten. Eine vermehrte Bildung dieser Struktureinheiten in späteren Stadien der Lignifizierung ist wahrscheinlich, da diese durch die Kopplung eines Monomers an ein bereits bestehendes Polymer entstehen (Ralph et al. 2004b). Das HMBC-Spektrum der acetylierten Lignine, die aus den UBS der Radieschen der Ernte 5 isoliert wurden, war mit dem der Ernte 4 vergleichbar. Eine Ausnahme stellte das Fehlen der Signale dar, die Hinweise auf die in Dibenzodioxocinstrukturen involvierten Monolignole geben. Dies war verwunderlich, da diese zuvor detektiert wurden und ein Abbau dieser Struktureinheiten sehr unwahrscheinlich ist. Allerdings waren die entsprechenden Signale auch in den Spektren der Lignine aus den Ernten 3 und 4 lediglich schwach vorhanden. Demnach kann vermutet werden, dass die Ausbildung von Dibenzodioxocinstrukturen keine große Rolle im Verlauf der Lignifizierung von Radieschenzellwänden spielt, was bereits aufgrund dessen abnehmenden Anteils in der Bindungstypenverteilung angenommen wurde.

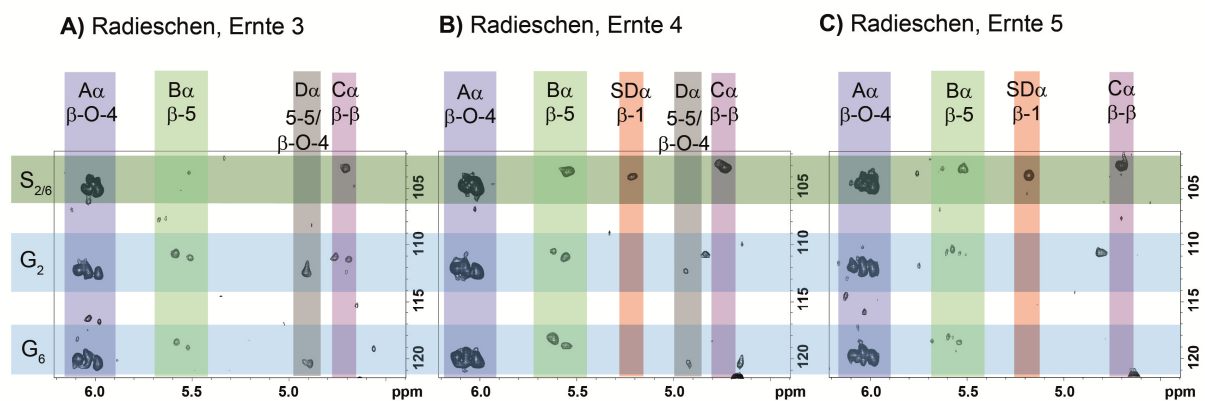


Abbildung 39: Ausschnitte aus HMBC-Spektren von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen der Radieschen der Ernten 3 (A), 4 (B) und 5 (C) isoliert wurden. Die farblich hinterlegten Banden zeigen die Korrelationen über drei Bindungen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps und den 2/6-Kohlenstoffen der Guaiacyl (G)- bzw. der Syringyleinheiten (S). Nicht gezeigt sind die ebenfalls vorhandenen Korrelationen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps mit den β - und γ -Kohlenstoffen, die zur Bestätigung des Bindungstyps herangezogen wurden. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4); SD, Spirodienon (β -1).

4.2.3 Zellwandcharakterisierung von Karotten

4.2.3.1 Sensorische Beurteilung des Probenmaterials

Die Verkostung der Karotten erfolgte ungeschält und im rohen Zustand. Dabei wurden verschiedene Geschmacks- (frisch-karottig, süß, bitter, erdig, fremd) und Konsistenzattribute (knackig, holzig, fest, zäh) von insgesamt sieben bis acht Prüfern bewertet. Die Ergebnisse der sensorischen Bewertung sind in Abbildung 40 dargestellt.

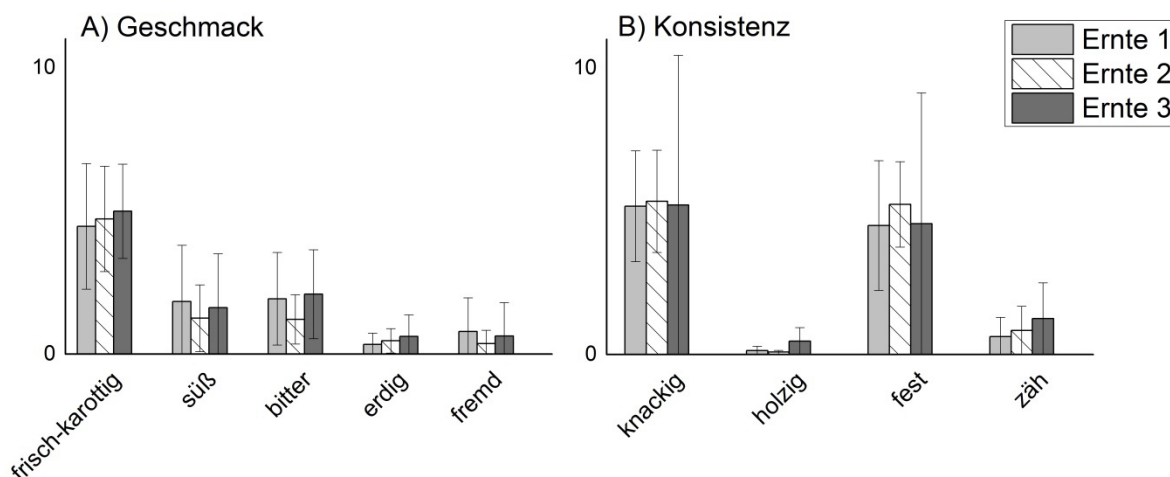


Abbildung 40: Ergebnisse der sensorischen Beurteilung der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Karotten hinsichtlich Geschmack (A) und Konsistenz (B). Die Ergebnisse sind für alle Ernten (1-3) gezeigt. Die Verkostung erfolgte je nach Zeitpunkt von sieben bis acht Prüfern.

Die Proben der Ernte 1 wurden als frisch-karottig und leicht süß und bitter beschrieben. Die Textur war knackig und fest. Zudem waren die Karotten kaum holzig und zäh. Beim Vergleich der Ernten fällt auf, dass sich die Proben im Verlauf der Reifung sowohl hinsichtlich des Geschmacks als auch hinsichtlich der Konsistenz nicht veränderten.

4.2.3.2 Bestimmung des Ballaststoffgehaltes

Die Bestimmung der Ballaststoffgehalte erfolgte getrennt nach UBS und LBS, jeweils in einer Dreifachbestimmung. Die auf getrocknetes Karottenmehl bezogenen Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

Die Gehalte der UBS überwogen die Gehalte der LBS deutlich. So wies die Ernte 1 einen UBS-Gehalt von $33,0 \pm 0,7$ g/100 g Karottenmehl auf. Der Gehalt der LBS lag dagegen mit $5,4 \pm 0,3$ g/100 g Karottenmehl um etwa das Sechsfache niedriger. Der Vergleich der Ernten ergab keine bedeutsamen Veränderungen der Ballaststoffgehalte während der Reifung. Daher ist anzunehmen, dass nur geringfügige Veränderungen der Ballaststoffzusammensetzung während des gewählten Reifezeitraums stattfinden.

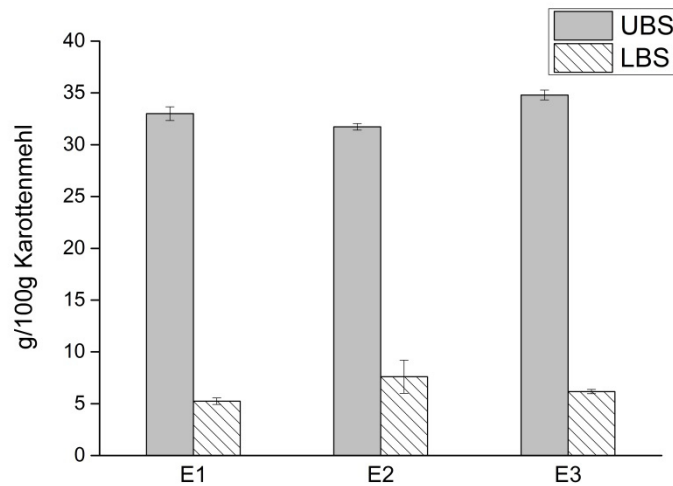


Abbildung 41: Unlösliche (UBS) und lösliche (LBS) Ballaststoffgehalte des getrockneten Karottenmehls. Dargestellt sind die Ergebnisse der Ernten 1-3. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung.

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich änderte sich auch der Wassergehalt der Karotten zu den verschiedenen Erntezeitpunkten nicht. Unter Berücksichtigung des Wassergehaltes ergab sich ein Gesamtballaststoffgehalt zwischen 2,5 und 3,0 g/100 g Frischgewicht. In der Literatur sind Gesamtballaststoffgehalte von Karotten mit 2,6 g/100 g Frischgewicht oder auch 5,7 g/100 g Frischgewicht angegeben (Khanum et al. 2000; Theander et al. 1995). Unter Berücksichtigung der Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Ballaststoffanalyse und der Varianzen aufgrund unterschiedlicher Probenmaterialien, ist der hier ermittelte Ballaststoffgehalt der Karotten gut mit den Literaturwerten vergleichbar.

Tabelle 19: Gesamtballaststoffgehalte (BS) der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Karotten bezogen auf das Frischgewicht ($n=3$). Der dafür notwendige Wassergehalt resultiert aus dem Gewichtsverlust während der Gefriertrocknung der Proben ($n=1$ für Ernte 1, $n=2$ für die Ernten 2 und 3).

	Wassergehalt [%]	BS [g/100 g Frischgewicht]
Ernte 1	92,8	2,8 ± 0,03
Ernte 2	92,3 ± 0,3	3,0 ± 0,1
Ernte 3	93,8 ± 1,1	2,5 ± 0,04

4.2.3.3 Charakterisierung von Polysaccharidstrukturen der unlöslichen Ballaststoffe

Die Charakterisierung der Polysaccharide der UBS aus Karotten erfolgte durch die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung nach H_2SO_4 -Hydrolyse und nach Methanolyse. Die Ergebnisse beider Methoden sind in Abbildung 42 dargestellt. Auf die chemikalienintensive Methylierungsanalyse wurde verzichtet, da Polysaccharidstrukturen der Karotte aus der Literatur bekannt sind (Houben et al. 2011; Kang et al. 2008; Massiot et al. 1988a; Massiot et al. 1988b; Ng et al. 1998; Stevens und Selvendran 1984). Zudem waren kaum

Änderungen der Monosaccharidzusammensetzung zwischen den Erntezeiträumen festzustellen. Im Allgemeinen ist die hier ermittelte Monosaccharidzusammensetzung mit der aus der Literatur vergleichbar. Nach H_2SO_4 -Hydrolyse konnte erwartungsgemäß ein hoher Anteil an Glucose bestimmt werden, der hauptsächlich aus der Cellulose stammt. Der mittels Methanolyse bestimmte Anteil von 6,7 mol% Glucose (Ernte 1) zeigte, dass ein geringer Teil der mittels H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzten Glucose den Xyloglucanen zuzuordnen ist. Massiot et al. (1988a) zeigten mittels Methylierungsanalyse das Vorhandensein von 1,4,6-verknüpfter Glucopyranose, wodurch die Existenz von Xyloglucanen in Karottenzellwänden bestätigt werden konnte. Sowohl die H_2SO_4 -Hydrolyse als auch die Methanolyse führten zur Freisetzung von Mannose und Xylose in etwa gleichen Anteilen. Mannose resultiert dabei vermutlich aus Mannanen bzw. Galacto- (Gluco-) Mannanen. Das Vorkommen von substituierten Mannanen in Karotten konnte von Massiot et al. (1988a) gezeigt werden, da sie neben 1,4-verknüpfter Mannopyranose auch geringere Anteile an 1,4,6-verknüpfter Mannopyranose identifizierten. Ein Teil des hier bestimmten Xyloseanteils stammt vermutlich zusätzlich aus Xylanen, da diese ebenfalls in Karotten nachgewiesen wurden (Massiot et al. 1988a). Zusätzlich konnte in den Arbeiten von Massiot et al. (1988a) gezeigt werden, dass das Xylanrückgrat gering an Position *O*-3 oder *O*-2 substituiert vorliegt (Massiot et al. 1988a). Die Art der Substituenten ist jedoch nicht bekannt.

Die stark vertretene Pektinfraktion in den UBS der hier analysierten Karotten besteht zu etwa ähnlichen Anteilen (bezogen auf die Hauptketten) aus Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen, was aus dem Verhältnis von Galacturonsäure zu Rhamnose von etwa 3:1 hervorgeht (Methanolyse). Arabinose und Galactose, die zu gleichen Anteilen vorlagen, stammen daher vermutlich aus den neutralen Pektinseitenketten Arabinan und (Arabino-) Galactan. Mithilfe der hier durchgeführten Monosaccharidanalyse sind keine Aussagen über die genauen Strukturen der Pektinseitenketten zu treffen. Es ist jedoch bekannt, dass die Arabinane in Karottenzellwänden stark verzweigt in Position *O*-2 und/oder *O*-3 vorliegen (Massiot et al. 1988a; Stevens und Selvendran 1984). Im Hinblick auf die vorliegenden Galactane konnten in der Literatur Typ I und II Arabinogalactane nachgewiesen werden (Massiot et al. 1988a; Stevens und Selvendran 1984). Houben et al. (2011) zeigten zudem, dass die Uronsäuren der UBS einen hohen Methylierungsgrad von 67,2% aufweisen.

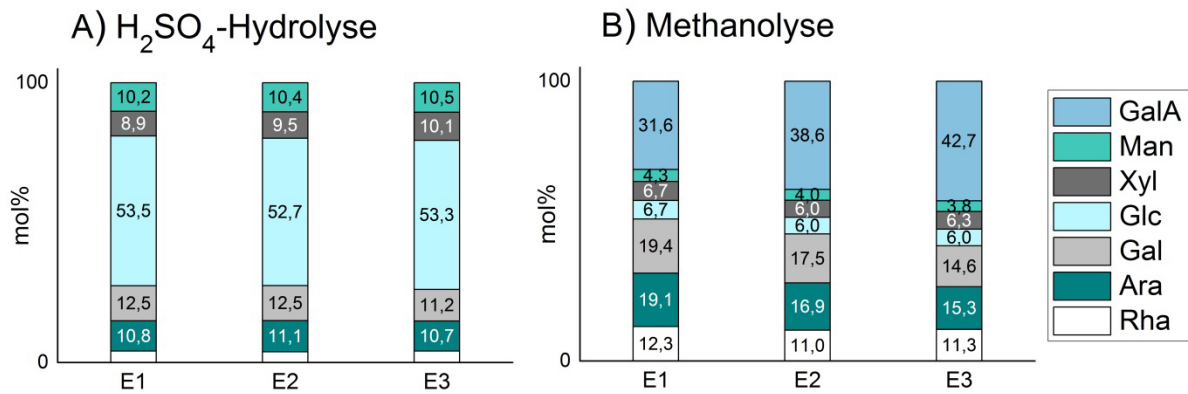


Abbildung 42: Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide der unlöslichen Ballaststoffe aus Karotten der Ernten 1-3 nach H₂SO₄-Hydrolyse (A) und Methanolyse (B). Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Da Uronsäuren nach H₂SO₄-Hydrolyse unterbestimmt werden, sind diese hierbei nicht mit einberechnet. Nach der Methanolyse waren zusätzlich Fucose und Glucuronsäure in Spuren (≤ 1 mol%) detektierbar, die ebenfalls nicht dargestellt sind. GalA, Galacturonsäure; Man, Mannose; Xyl, Xylose; Glc, Glucose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; E, Ernte.

Das mittels H₂SO₄-Hydrolyse ermittelte Profil der neutralen Monosaccharide der vorliegenden Polysaccharide veränderte sich während der Reifung innerhalb des hier gewählten Zeitraums von 9 Wochen nicht. Auch dies war aufgrund von Literaturdaten zu erwarten, da Ng et al. (1998) keine Änderung der Monosaccharidzusammensetzung der Zellwandpolysaccharide von Karotten innerhalb von 18 Wochen Reifung feststellten. Dies war, wie bereits erwähnt, ein weiterer Grund dafür, warum hier auf die Durchführung der chemikalienintensiven Methylierungsanalyse verzichtet wurde. Ng et al. (1998) stellten erst nach einer Reifezeit von 22 Wochen eine leichte Zunahme des Galacturonsäureanteils und eine Abnahme der Arabinose-, Galactose- und Glucoseanteile fest. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass Ng et al. (1998) Karotten im unreifen Zustand bis hin zur vollständigen Reife beobachteten, während im Rahmen dieser Arbeit die erste Ernte in etwa zum optimalen Erntezeitpunkt erfolgte. Zudem war der im Rahmen dieser Arbeit gewählte Zeitraum lediglich 9 Wochen lang. Obwohl nach H₂SO₄-Hydrolyse keine Änderungen in der Monosaccharidzusammensetzung festgestellt wurden, wurde nach Methanolyse eine leichte Abnahme der Arabinose- und Galactoseanteile bei gleichzeitiger Zunahme des Galacturonsäureanteils über die Reifung beobachtet. Die Ursache (Abbau bzw. Neusynthese verschiedener Polysaccharide) dieser Veränderungen kann anhand der durchgeführten Analysen nicht festgestellt werden.

4.2.3.4 Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Monomere

In der Literatur ist das Vorkommen einiger zellwandgebundener phenolischer Monomere in Karottenzellwänden bereits beschrieben (Kang et al. 2008; Massiot et al. 1988a; Ng et al. 1998; Parr et al. 1997). Das dominierende Monomer stellte dabei jeweils die 4-Hydroxybenzoesäure dar. Daneben wurden *trans*- und *cis*-Ferulasäure, Vanillinsäure, Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd und *trans-para*-Cumarsäure identifiziert. Die Verteilung und Gehalte variieren je nach Literaturstelle, was vermutlich auf verschiedene Ausgangsmaterialien, aber auch auf methodische Unterschiede zurückzuführen ist. Die Analyse der phenolischen Monomere nach alkalischer Verseifung der UBS der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Karotten konnte die vorhandenen Literaturdaten bestätigen. Die lediglich von Massiot et al. (1988a) identifizierte 4-Hydroxyphenylessigsäure konnte nicht identifiziert werden. Die Gehalte der einzelnen Monomere sind in Tabelle 20 für alle drei Ernten zusammengefasst. Den Hauptanteil der phenolischen Monomere in den UBS der Karotten der Ernte 1 stellte die 4-Hydroxybenzoesäure mit etwa 56% dar. *trans*-Ferulasäure und Vanillinsäure waren jeweils mit etwa 12-13% vertreten. Vanillin, *trans-para*-Cumarsäure, 4-Hydroxybenzaldehyd und *cis*-Ferulasäure waren in Anteilen von $\leq 3\%$ zu finden. Während der Reifung kam es zwischen Ernte 2 (3 Wochen Reifung) und Ernte 3 (9 Wochen Reifung) zu einem Anstieg der Gesamtgehalte an phenolischen Monomeren. Dies ist insbesondere auf den Anstieg des Gehaltes der 4-Hydroxybenzoesäure zurückzuführen. Die Gehalte der anderen phenolischen Monomere änderten sich dagegen nicht oder nur geringfügig. Ng et al. (1998) zeigten ebenfalls durch sequentielle alkalische Hydrolyse, dass während der Reifung von Karotten der Gehalt an 4-Hydroxybenzoesäure ansteigt. Allerdings stellten sie zudem eine leichte Abnahme der Gehalte an 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin sowie eine starke Abnahme an Ferulasäure fest. Letzteres konnte bei den hier gewählten Erntezeitpunkten nicht beobachtet werden. Eine Erklärung dafür könnten die unterschiedlich gewählten Ausgangszeitpunkte sein. Die erste Ernte der hier verwendeten Karotten erfolgte etwa zum optimalen Erntezeitpunkt für Karotten, wohingegen Ng et al. (1998) unreife Karotten bis zu deren Reife beobachteten.

Neben phenolischen Monomeren konnte die 8-O-4-DFS identifiziert und quantifiziert werden. Auch das Vorkommen dieser DFS wurde bereits in der Literatur beschrieben (Ng et al. 1998; Parr et al. 1997). Ng et al. (1998) identifizierten daneben zusätzlich 8-8-c-DFS, 8-5-nc-DFS und 8-5-c-DFS. Auch Parr et al. (1997) detektierten weitere Peaks, die sie aufgrund der UV-Spektren und des Retentionsverhaltens vorläufig als weitere DFS identifizierten. Deswegen wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben weiter qualitativ mittels LC-MS/MS auf eventuell vorhandene DFS und TriFS untersucht. Mit Hilfe spezifischer Massenübergänge wurden so 8-8-c/-nc/-THF-DFS, 8-5-c/-nc/-dc-DFS, 5-5-DFS und 4-O-5-DFS nachgewiesen. Außerdem konnte die bereits über HPLC-DAD identifizierte 8-O-4-DFS be-

stätigt werden. Des Weiteren wurden zusätzlich die zwei Trimere 8-O-4/8-O-4-TriFS und 5-5/8-O-4-TriFS nachgewiesen.

Table 20: Gehalte der phenolischen Monomere sowie der 8-O-4-Diferulasäure (8-O-4-DFS) bezogen auf unlösliche Ballaststoffe (UBS) der Karottenproben (Ernte 1-3). Die Bestimmung erfolgte nach alkalischer Verseifung der UBS und anschließender Analyse mittels HPLC-DAD in Dreifachbestimmung.

	Ernte 1	Ernte 2	Ernte 3
Monomer [mg/100 g UBS]			
4-Hydroxybenzoesäure	49,61 ± 2,85	49,44 ± 4,87	70,64 ± 0,63
trans-Ferulasäure	11,67 ± 0,44	11,26 ± 1,12	13,37 ± 0,42
Vanillinsäure	10,86 ± 0,67	11,69 ± 1,14	12,27 ± 0,27
Vanillin	2,89 ± 1,42	3,14 ± 1,71	4,00 ± 2,65
trans-para-Cumarsäure	0,77 ± 0,08	0,81 ± 0,09	1,04 ± 0,04
4-Hydroxybenzaldehyd	0,46 ± 0,13	0,49 ± 0,19	0,58 ± 0,28
cis-Ferulasäure	0,48 ± 0,05	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,07
ΣMonomere [mg/100 g UBS]	87,78 ± 2,57	88,63 ± 8,30	113,20 ± 3,00
DFS [mg/100 g UBS]			
8-O-4-DFS	2,12 ± 0,26	2,25 ± 0,22	2,49 ± 0,24

Die Ausbildung von DFS und TriFS kann zur intra- und/oder intermolekularen Vernetzung von Polysacchariden führen (Bunzel 2010). Ob bzw. an welche Polysaccharide die Ferulasäure in Karotten gebunden ist, ist bislang jedoch nicht bekannt. Obwohl DFS und TriFS nur in vergleichsweise geringen Mengen in den UBS der Karotten vorliegen, können sie dennoch Einfluss auf die Textur von Karotten haben. Die Bedeutung der phenolischen Monomere in Karottenzellwänden, insbesondere der 4-Hydroxybenzoesäure, wird unterschiedlich diskutiert. So können sie u.a. eine Rolle bei der Abwehr von Pflanzenpathogenen spielen. In Karotten-Zellkulturen konnte ein erhöhter Gehalt an zellwandgebundener 4-Hydroxybenzoesäure nach Behandlung mit einem Auslöser von Pilzinfektionen festgestellt werden (Schnitzler und Seitz 1989). Des Weiteren kann 4-Hydroxybenzoesäure am Aufbau des Ligninpolymers beteiligt sein, da *para*-Hydroxybenzoate als Ligninmonomere fungieren können (Ralph et al. 2004b).

4.2.3.5 Bestimmung des Ligningehaltes

Die Ligningehalte der UBS aus Karotten wurden sowohl als Klason-Lignin als auch als ABSL bestimmt. In Abbildung 43 ist zu sehen, dass der ABSL-Gehalt bei jeder Ernte etwa um das Zwei- bis Dreifache geringer als der Klason-Ligningehalt lag. Der ABSL-Gehalt der UBS aus Ernte 1 betrug $2,5 \pm 0,1$ g/100 g UBS, der Klason-Ligningehalt $5,8 \pm 0,1$ g/100 g UBS. In der

Literatur ist ein Klason-Ligningehalt von etwa 6% zu finden (Massiot et al. 1988a). Wie zuvor beschrieben enthalten die UBS der Karotten einen geringen Anteil an phenolischen Monomeren. Da diese bei der zur Ligninquantifizierung verwendeten Wellenlänge von 280 nm ebenfalls absorbieren, können sie die ABSL-Bestimmung beeinflussen. Durch den Einsatz eines polysaccharidabbauenden Enzymgemisches kann allerdings eine Überbestimmung des ABSL durch polysaccharidgebundene phenolische Monomere ausgeschlossen oder zumindest stark reduziert werden. Das Hauptmonomer 4-Hydroxybenzoesäure ist allerdings auch als Ligninbestandteil bekannt, da es u.a. bei Pappeln oder Palmen Monolignole vor dem Einbau in das Ligninpolymer verestert (Lu et al. 2015; Ralph et al. 2004b). Liegt 4-Hydroxybenzoesäure ligningebunden vor, kann sie das Ergebnis der photometrischen ABSL-Bestimmung beeinflussen. Der beobachtete Anstieg des Gehaltes an zellwandgebundener 4-Hydroxybenzoesäure führte allerdings nicht zu einem Anstieg des ABSL-Gehaltes, da dieser im Verlauf der Reifung konstant blieb. Auch der Klason-Ligningehalt veränderte sich über die Reifung der Karotten nicht. Trotz der Lösungsmittelextraktion der UBS zur Entfernung von Fetten und teilweise von Wachsen sowie der Protein- und Aschekorrektur des Klason-Lignins, könnte dennoch der Klason-Ligningehalt überbestimmt worden sein. So kann z.B. Suberin als ebenfalls zumindest teilweise säureunlöslicher Rückstand verbleiben und gravimetrisch mitbestimmt werden (Bunzel et al. 2011). Suberin ist vor allem im Periderm oder in der Wurzelendodermis zu finden und ist daher in Karottenzellwänden zu erwarten (Andersen et al. 2015; Kolattukudy et al. 1975).

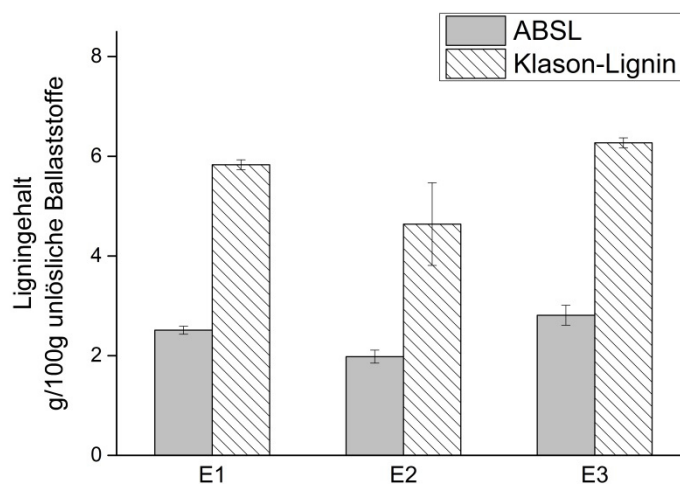


Abbildung 43: Ligningehalte der unlöslichen Ballaststoffe aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Karotten. Die Bestimmung erfolgte als Klason-Lignin und als acetyl-bromidlösliches Lignin (ABSL). Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung.

Da die Gehalte aufgrund der beschriebenen Nachteile der zwei Methoden unterschiedlich sind, kann keine Aussage über den tatsächlich vorliegenden Ligningehalt getroffen werden. Mit keiner der beiden Methoden war eine Veränderung der Ligningehalte während der Reifung zu beobachten, wodurch auf eine kaum stattfindende Lignifizierung während des Erntes

zeitraumes geschlossen werden kann. Dies war zu erwarten, da auch die Ballaststoffgehalte der zu den unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Karotten keine gravierenden Veränderungen aufwiesen.

4.2.3.6 Charakterisierung von Ligninstrukturen

Die Monomerzusammensetzungen der Lignine aus den UBS der Karotten der Ernten 1-3 wurden mittels DFRC-Methode und 2D-NMR ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 vergleichend dargestellt. Beide Methoden zeigten, dass Lignine aus Karotten sehr G-dominant sind, da die G-Einheiten mit über 95% nachgewiesen wurden. Dies konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Bunzel et al. 2005b; Schäfer et al. 2015). Die Bestimmung der geringen Anteile an H- und S-Einheiten war dagegen nicht mit beiden Methoden möglich. So konnten mittels DFRC-Methode die Anteile der H-Einheiten gut zu ca. 4% bestimmt werden. Die Identifizierung der H-Einheiten im HSQC-Spektrum war hingegen nicht möglich, da ähnliche wie in den zuvor besprochenen pflanzlichen Materialien dominante Signale mit ähnlicher chemischer Verschiebung vorhanden waren. Davon abweichend konnten die S-Einheiten im HSQC-Spektrum eindeutig identifiziert und durch Volumenintegration des entsprechenden Signals semiquantitativ bestimmt werden, wodurch ein Anteil von etwa 1,4% ermittelt wurde. Mittels DFRC-Methode und anschließender GC-SIM-MS Analyse konnten die S-Einheiten zwar nachgewiesen werden, allerdings lagen die Gehalte unterhalb des durch die Kalibrierung abgedeckten Konzentrationsbereichs, sodass keine Quantifizierung möglich war. Die Monomerzusammensetzung der Lignine änderte sich zwischen den drei Erntezeitpunkten nicht. Dies war zu erwarten, da kein Anstieg des Ligningehaltes beobachtet wurde.

Tabelle 21: Charakterisierung der Monomerzusammensetzung der Ligninpolymere aus den unlöslichen Ballaststoffen der zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Karotten mittels derivatization followed by reductive cleavage (DFRC)-Methode und 2D-NMR. Die Ergebnisse der DFRC-Methode sind in mol% dargestellt und resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Die mittels 2D-NMR ermittelten Ergebnisse resultieren aus einer Einfachbestimmung der isolierten Lignine. H, Hydroxyphenyl; G, Guaiacyl; S, Syringyl; ng, nachgewiesen.

	H:G:S (DFRC) [mol%]	G:S (NMR)
Ernte 1	4,1 : 95,9 : ng	98,6 : 1,4
Ernte 2	4,2 : 95,8 : ng	98,7 : 1,3
Ernte 3	4,3 : 95,7 : ng	98,6 : 1,4

Mittels 2D-NMR (HSQC-Experimente) konnten die vorhandenen Bindungstypen und deren Anteile in den Ligninen semiquantitativ bestimmt werden (Abbildung 44). Die dadurch erhaltenen Bindungstypenprofile sind in Tabelle 22 dargestellt.

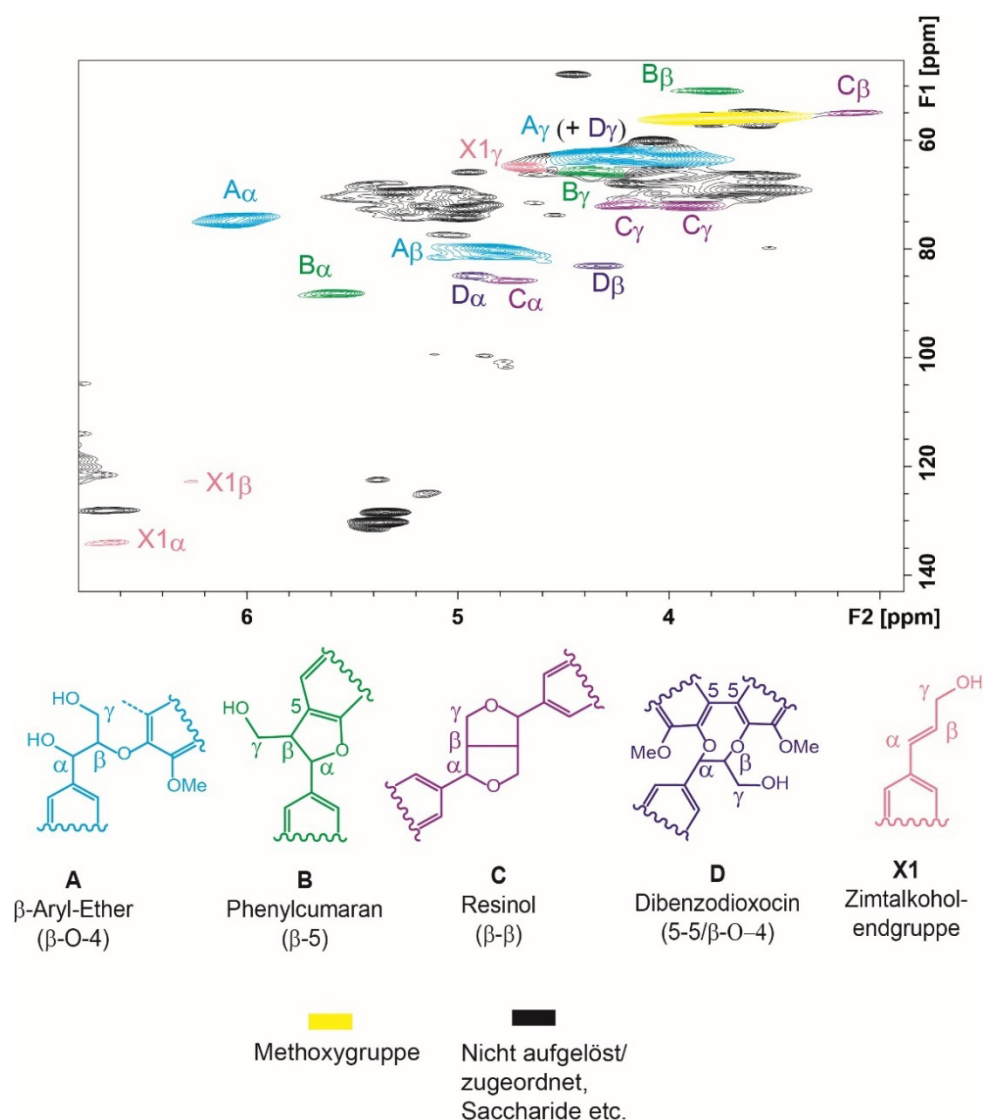


Abbildung 44: Ausschnitt des HSQC-Spektrums der acetylierten Lignine, die aus den unlöslichen Ballaststoffen der Karotten der Ernte 3 isoliert wurden. Die γ -C-H-Korrelation der Dibenzodioxocinstruktur ist aufgrund des breiten Signals der γ -C-H-Korrelation der β -O-4-Bindung nicht ausreichend aufgelöst. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . Die identifizierten Bindungstypen sind entsprechend farblich markiert. Die berechneten Anteile sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Die Ligninpolymere, die aus den UBS der Ernte 1 isoliert wurden, enthielten erwartungsgemäß mit 69,9% β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindungen) als Hauptbindungstyp. Daneben waren Phenylcumaranstrukturen (β -5-Bindungen) mit 13,1% zu finden, gefolgt von Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) mit 9,4% und Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen) mit 7,6%. Außerdem konnten Zimtalkoholendgruppen identifiziert werden. Unter Annahme eines Korrekturfaktors von 1 wurden deren Anteile auf etwa 4% abgeschätzt. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass sich das Bindungstypenprofil der Lignine aus den UBS der Karotten der Ernten 1-3 nicht unterscheidet. Dies war zu erwarten, da weder ein Anstieg der Ligningehalte noch Änderungen der Monolignolzusammensetzung während des gewählten Erntezeitraums zu beobachten waren.

Tabelle 22: Bindungstypen und deren Anteile in Ligninen, die aus den zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Karottenproben isoliert wurden. Bei den in Klammern dargestellten Werten ist zu berücksichtigen, dass hierbei ein Korrekturfaktor von 1 für die Zimtalkoholendgruppen (X1) angenommen wurde, da hierfür kein Korrekturfaktor in der Literatur vorhanden ist. A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4). n=1.

	%A	%B	%C	%D	%X1
Ernte 1	69,9	13,1	9,4	7,6	
	(67,1)	(12,6)	(9,0)	(7,3)	(4,0)
Ernte 2	72,3	13,5	7,7	6,5	
	(70,0)	(13,0)	(7,5)	(6,3)	(3,1)
Ernte 3	69,9	13,2	9,4	7,5	
	(66,4)	(12,5)	(9,0)	(7,1)	(4,9)

Anhand der HMBC-Experimente können lediglich Aussagen darüber getroffen werden, in welchen Bindungen die G-Einheiten involviert sind. Aufgrund der sehr niedrigen S-Anteile konnten in den HMBC-Spektren keine Signale identifiziert werden, die eine Zuordnung der S-Einheiten zu bestimmten Bindungstypen ermöglichen. In Abbildung 45 ist beispielhaft ein Ausschnitt eines HMBC-Spektrums der Lignine gezeigt, die aus den UBS der Karotten des dritten Erntezeitpunktes isoliert wurden. Dabei ist ersichtlich, dass die G-Einheiten sowohl β -Aryl-Ether, als auch Phenylcumaran- und Dibenzodioxocinstrukturen ausbilden. Eine Korrelation der G-Einheiten zu Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) war dagegen nicht ersichtlich, obwohl diese mit einem Anteil von ca. 9,4% vertreten sind. In der Literatur wird beschrieben, dass Resinolstrukturen bevorzugt durch Sinapylalkohol gebildet werden (Ralph et al. 2004b). Ob dies für Karottenlignine zutrifft ist aufgrund der vergleichsweise geringen Anteile an S-Einheiten von ca. 1,4% fraglich, kann jedoch anhand der durchgeführten 2D-NMR Analysen nicht abschließend geklärt werden.

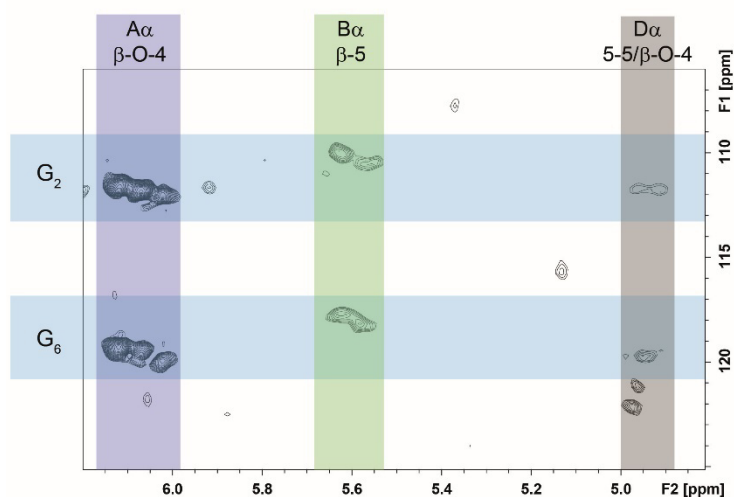


Abbildung 45: Ausschnitt des HMBC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen von Karotten der Ernte 3 isoliert wurden. Die farblich hinterlegten Banden zeigen die Korrelationen über drei Bindungen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps und den 2/6-Kohlenstoffen der Guaiacyleinheiten (G). Nicht gezeigt sind die ebenfalls vorhandenen Korrelationen zwischen den α -Protonen des jeweiligen Bindungstyps mit den β - und γ -Kohlenstoffen. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 . A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumaran (β -5); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4).

Neben den Signalen der klassischen Monolignoleinheiten H, G und S konnten im aromatischen Bereich der HSQC-Spektren der isolierten Lignine auch Signale der 4-Hydroxybenzoesäure identifiziert werden. Diese Signale wurden ebenfalls zur semiquantitativen Bestimmung der 4-Hydroxybenzoesäure verwendet. Die Identifizierung erfolgte, wie in Abbildung 46 dargestellt, über die aromatischen C2/6-H2/6- und C3/5-H3/5-Korrelationen. Zur Bestimmung der chemischen Verschiebungen der diesen Korrelationen entsprechenden Signale wurde der acetylierte 4-Hydroxybenzoesäureethylester als Standardsubstanz verwendet. In Abbildung 46 sind ebenfalls die durch Volumenintegration berechneten Anteile der G-, S- und 4-Hydroxybenzoesäureanteile für alle Ernten gezeigt. Hierbei sollte beachtet werden, dass 4-Hydroxybenzoesäure überbestimmt sein kann, da sie als Endgruppe langsamer relaxiert als das restliche Polymer (Mansfield et al. 2012). Innerhalb des Erntezeitraums war ein Anstieg des Anteils der 4-Hydroxybenzoesäure zu beobachten. Dies korreliert mit dem ansteigenden Gehalt der 4-Hydroxybenzoesäure, der nach alkalischer Verseifung der unlöslichen Ballaststoffe bestimmt wurde. Aufgrund der Ergebnisse der 2D-NMR Analysen (HSQC-Experimente) der isolierten Lignine und deren Korrelation mit den Gehalten an alkalisch freisetzbarer 4-Hydroxybenzoesäure kann vermutet werden, dass 4-Hydroxybenzoesäure über eine Esterbindung an Lignin gebunden vorliegt.

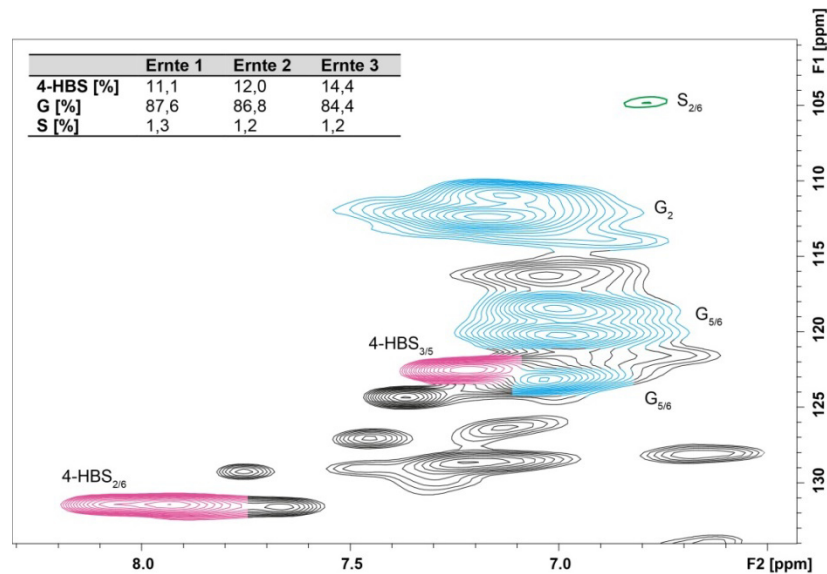


Abbildung 46: Ausschnitt des HSQC-Spektrums (aromatischer Bereich) von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen von Karotten der Ernte 3 isoliert wurden. Die Signale zur Identifizierung der Monomereinheiten Guaiacyl (G), Syringyl (S) und 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBS) sind entsprechend farblich markiert. Zusätzlich sind deren Anteile [%] tabellarisch für alle Ernten angegeben. Diese wurden durch Volumenintegration der C2-H2-Korrelationen (G) bzw. der C2/6-H2/6-Korrelationen (S und 4-HBS) erhalten. Die Messung erfolgte in Aceton- d_6 .

Das Vorkommen von 4-Hydroxybenzoesäure in Ligninen ist bereits bekannt (Kim und Ralph 2010; Lu et al. 2015; Ralph und Landucci 2010; Rencoret et al. 2013). Es wird davon ausgegangen, dass sie, ähnlich wie die *para*-Cumarsäure in Gräsern (Grabber et al. 1996; Ralph et al. 1994) oder Acetate in Kenaf (Lu und Ralph 2002), ausschließlich mit der γ -ständigen Hydroxygruppe der S-Einheiten verestert vorliegt. Die γ -Selektivität spricht dabei für eine Veresterung der Monolignole vor dem Einbau in das Ligninpolymer, wodurch die entstehenden Konjugate ebenfalls als Ligninmonomere angesehen werden. Allerdings gibt es in Bezug auf die 4-Hydroxybenzoesäure hierzu kaum Daten, die diese Annahmen bestätigen. Erst kürzlich konnte jedoch für Lignine aus Palmenholz gezeigt werden, dass 4-Hydroxybenzoesäure tatsächlich hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, mit der γ -Hydroxygruppe von Sinapylalkohol verestert vorliegt (Lu et al. 2015). Dies wurde u.a. durch den Nachweis von Tetrahydrofuranstrukturen innerhalb des Ligninpolymers bestätigt (Lu et al. 2015). Tetrahydrofuranstrukturen entstehen nach der β - β -Kopplung zweier Monolignole durch anschließende Wasseranlagerung und Ringschluss (Lu und Ralph 2008). Die alternative Entstehung der klassischen Resinolstrukturen ist nicht möglich, da γ -ständige Estergruppen die sich an die β - β -Kopplung anschließende interne Rearomatisierungsreaktion verhindern (Lu und Ralph 2008). Diese Tetrahydrofuranstrukturen konnten jedoch nicht in den Ligninen der analysierten Karotten nachgewiesen werden.

Dennoch wurde wie oben beschrieben eine Bindung von 4-Hydroxybenzoesäure an Lignin in Karotten vermutet. Die (überwiegende) Bindung an Polysaccharide konnte anhand von Vorversuchen ausgeschlossen werden. Hierbei konnte durch die Inkubation mit einem polysaccharidabbauenden Enzymgemisches gezeigt werden, dass der Hauptanteil der 4-Hydroxybenzoesäure (etwa 80%) im Rückstand verblieb. Allerdings muss beachtet werden, dass durch die Enzyminkubation kein vollständiger Abbau der Polysaccharide stattfand, was mittels Monosaccharidanalyse des Rückstandes gezeigt wurde. Durch die Isolierung der Lignine fand eine zusätzliche Aufreinigung statt. Die Isolierung mit Hilfe von Säure-Dioxan hat den Vorteil, dass noch bestehende Lignin-Kohlenhydrat-Bindungen gespalten werden. Zur weiteren Aufreinigung wurden die isolierten Ligninpolymere in Wasser (pH 2) ausgefällt. Die anschließende Identifizierung der 4-Hydroxybenzoesäure im HSQC-Spektrum der isolierten Lignine spricht daher stark für die Bindung an Lignin. Allerdings wäre auch eine Bindung an Suberin, welches nach dieser Probenaufarbeitung zumindest noch teilweise vorhanden sein kann, denkbar. Suberin besitzt neben der aliphatischen Domäne eine aus überwiegend Hydroxymyrsäuren bestehende polyphenolische Domäne (Bernards et al. 1995), woran eine Bindung der 4-Hydroxybenzoesäure möglich wäre. Zum endgültigen Nachweis der Bindung der 4-Hydroxybenzoesäure an Lignin wurde das HMBC-Experiment herangezogen. Da wie zuvor beschrieben 4-Hydroxybenzoesäure durch alkalische Verseifung unter vergleichsweise milden Bedingungen freigesetzt wird, kann von einer Esterbindung ausgegangen werden, wobei diese theoretisch in α - und/oder γ -Position der Monolignole möglich ist.

Der Nachweis der Bindung der 4-Hydroxybenzoesäure an das Ligninpolymer kann allgemein über die Kopplung des Carbonylkohlenstoffs der 4-Hydroxybenzoesäure mit den α - und/oder γ -ständigen Protonen der in Frage kommenden Bindungstypen erfolgen. Hierbei ist zu beachten, dass Resinolstrukturen weder eine α - noch eine γ -ständige Hydroxygruppe besitzen. Des Weiteren sind sowohl bei Phenylcumaran- als auch bei Dibenzodioxocin- und Spirodienonstrukturen lediglich γ -ständige Hydroxygruppen vorhanden, wohingegen β -Aryl-Ether α - und γ -ständige Hydroxygruppen aufweisen können. Spirodienonstrukturen konnten in den Karottenligninen nicht nachgewiesen werden. Daher kommen somit lediglich die Kopplungen des Carbonylkohlenstoffs der 4-Hydroxybenzoesäure mit den α - und/oder γ -ständigen Protonen der β -Aryl-Ether bzw. mit den γ -ständigen Protonen der Phenylcumaran- und Dibenzodioxocinstrukturen in Frage, um die Bindung von 4-Hydroxybenzoesäure an Lignine aus Karotten nachzuweisen (Abbildung 47). Die chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoffs der 4-Hydroxybenzoesäure ($\delta^{13}\text{C}$ 165,04 ppm) wurde anhand des acetylierten 4-Hydroxybenzoesäureethylesters bestimmt. Die chemischen Verschiebungen der α - und/oder γ -ständigen Protonen der in Frage kommenden Bindungstypen sind aus der Literatur bekannt und wurden in den hier durchgeführten 2D-NMR Experimenten bestätigt.

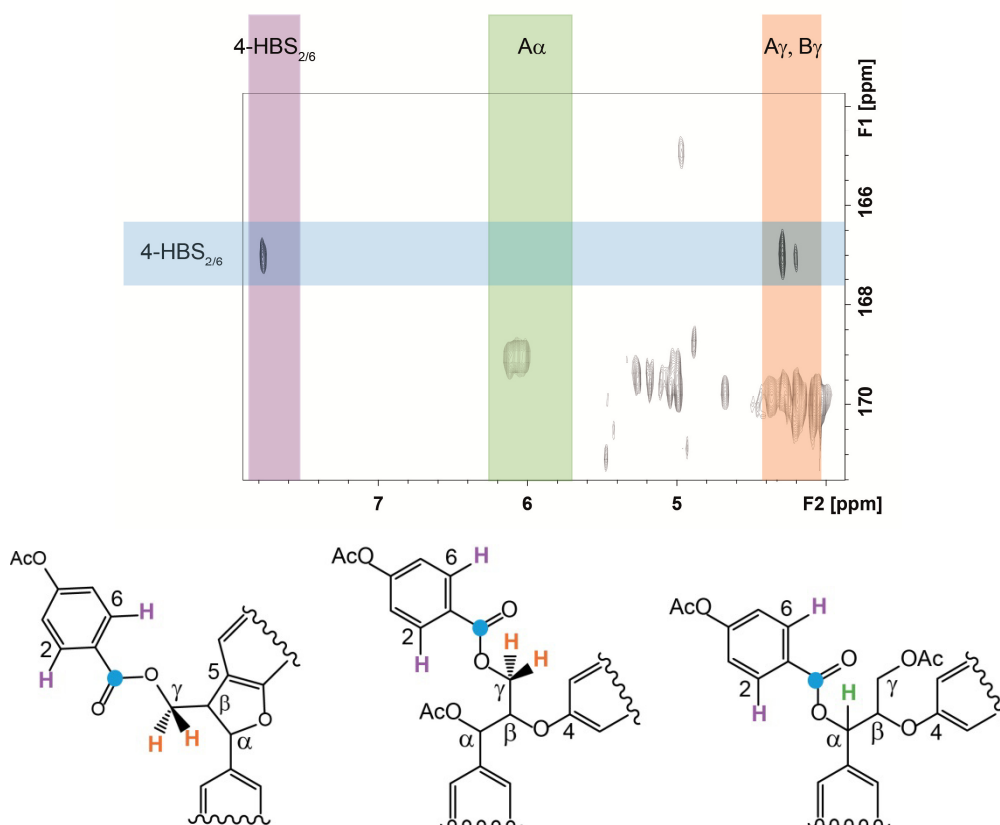


Abbildung 47: Ausschnitt des HMBC-Spektrums von acetylierten Ligninen, die aus den unlöslichen Ballaststoffen von Karotten der Ernte 3 isoliert wurden. Farblich dargestellt ist die Korrelation des Carbonylkohlenstoffs der 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBS) (blau) mit den γ -ständigen Protonen der Ligninbindungstypen β -Aryl-Ether (β -O-4, A) und Phenylcoumaran (β -5, B) (orange). Zusätzlich zu sehen ist auch die Korrelation des Carbonylkohlenstoffs der 4-HBS mit den eigenen Protonen in Position 2/6 (violett). Der grüne Bereich markiert die chemische Verschiebung der α -ständigen Protonen der β -Aryl-Ether. Zusätzlich ist die mögliche Bindung von 4-HBS an die α - und γ -ständige Hydroxygruppe des β -Aryl-Ethers sowie an die γ -ständige Hydroxygruppe der Phenylcoumaranstruktur gezeigt.

Das HMBC-Spektrum (Abbildung 47) zeigte einen Korrelationspeak, der Kopplungen zwischen dem Carbonylkohlenstoff der 4-Hydroxybenzoesäure und den γ -Protonen des β -Aryl-Ethers (β -O-4-Bindung) und/oder der Phenylcoumaranstruktur (β -5-Bindung) zuzuordnen ist. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Bindungstypen kann aufgrund ähnlicher chemischer Verschiebungen der γ -Protonen nicht getroffen werden. Kopplungen zu den α -Protonen des β -Aryl-Ethers waren nicht vorhanden. Somit konnte bestätigt werden, dass die Esterbindung hauptsächlich an der γ -ständigen Hydroxygruppe der Monolignole erfolgt. Dies lässt vermuten, dass die Veresterung der Monolignole vor dem eigentlichen Einbau der anschließend konjugierten Monomere passiert. Möglich wäre theoretisch jedoch auch eine nachträgliche Veresterung von im Ligninpolymer endständigen Monolignolen. Zudem kann nicht gesagt werden, welche Monomere bevorzugt mit 4-Hydroxybenzoesäure verestert werden, da die chemischen Verschiebungen der γ -Protonen lediglich den Bindungstypen zugeordnet werden können. Eine Unterscheidung, durch welche Monomere diese ausgebildet

werden, ist nicht möglich. Die bevorzugte Veresterung der S-Einheiten mit 4-Hydroxybenzoesäure, die bei *para*-Cumarsäure oder Acetaten beobachtet wurde, scheint jedoch fraglich, da das Ligninpolymer der Karotten einen sehr geringen Anteil an S-Einheiten (1%) im Vergleich zu den Anteilen an 4-Hydroxybenzoesäure (11-14%) aufwies. Allerdings kann der Anteil an 4-Hydroxybenzoesäure wie bereits zuvor beschrieben deutlich überbestimmt worden sein. In welchem Ausmaß eine Überbestimmung stattfand, kann jedoch nicht gesagt werden.

4.3 Zusammenfassende Diskussion

Die Charakterisierung der UBS der untersuchten Gemüseproben zeigte, dass es während der Lagerung bzw. Reifung zu Veränderungen der Zellwandzusammensetzung kommt. Die qualitativen Veränderungen waren während der Lagerung und der Reifung der Proben überwiegend vergleichbar, quantitativ gab es jedoch teilweise erhebliche Unterschiede. Das Ausmaß der Veränderungen war stark abhängig von der Probenart sowie von der Lagertemperatur und -zeit bzw. von den gewählten Erntezeitpunkten. Die Karotten stellten eine Ausnahme dar, da sie während der Reifung kaum Veränderungen der Zellwandkomponenten zeigten. Bei den anderen Proben konnten dagegen sowohl Veränderungen der Polysaccharidprofile als auch der Ligningehalte und der Ligninpolymerstrukturen festgestellt werden. Die Charakterisierung der Polysaccharide zeigte eine vergleichbare Abnahme der Galactan- und Arabinanteile. Eine Ausnahme stellte der Spargel dar, da hier die Abnahme des Galactanteils dominierte. Aussagen über eine Abnahme des Arabinanteils in den unlöslichen Ballaststoffen von Spargel können aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der Monosaccharidanalyse sowie der Methylierungsanalyse nicht eindeutig getroffen werden. Bei der Obstreifung wird häufig zunächst ein Abbau der Galactane beschrieben, wohingegen ein Abbau der Arabinstrukturen bevorzugt während der Lagerung von Obst beobachtet wird (Brummell et al. 2004; Pena und Carpita 2004). Dieser Unterschied konnte bei den Gemüseproben nicht festgestellt werden. Gleichzeitig zur Abnahme der Anteile der neutralen Pektinseitenketten nahm der Xylananteil in den UBS der Proben, mit Ausnahme des Spargels, zu. Bei Spargel nahm lediglich der Anteil der säurehydrolytisch freigesetzten Xylose zu, eine Zunahme des Anteils an 1,4-verknüpften Xylopyranosen konnte dagegen mit Hilfe der Methylierungsanalyse nicht festgestellt werden. Ob die Zunahme des Xyloseanteils aus einem erhöhten Anteil an Xylanen und/oder an Xyloglucanen bzw. Xylogalacturonanen resultiert, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden.

Die Polysaccharidprofile der gelagerten Proben (Spargel, Brokkoli) zeigten zusätzlich eine Zunahme des durch H_2SO_4 -Hydrolyse bestimmten Glucoseanteils sowie der 1,4-verknüpften Glucopyranosen. Sowohl Cellulose als auch Xyloglucane besitzen ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften Glucopyranosen. Daher ist sowohl der durch H_2SO_4 -

Hydrolyse freigesetzte Glucoseanteil als auch der Anteil an 1,4-verknüpfter Glucopyranose aus der Methylierungsanalyse beiden Polysacchariden zuzuordnen. Eine, wenn auch nicht vollständig spezifische, Unterscheidung kann anhand des durch Methanolyse freigesetzten Glucoseanteils getroffen werden. Durch die Methanolyse wird kristalline Cellulose nicht hydrolysiert, sodass der nach Methanolyse ermittelte Glucoseanteil zum größten Teil den Xyloglucanen zuzuordnen ist. Das Vorkommen von Xyloglucanen kann zudem durch die Identifizierung des PMAAs der 1,4,6-verknüpften Glucopyranose aus der Methylierungsanalyse bestätigt werden. Der durch Methanolyse bestimmte Anteil an Glucose bei Spargel und Brokkoli blieb während der Lagerung weitgehend konstant. Dies lässt vermuten, dass der nach H_2SO_4 -Hydrolyse bestimmte Anstieg des Glucoseanteils sowie der Anstieg der 1,4-verknüpften Glucopyranose während der Lagerung der Proben überwiegend auf eine Zunahme des Celluloseanteils zurückzuführen ist. Eine eindeutige Bestätigung kann jedoch mit Hilfe der verwendeten Methoden nicht erhalten werden. Im Gegensatz zu den gelagerten Proben, konnte bei den zu verschiedenen Zeitpunkten geernteten Proben (Radieschen, Kohlrabi) anhand der beschriebenen Überlegungen keine Zunahme der Celluloseanteile ausgemacht werden. Bei Radieschen konnte dagegen eine Abnahme des Xyloglucananteils ab Ernte 4 (9,5 Wochen zusätzliche Reifung nach der ersten Ernte, 17,5 Wochen nach Aussaat) festgestellt werden. Die Charakterisierung der Polysaccharide aus den UBS von Kohlrabi zeigte keine Abnahme des Xyloglucananteils während der Reifung. Allerdings waren Veränderungen der Polysaccharide hier generell schwach ausgeprägt, sodass geringe Veränderungen des Xyloglucananteils möglicherweise mit Hilfe der verwendeten Methoden nicht erkannt wurden. Obwohl die Ergebnisse darauf hindeuten, kann nicht eindeutig bewertet werden, ob die Zunahme der Celluloseanteile ein lagerungsspezifischer und die Abnahme der Xyloglucananteile ein reifungsspezifischer Prozess darstellt. So kann die beobachtete Abnahme der Xyloglucananteile bei den Radieschen sowohl Einfluss auf den durch H_2SO_4 -Hydrolyse freigesetzten Glucoseanteil als auch auf den Anteil an 1,4-verknüpfter Glucopyranose haben, sodass eine gleichzeitige, potentielle Zunahme der Celluloseanteile mit Hilfe der verwendeten Methoden unerkant bleiben kann. Gleichermaßen kann auch eine potentielle Abnahme des Xyloglucananteils bei den gelagerten Proben durch die teilweise unspezifische Unterscheidung zwischen Cellulose und Xyloglucanen nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Insgesamt muss bei der Interpretation der Ergebnisse der Monosaccharidzusammensetzung sowie der Methylierungsanalyse beachtet werden, dass jeweils relative Anteile bestimmt werden. Aussagen über einen tatsächlichen Auf- oder Abbau der einzelnen Polysaccharide während der Reifung oder Lagerung können daher nicht getroffen werden. Eine Abnahme der Anteile individueller Polysaccharide oder von Polysaccharidgruppen kann theoretisch aus einem enzymatischen Abbau dieser Polysaccharide oder aus einer verstärkten Neusyn-

these anderer Polysaccharide resultieren. Gleichmaßen kann aus der Zunahme bestimmter Polysaccharidanteile nicht geschlossen werden, ob diese Polysaccharide neu synthetisiert werden oder die Anteile aufgrund eines Abbaus anderer Polysaccharidstrukturen zunehmen. Lediglich für Arabinanstrukturen können aufgrund der vorliegenden Daten aus der Methylierungsanalyse bzw. des enzymatisch-chromatographischen Arabinan-Screenings Überlegungen über einen möglichen enzymatischen Abbau der Arabinane angestellt werden. Der enzymatische Abbau dieser neutralen Pektinseitenketten wird durch Arabinofuranosidasen katalysiert, die terminale Arabinofuranoseeinheiten am nicht-reduzierenden Ende des Polysaccharids abspalten (Tateishi 2008). Daher liegt es nahe, dass zunächst bevorzugt Verzweigungen innerhalb der Arabinane abgebaut werden. Ein möglicher enzymatischer Abbau der Arabinane könnte daher anhand der Verhältnisse zwischen verzweigten und linearen Strukturen erkannt werden. Sowohl bei Brokkoli als auch bei Kohlrabi und Radieschen veränderte sich das Verhältnis des PMAAs der 1,5-verknüpften Arabinofuranose zu der Summe der PMAAs der 1,2,5-, 1,3,5- und 1,2,3,5-verknüpften Arabinofuranosen nicht, was zunächst nicht für einen enzymatischen Abbau der Arabinane spricht. Für Spargel ist diesbezüglich keine Aussage möglich, da eine Verzweigung des Arabinanrückgrats in Position O-2 nicht vorhanden und in Position O-3 lediglich qualitativ nachweisbar war. Auch die mittels *endo*-Arabinanase freigesetzten Arabino oligosaccharide, die Verzweigungen des Arabinanrückgrats in Position O-2 und/oder O-3 repräsentieren, können in Verhältnis zu den Arabino oligosacchariden, die die linearen Bereiche des Arabinanrückgrats repräsentieren, gesetzt werden. Das Arabinan-Screening wurde für Radieschen und Brokkoli angewandt. Für Brokkoli deckte sich das Ergebnis des Arabinan-Screenings mit dem Ergebnis der Methylierungsanalyse. Bei Radieschen konnte, entgegen der Ergebnisse aus der Methylierungsanalyse, ab Ernte 4 eine geringe Zunahme des Verhältnisses von linearen zu verzweigten Strukturelementen beobachtet werden. Allerdings muss beachtet werden, dass hierbei auch Anteile eines Arabino oligosaccharids, das aus einer unvollständigen enzymatischen Hydrolyse resultiert, bestimmt wurden. Dies könnte für eine nicht vollständige, d.h. bis zu den Endprodukten der eingesetzten Enzyme ablaufende Hydrolyse sprechen. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass die während der Enzyminkubation freigesetzte monomere Arabinose, die teilweise ebenfalls lineare Abschnitte des Arabinanrückgrats repräsentiert, bei der Berechnung der Arabino oligosaccharidverteilung nicht berücksichtigt wurde. Wodurch die widersprüchlichen Ergebnisse zustande kommen, kann an dieser Stelle nicht eindeutig bewertet werden. Insgesamt weisen diese Überlegungen zwar darauf hin, dass ein enzymatischer Abbau der Arabinanstrukturen vermutlich nur gering zur beobachteten Abnahme der Arabinananteile beiträgt, ein enzymatischer Abbau kann jedoch aufgrund der Daten nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die zunehmenden Xylan- und teilweise Celluloseanteile könnten zusammen mit dem abnehmenden Anteil an neutralen Pektinseitenketten auch auf eine

verstärkte Auflagerung von Sekundärzellwänden hinweisen. Pflanzliche Primär- und Sekundärzellwände unterscheiden sich in ihrer Polysaccharidzusammensetzung. So stellen Xylane die Hauptthemicellulosen der Sekundärzellwände dar, wohingegen Primärzellwände dikotyler Pflanzen vorwiegend Xyloglucane enthalten. Zudem weisen Sekundärzellwände einen höheren Anteil an Cellulose und einen geringeren Anteil an Pektinen als Primärzellwände auf. Die Abnahme der Arabinan- und Galactananteile würde in diesem Fall mit der Neusynthese von Xylanen und Cellulose erklärt werden können. Eine abschließende, eindeutige Bewertung über einen Auf- bzw. Abbau der Polysaccharide kann jedoch trotz der vorliegenden Daten aus unterschiedlichen Methoden nicht erfolgen. Für eine weitergehende Beurteilung wären Daten zur Expression von Enzymen der Polysaccharidsynthese in weiteren Studien hilfreich.

Neben Veränderungen der Polysaccharidprofile konnte bei den Proben (Ausnahme Karotte) eine Zunahme der Ligningehalte während der Lagerung bzw. Reifung festgestellt werden. Einhergehend mit den ansteigenden Ligningehalten veränderten sich die Monolignolzusammensetzungen der Ligninpolymere. So nahm der Anteil an Sinapylalkohol im Vergleich zu den Monolignolen *para*-Cumaryl- und Coniferylalkohol in den Ligninpolymeren deutlich zu. Gleichzeitig stieg der Anteil an β -Aryl-Ethern (β -O-4-Bindungen) in den Ligninpolymeren. Im Gegensatz zur Polysaccharidcharakterisierung lassen die im Rahmen der Lignincharakterisierung bestimmten relativen Anteile der Monolignole bzw. der Bindungstypen Rückschlüsse bezüglich Neusynthesen gegenüber Abbau zu, da Lignin durch pflanzeigene Enzyme lediglich auf- und nicht abgebaut wird. Aus der Zunahme der Sinapylalkohol- und der β -Aryl-Etheranteile kann daher geschlossen werden, dass Sinapylalkohol während der lager- und reifebedingten Lignifizierung bevorzugt über diesen Bindungstyp in die Ligninpolymere eingebunden wird. Die gleichzeitig beobachtete Abnahme der Anteile der Dibenzodioxocineinheiten (5-5/ β -O-4-Bindung) zeigt, dass die Ausbildung dieser Struktureinheiten eine untergeordnete Rolle in der späteren Phase der Lignifizierung spielt. Dies resultiert vermutlich aus dem vermehrten Einbau von Sinapylalkohol, da hier die aromatische C5-Position durch eine Methoxygruppe belegt ist und daher nicht zur Ausbildung einer Bindung zur Verfügung steht. Interessanterweise erhöhte sich zusätzlich zum Anteil an Sinapylalkohol der Anteil an *para*-Cumarylalkohol in den Ligninen aus Kohlrabi. Dies ist ungewöhnlich, da *para*-Cumarylalkohol in den späteren Phasen der Lignifizierung normalerweise selten als Monolignol zum Einbau in das Ligninpolymer dient (Donaldson 2001). Gleichzeitig nahm der Anteil an Resinolstrukturen (β - β -Bindungen) zu. Diese Struktureinheiten werden bevorzugt durch Dimerisierung zweier Monolignole während der frühen Phase der Lignifizierung gebildet (Ralph et al. 2004b). Daher spricht die Zunahme der *para*-Cumarylalkohol- und Resinolstrukturanteile für eine zusätzliche Neubildung von Ligninen in den Kohlrabizellwänden. Für Lignine aus Spargel war das Gegenteil zu beobachten. Hier nahm der Anteil an Resinolstrukturen während

der Lagerung ab, sodass vermutet werden kann, dass die Ligninbildung verstärkt durch den Einbau der Monolignole in bereits bestehende Polymere stattfindet.

Das Ausmaß der beschriebenen Veränderungen der Zellwandkomponenten während der Lagerung und Reifung der Gemüseproben war abhängig von der Probenart sowie von den unterschiedlichen Bedingungen während der Lagerung bzw. von den Erntezeitpunkten. Die Lagerversuche wurden bei 20°C (etwa Raumtemperatur) und 1°C (Kühlagerung) durchgeführt. Hier war deutlich, dass die Veränderungen der Zellwandkomponenten während der Lagerung bei 20°C deutlich schneller zu beobachten und stärker ausgeprägt waren als bei der Lagerung bei 1°C. Dies war zu erwarten, da die meisten Prozesse der Zellwandveränderungen enzymatisch ablaufen. Sowohl bei Spargel als auch bei Brokkoli waren die Veränderungen der Polysaccharidprofile sowie der Anstieg der Ligningehalte und Veränderungen der Ligninstrukturen während der Lagerung bei 1°C erst nach 21 bzw. 28 Tagen festzustellen. Dagegen waren Veränderungen während der Lagerung bei 20°C bereits ab 3 Tagen (Spargel) bzw. 7 Tagen (Brokkoli) Lagerdauer in deutlich stärkerem Ausmaß zu beobachten. Somit wird deutlich, dass Veränderungen der Zellwandkomponenten während der Lagerung der Gemüseproben maßgeblich durch die Lagertemperatur und die Lagerdauer beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu waren bei den Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet wurden (Radieschen, Kohlrabi, Karotten), unterschiedliche Tendenzen der Zellwandveränderungen zu erkennen. Veränderungen der Zellwandkomponenten und deren Strukturen waren am stärksten bei Radieschen ausgeprägt. Hier war ab Ernte 3 (6 Wochen zusätzliche Reifung nach der ersten Ernte, 14 Wochen nach Aussaat) ein geringer Anstieg des Ballaststoff- und Ligningehaltes sowie Veränderungen der Polysaccharidprofile und der Ligninstrukturen zu erkennen. Zwischen Ernte 3 und 4 (9,5 Wochen zusätzliche Reifung) erfolgten sprunghafte qualitative als auch quantitative Veränderungen der genannten Komponenten. Auch bei Kohlrabi waren erste Veränderungen ab Ernte 3 (6 Wochen zusätzliche Reifung nach der ersten Ernte, 20 Wochen nach Aussaat) zu erkennen, deren Ausmaß bis zu Ernte 5 (15 Wochen zusätzliche Reifung), im Gegensatz zu den Radieschen, kontinuierlich anstieg. Das Gesamtausmaß der Zellwandveränderungen war deutlich geringer ausgeprägt als bei den Radieschen. Dagegen waren bei Karotten keine Veränderungen der Zellwandzusammensetzung zu späteren Erntezeitpunkten festzustellen. Lediglich der Gehalt der überwiegend lignin gebundenen 4-Hydroxybenzoesäure stieg zum Erntezeitpunkt 3 (9 Wochen zusätzliche Reifung, 35 Wochen nach Aussaat) leicht an. Ein zusätzlicher Faktor, der bei der Veränderung der Zellwandkomponenten vermutlich eine Rolle spielt, sind die Wachstumsbedingungen (Wasserszufuhr, Düngung, Licht) der Pflanzen, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde. Der Anbau der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus, sodass vergleichbare Bedingungen eingehalten werden konnten.

Die festgestellten Veränderungen der Zellwandkomponenten sowie deren Strukturen gingen einher mit einem Verlust der sensorischen Qualität der Proben. Die Textur wurde bei allen Proben als tendenziell holziger, faseriger und zäher und gleichzeitig als weniger zart, saftig und knackig bewertet. Eine Ausnahme stellten erneut die Karotten dar, die keine Veränderungen der sensorischen Qualität zeigten. Die Ausprägung der sensorischen Merkmale war abhängig von der Probenart, aber auch von den jeweiligen Versuchsbedingungen (Lager-temperatur und -zeit bzw. Erntezeitpunkt). So waren die Texturveränderungen von den bereits beschriebenen Veränderungen der Polysaccharidprofile begleitet. Ein Faktor, der oft mit dem Verholzen und der Verfestigung der Textur von Gemüse in Verbindung gebracht wird, ist Lignin (Rodriguez et al. 1999a; Waldron et al. 2003). So ging für die analysierten Proben eine stärker ausgeprägte Wahrnehmung der Texturattribute holzig und faserig mit einer Zunahme des Ligningehaltes einher. Für Spargel kommt hinzu, dass dessen Lagerung, insbesondere bei 20°C, einen drastischen Anstieg der Gehalte an Zellwand Cross-Links verursachte. Durch die Ausbildung von Ferulasäureoligomeren können Polysaccharide untereinander, aber auch Polysaccharide und Lignin vernetzt werden, wodurch ein festeres Netzwerk entsteht. Insgesamt verdeutlichen die mit den Veränderungen der sensorischen Qualität einhergehenden Veränderungen der Zellwandkomponenten, dass die Zellwandzusammensetzung die Textur von pflanzlichen Lebensmitteln maßgeblich beeinflusst. Daher können die Texturveränderungen gut mit Hilfe der gleichzeitig stattfindenden Zellwandveränderungen chemisch beschrieben werden. Dabei muss die Zellwand als komplexes System unterschiedlicher Komponenten betrachtet werden. Neben dem Einfluss der einzelnen Komponenten spielen letztendlich die gesamte Zusammensetzung der Zellwand und die Interaktionen der Einzelkomponenten die größte Rolle in Bezug auf die Textur der Gemüseproben.

Die Zellwandpolymere beeinflussen nicht nur die Textur von pflanzlichen Lebensmitteln, sondern sind mit Ausnahme der Strukturproteine auch bedeutende Ballaststoffkomponenten. Ballaststoffen werden im Allgemeinen ernährungsphysiologisch positive Eigenschaften zugeschrieben, die jedoch stark abhängig von dem Gehalt der verschiedenen Komponenten, aber auch von deren Feinstrukturen sind. Die Untersuchungen zu lager- und reifebedingten Veränderungen der Zellwandzusammensetzung verschiedener Gemüseproben zeigten, dass sich die Zellwandkomponenten während der Lagerung bzw. Reifung verändern. Diese Veränderungen können Einfluss auf potentielle ernährungsphysiologische Eigenschaften haben. Ein oft diskutierter, protektiver Mechanismus ist die Entstehung von kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat, die durch mikrobielle Fermentation der Ballaststoffe im Dickdarm gebildet werden (Harris und Ferguson 1999). Diese senken u.a. den pH-Wert im Kolon und können das Wachstum pathogener Mikroorganismen hemmen (Slavin 2013). Das Ausmaß der Fermentation sowie die Art der Fermentationsprodukte sind abhängig von der Zusammensetzung der Ballaststoffe (Bourquin et al. 1996; Plaami 1997; Slavin 2013). Daher

ist anzunehmen, dass die über die Lagerung bzw. Reifung veränderten Polysaccharidprofile Auswirkungen auf das Ausmaß und die Art der entstehenden kurzkettigen Fettsäuren haben. Des Weiteren kann auch die Lokalisation der Ballaststofffermentation im Dickdarm durch die Ballaststoffzusammensetzung beeinflusst werden. Die Fermentation von Polysacchariden findet im Allgemeinen im proximalen Abschnitt des Kolons statt, wohingegen Proteine bevorzugt im distalen Bereich fermentiert werden. Die Proteinferrmentation wird in Zusammenhang mit der Entstehung von Dickdarmkrebs gebracht, da hierbei teilweise toxische Verbindungen wie Phenole oder Ammoniak entstehen (Blaut 2002). Die kinetische Beeinflussung der Ballaststofffermentation durch Zellwand Cross-Links ist aufgrund der Literaturdaten nicht eindeutig zu bewerten. So konnte zwar gezeigt werden, dass Cross-Links die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Ballaststofffermentation durch kohlenhydratabbauende Enzyme *in vitro* reduzieren können (Grabber et al. 1998; Grabber et al. 2009). Funk et al. (2007b) zeigten allerdings, dass moderate Gehalte an Ferulasäure und DFS die Fermentation von Polysacchariden durch die menschliche Mikrobiota kaum beeinflussen. Während der Lagerung von Spargel nahm die Summe der gebildeten DFS und TriFS, insbesondere bei 20°C, drastisch zu. Ein Einfluss dieses Ausmaßes an Cross-Link Bildung auf die Lokalisation der Ballaststofffermentation bleibt in zukünftigen Studien zu untersuchen. Auch lignifizierte Ballaststoffe reduzieren das Ausmaß der Ballaststofffermentation, wobei dem Ligningehalt eine größere Rolle als der Zusammensetzung der Ligninpolymere zukommt (Funk et al. 2007a; Grabber et al. 2009). Der Ligningehalt der Proben stieg sowohl während der Lagerung als auch während der Reifung an. Auch dies könnte eine verstärkte Fermentation der Ballaststoffe im distalen Kolonbereich, jedoch eventuell auch ein insgesamt niedrigeres Ausmaß der Kohlenhydratfermentation im Kolon zur Folge haben. Neben dem Ligningehalt spielt auch die Struktur der Ligninpolymere eine Rolle bei der Bewertung potentieller ernährungsphysiologischer Eigenschaften. So beeinflusst die Monolignolzusammensetzung der Ligninpolymere die Adsorption von HAAs *in vitro* (Funk et al. 2006; Harris et al. 1996). Funk et al. (2006) zeigten, dass hydrophobere HAAs besser durch G-reiche Lignine und weniger hydrophobe HAAs besser durch S-reiche Lignine adsorbiert werden (Funk et al. 2006). Da während der Reifung bzw. Lagerung der Gemüseproben der Anteil an S-Einheiten deutlich anstieg, könnte somit die Fähigkeit der Ballaststoffe bestimmte HAAs zu adsorbieren beeinflusst werden. Zu beachten ist jedoch, dass in zitierten Versuchen auch festgestellt wurde, dass Matrixpolysaccharide zur Adsorption beitragen. Insgesamt müssen somit auch für eine Bewertung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften *in vivo* die Summe aller Ballaststoffkomponenten sowie deren Interaktionen untereinander und mit der Lebensmittelmatrix betrachtet werden.

5 Zusammenfassung

Pflanzliche Lebensmittel und insbesondere pflanzliche Zellwände stellen die Hauptaufnahmequelle für Ballaststoffe in der menschlichen Ernährung dar. Ballaststoffen werden eine Reihe potentieller ernährungsphysiologischer Eigenschaften zugeschrieben, die jedoch stark abhängig von der Zusammensetzung der Zellwandkomponenten und deren Strukturen sind. Des Weiteren beeinflusst die Zellwandzusammensetzung die Textur eines pflanzlichen Lebensmittels. So wird die Textur von z.B. Sprossgemüse während der Lagerung häufig mit einer Zunahme der Holzigkeit, Festigkeit, Faserigkeit und Zähigkeit korreliert. Auch die Reifung von bestimmten Gemüsesorten, wie z.B. Radieschen oder Kohlrabi, über den optimalen Erntezeitpunkt hinaus kann dazu führen, dass genannte Attribute verstärkt zu deren Texturbeschreibung herangezogen werden. Die damit einhergehenden chemischen Veränderungen der Zellwandkomponenten sind jedoch, im Gegensatz zur Reifung von Obst, kaum beschrieben. Sowohl zur chemischen Beschreibung von Texturveränderungen als auch zur Bewertung potentieller ernährungsphysiologischer Eigenschaften sind eine Betrachtung aller Zellwandkomponenten sowie deren Strukturcharakterisierung notwendig. Daten zur strukturellen Charakterisierung der Zellwandkomponenten von Gemüse sind in der Literatur allerdings kaum vorhanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Zusammensetzungen der unlöslichen Ballaststoffe verschiedener Gemüsesorten (Spargel, Brokkoli, Kohlrabi, Radieschen und Karotten) mittels unterschiedlicher spektroskopischer und chromatographischer Methoden analysiert. Des Weiteren wurden reife- und lagerbedingte Veränderungen der Zellwandkomponenten charakterisiert. Dazu wurden Spargel und Brokkoli bei 20°C und 1°C für unterschiedliche Zeiträume gelagert. Für Radieschen, Kohlrabi und Karotten wurden verschiedene Erntezeitpunkte gewählt. Nach jeder Probenahme wurde das Probenmaterial sensorisch bewertet. Anschließend erfolgte die chemische Analyse der aus den Proben isolierten unlöslichen Ballaststoffe. Die chemische Analyse umfasste die Charakterisierung der Monosaccharidzusammensetzung der Polysaccharide nach Säurehydrolyse (zweistufige H₂SO₄-Hydrolyse bzw. Methanolyse gefolgt von einer Trifluoressigsäurehydrolyse). Die säurehydrolytisch freigesetzten Monosaccharide wurden anschließend mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulst amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) identifiziert und quantifiziert. Mit Hilfe der Methylierungsanalyse wurden die Bindungsverhältnisse der Monosaccharide im Polysaccharid bestimmt. Die dabei entstehenden partiell methylierten Alditolacetate wurden gaschromatographisch getrennt, anhand charakteristischer Fragmentierungsmuster mit Hilfe eines Massenspektrometers identifiziert und mittels Flammenionisationsdetektion semiquantitativ bestimmt. Zudem diente das enzymatisch-chromatographische Arabinan- bzw. Galactan-Screening bei ausgewählten Proben (Brokkoli, Radieschen) zur näheren Strukturcharakterisierung der neutralen Pektinseitenketten. Die

enzymatisch freigesetzten Arabino- bzw. Galactooligosaccharide wurden mittels HPAEC-PAD identifiziert und semiquantitativ bestimmt. Ein weiterer Schwerpunkt war die Bestimmung von Ligningehalten und die Charakterisierung von Ligninstrukturen in pflanzlichen Zellwänden. Lignifizierte Zellwände bzw. Ballaststoffe können die Textur von Gemüse negativ beeinflussen, stehen andererseits aber u.a. in der Diskussion durch die Adsorption von bestimmten Kanzerogenen wie heterocyclische aromatische Amine das Risiko der Entstehung von Dickdarmkrebs zu senken. Die Ligningehalte wurden als Klason-Lignin und als acetylbromidlösliches Lignin bestimmt. Der Klason-Ligningehalt wurde gravimetrisch nach säurehydrolytischer Entfernung anderer Zellwandbestandteile ermittelt. Die Bestimmung des acetylbromidlöslichen Lignins erfolgte spektrophotometrisch nach Lösen des Lignins in Acetylbromid und Essigsäure. Beide Methodenprinzipien können sowohl zu einer Über- als auch zu einer Unterbestimmung der Ligningehalte führen, wodurch belastbare Aussagen zu tatsächlich vorliegenden Ligningehalten nur schwer zu treffen sind. Die Monolignolzusammensetzung der Ligninpolymere wurde mittels derivatization followed by reductive cleavage-Methode bestimmt. Die Monolignole, die vollständig über β -Aryl-Ether in das Polymer eingebaut wurden, konnten so selektiv freigesetzt und mit Hilfe einer in dieser Arbeit entwickelten und validierten gaschromatographischen Methode analysiert werden. Die Identifizierung und Quantifizierung der Monolignole erfolgte mit Hilfe eines Massenspektrometers im selected ion monitoring-Modus. Als interne Standardsubstanzen dienten synthetisierte deuteriummarkierte Monolignolacetate. Eine weitere wichtige Methode zur Strukturcharakterisierung von Ligninpolymeren stellt die 2D-Kernspinresonanzspektroskopie (2D-NMR) dar. Mit Hilfe von heteronuclear single quantum coherence (HSQC)-Experimenten konnten sowohl die Monolignole als auch die im Ligninpolymer vorhandenen Bindungstypen charakterisiert werden. Durch heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)-Experimente konnten weiterführende Strukturinformationen erhalten werden. So konnte analysiert werden, durch welche Monolignole die verschiedenen Bindungstypen im Ligninpolymer ausgebildet wurden. Zudem war der Nachweis der Veresterung von Monolignolen, z.B. mit Hydroxyzimtsäuren, möglich. Letzteres war hauptsächlich für Lignine aus Spargel und Karotten interessant, da diese Proben vergleichsweise hohe Gehalte an *para*-Cumarsäure (Spargel) bzw. 4-Hydroxybenzoesäure (Karotte) aufwiesen. Die Quantifizierung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile, d.h. von Verbindungen, die Zellwandpolymere potentiell vernetzen können, der Zellwände von Karotten und Spargel erfolgte nach alkalischer Hydrolyse der unlöslichen Ballaststoffe und anschließender Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und UV-Detektion mit Hilfe eines Diodenarraydetektors.

Die Charakterisierung der Zellwandpolysaccharide der Gemüseproben der ersten Ernten bzw. der für die Lagerversuche frisch geernteten Proben ergab typische Polysaccharidprofile dikotyler Pflanzen. So war Cellulose der Hauptbestandteil, gefolgt von Hemicellulosen wie

Xyloglucanen, Xylanen und linearen bzw. teilweise verzweigten Mannanen. Die Pektinfraktionen bestanden überwiegend aus vergleichbaren Anteilen an Homogalacturonanen und Typ I Rhamnogalacturonanen. Als neutrale Pektinseitenketten wurden unterschiedliche Anteile an Arabinanen und (Arabino-) Galactanen bestimmt. Bei Brokkoli und Kohlrabi überwog der Arabinananteil, während bei Spargel der Galactananteil dominierte. Radieschen und Karotten enthielten etwa gleiche Anteile beider neutraler Pektinseitenketten. Die Ligninzusammensetzungen der Gemüseproben zeigten deutliche Unterschiede. So spielte *para*-Cumarylalkohol als Monolignol in den Ligninen aus Spargel, Kohlrabi, Brokkoli und Karotte nur eine untergeordnete Rolle. Die Ligninpolymere aus Radieschen enthielten dagegen vergleichsweise hohe Anteile (14%) an *para*-Cumarylalkohol. Coniferylalkohol war mit Anteilen von >90% das Hauptmonolignol in den Ligninpolymeren aus Brokkoli und Karotten. Lignine aus Spargel, Radieschen und Kohlrabi enthielten dagegen etwa ähnliche Anteile an Coniferyl- und Sinapylalkohol. In allen analysierten Ligninpolymeren konnten β -Aryl-Ether (β -O-4-Bindungen) als Hauptbindungstypen identifiziert werden, gefolgt von Phenylcumaran (β -5-Bindungen)-, Resinol (β - β -Bindungen)- und Dibenzodioxocinstrukturen (5-5/ β -O-4-Bindungen). Zusätzlich enthielten die Ligninpolymere aus Brokkoli, Kohlrabi und Radieschen geringe Anteile an Spirodienonstrukturen (β -1/ α -O- α -Bindungen). Die HMBC-Spektren der isolierten Lignine aus Radieschen zeigten, dass die Spirodienonstrukturen bevorzugt durch Sinapylalkohol gebildet werden. Ebenso zeigten die HMBC-Spektren der Lignine aus Radieschen und Kohlrabi, dass Sinapylalkohol bevorzugt an der Ausbildung von Resinolstrukturen beteiligt ist. HSQC-Experimente der isolierten, acetylierten Lignine aus Karotte und Spargel lieferten Hinweise darauf, dass 4-Hydroxybenzoesäure (Karotte) bzw. *para*-Cumarsäure (Spargel) ligningebunden vorliegt. Weiterführende HMBC-Experimente bestätigten, dass 4-Hydroxybenzoesäure in Karottenligninen bevorzugt mit der γ -ständigen Hydroxygruppe der Monolignole verestert ist. Ein entsprechender Nachweis für *para*-Cumarsäure (Spargel) konnte allerdings nicht erbracht werden. Eine Bindung von *para*-Cumarsäure an Spargellignin ist wahrscheinlich, konnte allerdings aufgrund der durchgeführten Analysen nicht eindeutig bestätigt werden.

Während der Lagerung bzw. Reifung der Proben veränderte sich die Zusammensetzung der unlöslichen Ballaststoffe in Abhängigkeit der Probenart und der Lagerbedingungen bzw. der Erntezeitpunkte. Eine Ausnahme stellten die Karotten dar, da hier kaum Veränderungen der Zellwandkomponenten festgestellt wurden. Lediglich eine leichte Zunahme des Gehaltes der ligningebundenen 4-Hydroxybenzoesäure konnte beobachtet werden. Die restlichen Proben zeigten Veränderungen der Zellwandpolysaccharidprofile während der Lagerung bzw. Reifung. Der Anteil an Arabinanen und Galactanen nahm deutlich ab, wohingegen der Xylananteil anstieg. Zusätzlich war bei den gelagerten Proben (Spargel, Brokkoli) ein erhöhter Anteil an Cellulose festzustellen. Die angewandten Methoden zur Polysaccharidcharakterisierung

lassen lediglich Aussagen über relative Anteile der Polysaccharide in den unlöslichen Ballaststoffen zu. Aussagen über einen Auf- bzw. Abbau eines bestimmten Polysaccharids in vor- oder nacherntephysiologischen Prozessen können daher nicht getroffen werden. Ob die Abnahme der Anteile an neutralen Pektinseitenketten aus deren enzymatischen Abbau oder aus der Neusynthese anderer Polysaccharide resultiert kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend bewertet werden. Des Weiteren war eine Zunahme der Ligningehalte während der Lagerung bzw. mit Verlauf der Reifung festzustellen. Für den Aufbau des Ligninpolymers während der Lagerung bzw. während der Reifung über den optimalen Erntezeitpunkt hinaus wurde bevorzugt das Monolignol Sinapylalkohol verwendet. Interessanterweise ließen 2D-NMR Analysen der isolierten, acetylierten Lignine aus Kohlrabi vermuten, dass die Lignifizierung hier nicht ausschließlich über die Kopplung von Monolignolen an bereits bestehende Polymere erfolgt, sondern Lignine zusätzlich neu gebildet werden. Die Lagerung von Spargel führte zudem zu einem drastischen Anstieg der zellwandgebundenen phenolischen Monomere sowie Di- und Triferulasäuren.

Die Charakterisierung der in den unlöslichen Ballaststoffen enthaltenen Zellwandkomponenten der Gemüseproben zeigte, dass die Zusammensetzung der Zellwände sehr komplex und stark variabel ist. Lager- und reifebedingte Veränderungen der Zellwandkomponenten gingen mit gleichzeitig stattfindenden Texturveränderungen der Gemüseproben einher. Die Zunahme der Holzig-, Faserig- und Zähigkeit der Proben kann daher anhand der analysierten Zellwandveränderungen chemisch beschrieben werden. Zudem können die Veränderungen der Zellwandkomponenten Einfluss auf potentielle ernährungsphysiologische Eigenschaften der Ballaststoffe haben. Das durch Lagerung bzw. Reifung veränderte Polysaccharidprofil kann Auswirkungen auf das Ausmaß der mikrobiellen Kohlenhydratfermentation im Dickdarm und das gebildete Spektrum an Fermentationsprodukten haben. Zudem ist eine Beeinflussung der Lokalisation der Fermentation im Dickdarm durch einen erhöhten Ligningehalt und durch verstärkt ausgebildete Zellwand Cross-Links (Spargel) möglich. Auch die veränderten Ligninstrukturen können sich auf die Adsorption potentieller Kanzerogene wie heterocyclische aromatische Amine an lignifizierte Ballaststoffe auswirken. Ob die hier dargestellten Veränderungen der Zellwandkomponenten jedoch tatsächlich derartige Einflüsse auf ernährungsphysiologische Eigenschaften haben, muss in weiteren Studien, idealerweise *in vitro* Studien gefolgt von *in vivo* Studien, gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- AACCI** (2001): The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* 46, 112.
- Albersheim P., Nevins D.J., English P.D., Karr A.** (1967): A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5, 340-345.
- Alejandro S., Lee Y., Tohge T., Sudre D., Osorio S., Park J., Bovet L., Lee Y., Geldner N., Fernie A.R., Martinoia E.** (2012): AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr. Biol.* 22, 1207-1212.
- Allerdings E., Ralph J., Steinhart H., Bunzel M.** (2006): Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry* 67, 1276-1286.
- Andersen T.G., Barberon M., Geldner N.** (2015): Suberization - the second life of an endodermal cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28, 9-15.
- Andreasen M.F., Christensen L.P., Meyer A.S., Hansen A.** (1999): Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.* 79, 411-413.
- Argyropoulos D.S., Jurasek L., Kristofova L., Xia Z.C., Sun Y.J., Palus E.** (2002): Abundance and reactivity of dibenzodioxocins in softwood lignin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 658-666.
- Asp N.G.** (1987): Dietary fiber - Definition, chemistry and analytical determination. *Mol. Aspects Med.* 9, 17-29.
- Asp N.G., Bjorck I., Nyman M.** (1993): Physiological effects of cereal dietary fiber. *Carbohydr. Polym.* 21, 183-187.
- Azuma T., Okita N., Nanmori T., Yasuda T.** (2005): Relationship between the deposition of phenolic acids in the cell walls and the cessation of rapid growth in internodes of floating rice. *Plant Prod. Sci.* 8, 447-453.
- Barberousse H., Roiseux O., Robert C., Paquot M., Deroanne C., Blecker C.** (2008): Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1494-1511.
- Baucher M., Monties B., Van M.M., Boerjan W.** (1998): Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 125-197.
- Bento J.F., Mazzaro I., Silva L.M.D., Moreira R.D., Ferreira M.L.C., Reicher F., Petkowicz C.L.D.** (2013): Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the *Leguminosae*. *Carbohydr. Polym.* 92, 192-199.
- Bernards M.A., Lopez M.L., Zajicek J., Lewis N.G.** (1995): Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. *J. Biol. Chem.* 270, 7382-7386.
- Bestard M.J., Sanjuan N., Rossello C., Mulet A., Femenia A.** (2001): Effect of storage temperature on the cell wall components of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) plant tissues during rehydration. *J. Food Eng.* 48, 317-323.

- Björkman A.** (1954): Isolation of lignin from finely divided wood with neutral solvents. *Nature* 174, 1057-1058.
- Blaut M.** (2002): Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur. J. Nutr.* 41, 11-16.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M.** (2003): Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519-546.
- Bourquin L.D., Titgemeyer E.C., Fahey G.C.** (1996): Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr. Res.* 16, 1119-1131.
- Bradford M.M.** (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brummell D.A.** (2006): Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33, 103-119.
- Brummell D.A., Dal Cin V., Crisosto C.H., Labavitch J.M.** (2004): Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55, 2029-2039.
- Buanafina M.M.D.** (2009): Feruloylation in grasses: current and future perspectives. *Mol. Plant* 2, 861-872.
- Bunzel M.** (2010): Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem. Rev.* 9, 47-64.
- Bunzel M., Ralph J.** (2006): NMR characterization of lignins isolated from fruit and vegetable insoluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8352-8361.
- Bunzel M., Ralph J., Brüning P., Steinhart H.** (2006): Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6409-6418.
- Bunzel M., Ralph J., Funk C., Steinhart H.** (2003): Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.* 217, 128-133.
- Bunzel M., Ralph J., Funk C., Steinhart H.** (2005a): Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* 46, 5845-5850.
- Bunzel M., Ralph J., Lu F., Hatfield R.D., Steinhart H.** (2004): Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6496-6502.
- Bunzel M., Ralph J., Marita J., Steinhart H.** (2000): Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3166-3169.
- Bunzel M., Ralph J., Marita J.M., Hatfield R.D., Steinhart H.** (2001): Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Agric. Food Chem.* 81, 653-660.
- Bunzel M., Schübler A., Tchetsseubu Saha G.** (2011): Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12506-12513.
- Bunzel M., Seiler A., Steinhart H.** (2005b): Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9553-9559.

- Caffall K.H., Mohnen D.** (2009): The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344, 1879-1900.
- Capek P., Alföldi J., Liskova D.** (2002): An acetylated galactoglucomannan from *Picea abies* L. Karst. *Carbohydr. Res.* 337, 1033-1037.
- Carpita N.C., Gibeaut D.M.** (1993): Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1-30.
- Chen F., Tobimatsu Y., Havkin-Frenkel D., Dixon R.A., Ralph J.** (2012): A polymer of caffeyl alcohol in plant seeds. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 109, 1772-1777.
- Chen F., Tobimatsu Y., Jackson L., Nakashima J., Ralph J., Dixon R.A.** (2013): Novel seed coat lignins in the Cactaceae: structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. *Plant J.* 73, 201-211.
- Churms S.C.** (1990): Recent developments in the chromatographic analysis of carbohydrates. *J. Chromatogr.* 500, 555-583.
- Ciucanu I., Kerek F.** (1984): A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.
- Codex Alimentarius** (2010): Guidelines on nutrition labelling CAC/GL 2-1985. Joint FAO/WHO Food Standards Programm, Secretariat of the Codex Alimentarius Commission, FAO: Rome.
- Colquhoun I.J., Ralet M.C., Thibault J.F., Faulds C.B., Williamson G.** (1994): Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by NMR-spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 263, 243-256.
- Cong F., Diehl B.G., Hill J.L., Brown N.R., Tien M.** (2013): Covalent bond formation between amino acids and lignin: Cross-coupling between proteins and lignin. *Phytochemistry* 96, 449-456.
- Cosgrove D.J.** (2005): Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850-861.
- Crestini C., Argyropoulos D.S.** (1997): Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative P-31 and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α -O-4 substructures. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1212-1219.
- Das Gupta P.C., Mukherjee P.P.** (1967): The hemicellulose of sisal fibre (*Agave sisalana*). *J. Chem. Soc.*, 1179-1182.
- 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. *Anal. Biochem.* 207, 176-185.
- de Vries J.A., den Uijl C.H., Voragen A.G.J., Rombouts F.M., Pilnik W.** (1983): Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydr. Polym.* 3, 193-205.
- Deepak S., Shailasree S., Kini R.K., Muck A., Mithofer A., Shetty S.H.** (2010): Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *J. Phytopathol.* 158, 585-593.

- del Río J.C., Rencoret J., Prinsen P., Martínez Á.T., Ralph J., Gutiérrez A.** (2012): Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5922-5935.
- Deytieux-Belleau C., Vallet A., Doneche B., Geny L.** (2008): Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 638-646.
- Dixon R.A., Chen F., Guo D., Parvathi K.** (2001): The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* 57, 1069-1084.
- Dobberstein D., Bunzel M.** (2010): Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8927-8935.
- Donaldson L.A.** (2001): Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, 859-873.
- Englyst H.N., Quigley M.E., Hudson G.J.** (1994): Determination of dietary fiber as nonstarch polysaccharides with gas-liquid-chromatography, high-performance liquid-chromatography or spectrophotometric measurement of constituent sugars. *Analyst* 119, 1497-1509.
- Femenia A., Bestard M.J., Sanjuan N., Rossello C., Mulet A.** (2000): Effect of rehydration temperature on the cell wall components of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) plant tissues. *J. Food Eng.* 46, 157-163.
- Femenia A., Waldron K.W., Robertson J.A., Selvendran R.R.** (1999): Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) during tissue development and plant maturation. *Carbohydr. Polym.* 39, 101-108.
- Ferguson L.R., Harris P.J.** (1996): Studies on the role of specific dietary fibres in protection against colorectal cancer. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 350, 173-184.
- Ford C.W., Hartley R.D.** (1990): Cyclodimers of *p*-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.* 50, 29-43.
- Fujimoto A., Matsumoto Y., Chang H.M., Meshitsuka G.** (2005): Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin. *J. Wood Sci.* 51, 89-91.
- Fukushima R.S., Hatfield R.D.** (2001): Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3133-3139.
- Funk C., Braune A., Grabber J.H., Steinhart H., Bunzel M.** (2007a): Model studies of lignified fiber fermentation by human fecal microbiota and its impact on heterocyclic aromatic amine adsorption. *Mutat. Res.* 624, 41-48.
- Funk C., Braune A., Grabber J.H., Steinhart H., Bunzel M.** (2007b): Moderate ferulate and diferulate levels do not impede maize cell wall degradation by human intestinal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2418-2423.

- Funk C., Ralph J., Steinhart H., Bunzel M.** (2005): Isolation and structural characterization of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry* 66, 363-371.
- Funk C., Weber P., Thilker J., Grabber J.H., Steinhart H., Bunzel M.** (2006): Influence of lignification and feruloylation of maize cell walls on the adsorption of heterocyclic aromatic amines. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1860-1867.
- Gibson L.J.** (2012): The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *J. R. Soc., Interface* 9, 2749-2766.
- Grabber J.H., Hatfield R.D., Ralph J.** (1998): Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* 77, 193-200.
- Grabber J.H., Mertens D.R., Kim H., Funk C., Lu F.C., Ralph J.** (2009): Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *J. Sci. Food Agric.* 89, 122-129.
- Grabber J.H., Quideau S., Ralph J.** (1996): *p*-Coumaroylated syringyl units in maize lignin: Implications for β -ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry* 43, 1189-1194.
- Grabber J.H., Ralph J., Hatfield R.D.** (2000): Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6106-6113.
- Grabber J.H., Ralph J., Hatfield R.D.** (2002): Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: Implications for lignification in grasses. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6008-6016.
- Gross K.C., Sams C.E.** (1984): Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening - A species survey. *Phytochemistry* 23, 2457-2461.
- Gruz J., Pospisil J., Kozubikova H., Pospisil T., Dolezal K., Bunzel M., Strnad M.** (2015): Determination of free diferulic, disinapic and dicoumaric acids in plants and foods. *Food Chem.* 171, 280-286.
- Guerra A., Filpponen I., Lucia L.A., Saquing C., Baumberger S., Argyropoulos D.S.** (2006): Toward a better understanding of the lignin isolation process from wood. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5939-5947.
- Gunness P., Gidley M.J.** (2010): Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food Funct.* 1, 149-155.
- Hague A., Manning A.M., Hanlon K.A., Huschtscha L.I., Hart D., Paraskeva C.** (1993): Sodium-butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a p53-dependent pathway - Implications for the possible role of dietary fiber in the prevention of large-bowel cancer. *Int. J. Cancer* 55, 498-505.
- Hakomori S.I.** (1964): Rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* 55, 205-208.
- Harris P.J., Ferguson L.R.** (1993): Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 290, 97-110.
- Harris P.J., Ferguson L.R.** (1999): Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 443, 95-110.

- Harris P.J., Smith B.G.** (2006): Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: Structures, properties and uses in food products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 129-143.
- Harris P.J., Triggs C.M., Robertson A.M., Watson M.E., Ferguson L.R.** (1996): The adsorption of heterocyclic aromatic amines by model dietary fibers with contrasting compositions. *Chem.-Biol. Interact.* 100, 13-25.
- Hatfield R.D., Fukushima R.S.** (2005): Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.* 45, 832-839.
- Hatfield R.D., Grabber J.H., Ralph J., Brei K.** (1999): Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: Some cautionary notes. *J. Agric. Food Chem.* 47, 628-632.
- Hatfield R.D., Jung H.J.G., Ralph J., Buxton D.R., Weimer P.J.** (1994): A comparison of the insoluble residues by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* 65, 51-58.
- Hatfield R.D., Ralph J.** (1999): Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. *J. Sci. Food Agric.* 79, 425-427.
- Heerdt B.G., Houston M.A., Augenlicht L.H.** (1994): Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 54, 3288-3294.
- Hijazi M., Velasquez S.M., Jamet E., Estevez J.M., Albenne C.** (2014): An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: Toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Front. Plant Sci.* 5, 395.
- Holtman K.M., Chang H.-M., Jameel H., Kadla J.F.** (2003): Elucidation of lignin structure through degradative methods: Comparison of modified DFRC and thioacidolysis. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3535-3540.
- Holtman K.M., Chang H.M., Kadla J.F.** (2004): Solution-state nuclear magnetic resonance study of the similarities between milled wood lignin and cellulolytic enzyme lignin. *J. Agric. Food Chem.* 52, 720-726.
- Houben K., Jolie R.P., Fraeye I., Van Loey A.M., Hendrickx M.E.** (2011): Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydr. Res.* 346, 1105-1111.
- Hu Z., Yeh T.-F., Chang H.-M., Matsumoto Y., Kadla J.F.** (2006): Elucidation of the structure of cellulolytic enzyme lignin. *Holzforschung* 60, 389-397.
- Ibanez A.B., Bauer S.** (2014): Downscaled method using glass microfiber filters for the determination of Klason lignin and structural carbohydrates. *Biomass Bioenergy* 68, 75-81.
- Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A.** (1990): Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29, 733-737.
- Iiyama K., Wallis A.F.A.** (1990): Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agric.* 51, 145-161.

- Ikeda T., Holtman K.M., Kadla J.F., Chang H.-M., Jameel H.** (2002): Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 50, 129-135.
- Ishii T.** (1997): Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* 127, 111-127.
- Ishii T., Hiroi T.** (1990): Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot. *Carbohydr. Res.* 206, 297-310.
- Ishii T., Hiroi T., Thomas J.R.** (1990): Feruloylated xyloglucan and *p*-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell walls. *Phytochem.* 29, 1999-2003.
- Ishii T., Matsunaga T., Pellerin P., O'Neill M.A., Darvill A., Albersheim P.** (1999): The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 274, 13098-13104.
- Ishii T., Tobita T.** (1993): Structural characterization of feruloyl oligosaccharides from spinach leaf cell walls. *Carbohydr. Res.* 248, 179-190.
- Jacquet G., Pollet B., Lapierre C.** (1995): New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2746-2751.
- Jaramillo S., Rodriguez R., Jimenez A., Guillen R., Fernandez-Bolanos J., Heredia A.** (2007): Effects of storage conditions on the accumulation of ferulic acid derivatives in white asparagus cell walls. *J. Sci. Food Agric.* 87, 286-296.
- Jilek M.L., Bunzel M.** (2013): Dehydrotriferulic and dehydrodiferulic acid profiles of cereal and pseudocereal flours. *Cereal Chem.* 90, 507-514.
- Kamisaka S., Takeda S., Takahashi K., Shibata K.** (1990): Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles - Their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiol. Plant.* 78, 1-7.
- Kang Y.H., Parker C.C., Smith A.C., Waldron K.W.** (2008): Characterization and distribution of phenolics in carrot cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8558-8564.
- Karhunen P., Rummakko P., Sipila J., Brunow G., Kilpelainen I.** (1995a): Dibenzodioxocins; a novel type of linkage in softwood lignins. *Tetrahedron Lett.* 36, 169-170.
- Karhunen P., Rummakko P., Sipila J., Brunow G., Kilpelainen I.** (1995b): The formation of dibenzodioxocin structures by oxidative coupling. A model reaction for lignin biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 36, 4501-4504.
- Khanizadeh S., Buszard D., Zarkadas C.G.** (1995): Misuse of the Kjeldahl method for estimating protein content in plant tissue. *Hortscience* 30, 1341-1342.
- Khanum F., Swamy M.S., Krishna K.R.S., Santhanam K., Viswanathan K.R.** (2000): Dietary fiber content of commonly fresh and cooked vegetables consumed in India. *Plant Foods Hum. Nutr.* 55, 207-218.
- Kim H., Ralph J.** (2005): Simplified preparation of coniferyl and sinapyl alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3693-3695.

- Kim H., Ralph J.** (2010): Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d*₆/pyridine-*d*₅. *Org. Biomol. Chem.* 8, 576-591.
- Kim H., Ralph J.** (2014): A gel-state 2D-NMR method for plant cell wall profiling and analysis: A model study with the amorphous cellulose and xylan from ball-milled cotton linters. *RSC Adv.* 4, 7549-7560.
- Kim H., Ralph J., Akiyama T.** (2008): Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d*₆. *Bioenerg. Res.* 1, 56-66.
- Kolattukudy P.E., Kronman K., Poulou A.J.** (1975): Determination of structure and composition of suberin from roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiol.* 55, 567-573.
- Kontraszti M., Hudson G.J., Englyst H.N.** (1999): Dietary fibre in Hungarian foods measured by the Englyst NSP procedure and the AOAC Prosky procedure: A comparison study. *Food Chem.* 64, 445-450.
- Kroon P.A., Garcia-Conesa M.T., Fillingham I.J., Hazlewood G.P., Williamson G.** (1999): Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food Agric.* 79, 428-434.
- Lan W., Lu F.C., Regner M., Zhu Y.M., Rencoret J., Ralph S.A., Zakai U. I., Morreel K., Boerjan W., Ralph J.** (2015): Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification. *Plant Physiol.* 167, 1284-1295.
- Lange B.M., Lapierre C., Sandermann H.** (1995): Elicitor-induced spruce stress lignin - Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol.* 108, 1277-1287.
- Lapierre C., Monties B., Rolando C.** (1985): Thioacidolysis of lignin - comparison with acidolysis. *J. Wood Chem. Technol.* 5, 277-292.
- Lawoko M., Henriksson G., Gellerstedt G.** (2005): Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules* 6, 3467-3473.
- Leschine S.B.** (1995): Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 399-426.
- Liu C.-J., Miao Y.-C., Zhang K.-W.** (2011): Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. *Molecules* 16, 710-727.
- Lowry J.B., Conlan L.L., Schlink A.C., McSweeney C.S.** (1994): Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.* 65, 41-49.
- Lu F., Ralph J.** (1997a): Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2590-2592.
- Lu F., Ralph J.** (1997b): DFRC method for lignin analysis. 1. New method for β -aryl ether cleavage: Lignin model studies. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4655-4660.
- Lu F., Ralph J.** (1998): The DFRC method for lignin analysis. Part 3. NMR studies. *J. Wood Chem. Technol.* 18, 219-233.

- Lu F.C., Karlen S.D., Regner M., Kim H., Ralph S.A., Sun R.C., Kuroda K., Augustin M.A., Mawson R., Sabarez H., Singh T., Jimenez-Monteon G., Zakaria S., Hill S., Harris P.J., Boerjan W., Wilkerson C.G., Mansfield S.D., Ralph J.** (2015): Naturally *p*-hydroxybenzoylated lignins in palms. *BioEnergy Res.* 8, 934-952.
- Lu F.C., Ralph J.** (1999): Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1988-1992.
- Lu F.C., Ralph J.** (2002): Preliminary evidence for sinapyl acetate as a lignin monomer in kenaf. *Chem. Commun.*, 90-91.
- Lu F.C., Ralph J.** (2008): Novel tetrahydrofuran structures derived from β - β -coupling reactions involving sinapyl acetate in Kenaf lignins. *Org. Biomol. Chem.* 6, 3681-3694.
- Mackie W., Preston R.D.** (1968): Occurrence of mannan microfibrils in green algae *Codium fragile* and *Acetabularia crenulata*. *Planta* 79, 249-253.
- Mansfield S.D., Kim H., Lu F., Ralph J.** (2012): Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR. *Nat. Protoc.* 7, 1579-1589.
- Massiot P., Rouau X., Thibault J.F.** (1988a): Structural study of the cell-wall of carrot (*Daucus carota* L.). 1. Isolation and characterization of the cell-wall fibers of carrot. *Carbohydr. Res.* 172, 217-227.
- Massiot P., Rouau X., Thibault J.F.** (1988b): Structural study of the cell wall of carrot (*Daucus carota* L.). 2. Characterization of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of carrot. *Carbohydr. Res.* 172, 229-242.
- Mathew S., Abraham T.E.** (2004): Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 59-83.
- McCleary B.V., DeVries J.W., Rader J.I., Cohen G., Prosky L., Mugford D.C., Champ M., Okuma K.** (2010): Determination of total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 93, 221-233.
- McCleary B.V., Sloane N., Draga A.** (2015): Determination of total dietary fibre and available carbohydrates: A rapid integrated procedure that simulates *in vivo* digestion. *Starch/Stärke* 67, 860-883.
- McCleary B.V., Sloane N., Draga A., Lazewska I.** (2013): Measurement of total dietary fiber using AOAC method 2009.01 (AACC International Approved Method 32-45.01): Evaluation and updates. *Cereal Chem.* 90, 396-414.
- McDougall G.J., Morrison I.M., Stewart D., Hillman J.R.** (1996): Plant cell walls as dietary fibre: Range, structure, processing and function. *J. Sci. Food Agric.* 70, 133-150.
- McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P.** (1984): Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
- Melton L.D., Smith B.G., Ibrahim R., Schroeder R.** (2009): Mannans in primary and secondary plant cell walls. *N. Z. J. For. Sci.* 39, 153-160.
- Mohnen D.** (2008): Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266-277.

- Mueller S., Jardine W.G., Evans B.W., Vietor R.J., Snape C.E., Jarvis M.C.** (2003): Cell wall composition of vascular and parenchyma tissues in broccoli stems. *J. Sci. Food Agric.* 83, 1289-1292.
- Ng A., Parr A.J., Ingham L.M., Rigby N.M., Waldron K.W.** (1998): Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* cv. Armstrong) during maturation and storage. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2933-2939.
- Nguema-Ona E., Vre-Gibouin M., Gotte M., Plancot B., Lerouge P., Bardor M., Driouch A.** (2014): Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Front. Plant Sci.* 5, 1-12.
- Nunez A., Fishman M.L., Fortis L.L., Cooke P.H., Hotchkiss A.T.** (2009): Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10951-10958.
- Obel N., Porchia A.C., Scheller H.V.** (2002): Dynamic changes in cell wall polysaccharides during wheat seedling development. *Phytochemistry* 60, 603-610.
- Pan G.X., Bolton J.L., Leary G.J.** (1998): Determination of ferulic and *p*-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5283-5288.
- Park Y.B., Cosgrove D.J.** (2015): Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol.* 56, 180-194.
- Parr A.J., Ng A., Waldron K.W.** (1997): Ester-linked phenolic components of carrot cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2468-2471.
- Pena M.J., Carpita N.C.** (2004): Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiology* 135, 1305-1313.
- Peng J., Lu F., Ralph J.** (1998): The DFRC method for lignin analysis. Part 4. Lignin dimers isolated from DFRC-degraded loblolly pine wood. *J. Agric. Food Chem.* 46, 553-560.
- Pettolino F.A., Walsh C., Fincher G.B., Bacic A.** (2012): Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nat. Protoc.* 7, 1590-1607.
- Piber M., Koehler P.** (2005): Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: Evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5276-5284.
- Plaami S.P.** (1997): Content of dietary fiber in foods and its physiological effects. *Food Rev. Int.* 13, 29-76.
- Powell D.A., Morris E.R., Gidley M.J., Rees D.A.** (1982): Conformations and interactions of pectins II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J. Mol. Biol.* 155, 517-531.
- Prajapati V.D., Jani G.K., Moradiya N.G., Randeria N.P., Nagar B.J., Naikwadi N.N., Variya B.C.** (2013): Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 83-92.
- Prasanna V., Prabha T.N., Tharanathan R.N.** (2007): Fruit ripening phenomena - An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 1-19.

- Quideau S., Ralph J.** (1992): Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and *p*-coumaryl alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1108-1110.
- Quideau S., Ralph J.** (1997): Lignin-ferulate cross-links in grasses. 4. Incorporation of 5-5-coupled dehydrodiferulate into synthetic lignin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2351-2358.
- Ralph J.** (2010): Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.* 9, 65-83.
- Ralph J., Akiyama T., Coleman H.D., Mansfield S.D.** (2012): Effects on lignin structure of coumarate 3-hydroxylase downregulation in poplar. *BioEnergy Res.* 5, 1009-1019.
- Ralph J., Akiyama T., Kim H., Lu F.C., Schatz P.F., Marita J.M., Ralph S.A., Reddy M.S.S., Chen F., Dixon R.A.** (2006): Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure. *J. Biol. Chem.* 281, 8843-8853.
- Ralph J., Bunzel M., Marita J.M., Hatfield R.D., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Grabber J.H., Steinhart H.** (2004a): Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* 3, 79-96.
- Ralph J., Grabber J.H., Hatfield R.D.** (1995): Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* 275, 167-178.
- Ralph J., Hatfield R.D., Piquemal J., Yahiaoui N., Pean M., Lapierre C., Boudet A.M.** (1998a): NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95, 12803-12808.
- Ralph J., Hatfield R.D., Quideau S., Helm R.F., Grabber J.H., Jung H.-J.G.** (1994): Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 9448-9456.
- Ralph J., Helm R.F., Quideau S., Hatfield R.D.** (1992): Lignin feruloyl ester cross-links in grasses. 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2961-2969.
- Ralph J., Kim H., Peng J.P., Lu F. C.** (1999): Arylpropane-1,3-diols in lignins from normal and CAD-deficient pines. *Org. Lett.* 1, 323-326.
- Ralph J., Landucci L.L.** (2010): NMR of lignins, CRC Press, 137-244.
- Ralph J., Lapierre C., Lu F., Marita J.M., Pilate G., van Doorselaere J., Boerjan W., Jouanin L.** (2001a): NMR evidence for benzodioxane structures resulting from incorporation of 5-hydroxyconiferyl alcohol into lignins of O-methyltransferase-deficient poplars. *J. Agric. Food Chem.* 49, 86-91.
- Ralph J., Lapierre C., Marita J.M., Kim H., Lu F., Hatfield R.D., Ralph S.A., Chapple C., Franke R., Hemm M.R., Van Doorselaere J., Sederoff R.R., O'Malley D.M., Scott J.T., MacKay J.J., Yahiaoui N., Boudet A.M., Pean M., Pilate G., Jouanin L., Boerjan W.** (2001b): Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* 57, 993-1003.
- Ralph J., Lu F.C.** (1998): The DFRC method for lignin analysis. 6. A simple modification for identifying natural acetates on lignins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4616-4619.

- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H., Boerjan W.** (2004b): Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.* 3, 29-60.
- Ralph J., Peng J.P., Lu F.C.** (1998b): Isochroman structures in lignin: A new beta-1 pathway. *Tetrahedron Lett.* 39, 4963-4964.
- Ralph S.A., Ralph J., Landucci L.L.** (2009). NMR database of lignin and cell wall model compounds. https://www.glbrc.org/databases_and_software/nmrdatabase/; Accessed: 29/07/2015.
- Redondo-Cuenca A., Villanueva-Suarez M.J., Rodriguez-Sevilla M.D., Heredia-Moreno A.** (1997): Changes in insoluble and soluble dietary fiber of white asparagus (*Asparagus officinalis* L.) during different conditions of storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3228-3232.
- Rencoret J., Gutierrez A., Nieto L., Jimenez-Barbero J., Faulds C.B., Kim H., Ralph J., Martinez A.T., del Rio J.C.** (2011): Lignin composition and structure in young versus adult *Eucalyptus globulus* plants. *Plant Physiol.* 155, 667-682.
- Rencoret J., Ralph J., Marques G., Gutierrez A., Martinez A.T., del Rio J.C.** (2013): Structural characterization of lignin isolated from coconut (*cocos nucifera*) coir fibers. *J. Agric. Food Chem.* 61, 2434-2445.
- Rennie E.A., Scheller H.V.** (2014): Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 100-107.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D.A.** (2001): Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929-967.
- Rodriguez-Arcos R.C., Smith A.C., Waldron K.W.** (2002): Effect of storage on wall-bound phenolics in green asparagus. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3197-3203.
- Rodriguez-Arcos R.C., Smith A.C., Waldron K.W.** (2004): Ferulic acid cross-links in asparagus cell walls in relation to texture. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4740-4750.
- Rodriguez-Gacio M.D.C., Iglesias-Fernandez R., Carbonero P., Matilla A.J.** (2012): Softening-up mannan-rich cell walls. *J. Exp. Bot.* 63, 3975-3988.
- Rodriguez R., Jaramillo S., Guillen R., Jimenez A., Fernandez-Bolanos J., Heredia A.** (2005): Cell wall phenolics of white and green asparagus. *J. Sci. Food Agric.* 85, 971-978.
- Rodriguez R., Jimenez A., Guillen R., Heredia A., Fernandez-Bolanos J.** (1999a): Postharvest changes in white asparagus cell wall during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3551-3557.
- Rodriguez R., Jimenez A., Guillen R., Heredia A., Fernandez-Bolanos J.** (1999b): Turnover of white asparagus cell wall polysaccharides during postharvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4525-4531.
- Saeman J.F., Bubl J.L., Harris E.E.** (1945): Quantitative saccharification of wood and cellulose. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 17, 35-37.
- Santiago R., Malvar R.A.** (2010): Role of dehydrodiferulates in maize resistance to pests and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 691-703.

- Schäfer J., Urvat F., Rund K., Bunzel M.** (2015): A stable-isotope dilution GC-MS approach for the analysis of DFRC (derivatization followed by reductive cleavage) monomers from low-lignin plant materials. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2668-2673.
- Schnitzler J.P., Seitz H.U.** (1989): Rapid responses of cultured carrot cells and protoplasts to an elicitor from the cell wall of *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. *Z. Naturforsch. C* 44, 1020-1028.
- Selvendran R.R.** (1984): The plant cell wall as a source of dietary fiber: chemistry and structure. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 320-337.
- Sibout R., Hofte H.** (2012): Plant cell biology: The ABC of monolignol transport. *Curr. Biol.* 22, R533-R535.
- Slavin J.** (2013): Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417-1435.
- Slavin J.L., Brauer P.M., Marlett J.A.** (1981): Neutral detergent fiber, hemicellulose and cellulose digestibility in human subjects. *J. Nutr.* 111, 287-297.
- Stevens B.J.H., Selvendran R.R.** (1984): Structural features of cell wall polysaccharides of the carrot *daucus carota*. *Carbohydr. Res.* 128, 321-333.
- Superko H.R., Haskell W.L., Sawreykubicek L., Farquhar J.W.** (1988): Effects of solid and liquid guar gum on plasma cholesterol and triglyceride concentrations in moderate hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* 62, 51-55.
- Sweet D.P., Shapiro R.H., Albersheim P.** (1975): Quantitative analysis by various GLC response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* 40, 217-225.
- Tan L., Eberhard S., Pattathil S., Warder C., Glushka J., Yuan C.H., Hao Z.Y., Zhu X., Avci U., Miller J.S., Baldwin D., Pham C., Orlando R., Darvill A., Hahn M.G., Kieliszewski M. J., Mohnen D.** (2013): An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell* 25, 270-287.
- Tateishi A.** (2008): β -Galactosidase and α -L-arabinofuranosidase in cell wall modification related with fruit development and softening. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 77, 329-340.
- Theander O., Aman P., Westerlund E., Andersson R., Petersson D.** (1995): Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason Lignin (The Uppsala method): Collaborative study. *J. AOAC Int.* 78, 1030-1044.
- Theander O., Westerlund E.A.** (1986): Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 34, 330-336.
- Theuwissen E., Mensink R.P.** (2008): Water soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol. Behav.* 94, 285-292.
- Tuomivaara S.T., Yaoi K., O'Neill M.A., York W.S.** (2015): Generation and structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides, including an update on xyloglucan nomenclature. *Carbohydr. Res.* 402, 56-66.
















- Turesky R.J., Le Marchand L.** (2011): Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: Lessons learned from aromatic amines. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1169-1214.
- Turner P.R., Tuomilehto J., Happonen P., Laville A.E., Shaikh M., Lewis B.** (1990): Metabolic studies on the hypolipemic effect of guar gum. *Atherosclerosis* 81, 145-150.
- Van Buren J.P.** (1979): The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Texture Stud.* 10, 1-23.
- Van Soest P.J.** (1963): Use of detergents in analysis of fibrous feeds. 2. A Rapid method for determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46, 829-835.
- Van Soest P.J., Wine R.H.** (1968): Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51, 780-785.
- Vance C.P., Kirk T.K., Sherwood R.T.** (1980): Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 259-288.
- Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W.** (2010): Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 153, 895-905.
- Vega-Sanchez M.E., Verhertbruggen Y., Scheller H.V., Ronald P.C.** (2013): Abundance of mixed linkage glucan in mature tissues and secondary cell walls of grasses. *Plant Signaling Behav.* 8, 1-4.
- Villanueva-Suarez M.J., Redondo-Cuenca A., Rodriguez-Sevilla M.D., Heredia-Moreno A.** (1999): Postharvest storage of white asparagus (*Asparagus officinalis* L.): Changes in dietary fiber (nonstarch polysaccharides). *J. Agric. Food Chem.* 47, 3832-3836.
- Villanueva-Suarez M.J., Redondo-Cuenca A., Rodriguez-Sevilla M.D., Martinez M.D.** (2003): Characterization of nonstarch polysaccharides content from different edible organs of some vegetables, determined by GC and HPLC: Comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5950-5955.
- Vince A.J., Burrige S.M.** (1980): Ammonia production by intestinal bacteria - the effects of lactose, lactulose and glucose. *J. Med. Microbiol.* 13, 177-191.
- Vince A.J., McNeil N.I., Wager J.D., Wrong O.M.** (1990): The effect of lactulose, pectin, arabinogalactan and cellulose on the production of organic acids and metabolism of ammonia by intestinal bacteria in a fecal incubation system. *Br. J. Nutr.* 63, 17-26.
- Vincken J.P., Schols H.A., Oomen R.J.F.J., McCann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G.J., Visser R.G.F.** (2003): If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132, 1781-1789.
- Vismeh R., Lu F.C., Chundawat S.P.S., Humpula J.F., Azarpira A., Balan V., Dale B.E., Ralph J., Jones A.D.** (2013): Profiling of diferulates (plant cell wall cross-linkers) using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst* 138, 6683-6692.
- Vogel J.** (2008): Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Op. Plant Biol.* 11, 301-307.
- Voragen A.G.J., Coenen G.J., Verhoef R.P., Schols H.A.** (2009): Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* 20, 263-275.





















- Wakabayashi K.** (2000): Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *J. Plant Res.* 113, 231-237.
- Waldron K., Selvendran R.R.** (1992): Cell wall changes in immature asparagus stem after excision. *Phytochemistry* 31, 1931-1940.
- Waldron K.W., Parker M.L., Smith A.C.** (2003): Plant cell walls and food quality. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 2, 128-146.
- Waldron K.W., Parr A.J., Ng A., Ralph J.** (1996): Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem. Anal.* 7, 305-312.
- Waldron K.W., Selvendran R.R.** (1990a): Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues. *Physiol. Plant.* 80, 568-575.
- Waldron K.W., Selvendran R.R.** (1990b): Effect of maturation and storage on asparagus (*Asparagus officinalis*) cell wall composition. *Physiol. Plant.* 80, 576-583.
- Wefers D., Gmeiner B.M., Tyl C.E., Bunzel M.** (2015a): Characterization of diferuloylated pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* WILLD.). *Phytochemistry* 116, 320-328.
- Wefers D., Tyl C.E., Bunzel M.** (2015b): Neutral pectin side chains of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) contain long, partially branched arabinans and short galactans, both with terminal arabinopyranoses. *J. Agric. Food Chem.* 63, 707-715.
- Willfor S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnakki 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. Crops Prod.* 29, 571-580.
- Willis R.B., Montgomery M.E., Allen P.R.** (1996): Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1804-1807.
- Wright R.S., Anderson J.W., Bridges S.R.** (1990): Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 26-29.
- Wu S., Argyropoulos D.S.** (2003): An improved method for isolating lignin in high yield and purity. *J. Pulp Paper Sci.* 29, 235-240.
- Yan C.C., Yin M., Zhang N., Jin Q., Fang Z., Lin Y., Cai Y.P.** (2014): Stone cell distribution and lignin structure in various pear varieties. *Sci. Hort.* 174, 142-150.
- You T.-T., Mao J.-Z., Yuan T.-Q., Wen J.-L., Xu F.** (2013): Structural elucidation of the lignins from stems and foliage of *Arundo donax* Linn. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5361-5370.
- Zhang L., Gellerstedt G.** (2001): NMR observation of a new lignin structure, a spiro-dienone. *Chem. Commun.*, 2744-2745.
- Zhang L.M., Gellerstedt G., Ralph J., Lu F.C.** (2006): NMR studies on the occurrence of spirodienone structures in lignins. *J. Wood Chem. Technol.* 26, 65-79.










Zhang L.M., Henriksson G., Gellerstedt G. (2003): The formation of β - β structures in lignin biosynthesis - are there two different pathways? *Org. Biomol. Chem.* 1, 3621-3624.




















7 Chemikalien und Instrumente





7.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller (Reinheit)	H- und P-Sätze
Aceton Aceton- d_6	VWR (HPLC-Grade) VWR (99,8% D)	  H225, H319, H336, EUH066 P210, P280, P305+P351+P338
Acetonitril	VWR (LC-MS-Grade)	  H225, H332, H302, H312, H319 P210, P305+P351+P338, P403+P235
Acetylbromid	Sigma (99%)	 H290, H314, H340, EUH014 P280, P310, P301+P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338
Acetylchlorid	Fluka ($\geq 99\%$)	  H225, H314 P210, P305+P351+P338, P310, EUH014
Amberlite FPA53 (OH ⁻)	Megazyme	
Ambersep 200 (H ⁺)	Megazyme	
Ameisensäure	Merck ($\geq 98\%$)	  H226, H314 P280, P305+P351+P338, P310
Ammoniak-Lösung	Merck (25%)	   H314, H335, H400 P261, P273, P280, P305+P351+P338, P310
Ammoniumchlorid	Roth ($\geq 95\%$)	 H302, H319 P305+P351+P338
D-Apiose	Sigma ($\geq 99,9$)	
L-Arabinose	Sigma ($\geq 99\%$)	
Borhydridaustauscherharz	Sigma (2,5-5,0 mm BH ₄ ⁻ /g)	 H315, H319, H335 P261, P305+P351+P338
Calciumchlorid Dihydrat	Roth (>99%)	
Celite 545	Roth	
Coniferaldehyd	Sigma (98%)	 H315, H319, H335 P261, P305+P351+P338

<i>para</i> -Cumarsäure	Fluka (≥98%)	 H315, H319, H335 P261+P351+P338
Dichlormethan	VWR	 H351 P201, P281, P308+P313
Diethylether	VWR (100%)	  H224, H302, H336 P210, P243, P301+P312, P303+P361+P353, P304+P340, P403+P233, EUH019, EUH066
Diisobutylaluminiumhydrid	Sigma (1 M in Toluol)	  H225, H250, H261, H304, H314, H336, H361d, H373 P210, P222, P231+P232, P261, P280, P422
Dimethylsulfoxid	Roth (99,8%)	
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (≥99%)	
1,4-Dioxan	VWR (≥99,8)	   H225, H315, H319, H335, EUH019, EUH066 P201, P210, P243, P281, P309+P311, P304+P340, P305+P351+P338
Essigsäure, konzentriert	Roth (≥99,8%)	  H226, H314 P280, P305+P351+P338, P310
Essigsäureanhydrid Essigsäureanhydrid- <i>d</i> ₆	Roth (≥99%) Sigma (99% D)	  H226, H302, H314, H332 P280, P305+P351+P338, P310
Ethanol	VWR (99%)	 H225 P210
Ethylacetat	Roth (≥99,5%)	  EUH066, H225, H319, H336 P210, P243, P261, P280, P305+P351+P338, P403, P233
L-Fucose	Alfa Aesar (≥99%)	
D-Galactose	Sigma (≥99%)	
D-Galacturonsäure Monohydrat	Fluka (≥97%)	
D-Glucose	Sigma (≥99,5%)	
D-Glucuronsäure	Sigma (≥98%)	
n-Hexan	VWR (95%)	   

		H225, H304, H315, H373, H336, H361f, H411 P210, P240, P273, P301+P310, P302+P352, P331, P403,+P235
Hydroxylaminhydrochlorid	Alfa Aesar (99%)	 H290, H302+H312, H315, H317, H319, H351, H373, H410 P280, P305+P351+P338
Kaffeensäure	Fluka (97%)	 H351 P281, P308+P313
Magnesiumsulfat	VWR (99%)	
Maleinsäure	Roth (>99%)	 H302, H315, H319, H317, H335 P280, P301+P312, P304+P340, P305+P351+P338, P332+P313
D-Mannit	Sigma (≥99%)	
D-Mannose	Sigma (≥99%)	
Methanol	VWR (HPLC/LC-MS-Grade)	 H225, H331, H311, H301, H370 P210, P233, P280, P302
Methanolische Salzsäure	Fluka (1,25 M)	 H225, H301+H311+H331, H314, H370 P210, P260, P280, P301+P310, P305+P351+P338, P310
1-Methylimidazol	Sigma (≥99%)	 H302, H312, H314 P280, P305+P351+P338, P310
Methyliodid	VWR (99%)	 H351, H301+H331, H312, H335, H315 P201, P281, P302+P352, P304+ P340, P309+P310
Na ₂ CaEDTA	Lancaster (99%)	 H319 P305+351+338
Natriumacetat	Sigma (ReagentPlus ≥99%)	
Natriumbordeuterid	Roth (98% D)	 H260, H301, H311, H314 P223, P231+P232, P280, P301+P310, P370+P378, P422
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Roth (≥99%)	
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haen (99,5%)	

Natriumhydroxid	Roth (≥99%)	 H290, H314 P280, P305+P351+P338, P310
Natriumhypochlorid-Lösung	Roth (12%)	  H314, H400 P273, P280, P305+P351+P338, P310, EUH031
Natriumnitroprussiat Dihydrat	Roth (≥99%)	 H301 P301+P310
Natriumsalicylat	Fluka (≥99%)	 H302, H319 P305+P351+P338
Natriumthiosulfat	Roth (≥99%, p.a.)	
Petrolether	VWR (40-60°C)	    H225, H304, H336, H411, EUH066 P210, P243, P280, P273, P301+P331, P304+P340, P309+P310
Pyridin	VWR (100%)	  H225, H332, H302, H312 P210, P233
D-Raffinose	Supelco	
L-Rhamnose Monohydrat	Sigma (≥99%)	
Salzsäure	VWR (37%)	  H314, H335 P261, P280, P305+P351+P338, P310
Schwefelsäure	VWR (95%)	 H314, H412 P273, P280, P305+P351+P338, P310
Selenreaktionsgemisch	Fluka	 H411 P273
Sinapaldehyd	Sigma (98%)	 H315, H319, H335 P261, P305+P351+P338
D-Sorbitol	Sigma (>99,5%)	
Tetrahydrofuran	VWR (>98%)	   H225, H302+H312+H332, H319, H351, H335 P280, P210, P301+P312, P303+P361+P353, P305+P351+P338,

Trifluoressigsäure	Sigma (≥99%)	P337+P313, EUH019  H314, H332, H412 P273, P280, P305+P351+P338, P310
Trinatriumphosphat Dodecahydrat	Sigma (≥98%)	 H315, H318, H335 P260, P280, P305+P351+P338
Trizma-Base	Sigma (≥99,9%)	 H315, H319, H335 P280, P302+P352, P305+P351+P338
D-Xylose	Sigma (≥99,9%)	
Zinkstaub		 H410 P273, P391, P501

7.2 Enzyme

Enzym	Herkunft/Aktivität	Firma
α-Amylase (Termamyl 120L)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes
α-Amylase	Schweinepankreas Type VI-B (15 U/mg)	Sigma
Amyloglucosidase (AMG 300 L)	<i>Aspergillus niger</i>	Novozymes
Amyloglucosidase EC 3.2.1.3	<i>Aspergillus niger</i> (3260 U/ml)	Megazymes
Protease (Alcalase 1.5 MG Type FG)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes
Protease EC 3.4.21.14	<i>Bacillus licheniformis</i> (50 /ml)	Megazymes
Driselase	<i>Basidiomyceten</i> sp.	Sigma
<i>endo</i> -1,4-β-D-Galactanase EC 3.2.1.89	<i>Aspergillus niger</i> (1300 U/ml)	Megazyme
<i>endo</i> -1,5-α-L-Arabinanase EC 3.2.1.99	<i>Aspergillus niger</i> (200 U/ml)	Megazyme

7.3 Instrumente

LC-MS (Waters)

Hersteller	Waters
Pumpe, Autosampler	Waters 2690, Separation Module
Säulenofen	Beckman coulter
DAD-Detektor	Waters 996
Massenspektrometer	Micromass, Quattro micro

GC-MS/GC-FID

Hersteller	Shimadzu
Gaschromatograph	GC-2010 Plus
Autosampler	AOC-20i Auto Injector
Detektor	GC-MS QP 2010 SE GC-FID

HPAEC-PAD

Hersteller	Thermo Scientific
Gerätebezeichnung	Dionex ICS-5000 System
Pumpe	Dionex IC-5000 DP
Autosampler	AS-AP
Detektor	PAD, Dionex ICS-5000 DC

HPLC-DAD

Hersteller	Shimadzu
Communication Modul	CBM-20A
Säulenofen	CTO-20AC
Pumpe	LC-20AT
Autosampler	SIL-20AC
Detektor	DAD, SP-M20A

HPLC-RI

Hersteller	Merck, Hitachi
Interface	D-7000
Pumpe	L-7100
Autosampler	L-7200
Detektor	RI-Detektor 2300, Knauer

NMR

Hersteller	Bruker
Gerätebezeichnung	Ascend 500 MHz
Probenkopf	CryoProbe Prodigy

Kugelmühle

Hersteller	Retsch
Gerätebezeichnung	Planeten-Kugelmühle PM100
Material Becher, Kugel	Zirkoniumdioxid

UV/vis Spektrophotometer

Hersteller	Jasco
Gerätebezeichnung	V-550

8 Arbeitsvorschriften

8.1 Präparative Ballaststoffisolierung

- Einwaage von 15 g Mehl und Zugabe von 200 ml Natriumphosphatpuffer (0,08 M, pH 6,2)
- Zugabe von 1,5 ml thermostabiler α -Amylase (Termamyl 120 L, Novozymes)
- Inkubation für 20 min bei 92°C, den Kolben dabei alle 5 min schwenken
- Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur in Eis und Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 mit 0,275 M NaOH
- Zugabe von 1,12 g Protease (Alcalase 1.5 MG Type FG, Novozymes)
- Inkubation für 30 min bei 60°C unter ständigem Schütteln
- Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur in Eis und Einstellen des pH-Wertes auf 4,5 mittels 0,325 M HCl
- Zugabe von 700 μ l Amyloglucosidase (AMG 300 L, Novozymes)
- Inkubation für 30 min bei 60°C unter ständigem Schütteln
- Zentrifugieren der warmen Lösung (Überstand enthält LBS)
- Waschen des Rückstands mit 2x 100 ml und 1x 50 ml 60°C warmen H₂O (Überstand mit zuvor erhaltenem Überstand vereinigen)
- Waschen des Rückstandes mit 1x 100 ml und 1x 50 ml 99%-igem Ethanol waschen
- Waschen des Rückstandes mit 1x 100 ml und 1x 50 ml Aceton
- Rückstand bei 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen
- Die getrockneten UBS in eine Soxhlehülse geben und anschließend jeweils je 6 h mit Ethanol, Ethylacetat und n-Hexan in einer Soxhletapparatur extrahieren und anschließend bei 40°C im Vakuumtrockenschrank erneut trocknen
- Ausfällen der LBS durch Zugabe der vierfachen Menge an 99%-igem Ethanol zu den vereinigten wässrigen Überständen (Präzipitatbildung über Nacht)
- Überstand abgießen, Rest der Lösung abzentrifugieren
- Waschen des Rückstandes mit 1x 100 ml und 1x 50 ml 78%-igem Ethanol
- Waschen des Rückstandes mit 1x 100 ml und 1x 50 ml 99%-igem Ethanol
- Waschen des Rückstandes mit 1x 100 ml und 1x 50 ml Aceton
- Rückstand bei 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen

8.2 Analytische Ballaststoffbestimmung

- 1 g Mehl mit 1 ml Ethanol (99%) und 40 ml Natriummaleatpuffer (50 mM, pH 6,0, enthält 2 mM CaCl₂)
Natriummaleatpuffer: enthält Pankreas- α -Amylase (50 U/ml, Sigma) und Amyloglucosidase (3,4 U/ml, Megazyme)
- 16 h bei 37°C unter Rühren inkubieren
- Mit 0,75 M Trizma-Base pH 8,2 einstellen
- 20 min bei > 90°C inkubieren (Wasserbad 95 °C)
- Zugabe von 0,1 ml Protease (50 mg/ml, Megazyme)
- Inkubation der Lösung für 30 min bei 60°C
- Mit 2 M Essigsäure pH 4,3 einstellen
- Bei Bestimmung der NMLBS: Zugabe von 10 ml Sorbitol-Lösung (10 mg/ml)
- Lösung über zuvor gewogene Tiegelfilter mit Celite abfiltrieren
- Rückstandes mit 2x 25 ml und 1x 10 ml 60°C warmen H₂O waschen
- Wässrige Filtrate vereinigen (enthalten LBS)
- Rückstand mit 2x 25 ml 99%-igem Ethanol 2x 25 ml Aceton waschen
- Rückstand im Tiegel über Nacht bei 105°C trocknen
- Ausfällen der LBS durch Zugabe der vierfachen Menge an 99%-igem Ethanol zu den vereinigten wässrigen Überständen (Präzipitatbildung über Nacht)
- Lösung über zuvor gewogene Tiegelfilter mit Celite abfiltrieren
- Rückstand mit 2x 25 ml und 1x 10 ml 78%-igem Ethanol waschen
- Die erhaltenen Filtrate ggf. aufbewahren (enthalten NMLBS)
- Rückstand mit 2x 25 ml 99%-igem Ethanol und 2x 25 ml Aceton waschen
- Rückstand im Tiegel über Nacht bei 105°C trocknen

NMLBS (nur bei Spargel)

- Filtrate nach der Filtration der LBS und nach dem Waschschrift mit 78%-igem Ethanol am Rotationsverdampfer eindampfen
- Rückstand quantitativ in 25 ml aufnehmen
- Davon 10 ml auf einen zuvor präparierten Ionenaustauscher geben und mit 40 ml bi-dest. H₂O eluieren
Ionenaustauscher: 5 g Amberlite FPA53 (OH⁻) und 5 g Ambersep 200 (H⁺) mischen, in eine SPE-Kartusche geben und mit bi-dest. H₂O waschen
- Eluat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eindampfen und quantitativ in 2 ml bi-dest. H₂O aufnehmen

- Lösung durch PTFE-Spritzenfilter (0,45 µm) filtrieren und zur Analyse mittels HPLC-RI verwenden (Injektionsvolumen 50 µl)
- Quantifizierung: Kalibrierung mit 0,5-20 mg/ml Glucose-Lösungen (enthalten je 20 mg/ml Sorbitol als interne Standardsubstanz)
- HPLC-Parameter zur Bestimmung der NMLBS:

Säule:	Sugar Pak (Waters), 300 x 8 mm, 10 µm
Säulenofen:	80°C
Eluent:	Na ₂ CaEDTA (50 mg/ml)
Flussrate:	0,5 ml/min (isokratisch)
Detektion	RI-Detektor

8.3 Bestimmung des Restaschegehaltes

- Proben werden bei 520°C im Muffelofen 5 h lang verascht
 - präparativ gewonnene UBS/LBS: Einwaage 100-200 mg
 - analytisch gewonnene UBS/LBS: Veraschung des Tiegels
 - Klason-Lignin: Veraschung des Rückstandes (mit Filter)

8.4 Bestimmung des Restproteingehaltes

- Proben in Kjeldahl-Aufschlusskolben geben, Glasperlen dazugeben
 - präparativ gewonnene UBS/LBS: 100 mg Einwaage
 - analytisch gewonnene UBS/LBS: kompletter Rückstand (mit Celite)
 - Klason-Lignin: Rückstand mit Filter (stickstofffrei)
- Zugabe von 500 mg Selenreaktionsgemisch und 5 ml konzentrierte H₂SO₄
- Aufschluss der Proben für 1-1,5 h auf einem Heizblock
- Lösung abkühlen lassen, 10 ml bidest. H₂O dazugeben und quantitativ in einen 50 ml Messkolben überführen
- In ein Reagenzglas mit Schraubdeckel 0,1 ml Probe (eventuell zuvor zentrifugieren und/oder verdünnen) und 4 ml Farbreagenz geben (vortexen)
 - Farbreagenz: 3,2 g Natriumsalicylat + 18,5 g Trinatriumphosphat Dodecahydrat + 0,05 g Natriumnitoprussiat in 100 ml H₂O lösen
- Zugabe von 1 ml 0,25%-iger Natriumhypochloridlösung (vortexen)
- Nach 10 min die Extinktion bei 685 nm messen
- Die Durchführung ist für die Kalibrierlösungen analog zur Probe
 - Kalibrierung mit Ammoniumchloridlösungen (6-44 mg N/l)
- Ebenso wird ein Blindwert (0,1 ml Probe durch bidest. H₂O ersetzen) durchgeführt

8.5 Monosaccharidanalyse

H₂SO₄-Hydrolyse

- Einwaage von 100 mg UBS in ein Pyrexglas, Glasperlen dazu
- Zugabe von 1,5 ml 12 M H₂SO₄, vortexen
- 30 min im Eisbad stehen lassen, dabei alle 10 Minuten vortexen
- Anschließend 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei alle 30 min vortexen
- Zugabe von 9,75 ml H₂O
- Hydrolyse für 3 h bei 100°C im Trockenschrank
- Abkühlen und 2 ml durch PTFE Spritzenfilter (0,45 µm) filtrieren

Alternativ: Filtrat der Klason-Ligninbestimmung verwenden

- 100 µl Filtrat mit 75 µl 4 M NaOH und 825 µl H₂O versetzen
- 20 µl Probelösung mit 20 µl 1 mM Mannit (zur Kontrolle der Messung) und 360 µl bidest. H₂O versetzen (Verdünnung je nach Probe anpassen)
- Injektionsvolumen HPAEC: 25 µl

Methanolyse

- Einwaage von 10-25 mg UBS in 3,5 ml GC-Vial
- Zugabe von 2 ml 1,25 M methanolischer HCl, 16 h bei 80°C behandeln
- Abkühlen, 40 µl in kleines GC-Vial pipettieren und im Evaporator zur Trockne eindampfen
- Zugabe von 500 µl 2 M TFA-Lösung, 1 h bei 121°C hydrolysieren
- Hydrolysat im Evaporator bis zur Trockne eindampfen (2x je 200 µl Ethanol dazugeben und erneut zur Trockne eindampfen)
- Rückstand in 180 µl bidest. H₂O aufnehmen und 20 µl 1 mM Mannit dazugeben (Verdünnung je nach Probe anpassen)
- Injektionsvolumen HPAEC: 25 µl

HPAEC-Bedingungen

Säule: CarboPac PA-20
Detektion: PAD (Elektrode: AgCl)
Fluss: 0,4 ml/min
Eluent: A: bidest H₂O
B: 0,1 M NaOH
C: 0,1 M NaOH + 0,2 M NaOAc

Tabelle 23: Gradientenprogramme zur Analyse der Monosaccharide mittels Hochleistungs-anionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischer Detektion.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
Trennung der Monosaccharide			
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	90	10	0
0	90	10	0
1,5	96	4	0
22,0	96	4	0
32,0	0	100	0
32,1	0	0	100
42,0	0	0	100
Trennung Xylose und Mannose			
-20,0	0	100	0
-10,0	0	100	0
-9,9	96	4	0
25,0	96	4	0
25,1	0	0	100
40,0	0	0	100

8.6 Methylierungsanalyse

Methylierung

- 5 mg Probenmaterial in ein Pyrexglas einwiegen
- Zugabe von 2 ml DMSO, 15 min im Ultraschallbad behandeln, über Nacht quellen lassen und nochmals 15 min im Ultraschallbad behandeln
- Zugabe von etwa 100 mg frisch unter Stickstoff gemörsertes NaOH
- 90 min im Ultraschallbad und 90 min bei Raumtemperatur reagieren lassen
- 1 ml Methyljodid zugeben, 30 min im Ultraschallbad und 30 min bei Raumtemperatur reagieren lassen
- Zugabe von 3 ml Dichlormethan und 5 ml 0,1 M Natriumthiosulfatlösung, vortexen
- Obere Phase abnehmen und untere Phase 2x mit H₂O waschen
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, Rückstand unter Stickstoff vollständig trocknen
- Über Nacht bei 40°C im Vakuumtrockenschrank trocknen
- Methylierungsschritt wiederholen

Hydrolyse/Reduktion/Derivatisierung

- Zugabe von 2 ml 2 M TFA und 90 min bei 121°C hydrolysieren
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, Rückstand unter Stickstoff vollständig trocknen
- 20 mg Natriumborodeuterid in 0,3 ml Ammoniak (2 M) hinzugeben und 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zum Abbruch der Reaktion 100 µl Eisessig zugeben
- Unter Eiskühlung 450 µl 1-Methylimidazol und 3 ml Essigsäureanhydrid zugeben und 30 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Unter Eiskühlung 3 ml H₂O zugeben, abkühlen und mit 5 ml Dichlormethan extrahieren
- Organische Phase 3x mit H₂O waschen
- Restwasser im Gefrierschrank (-18°C) über Nacht ausfrieren
- GC-Analyse der organischen Phase

GC-MS/GC-FID Analyse

Säule:	GC-MS: DB-225MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm GC-FID: DB-225, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm
Trärgas:	Helium
Injektion:	GC-MS: Split 30:1 GC-FID: Split 10:1
Injektortemperatur:	220°C
Detektion:	MS: Transferline-Temperatur 220°C FID: Temperatur 240°C
Temperaturprogramm	140°C (1 min halten), Heizrate 20°C/min auf 220°C (25 min halten)

8.7 Arabinan- und Galactan-Screening

- 5 mg Probe einwiegen (Eppi)
 - Galactan-Screening: 500 µl H₂O zugeben, 40 min bei 121°C inkubieren
 - Arabinan-Screening: Zugabe von 500 µl bidest. H₂O, Lösung direkt verwenden
- 5 µl Enzymlösung dazugeben
 - Galactan-Screening: endo-Galactanase (100 U/ml)
 - Arabinan-Screening: endo-Arabinanase (20 U/ml)
- Inkubation für 24 h bei 40°C

- Enzyme 5 min im 95°C warmen Wasserbad inaktivieren
- Zentrifugation der Lösungen, Überstand abnehmen
- 105 µl bidest. H₂O vorlegen, 30 µl Überstand und 15 µl 100 µM Raffinoselösung (Endkonzentration 10 µM) zugeben
- Injektionsvolumen von 25 µl für HPAEC-Analyse verwenden

HPAEC-Bedingungen

- Säule: CarboPac PA-200
- Detektion: PAD (Elektrode: AgCl)
- Fluss: 0,45 ml/min
- Eluent: A: bidest H₂O
B: 0,1 M NaOH
C: 0,1 M NaOH + 0,5 M NaOAc

Tabelle 24: Gradientenprogramme zur Analyse der Arabino- und Galactooligosaccharide mittels Hochleistungsanionenaustauschchromatographie und gepulst amperometrischer Detektion.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
Trennung der Arabinoooligosaccharide			
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0	90	10	0
10,0	50	50	0
60,0	50	30	20
75,0	0	40	60
75,1	0	0	100
90,0	0	0	100
Trennung der Galactooligosaccharide			
-30,0	0	0	100
-20,0	0	0	100
-19,9	90	10	0
0	90	10	0
10,0	90	10	0
20,0	50	50	0
60,0	50	40	10
75,0	50	50	0
80,0	0	0	100
90,0	0	0	100

8.8 Bestimmung des Klason-Ligningehaltes

- 200-250 mg UBS einwiegen
- Zugabe von 7,5 ml 12 M H₂SO₄ unter Eiskühlung und 30 min im Eisbad stehen lassen (dabei alle 5 min rühren)
- 2 h bei Raumtemperatur rühren
- Zugabe von 48,75 ml bidest H₂O und Lösung 3 h bei 100°C hydrolysieren
- Probenhydrolysat nach Abkühlen auf Eis quantitativ über einen Glasfilter (GF/A, Whatman) filtrieren
Filtrat ggf. für Monosaccharidanalyse verwenden
- Rückstand säurefrei waschen (mit etwa 600 ml H₂O)
- Filter anschließend bei 60°C im Trockenschrank trocknen
Je ein Filter mit Rückstand für Asche- bzw. Proteinkorrektur verwenden

8.9 Bestimmung des ABSL-Gehaltes

- 25 mg Driselase-verdaute UBS einwiegen
Driselaseverdau: 1 g UBS mit 60 mg Driselase und 100 ml bidest. H₂O bei 37°C für 48 h inkubieren, Rückstand mit H₂O, Ethanol und Aceton waschen
- Zugabe von 4 ml 25%-iger Acetylbromidlösung in Essigsäure
- Proben 2 h bei 50°C im Wasserbad rühren
- Zugabe von 12 ml Eisessig unter Eiskühlung, zentrifugieren
- 2 ml der Lösung (für den Blindwert 2 ml H₂O), 2,5 ml Eisessig und 1,5 ml 0,3 M NaOH in einen 10 ml Kolben geben, mischen
- Zugabe von 0,5 ml 0,5 M Hydroxylaminhydrochloridlösung, mit Eisessig auf 10 ml auffüllen
- Messung der Probelösungen bei 280 nm
- Zusätzlich Messung des UV-Spektrums bei 200-400 nm (scanning speed 200 nm/min)

8.10 DFRC-Methode

8.10.1 Synthese der Standardsubstanzen

para-Cumarylalkohol

- Ca. 1 g *para*-Cumarsäure in 50 ml Ethanol und 5 ml Acetylchlorid lösen, über Nacht bei Raumtemperatur rühren
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, Reaktion wiederholen

- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, Rückstand in 500 µl Petrol-ether/Ethylacetat (50:50, v/v) umkristallisieren
- Ca. 500 mg des erhaltenen *para*-Cumarsäureethylesters in 30 ml Toluol lösen
- Unter Kühlung im Eiswasserbad und unter Stickstoff langsam 12 ml DIBAL-H (1 M in Toluol) zu tropfen, 1 h rühren
- In Reaktionslösung verbliebenes DIBAL-H durch Zugabe von 5 ml Ethanol quenchen, Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen, Rückstand in 50 ml H₂O aufnehmen
- Wässrige Phase 4x mit je 100 ml Ethylacetat extrahieren und vereinigte organische Phasen über Magnesiumsulfat trocknen
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und Rückstand in Aceton/Petrolether (50:50, v/v) umkristallisieren

Coniferyl- und Sinapylalkohol

- Ca. 200 mg Coniferaldehyd/Sinapaldehyd mit 8 ml Methanol und 900 mg Borhydridaustauscherharz (zuvor mit Methanol gewaschen) für 1 h bei Raumtemperatur rühren
- Gemisch über Glaswolle abfiltrieren und Filtrat am Rotationsverdampfer einengen
- Rückstand in 5 ml Ethylacetat aufnehmen und mittels SPE (Kieselgel, Chromabond, Macherey-Nagel) aufreinigen
SPE-Aufreinigung: Säule mit 5 ml Ethylacetat konditionieren, Probe aufgeben und mit 25 ml Ethylacetat eluieren
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und Rückstand in 9 ml Petrol-ether/Dichlormethan (50:50, v/v) umkristallisieren

Monolignol-Diacetate (-d₆)

- *para*-Hydroxymethylalkohole (*para*-Cumarylalkohol 162 mg, Coniferylalkohol 189 mg, Sinapylalkohol 216 mg) in ca. 3,2 ml Pyridin und 3,3 ml Essigsäureanhydrid (-d₆) lösen und 40 min bei Raumtemperatur rühren
- Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen (Coevaporation mit Ethanol) und Rückstand über Nacht gefriertrocknen
- ¹H-NMR Daten der sechsfach deuterierten Diacetate:
HDiAc-d₆: δ [ppm]: δ 7,50 (d, 2H, J=8,6 Hz, H₂/H₆), 7,10 (d, 2H, J=8,7 Hz, H₃/H₅), 6,71 (d, 1H, J=16,0 Hz, H_α), 6,35 (dt, 1H, J=16,0, 6,2 Hz, H_β), 4,69 (dd, 2H, J=6,2, 1,4 Hz, H_γ)

GDiAc- d_6 : δ [ppm]: δ 7,23 (s, 1H, H2), 7,02 (m, 2H, H5/H6), 6,69 (dt, 1H, $J=15,9, 1,3$ Hz, H α), 6,37 (dt, 1H, $J=15,9, 6,2$ Hz, H β), 4,69 (dd, 2H, $J=6,2, 1,4$ Hz, H γ), 3,85 (s, 3H, OCH₃).

SDiAc- d_6 : δ [ppm]: δ 6,85 (s, 2H, H2/H6), 6,67 (dt, 1H, $J=15,9, 1,2$ Hz, H α), 6,39 (dt, 1H, $J=15,9, 6,2$ Hz, H β), 4,69 (dd, 2H, $J=6,2, 1,3$ Hz, H γ), 3,81 (s, 6H, OCH₃).

8.10.2 Durchführung DFRC-Methode

- Einwaage von 10 mg Driselase-verdauter UBS
Driselaseverdau: 1 g UBS mit 60 mg Driselase und 100 ml bidest. H₂O bei 37°C für 48 h inkubieren, Rückstand mit H₂O, Ethanol und Aceton waschen
- Zugabe von 7,5 ml 20%-iger Acetylbromidlösung in Essigsäure
- Lösung für 3 h bei 50°C rühren
- Lösungsmittel abrotieren und Zugabe von 7,5 ml Reduktionslösung (Dioxan/Eisessig/H₂O, 5:4:1, v,v,v) und 50 mg Zinkstaub
- Reaktionsgemisch für 40 min bei Raumtemperatur rühren
- Überführung der Reaktionslösung in einen Schütteltrichter
- Zugabe von 10 ml NH₄Cl (gesättigt) und 10 ml Dichlormethan
- Zugabe der internen Standardsubstanzen (sechsfach deuterierte DFRC-Produkte)
Standardsubstanzen: Endkonzentration 30 μ M (bei Zugabe den späteren Verdünnungsfaktor berücksichtigen)
- Wässrige Phase 2x mit je 10 ml Dichlormethan extrahieren
- Wässrige Phase verwerfen und vereinigte organische Phasen 2x mit je 10 ml gesättigter NH₄Cl-Lösung waschen
- Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat, filtrieren, Lösungsmittel abrotieren
- Rückstand über Nacht acetylieren unter Zugabe von 1,5 ml Dichlormethan, 200 μ l Pyridin und 200 μ l Essigsäureanhydrid

Modifizierte Probenaufarbeitung

- Acetylierungsreagenzien abrotieren (Coevaporation mit Ethanol)
- Überführung des Rückstandes mit Dichlormethan in Eppi, Lösungsmittel unter Stickstoff abdampfen
- Zugabe von 1 ml Methanol, Suspension im Ultraschallbad behandeln
- Suspension zentrifugieren, Überstand abnehmen und im Evaporator abdampfen
- Rückstand in 1 ml Methanol/H₂O (40:60, v,v) aufnehmen und auf eine zuvor konditionierte (je 3 ml Methanol und H₂O) SPE-Kartusche (Strata-X, 200 mg/3 ml) geben

- Nach Probenaufgabe mit 3 ml H₂O und 3 ml Methanol/H₂O (20:80, v,v) waschen
- Elution der Analyten mit 9 ml Methanol
- Eluat abrotieren und Rückstand in 1 ml Methanol aufnehmen
- Lösung evtl. verdünnen und für GC-MS Analyse verwenden (Injektionsvolumen 1 µl)

GC-SIM-MS Analyse

Säule: RTx-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm

Trägergas: Helium

Injektion: Split, 30:1

Injektionstemperatur: 250°C

Ionenquelle: 220°C

Transferline: 275°C

- Temperaturprogramm: 160°C, Heizrate 10°C/min auf 230°C, Heizrate 5°C/min auf 240°C, Heizrate 20°C/min auf 260°C, Heizrate 10°C/min auf 300°C (10 min halten)
- Kalibrierung: HDiAc, GDiAc, SDiAc: 5-95 µM; HDiAc-*d*₆, GDiAc-*d*₆, SDiAc-*d*₆ (interne Standardsubstanzen): 30µM

Tabelle 25: Ausgewählte Fragmentationen (EI-MS, 70 eV) der diacetylierten (sechsfach deuterierten (-*d*₆)) Monolignole zur Identifizierung und Quantifizierung der derivatization followed by reductive cleavage-Produkte mittels GC-selected ion monitoring (SIM)-MS. DiAc, Diacetate.

	<i>para</i> -Cumaryl- alkohol	Coniferyl- alkohol	Sinapyl- alkohol
<i>m/z</i> (DiAc)	192	222	252
<i>m/z</i> (DiAc- <i>d</i> ₆)	196	226	256

8.11 Lignincharakterisierung mittels 2D-NMR Analyse

Ligninisolierung

- Mahlen von etwa 5-8 g UBS (je nach Verfügung) mit Hilfe der Kugelmühle
Kugelmühle: 1 g UBS werden für 3 h 25min bei 600 rpm gemahlen (5 min Intervall mit 5 min Pause zwischen den Mahlgängen)
- Driselaseverdau der fein gemahlene UBS
Driselaseverdau: 1 g UBS mit 60 mg Driselase und 100 ml bidest. H₂O bei 37°C für 48 h inkubieren, Rückstand 3x mit H₂O waschen und gefriertrocknen
- Driselase-verdaute UBS in Zweihalskolben mit Dioxan/0,01 M HCl (85:15, v,v) geben

Pro 1 g Probe etwa 130 ml Dioxan/0,01 M HCl

- Suspension für 10 min mit Stickstoff degasen und anschließend unter Rückfluss und ständigem Stickstoffstrom für 2 h erhitzen
- Abgekühlte Lösung durch Glasfiltertiegel (Porosität 3) filtrieren und Rückstand mit je 2x 25 ml mit Dioxan/H₂O (85:15, v/v) und 2x 25 ml Dioxan waschen
- Filtrat und Waschlösung vereinen und durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisieren
- Lösung anschließend auf etwa 10 ml einrotieren und tropfenweise in 1 l H₂O (pH 2) geben
- Präzipitation der Lignine über Nacht im Kühlschrank
- Rückstand abzentrifugieren, 3x mit H₂O waschen und gefriertrocknen

Acetylierung der Lignine

- Lignine (10-50 mg) durch Zugabe von 3 ml Pyridin und 3 ml Essigsäureanhydrid über Nacht acetylieren
- Abrotieren der Acetylierungsreagenzien (Coevaporation mit Ethanol zur Entfernung des Pyridins), Rückstand gefriertrocknen
- Rückstand in 500 µl Aceton-*d*₆ lösen (Ultraschallbad) und zur NMR-Messung verwenden

NMR-Messung

- Für die NMR-Messungen wurden die Standard HSQC- (adiabatische Pulse) und HMBC-Pulsprogramme von Bruker unter Verwendung der in Tabelle 26 angegebenen Parametern verwendet
- Als interne Referenz diente Aceton ($\delta^1\text{H}$ 2,04 ppm/ $\delta^{13}\text{C}$ 29,84 ppm)
- Das Processing wurde mittels Topspin-Software durchgeführt (Gewichtungsfunktionen siehe Tabelle 27)

Tabelle 26: Spezifische Parameter zur 2D-NMR Messung der acetylierten Lignine in Aceton-*d*₆. Die Anzahl der Scans war abhängig von der Probenmenge, lagen jedoch standardmäßig zwischen 64-128 Scans (heteronuclear single quantum coherence, HSQC) bzw. 128-256 Scans (heteronuclear multiple bond correlation, HMBC).

	HSQC	HMBC
F₂ (¹H) aquisition time (AQ)	~170 ms	~240-300 ms
F₁ (¹³C) aquisition time (AQ)	~9 ms	~9 ms
Interscan Delay (D1)	1 s	1 s
Long-range coupling delay (D6)		80 ms

Tabelle 27: Verwendete Processing-Parameter (Gewichtungsfunktionen) für 2D-NMR Spektren der acetylierten Lignine (aufgenommen in Aceton- d_6). HSQC, heteronuclear single quantum coherence; HMBC, heteronuclear multiple bond correlation; GM, Gaussian multiplication; QSINE, cosine-bell apodization; GB, Gaussian broadening factor; LB, Exponential broadening factor; SSB, sine bell shift.

	HSQC	HMBC
F_2 (^1H)	GM	GM
	GB=0.001	GB=0.1-0.5
	LB=-1	LB=-30
F_1 (^{13}C)	QSINE	QSINE
	SSB=2	SSB=0
		ggf. linear prediction (Koeffizient 32)

8.12 Bestimmung niedermolekularer, zellwandgebundener phenolischer Bestandteile

- 100 mg UBS einwiegen und 5 ml 2 M NaOH (zuvor mit Stickstoff degasen) dazugeben
- Unter Sauerstoff- und Lichtausschluss für 18 h bei Raumtemperatur verseifen
- Lösung unter Zugabe von konzentrierte HCl (etwa 1 ml) ansäuern und interne Standardsubstanzen zugeben
interne Standardsubstanzen: Kaffeesäure (zur Quantifizierung der phenolischen Monomere) und 5-5-(Mono-) Methyl-DFS (zur Quantifizierung der DFS und TriFS)
- Wässrige Phase 3x mit Diethylether extrahieren, organische Phasen vereinigen und unter Stickstoff abdampfen
- Rückstand in 250-500 μl THF/ H_2O (50:50, v,v) aufnehmen und 20 μl in HPLC injizieren

HPLC-Parameter

Säule:	Luna Phenyl-Hexyl, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm
Temperatur:	45°C
Fluss:	1 ml/min
Eluent:	A: 1 mM TFA B: Methanol/1 mM TFA (90:10, v,v) C: Acetonitril/1 mM TFA (90:10, v,v)
Detektor	DAD, 280 nm

Tabelle 28: Gradientenprogramme für die Analyse der phenolischen Monomere, sowie der Di- und Triferulasäuren (DFS und TriFS) mittels HPLC-DAD.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
Trennung der phenolischen Monomere			
0	87	0	13
10	87	0	13
20	77	3	20
25	70	5	25
30	25	25	50
35	0	50	50
40	0	50	50
45	87	0	13
50	87	0	13
Trennung der DFS und TriFS			
0	82	0	18
15	82	0	18
20	80	0	20
25	72	3	25
30	70	5	25
40	65	5	30
45	65	5	30
55	55	5	40
60	55	5	40
63	0	20	80
68	0	20	80
72	82	0	18
77	82	0	18

LC-MS/MS Analyse

Säule: Kinetex Phenyl-Hexyl, 150 mm x 4,6 mm, 2,6 µm
 Temperatur: 15°C
 Fluss: 0,5 ml/min
 Eluent: A: 0,01% HCOOH
 B: Methanol, 0,01% HCOOH
 C: Acetonitril, 0,01% HCOOH
 MS: ESI⁻
 Cone: 25 V
 Temperatur Quelle: 100°C

Tabelle 29: Gradientenprogramm für die qualitative Analyse der Di- und Triferulasäuren mittels LC-MS/MS.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	86	0	14
7	81	0	19
32	69	9	22
33	74	0	26
49	64	0	36
50	5	35	60
54	5	35	60
55	87	0	13
60	87	0	13

Tabelle 30: Massenübergänge der Di- und Triferulasäuren (DFS und TriFS) für den qualitativen Nachweis mittels LC-MS/MS. c, cyclisch; nc, nicht-cyclisch; dc, decarboxyliert; THF, Tetrahydrofuran.

	Mutter-Ion [m/z]	Tochter-Ion, Quantifier [m/z]	Tochter-Ion, Qualifier [m/z]
8-8-c-DFS	385,1	341,1	-
8-8-THF-DFS	403,1	151,1	233,1
8-8-nc-DFS	385,1	173,1	282,1
8-5-nc-DFS	385,1	341,1	297,1
8-5-c-DFS	341,1	267,1	282,1
8-5-dc-DFS	341,1	326,1	282,1
5-5-DFS	385,1	282,1	326,1
8-O-4-DFS	385,1	193,1	313,1
4-O-5-DFS	385,1	370,1	309,1
5-5/8-O-4-TriFS	577,2	355,1	489,2
8-O4/8-O-4-TriFS	577,2	193,1	-

9 Anhang

9.1 Tabellen

Tabelle 31: GC-MS Fragmentierungsmuster von diacetyliertem para-Cumaryl (HDiAc)-, Coniferyl- (GDiAc) und Sinapylalkohol (SDiAc) und den entsprechenden sechsfach deuterierten ($-d_6$) Verbindungen. Dargestellt sind lediglich die Fragmente mit einer relativen Intensität $\geq 3\%$. Die ausgewählten m/z-Werte zur Bestimmung der derivatization followed by reductive cleavage-Produkte mittels selected ion monitoring sind unterstrichen.

	m/z (relative Intensität)
HDiAc	133 (100) ^c , 149 (94), <u>192 (86)</u> ^b , 131 (65) 150 (65), 121 (53), 132 (45), 107 (41) ^d , 134 (40), 105 (38), 103 (37), 234 (17) ^a , 104 (15), 115 (15), 193 (12), 108 (7), 122 (6), 119 (6), 151 (5), 135 (5), 102 (5), 175 (5), 176(5),
HDiAc-d_6	150 (100), 134 (93) ^c , <u>196 (80)</u> ^b , 132 (58), 122 (52), 133 (45), 152 (43), 135 (37), 106 (33), 104 (25), 109 (25), 103 (17), 240 (16) ^a , 151 (13), 197 (12), 131 (11), 115 (11), 108 (10) ^d , 105 (8), 123 (7), 116 (6), 102 (5), 120 (5), 149 (3)
GDiAc	<u>222 (100)</u> ^b , 131 (77), 179 (51), 119 (37), 103 (36), 124 (26), 180 (25), 151 (24), 164 (20), 163 (19) ^c , 147 (17), 162 (17), 137 (16) ^d , 223 (13), 132 (11), 152 (10), 102 (8), 120 (8), 130 (8), 149 (7), 133 (7), 105 (7), 264 (7) ^a , 104 (6), 148 (5), 115 (5)
GDiAc-d_6	<u>226 (100)</u> ^b , 131 (76), 180 (61), 103 (33), 119 (29), 152 (27), 164 (21) ^c , 165 (17), 148 (16), 182 (15), 126 (15), 227 (15), 120 (13), 139 (12), 163 (11), 181 (9), 270 (8) ^a , 102 (8), 104 (8), 130 (8), 162 (7), 150 (7), 154 (7), 125 (7), 147 (6), 134 (5), 133 (5), 138 (4) ^d
SDiAc	<u>252 (100)</u> ^b , 161 (35), 149 (30), 209 (28), 210 (18), 133 (17), 105 (17), 253 (14), 194 (14), 154 (13), 181 (13), 193 (13) ^c , 131 (10), 121 (10), 162 (9), 103 (9), 177 (8), 182 (8), 192 (8), 167 (8), 118 (8), 106 (7), 119 (6), 115 (6), 147 (5), 135 (5), 179 (5), 132 (5), 134 (5), 107 (5), 294 (4) ^a , 167 (1) ^d
SDiAc-d_6	<u>256 (100)</u> ^b , 161 (32), 210 (31), 149 (27), 133 (15), 105 (15), 195 (15), 257 (15), 194 (13) ^c , 182 (12), 212 (12), 162 (9), 131 (9), 103 (9), 121 (8), 156 (8), 150 (7), 118 (6), 193 (6), 115 (6), 184 (6), 132 (6), 119 (5), 106 (5), 211 (5), 178 (5), 164 (5), 300 (3) ^a , 168 (3) ^d

^a Molekülion.

^b Fragment, das aus dem Molekülion durch Ketenabspaltung resultiert.

^c Fragment, das durch McLafferty-Umlagerung nach der Ketenabspaltung resultiert.

Tabelle 32: Verhältnisse [mol%] der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs), die nach Methylierungsanalyse und anschließender GC-FID Analyse semiquantitativ bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind für die unlöslichen Ballaststoffe von den frisch geernteten Spargelproben und den bei 20°C und 1°C für unterschiedliche Zeiträume gelagerten Spargelproben dargestellt und resultieren aus einer Doppelbestimmung. Die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose; t, terminal, p, Pyranose, f, Furanose.

PMAA [mol%]	frisch	1°C				20°C	
		7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage	3 Tage	7 Tage
t-Glcp	0,52 ± 0,14	0,60 ± 0,07	0,48 ± 0,05	0,44 ± 0,01	0,59 ± 0,13	0,47 ± 0,08	0,44 ± 0,04
1,4-Glcp	54,78 ± 0,45	56,16 ± 0,24	54,56 ± 1,13	54,83 ± 0,26	55,04 ± 0,35	58,74 ± 1,31	59,34 ± 0,87
1,4,6-Glcp	5,46 ± 0,04	5,47 ± 0,12	6,35 ± 0,20	5,88 ± 0,03	5,55 ± 0,05	5,45 ± 0,23	5,59 ± 0,09
t-Xylp	5,98 ± 0,01	5,81 ± 0,20	6,57 ± 0,15	6,78 ± 0,11	6,56 ± 0,09	5,91 ± 0,01	5,98 ± 0,06
1,4-Xylp	17,19 ± 0,67	15,54 ± 0,14	14,69 ± 0,42	16,05 ± 0,15	17,82 ± 0,24	17,30 ± 1,31	17,22 ± 0,84
1,2,4-Xylp^a							
t-Galp	1,77 ± 0,04	1,89 ± 0,01	1,90 ± 0,01	1,90 ± 0,03	1,59 ± 0,06	1,13 ± 0,08	0,94 ± 0,03
1,4-Galp	3,92 ± 0,19	3,72 ± 0,08	3,72 ± 0,13	3,22 ± 0,18	2,50 ± 0,11	1,41 ± 0,13	0,77 ± 0,07
1,6-Galp	0,32 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,50 ± 0,01	0,54 ± 0,005	0,50 ± 0,001	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01
t-Araf	2,54 ± 0,06	2,58 ± 0,08	2,97 ± 0,09	2,68 ± 0,03	2,56 ± 0,03	2,34 ± 0,01	2,51 ± 0,03
1,2-Araf	1,03 ± 0,03	1,22 ± 0,001	1,38 ± 0,06	1,21 ± 0,02	1,16 ± 0,05	1,43 ± 0,06	1,74 ± 0,002
1,5-Araf	3,00 ± 0,10	2,92 ± 0,08	3,13 ± 0,06	2,87 ± 0,02	2,58 ± 0,04	2,19 ± 0,20	1,74 ± 0,02
1,3,5-Araf^b							
1,2-Rhap	0,46 ± 0,08	0,60 ± 0,10	0,59 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,56 ± 0,05	0,54 ± 0,20	0,70 ± 0,18
1,2,4-Rhap	0,34 ± 0,01	0,32 ± 0,05	0,37 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02
1,4-Manp	2,69 ± 0,05	2,66 ± 0,02	2,77 ± 0,02	2,68 ± 0,12	2,74 ± 0,12	2,60 ± 0,20	2,55 ± 0,14

^a Dieses PMAA konnte mittels GC-MS identifiziert werden, eine Quantifizierung mittels GC-FID war aufgrund Coelution mit dem PMAA der 1,4-verknüpften Glucopyranose nicht möglich.

^b Dieses PMAA konnte mittels GC-MS identifiziert werden, eine Quantifizierung mittels GC-FID war aufgrund teilweiser Coelution mit einem dominanten, unbekanntem Peak nicht möglich.

Tabelle 33: Gehalte der zellwandgebundenen phenolischen Monomere der unlöslichen Ballaststoffe (UBS), die aus Spargel isoliert wurden, der bei 1°C (A) und 20°C (B) für unterschiedliche Zeiträume gelagert wurde. Die Ergebnisse sind vergleichend mit den Gehalten der phenolischen Monomere der UBS aus frisch geerntetem Spargel dargestellt. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung nach alkalischer Verseifung der UBS und anschließender HPLC-DAD Analyse.

A)

Phenolische Monomere [mg/100 g UBS]	frisch	1°C 7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
<i>trans-para</i> -Cumarsäure	9,27 ± 1,91	27,64 ± 3,16	40,15 ± 4,06	76,37 ± 20,90	89,13 ± 20,25
<i>cis-para</i> -Cumarsäure	2,19 ± 0,69	4,85 ± 0,97	5,67 ± 1,52	14,24 ± 3,45	10,54 ± 3,96
<i>trans</i> -Ferulasäure	4,24 ± 0,75	9,45 ± 1,32	17,85 ± 1,87	42,40 ± 12,76	54,94 ± 11,99
<i>cis</i> -Ferulasäure	2,26 ± 0,64	4,20 ± 0,55	5,94 ± 1,16	16,60 ± 3,73	15,50 ± 3,87
Vanillin	1,52 ± 0,76	2,63 ± 0,41	2,9 ± 0,72	7,10 ± 1,91	6,63 ± 1,15
Vanillinsäure	0,88 ± 0,21 ^a	1,14 ± 0,17 ^a	1,24 ± 0,27 ^a	3,05 ± 0,82	2,06 ± 0,50
4-Hydroxybenzoesäure	0,85 ± 0,35 ^a	0,94 ± 0,17 ^a	1,07 ± 0,25 ^a	2,07 ± 0,62	1,55 ± 0,33
4-Hydroxybenzaldehyd	0,79 ± 0,29 ^a	1,16 ± 0,11 ^a	1,41 ± 0,27	3,47 ± 1,07	2,06 ± 0,43

^a Semiquantitative Bestimmung, da die Werte unterhalb des für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationsbereichs lagen.

B)

Phenolische Monomere [mg/100 g UBS]	frisch	20°C 3 Tage	7 Tage
<i>trans-para</i> -Cumarsäure	9,27 ± 1,91	98,61 ± 18,25	247,19 ± 27,40
<i>cis-para</i> -Cumarsäure	2,19 ± 0,69	9,03 ± 1,96	20,35 ± 3,43
<i>trans</i> -Ferulasäure	4,24 ± 0,75	44,20 ± 7,17	74,37 ± 8,54
<i>cis</i> -Ferulasäure	2,26 ± 0,64	12,37 ± 1,81	18,48 ± 2,33
Vanillin	1,52 ± 0,76	4,89 ± 1,19	9,50 ± 1,16
Vanillinsäure	0,88 ± 0,21 ^a	1,58 ± 0,46 ^a	3,11 ± 0,78
4-Hydroxybenzoesäure	0,85 ± 0,35 ^a	1,18 ± 0,24 ^a	1,82 ± 0,40
4-Hydroxybenzaldehyd	0,79 ± 0,29 ^a	1,50 ± 0,34 ^a	3,11 ± 0,51

^a Semiquantitative Bestimmung, da die Werte unterhalb des für die Kalibrierung verwendeten Konzentrationsbereichs lagen.

Tabelle 34: Gehalte der zellwandgebundenen Diferulasäuren (DFS) der unlöslichen Ballaststoffe (UBS), die aus Spargel isoliert wurden, der bei 1°C (A) und 20°C (B) für unterschiedliche Zeiträume gelagert wurde. Die Ergebnisse sind vergleichend mit den DFS-Gehalten der UBS aus frisch geerntetem Spargel dargestellt. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung nach alkalischer Verseifung der UBS und anschließender HPLC-DAD Analyse. c, cyclisch; nc, nicht-cyclisch; ng, nachgewiesen; THF, Tetrahydrofuran.

A)

DFS [mg/100 g UBS]	frisch	1°C 7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
8-5-c-DFS	2,67 ± 0,17 ^b	7,62 ± 0,24	15,77 ± 0,75	33,81 ± 3,10	35,59 ± 1,3
8-5-nc-DFS	0,58 ± 0,06 ^b	1,45 ± 0,18 ^b	3,17 ± 0,25	6,65 ± 0,99	7,15 ± 0,84
8-8-c-DFS	0,67 ± 0,12 ^b	1,72 ± 0,23	3,51 ± 0,31	9,85 ± 1,47	8,66 ± 0,05
8-8-nc-DFS	1,14 ± 0,23 ^b	2,74 ± 0,26	6,44 ± 0,70	14,82 ± 3,62	14,65 ± 0,07
8-8-THF-DFS ^a	0,32 ± 0,07 ^b	0,88 ± 0,03	2,13 ± 0,22	5,62 ± 0,73	5,58 ± 0,33
8-O-4-DFS	0,62 ± 0,02 ^b	1,62 ± 0,15 ^b	3,78 ± 0,20	7,53 ± 0,58	8,80 ± 0,60
5-5-DFS	ng	ng	0,76 ± 0,09 ^b	1,41 ± 0,06	1,96 ± 0,19

^a Semiquantitative Bestimmung da keine Standardsubstanz zur eindeutigen Bestätigung der Peakidentität vorhanden war.

^b Semiquantitative Bestimmung, da die Werte unterhalb des getesteten Konzentrationsbereichs lagen.

B)

DFS [mg/100 g UBS]	frisch	20°C 3 Tage	7 Tage
8-5-c-DFS	2,67 ± 0,17 ^b	33,20 ± 2,33	65,77 ± 1,04
8-5-nc-DFS	0,58 ± 0,06 ^b	7,18 ± 0,73	14,30 ± 1,51
8-8-c-DFS	0,67 ± 0,12 ^b	8,96 ± 0,63	18,91 ± 1,41
8-8-nc-DFS	1,14 ± 0,23 ^b	13,81 ± 0,62	25,49 ± 2,22
8-8-THF-DFS ^a	0,32 ± 0,07 ^b	5,03 ± 0,82	9,10 ± 0,73
8-O-4-DFS	0,62 ± 0,02 ^b	8,65 ± 0,68	16,16 ± 0,72
5-5-DFS	ng	1,92 ± 0,25 ^b	3,50 ± 0,56

^a Semiquantitative Bestimmung da keine Standardsubstanz zur eindeutigen Bestätigung der Peakidentität vorhanden war.

^b Semiquantitative Bestimmung, da die Werte unterhalb des getesteten Konzentrationsbereichs lagen.

Tabelle 35: Gehalte der zellwandgebundenen Triferulasäuren (TriFS) der unlöslichen Ballaststoffe (UBS), die aus Spargel isoliert wurden, der bei 1°C (A) und 20°C (B) für unterschiedliche Zeiträume gelagert wurde. Die Ergebnisse sind vergleichend mit den TriFS-Gehalten der UBS aus frisch geerntetem Spargel dargestellt. Die Ergebnisse resultieren aus einer Dreifachbestimmung nach alkalischer Verseifung der UBS und anschließender HPLC-DAD Analyse. nc, nicht-cyclisch.

A)

TriFS [mg/100 g UBS]	frisch	1°C 7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
8-5-nc/8-O-4-TriFS ^a	0,31 ± 0,05	0,82 ± 0,14	2,28 ± 0,23	3,64 ± 0,23	4,43 ± 0,52
8-O-4/8-O-4-TriFS			1,77 ± 0,24	2,46 ± 0,45	3,44 ± 0,28
5-5/8-O-4-TriFS ^a			1,01 ± 0,02	1,60 ± 0,05	1,87 ± 0,15

^a Zur semiquantitativen Bestimmung wurden Responsefaktoren mittels isolierten TriFS-Standardsubstanzen gegen 5-5-(Mono-) Methyl-DFS als interne Standardsubstanz bestimmt.

B)

TriFS [mg/100 g UBS]	frisch	20°C 3 Tage	7 Tage
8-5-nc/8-O-4-TriFS ^a	0,31 ± 0,05	4,71 ± 0,89	10,93 ± 1,47
8-O-4/8-O-4-TriFS		3,92 ± 0,31	8,64 ± 0,52
5-5/8-O-4-TriFS ^a		2,08 ± 0,16	4,90 ± 0,28

^a Zur semiquantitativen Bestimmung wurden Responsefaktoren mittels isolierten TriFS-Standardsubstanzen gegen 5-5-(Mono-) Methyl-DFS als interne Standardsubstanz bestimmt.

Tabelle 36: Verhältnisse [mol%] der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs), die nach Methylierungsanalyse und anschließender GC-FID Analyse semiquantitativ bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind für die unlöslichen Ballaststoffe von frisch geerntetem und bei 20°C und 1°C für unterschiedliche Zeiträume gelagertem Brokkoli dargestellt und resultieren aus einer Doppelbestimmung. Die Abweichungen sind als Range/2 angegeben. Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose; t, terminal, p, Pyranose, f, Furanose.

PMAA [mol%]	frisch	1°C			20°C	
		7 Tage	14 Tage	28 Tage	7 Tage	9 Tage
t-Glcp	1,03 ± 0,15	0,66 ± 0,22	0,62 ± 0,09	0,74 ± 0,14	0,89 ± 0,002	0,84 ± 0,12
1,4-Glcp	38,60 ± 0,45	42,01 ± 0,16	41,13 ± 0,93	38,24 ± 4,88	47,38 ± 0,38	49,11 ± 2,25
1,4,6-Glcp	4,14 ± 0,27	4,73 ± 0,07	4,98 ± 0,25	4,19 ± 0,41	5,09 ± 0,35	4,87 ± 0,03
t-Xylp	5,14 ± 0,54	5,32 ± 0,26	5,27 ± 0,08	5,76 ± 0,40	5,80 ± 0,13	5,34 ± 0,24
1,4-Xylp	10,88 ± 1,01	10,84 ± 0,11	13,86 ± 0,68	16,31 ± 3,05	14,51 ± 0,87	14,82 ± 0,74
t-Galp	2,67 ± 0,51	2,28 ± 0,25	1,91 ± 0,23	2,02 ± 0,23	1,83 ± 0,17	1,90 ± 0,07
1,4-Galp	3,13 ± 0,15	2,63 ± 0,05	1,68 ± 0,28	1,52 ± 0,56	1,23 ± 0,03	1,24 ± 0,11
t-Araf	9,82 ± 2,11	9,55 ± 0,06	8,29 ± 0,16	8,11 ± 0,05	5,84 ± 0,29	5,11 ± 0,01
t-Arap	0,66 ± 0,28	0,65 ± 0,08	0,56 ± 0,08	0,72 ± 0,05	0,70 ± 0,07	0,48 ± 0,03
1,5-Araf	9,30 ± 2,04	8,38 ± 0,23	9,39 ± 0,83	8,67 ± 0,55	6,26 ± 0,39	6,04 ± 1,06
1,3,5-Araf^a	4,15 ± 1,31	3,26 ± 0,23	3,40 ± 0,41	4,34 ± 1,06	2,90 ± 0,59	2,07 ± 0,003
1,2,5-Araf	1,80 ± 0,11	2,01 ± 0,04	1,72 ± 0,21	1,82 ± 0,06	0,89 ± 0,05	1,63 ± 0,73
1,2,3,5-Araf	2,96 ± 1,12	2,79 ± 0,11	3,33 ± 0,46	3,72 ± 0,40	2,42 ± 0,80	3,00 ± 0,54
1,2-Rhap	1,42 ± 0,22	1,23 ± 0,21	1,11 ± 0,12	1,22 ± 0,10	0,88 ± 0,39	0,84 ± 0,39
1,2,4-Rhap	0,72 ± 0,15	0,61 ± 0,09	0,46 ± 0,03	0,39 ± 0,10	0,47 ± 0,05	0,54 ± 0,02
1,4-Manp	2,55 ± 0,51	2,16 ± 0,02	1,62 ± 0,26	1,60 ± 0,24	2,13 ± 0,04	1,41 ± 0,84
1,4,6-Manp	1,04 ± 0,28	0,89 ± 0,01	0,68 ± 0,07	0,62 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,76 ± 0,03

^a Überbestimmung aufgrund unvollständiger Peaktrennung im GC-FID Chromatogramm möglich.

Tabelle 37: Verhältnisse [mol%] der partiell methylierten Alditolacetate (PMAAs), die nach Methylierungsanalyse und anschließender GC-FID Analyse semiquantitativ bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind für die unlöslichen Ballaststoffe aus Kohlrabi (Ernte 1-5) dargestellt und resultieren aus einer Doppelbestimmung. Die Abweichungen sind als Range/2 in Klammern angegeben. Glc, Glucose; Xyl, Xylose; Gal, Galactose; Ara, Arabinose; Rha, Rhamnose; Man, Mannose; t, terminal, p, Pyranose, f, Furanose.

PMAA [mol%]	Ernte 1	Ernte 2	Ernte 3	Ernte 4	Ernte 5
t-Glcp	0,92 ± 0,07	0,89 ± 0,09	0,60 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,74 ± 0,14
1,4-Glcp	52,24 ± 0,41	53,61 ± 0,71	54,63 ± 0,30	50,60 ± 3,70	54,35 ± 1,53
1,4,6-Glcp	4,01 ± 0,06	3,98 ± 0,10	4,39 ± 0,05	3,63 ± 0,37	3,99 ± 0,11
t-Xylp	4,56 ± 0,02	4,43 ± 0,01	5,01 ± 5,01	4,91 ± 0,72	4,35 ± 0,10
1,4-Xylp	7,81 ± 0,38	8,16 ± 0,18	7,60 ± 7,60	9,53 ± 0,58	8,07 ± 0,27
1,2,4-Xylp^a					
t-Galp	2,22 ± 0,11	2,23 ± 0,01	2,22 ± 0,10	2,29 ± 0,12	1,90 ± 0,03
1,4-Galp	1,90 ± 0,15	1,94 ± 0,01	1,81 ± 0,10	1,81 ± 0,14	1,72 ± 0,07
1,6-Galp	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,005	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,002
t-Araf	8,31 ± 0,10	7,86 ± 0,10	7,21 ± 0,01	8,36 ± 0,85	7,87 ± 0,14
t-Arap	0,56 ± 0,07	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,55 ± 0,05	0,49 ± 0,06
1,2-Araf	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,22 ± 0,01
1,5-Araf	7,43 ± 0,11	6,60 ± 0,16	6,02 ± 0,01	6,55 ± 0,58	7,29 ± 1,74
1,3,5-Araf^b	2,11 ± 0,11	1,91 ± 0,17	2,26 ± 0,34	2,45 ± 0,51	2,14 ± 0,02
1,2,5-Araf	1,19 ± 0,02	1,17 ± 0,01	0,82 ± 0,03	0,81 ± 0,10	0,73 ± 0,07
1,2,3,5-Araf	2,18 ± 0,03	2,15 ± 0,05	1,88 ± 0,12	2,61 ± 0,39	2,14 ± 0,08
1,2-Rhap	1,05 ± 0,11	1,05 ± 0,04	1,28 ± 0,07	1,11 ± 0,06	0,79 ± 0,08
1,2,4-Rhap	0,60 ± 0,15	0,65 ± 0,01	0,66 ± 0,11	0,61 ± 0,12	0,45 ± 0,06
t-Manp	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,002	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01
1,4-Manp	1,88 ± 0,08	1,87 ± 0,004	2,02 ± 0,09	2,07 ± 0,10	1,87 ± 0,07
1,4,6-Manp	0,67 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,70 ± 0,04	0,67 ± 0,03

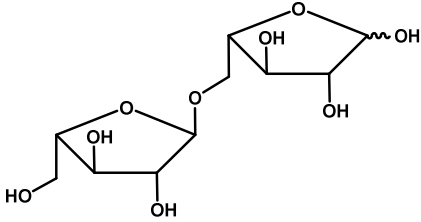
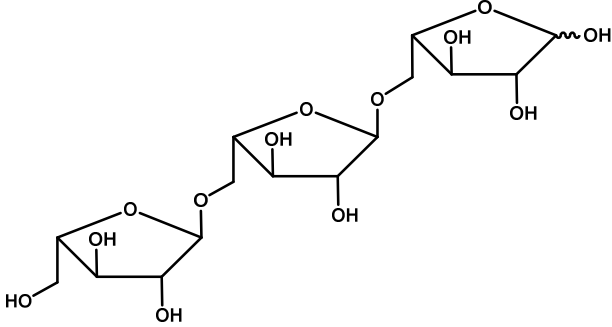
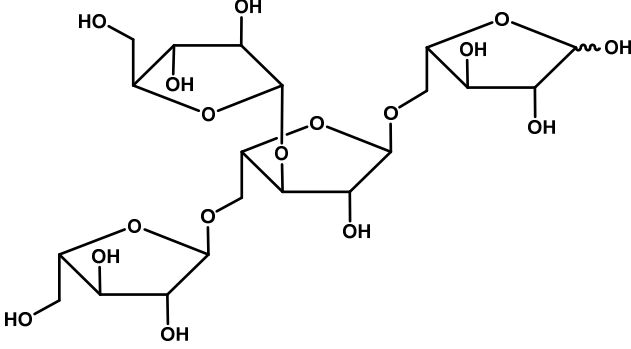
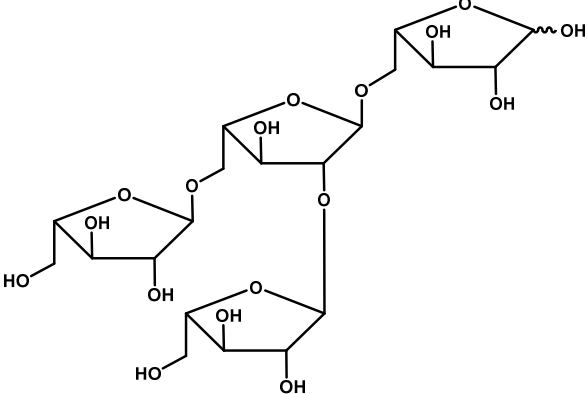
^a Dieses PMAA konnte mittels GC-MS identifiziert werden, eine Quantifizierung mittels GC-FID war aufgrund Coelution mit dem PMAA der 1,4-verknüpften Glucopyranose nicht möglich.

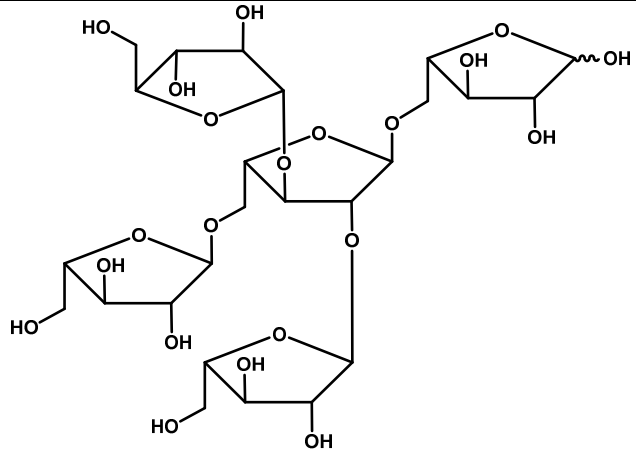
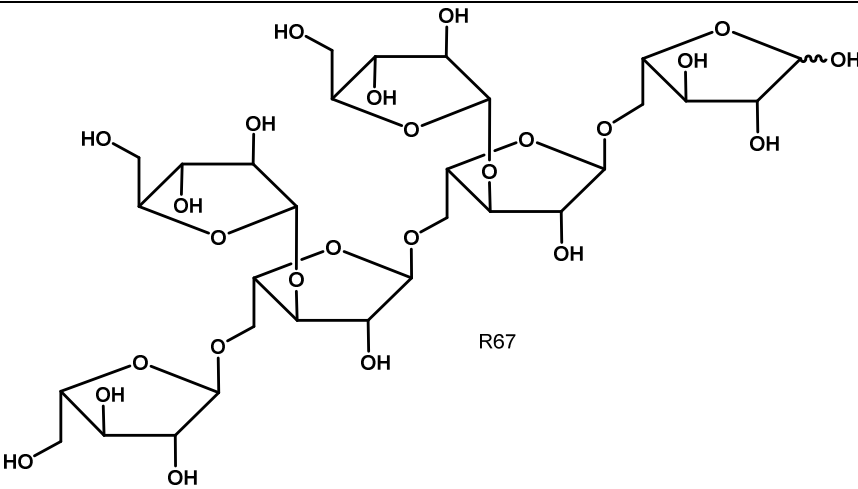
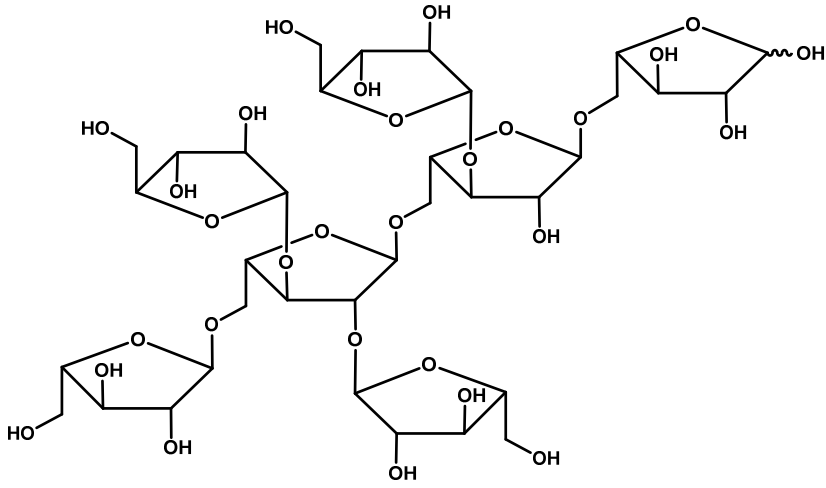
^b Überbestimmung aufgrund unvollständiger Peaktrennung im GC-FID Chromatogramm möglich.

Tabelle 38: Tabellarische Zusammenfassung der chemischen Verschiebungen für die Zuordnung der Ligninmonomere und der Ligninbindungstypen im HSQC-Spektrum. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Messung der isolierten, acetylierten Lignine in Aceton- d_6 . Zu beachten ist, dass die chemischen Verschiebungen aufgrund der Signalbreite lediglich Näherungen darstellen. Die chemische Verschiebung der Signale der Guaiacyl (G)- und Syringyleinheiten (S) können je nachdem welchen Bindungstyp diese Einheiten ausbilden unterschiedlich sein. Daher können sie in den jeweiligen Spektren unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Die γ -C-H-Korrelationen einiger Bindungstypen waren aufgrund der breiten Signale anderer Bindungstypen nicht ausreichend aufgelöst (na). Die chemischen Verschiebungen der Ferulasäure (FS), der para-Cumarsäure (pCS) und der 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBS) wurden anhand der jeweiligen acetylierten Ethylester ermittelt. A, β -Aryl-Ether (β -O-4); B, Phenylcumarane (β -5); C, Resinol (β - β); D, Dibenzodioxocin (5-5/ β -O-4); SD, Spirodienon (β -1/ α -O- α); F, klassische β -1-Bindung; X1, Zimtalkoholendgruppen; H, Hydroxyphenyl.

	α (7)	β (8)	γ (9)	2	3	5	6
A	6,03/75,08	4,77/80,59	4,20/63,15				
B	5,54/88,35	3,77/51,06	4,33/65,70				
C	4,73/86,11	3,11/55,10	4,24/72,28 3,91/72,28				
D	4,89/85,08	4,28/83,23	na				
SD	5,19/82,96	3,11/57,22	na				
F	6,06/76,53	3,53/50,75	na				
X1	6,62/133,96	6,24/123,03	4,64/65,13				
H				7,32/129,80	7,04/122,09	7,04/122,09	7,32/129,80
G				7,14/112,48 7,11/111,04		6,99/118,46 6,99/120,26 7,02/123,16	6,99/118,46 6,99/120,26 7,02/123,16
S				6,76/104,8 6,70/103,4			6,76/104,8 6,70/103,4
FS	7,65/144,33	6,56/119,23		7,47/112,18		7,11/123,95	7,26/121,93
pCS	7,67/143,58	6,52/118,63		7,72/129,72	7,19/122,60	7,19/122,60	7,72/129,72
4-HBS				8,06/131,43	7,26/122,87	7,26/122,87	8,06/131,43

Tabelle 39: Strukturen der Arabinooligosaccharide, die nach Inkubation der unlöslichen Ballaststoffe mittels endo-Arabinanase entstehen.

R28	
R38	
R49a	
R49b	

R51	 <p>Chemical structure of a branched oligosaccharide. It consists of four glucose units and one fructose unit. The glucose units are linked by alpha-1,4 glycosidic bonds, and the fructose unit is linked to the central glucose unit via a beta-2 glycosidic bond. The structure is shown in a chair conformation.</p>
R67	 <p>Chemical structure of a branched oligosaccharide, identical to the structure in R51. It consists of four glucose units and one fructose unit. The glucose units are linked by alpha-1,4 glycosidic bonds, and the fructose unit is linked to the central glucose unit via a beta-2 glycosidic bond. The structure is shown in a chair conformation. The label R67 is present in the bottom right of the structure.</p>
R68a	 <p>Chemical structure of a branched oligosaccharide, identical to the structures in R51 and R67. It consists of four glucose units and one fructose unit. The glucose units are linked by alpha-1,4 glycosidic bonds, and the fructose unit is linked to the central glucose unit via a beta-2 glycosidic bond. The structure is shown in a chair conformation. The label R68a is present in the top left of the structure.</p>

R71

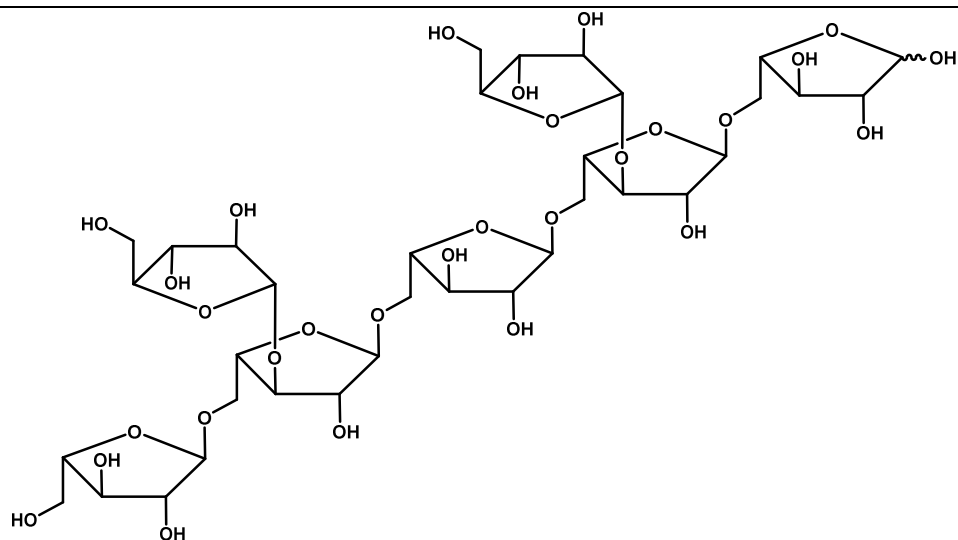
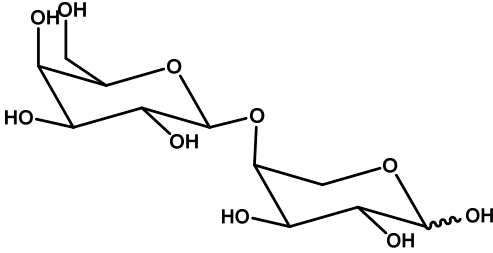
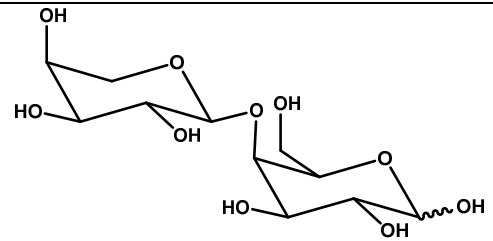
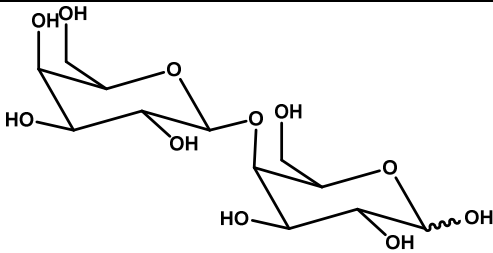
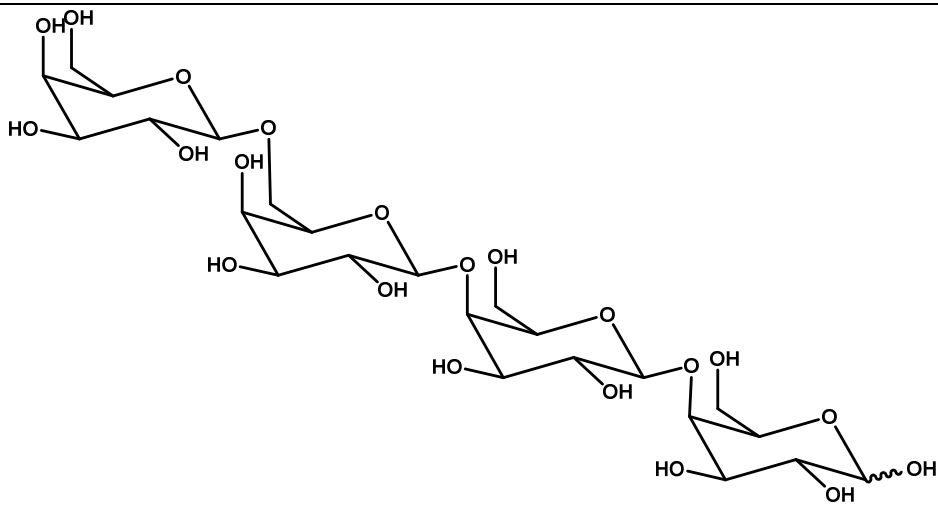
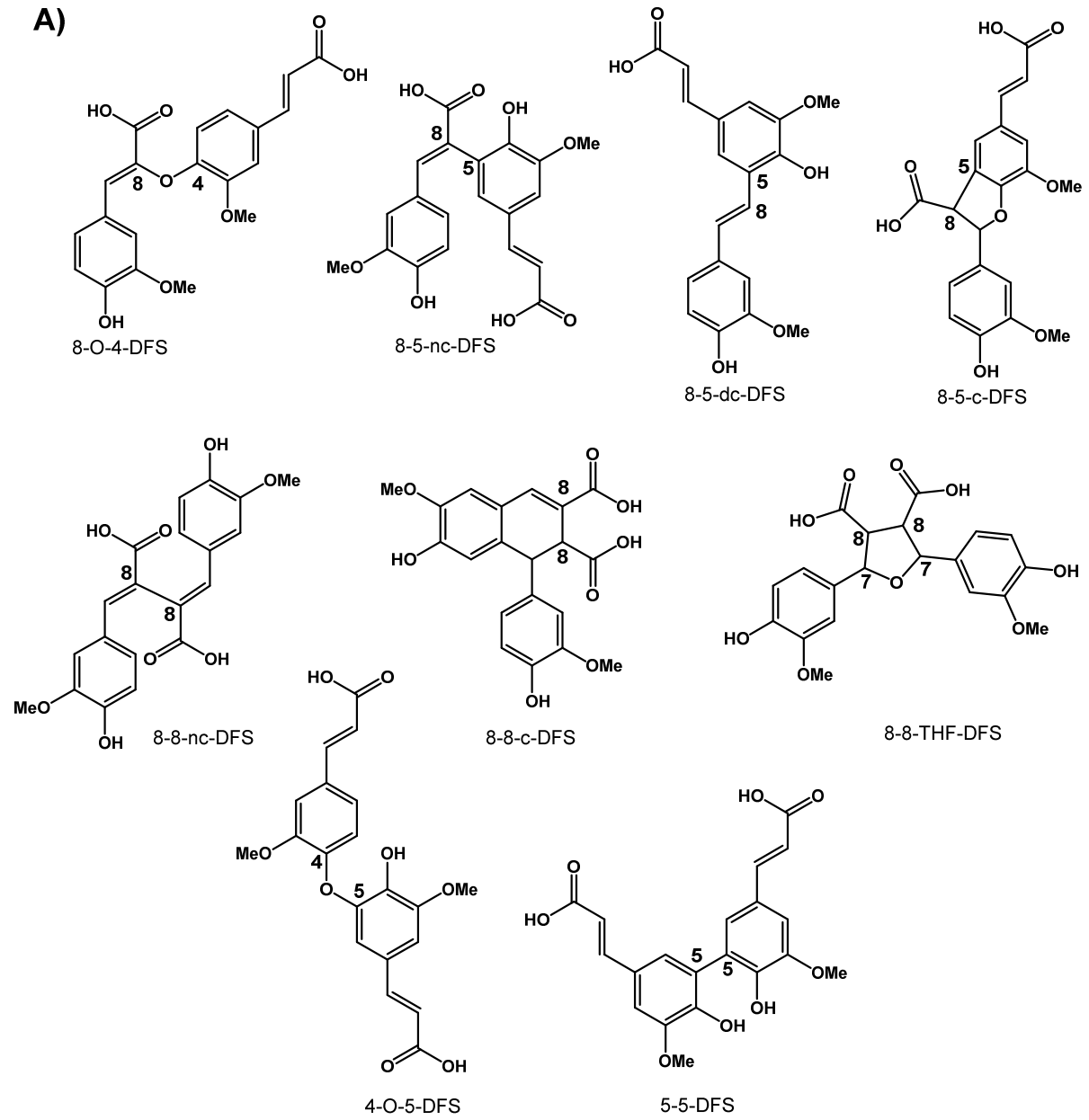


Tabelle 40: Strukturen der Galactooligosaccharide, die nach Inkubation der unlöslichen Ballaststoffe mittels endo-Galactanase entstehen.

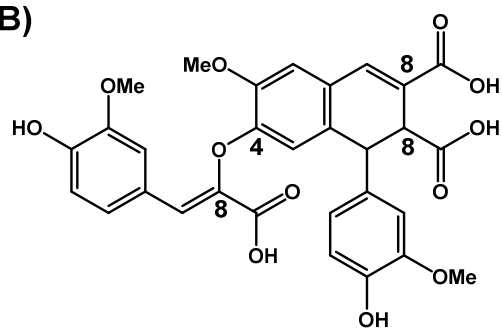
R12	
R15	
R19	
R37	

9.2 Abbildungen

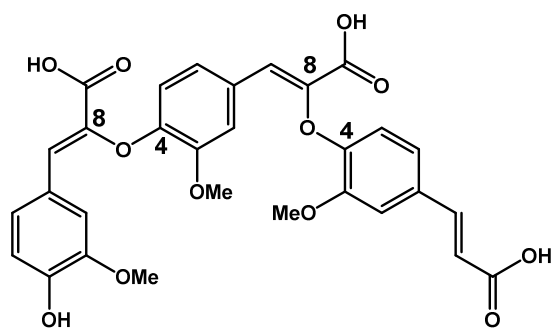
A)



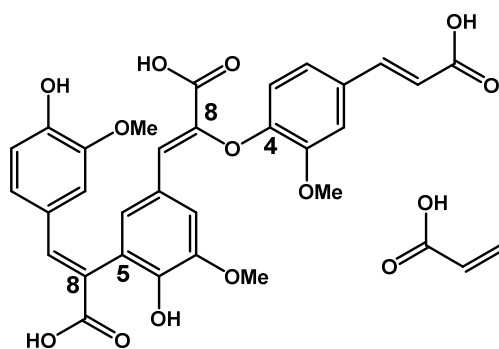
B)



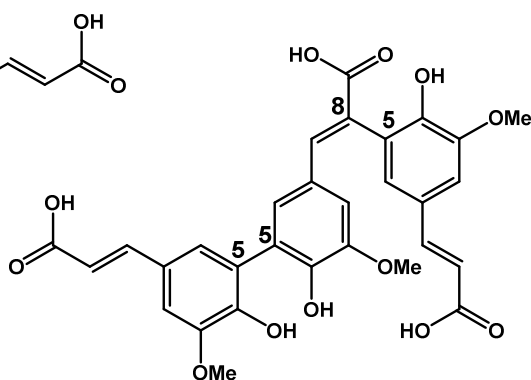
8-8-c/8-O-4-TriFS



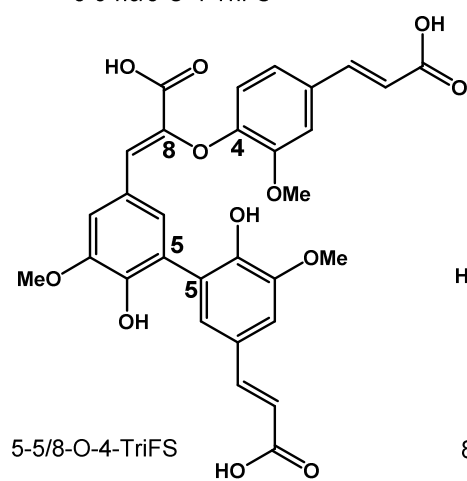
8-O-4/8-O-4-TriFS



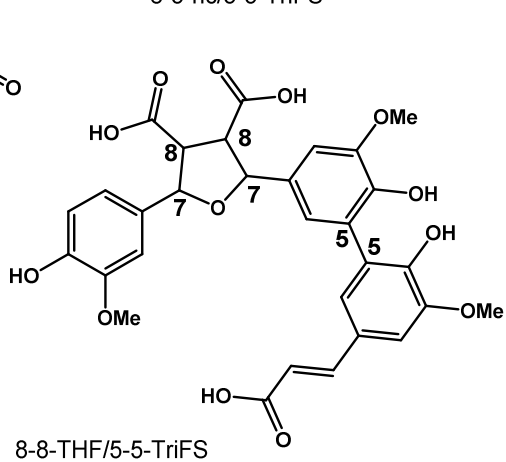
8-5-nc/8-O-4-TriFS



8-5-nc/5-5-TriFS

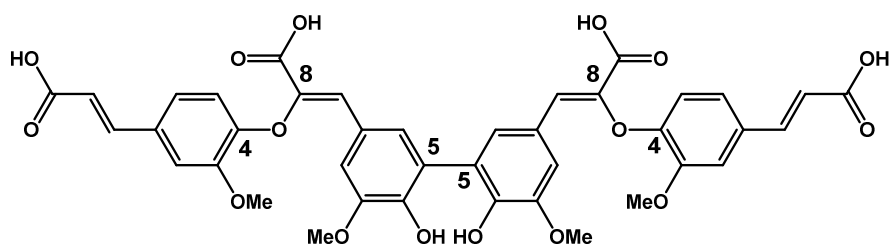


5-5/8-O-4-TriFS

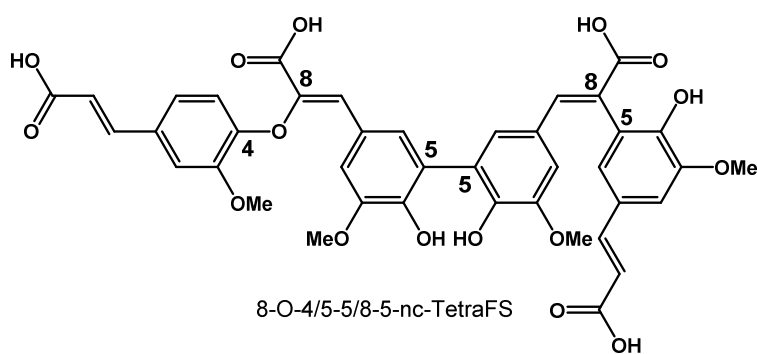


8-8-THF/5-5-TriFS

C)



8-O-4/5-5/8-O-4-TetraFS



8-O-4/5-5/8-5-nc-TetraFS

Abbildung 48: Strukturformeln der Diferulasäuren (DFS) (A), Triferulasäuren (TriFS) (B) und Tetraferulasäuren (TetraFS) (C) (Bunzel 2010). nc, nicht-cyclisch; c, cyclisch; dc, decarboxyliert; THF, Tetrahydrofuran.

Publikationsliste

Publikationen

Schäfer, J.; Urvat, F; Rund, K.; Bunzel, M. (2015): A stable-isotope dilution GC-MS approach for the analysis of DFRC (derivatization followed by reductive cleavage) monomers from low-lignin plant materials. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2668-2673.

Schäfer, J.; Wagner, S.; Trierweiler, B.; Bunzel, M. (2016): Characterization of cell wall components and their modifications during postharvest storage of *Asparagus officinalis* L.: Storage-related changes in dietary fiber composition. *J. Agric. Food Chem.* 64, 478-486.

Pedersen, M.B.; Bunzel, M.; Schäfer, J.; Knudsen, K.E.B.; Sorensen, J.F.; Yu, S.K.; Laerke, H.N. (2015): Ferulic acid dehydrodimer and dehydrotrimer profiles of distiller's dried grains with solubles from different cereal species. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2006-2012.

Beiträge auf Fachtagungen

43. Deutscher Lebensmittelchemikertag

Gießen, 22.09.-24.09.2014

Poster: Veränderung der Zellwandzusammensetzung von Gemüsespargel (*Asparagus officinalis* L.) während der Lagerung.

J. Schäfer, S. Wagner, B. Trierweiler, M. Bunzel

Regionalverbandstagung (LChG Südwest)

Geisenheim, 12.03.2015

Vortrag: Quantifizierung von DFRC Monomeren aus lignifizierten Ballaststoffen mittels GC-SIM-MS.

J. Schäfer, F. Urvat, K. Rund, M. Bunzel

6th International Dietary Fiber Conference

Paris, 01.06.-03.06.2015

Vortrag: Characterization of postharvest modifications of dietary fiber structures of plant based foods.

J. Schäfer, S. Wagner, L. Stanojlovic, B. Trierweiler, M. Bunzel

Poster: Determination of DFRC monomers from dietary fiber lignin by stable-isotope dilution GC-MS analysis.

J. Schäfer, F. Urvat, K. Rund, M. Bunzel

44. Deutscher Lebensmittelchemikertag

Karlsruhe, 14.09.-16.09.2015

Vortrag: Chemische Charakterisierung von Texturveränderungen bei gelagertem Gemüse.

J. Schäfer, B. Trierweiler, M. Bunzel

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Mirko Bunzel, der mir diese Arbeit durch sein entgegengebrachtes Vertrauen ermöglicht hat. Er war jederzeit offen für Diskussionen und hat meine Arbeit stets gefördert und unterstützt. Dieses außerordentliche Engagement, sei es auf fachlicher oder auch persönlicher Ebene, habe ich in den letzten Jahren sehr zu schätzen gelernt. Mein Dank geht zudem an Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig für die Übernahme des Korreferats.

Diese Arbeit wurde von der Carl-Zeiss-Stiftung finanziell gefördert, wofür ich mich an dieser Stelle ebenfalls bedanken möchte.

Die Zeit meiner Promotion war maßgeblich von allen Mitarbeitern und Doktoranden um mich herum geprägt, bei denen ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken möchte. Durch die vielen schönen Momente in- und außerhalb des Labors entstand eine gute Atmosphäre, die mit dazu beitrug, dass mir die Wissenschaft Spaß machte. Auf alle war stets Verlass, insbesondere auf Andi, der immer ein offenes Ohr für mich hatte. Besonderen Dank möchte ich an Rachel und Daniel richten, die mich nicht nur von Beginn meiner Promotion an begleiteten und mir mit Rat und Tat jederzeit zur Seite standen, sondern auch freiwillig (!) bereit waren, die doch nicht immer schmackhaften Proben sensorisch zu verkosten.

Meine Promotionszeit war zeitweise auch von Diplomanden geprägt, die meine Arbeiten mit ihren wissenschaftlichen Abschlussarbeiten unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich zudem bei den Mitarbeitern des Max Rubner-Instituts in Karlsruhe, die den Gemüseanbau bzw. die Gemüselagerung sowie die Sensorik der Proben koordinierten und durchführten. Gleichzeitig bedanke ich mich auch bei der Leitung des Queckbrunnerhofs für die Bereitstellung der Brokkoliprobe.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meinen Eltern und Schwestern, sowie meinen Freunden bedanken, die mich auf meinem Weg unterstützt, begleitet und mich einfach mich sein lassen haben. Insbesondere Simon bin ich dankbar dafür, dass er mir in den sehr stressigen Phasen stets zum Durchatmen verholfen hat und mir mit seiner gelassenen Art immer wieder die Augen für das Wesentliche geöffnet hat.

„Wo kämen wir hin, wenn jeder sagte, wo kämen wir hin und keiner ginge, um zu sehen, wohin wir kämen, wenn wir denn gingen.“

(Kurt Marti)